

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS “JOSÉ MATAIX”

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**EFFECTO DEL CONSUMO DE DIETA SIN GLUTEN SOBRE EL
ESTADO OXIDATIVO/ANTIOXIDANTE EN NIÑOS CELIACOS**

**TESIS DOCTORAL
CARLOTA ELISA MURIEL NEYRA
4 de Julio de 2019**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Carlota Elisa Muriel Neyra
ISBN: 978-84-1306-276-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/56593>

D^a M^a Teresa Nestares Pleguezuelo. Profesora Titular de Fisiología.

Universidad de Granada.

D. Javier Díaz Castro. Profesor Titular de Fisiología.

Universidad de Granada.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Efecto del consumo de dieta sin gluten sobre el estado oxidativo/antioxidante en niños celíacos”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por La Licenciada D^a. Carlota Elisa Muriel Neyra y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctora por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a 5 de Junio de 2019.

Prof. Dra.

D^a M^a Teresa Nestares Pleguezuelo

Prof. Dr.

D. Javier Díaz Castro

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo de investigación.

En primer lugar a mi directora, la Profesora María Teresa Nestares Pleguezuelo, quien ha confiado en mí desde el primer momento y me dio esta oportunidad. Gracias por la dedicación, la ayuda y el buen trato que me ha dado durante estos años.

A mi director, el Profesor Javier Díaz-Castro, por su cercanía y su disponibilidad en todo momento, por su ayuda desde el comienzo de este proyecto en el aprendizaje de todas las técnicas que he llevado a cabo y en el desarrollo día a día de este trabajo.

Al Profesor Jesús Rodríguez Huertas, director del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, por poner a mi disposición las instalaciones donde he realizado la parte experimental de esta Tesis.

Al Director del Departamento de Fisiología, el Profesor Miguel Moreno Prieto, por poner a mi disposición los recursos humanos para el desarrollo de esta Tesis.

Al Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital Universitario Materno Infantil Virgen de las Nieves de Granada (HUVN) y a los Doctores Rafael Martín Masot y José Maldonado Lozano por haber colaborado en el reclutamiento de los niños y en la obtención de las muestras para la realización de este estudio.

A los niños y a sus padres por su disposición y participación en este estudio.

A Jorge, un buen compañero de trabajo al que nunca he dudado en recurrir cuando lo he necesitado y siempre ha estado dispuesto a ayudarme y enseñarme.

A Silvia, con quien comencé y me enseñó la forma de trabajo en el laboratorio, me dio buenos consejos, y ha seguido atenta a mí hasta el final.

A todos mis amigos, que aunque no estén relacionados directamente con este trabajo, forman día a día parte de mi vida personal, me han apoyado y han compartido conmigo la ilusión por esto.

A mis padres, quienes me han hecho ser quien soy, han sido un ejemplo para mí de responsabilidad, superación y ambición, me han animado en los momentos más difíciles y me han apoyado en todo momento.

A mis hermanas, que siempre están ahí de la forma que haga falta, saben animar y sacar una sonrisa, y a quienes siento la responsabilidad de dar un buen ejemplo.

A Javi, mi novio, que quizás sea la persona que ha vivido conmigo esta tesis con más intensidad, más ha sufrido tanto los buenos como los malos momentos, en quien he sabido ver siempre un apoyo y quien me ha intentado transmitir la tranquilidad que a veces me costaba encontrar.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia.

Y a todas las personas que ocupan un lugar especial en mi vida, gracias.

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado”.

Albert Szent-Györgyi

Indice

1. OBJETO.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. LA ENFERMEDAD CELIACA.....	3
2.1.1. Definición.....	3
2.1.2. Etiopatogenia.....	5
2.1.2.1. Inmunología del tracto digestivo.....	5
2.1.2.2. Patogénesis de la enfermedad celiaca.....	7
2.1.2.3. Factores ambientales: el gluten.....	10
2.1.2.4. Inmunopatogenia de la enfermedad celiaca.....	15
2.1.2.5. Expresión y actividad de TG2 en el intestino delgado.....	19
2.1.2.6. Inmunidad innata frente al gluten.....	21
2.1.2.7. Respuesta inmunitaria adaptativa frente al gluten.....	22
2.1.3. Prevalencia y Epidemiología.....	24
2.1.3.1. Grupos de riesgo.....	28
2.1.4. Clínica de la enfermedad celiaca.....	30
2.1.4.1. Formas clínicas de la enfermedad celiaca.....	30
2.1.4.2. Características clínicas de la enfermedad celiaca.....	31
2.1.5. Diagnóstico de la enfermedad celiaca.....	37
2.1.5.1. Estudio serológico.....	41
2.1.5.2. Estudio genético.....	46
2.1.5.3. Biopsia de intestino delgado.....	47
2.1.5.4. Otras pruebas.....	52

2.1.6. Tratamiento de la enfermedad celiaca:	
La dieta sin gluten.....	53
2.1.6.1. Cumplimiento y dificultades de la dieta sin gluten.....	58
2.1.6.2. Dieta sin gluten y suplementación vitamínica y de otros micronutrientes.....	60
2.1.7. Seguimiento.....	62
2.1.7.1. Seguimiento serológico.....	65
2.1.7.2. Seguimiento mediante análisis bioquímico de sangre.....	65
2.1.7.3. Seguimiento mediante estudio histológico.....	66
2.1.8. Nuevas estrategias terapéuticas.....	66
2.1.9. Manifestaciones sistémicas de la enfermedad celiaca.....	69
2.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	85
2.2.1. Introducción.....	85
2.2.2. Tipos de RL y EROs.....	86
2.2.2.1. Anión superóxido.....	87
2.2.2.2. Peróxido de hidrógeno.....	88
2.2.2.3. Radical hidroxilo.....	89
2.2.3. Daños celulares provocados por los RL.....	92
2.2.3.1. Efectos sobre los lípidos: peroxidación lipídica.....	92
2.2.3.2. Efectos sobre las proteínas.....	98
2.2.3.3. Efectos sobre el material genético.....	99
2.2.4. Fuentes de RL y su relación con las patologías.....	109
2.2.4.1. Papel de la alimentación.....	111

2.2.5. Sistema de defensa antioxidante.....	118
2.2.6. Marcadores del daño oxidativo a biomoléculas.....	123
2.2.7. Estrés oxidativo y enfermedad celiaca.....	125
2.2.7.1. Alteración del equilibrio redox en la enfermedad celiaca.....	127
2.3. LA INFLAMACIÓN.....	133
2.3.1. El proceso inflamatorio.....	133
2.3.1.1. Marcadores biológicos de la inflamación.....	134
2.3.1.2. Las citoquinas.....	135
2.3.2. Enfermedad celiaca e inflamación.....	141
2.3.3. Alteración de la red de citoquinas y mediadores de la inflamación.....	145
2.3.4. Relación entre el estrés oxidativo y la inflamación.....	146
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	149
3.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	151
3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	151
3.3.1. SOD1 y SOD2 solubles.....	151
3.3.2. I5-F2t-isoprostanos.....	154
3.3.3. Estado antioxidante total.....	156
3.3.4. Melatonina y cortisol.....	157
3.3.5. 8-hidroxi- 2'-desoxiguanosina (8-OHdG).....	158

3.3.6. Determinación de la estabilidad del material genético mediante electroforesis en gel de células aisladas (ensayo comet alcalino).....	161
3.3.7. Parámetros inflamatorios.....	166
3.3.8. Análisis estadístico.....	173
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados.....	174
4.2. Discusión.....	180
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	194
6. BIBLIOGRAFÍA.....	199

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AA: Ácido Araquidónico (AA)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

AG: Ácidos Grasos

Anti-Ema: Anticuerpos anti-endomisio IgA: Inmunoglobulina A

Anti-DGP: Anticuerpos anti-péptidos de gliadina desaminada

Anti-TG2: Anti-transglutaminasa tisular tipo 2

BE: bromuro de Etidio

BER: Base Excision Repair

BGA: Eje cerebral

BSA: Albúmina bovina

CAT: Catalasa

CD: Células Dendríticas

CDR: cantidad diaria recomendada

COX: ciclooxigenasa

cPLA2: fosfolipasa citosólica A2

DAPI: 4,6-diamino-2-fenil indol

DH: Dermatitis herpetiforme

DHA: Ácido Docosahexaenoico

DMTI: Diabetes Mellitus tipo I

DMTII: Diabetes Mellitus tipo II

DSBR: Doble Strand Break Repair

DSG: Dieta Sin Gluten

EAI: Enfermedades Autoinmunes

EATL: Linfoma de Células T Asociado a Enteropatía

EC: Enfermedad Celiaca

ECR: Enfermedad Celiaca Refractaria

EO: Estrés Oxidativo

EPA: Ácido Eicosapentaenoico

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

ESGE: Sociedad Europea de gastroenterología endoscópica

FACE: Federacion de Asociaciones de Celiacos de España

Fn: Ficonectina

GPx: Glutation Peroxidasa

GR: Glutation Reductasa

GSH: Glutation

GSSG: GSH en forma oxidada

GST: glutation S-transferasa (GST)

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

H₂O: Agua

H₂O₂ : Peróxido de Hidrógeno

HUVN: Hospital Universitario Virgen de las Nieves

IBP: Inhibidor de la Bomba de Protones

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1

IFN: Interferón

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleuquina

iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible

$L\cdot$: Radical lipídico

LFa: Linfotoxina a

LIE: Linfocitos intraepiteliales

$LOO\cdot$: Radical peroxilo

LOOH: Hidroperóxido lipídico

LOX: lipooxigenasa

MMP: metaloproteinasas

MMR: Mismatch Repair Pathway

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NER: Nucleotide Excision Repair

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Natural Killer (citotóxica natural)

NO: Óxido nítrico

$O_2^{\cdot-}$: Anión superóxido

$OH\cdot$: Radical hidroxilo

OTM: Olive Tail Moment

PEPs: Prolil-endorpeptidasas

PG: prostaglandina

PL: Peroxidación lipídica

PPAR α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PPAR γ : receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

PSG: Productos Sin Gluten

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

RL: Radicales Libres

RO· : Radical alcoxilo

ROO· : Radical peroxilo

RS· : Radical thiilo

SBA: Adenocarcinoma de intestino delgado

SBI: Sobrecrecimiento Bacteriano Intestinal

SH: grupo tiol

SOD: Superóxido Dismutasa

TG2: Transglutaminada tisular tipo 2

tHcy: homocisteína plasmática total

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

XO: Xantina Oxidasa

8-OH-dG: 8-hidroxi-guanosina

Objeto

OBJETO

La enfermedad celiaca (EC) es una patología inflamatoria autoinmune multisistémica que se da en pacientes genéticamente susceptibles al gluten, considerada una de las enfermedades crónicas más frecuentes, cuya etiología se va esclareciendo poco a poco. Se trata de una enfermedad infradiagnosticada (los pacientes diagnosticados no superan el 10%) pero altamente prevalente en la población general (se considera que el 1% de la población mundial la padece). Su presentación clínica es variable comprendiendo el clásico síndrome de malabsorción y síntomas gastrointestinales, la forma no clásica con unos síntomas extraintestinales cada vez más caracterizados pero no específicos de la EC y la EC silente. El diagnóstico serológico tiene una elevada sensibilidad y especificidad y, en ocasiones debe confirmarse por biopsia. La patología cursa con un proceso inflamatorio crónico y generación de especies reactivas altamente perjudiciales para las funciones celulares, causando un daño a las biomoléculas y teniendo como consecuencia una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que provocan un deterioro para las células.

La dieta sin gluten, único tratamiento para la EC, consigue la desaparición de la mayoría de síntomas y, en la mayoría de los casos la normalización de la mucosa intestinal. Sin embargo, incluso con la gran cantidad de información sobre esta patología en la literatura científica, hasta la fecha todavía no está bien aclarado si el cumplimiento de la dieta sin gluten será suficiente para prevenir el estrés oxidativo y la señalización inflamatoria producida en pacientes con EC. Conocer esto tiene gran interés, por los posibles efectos secundarios perjudiciales que causaría un estado

oxidativo e inflamatorio crónico en el celiaco, a pesar de estar tratado con dieta sin gluten.

Por otra parte, los niños con EC son un grupo muy vulnerable e interesante desde el punto de vista de la investigación, debido a las implicaciones de la EC en el crecimiento y desarrollo somático. La presente Memoria de Tesis se diseñó para evaluar si el seguimiento de la dieta sin gluten en pacientes jóvenes con EC es suficiente para mantener un correcto equilibrio oxidativo/antioxidante y mejorar la señalización inflamatoria producida en la patología.

Antecedentes biliográficos

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. LA ENFERMEDAD CELIACA

2.1.1. DEFINICIÓN

La Enfermedad Celíaca (EC) es una patología inflamatoria crónica autoinmune causada por las proteínas contenidas en el gluten de los cereales (especialmente gliadinas y gluteninas) que se da en individuos genéticamente susceptibles (Castillo et al., 2015; Malamut & Cellier, 2015). En las tres últimas décadas, la EC ha experimentado un notable aumento de su prevalencia, siendo en Europa y Estados Unidos es del 1% (Kelly et al., 2015).

En la EC, no hay tolerancia oral al gluten; existe una respuesta inmune masiva, proinflamatoria y patógena hacia ciertas partes del proteoma del gluten (Stamnaes & Sollid, 2015). Esto hace que, a diferencia de un intestino sano, donde las vellosidades son largas y delgadas y las criptas cortas y proliferativas, el intestino celiaco tenga vellosidades acortadas o embotadas con el agrandamiento de las criptas, o incluso en casos acentuados, las vellosidades estén completamente ausentes, con una mucosa aplanada y un gran aumento en el volumen de la lámina de propia. Esto reduce dramáticamente la superficie de absorción del intestino delgado, lo que resulta en una pobre absorción de nutrientes (Stamnaes & Sollid, 2015).

A pesar de los avances en el conocimiento y en el desarrollo y perfeccionamiento de las pruebas serológicas, la EC sigue estando infradiagnosticada, ya que, aunque algunos síntomas son evidentes y fáciles de reconocer, otros pueden ser sutiles o manifestarse como complicaciones a largo plazo de la EC no tratada. El retraso o ausencia de diagnóstico puede tener consecuencias importantes para la salud y para la calidad de vida de los afectados. A su vez, el reconocimiento de casos, especialmente adultos, con lesiones histológicas de bajo grado y serología negativa, comporta el riesgo de “sobrediagnostico” a pacientes cuyas lesiones obedecen en realidad a otra causa. Ambos casos suponen un problema, por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de investigación y mejora de criterios clínicos, serológicos, genéticos y anatomopatológicos que permitan establecer un diagnóstico fiable de EC (Kelly et al., 2015).

La EC está caracterizada por la presencia de una combinación variable de manifestaciones clínicas dependientes de la ingestión de gluten, anticuerpos circulantes específicos de la EC, haplotipos HLA (antígeno leucocitario humano) DQ2 y/o DQ8 y enteropatía (Husby et al., 2012; Rubio-Tapia et al., 2013; Ludvigsson et al., 2014; NICE, 2015; Pennazio et al., 2015; Snyder et al., 2016). Los anticuerpos específicos de la EC comprenden autoanticuerpos anti-transglutaminasa tisular 2 (anti-TG2) isotipo inmunoglobulina A (IgA), anticuerpos anti-endomisio (anti-EmA) isotipo IgA, y anticuerpos anti-péptidos de gliadina desamidada (anti-DGP) isotipos (inmunoglobulina G) IgG e (Inmunoglobulina A) IgA (Husby et al., 2012).

El único tratamiento que existe actualmente para la EC es adherencia estricta y de por vida a una dieta sin gluten (DSG), (Plugis & Khosla, 2015; Nardecchia et al., 2019), que ayuda a prevenir complicaciones óseas, autoinmunes y malignas. La mayoría de los pacientes responden a la DSG, mejorando o eliminando los síntomas, y normalizándose tanto los niveles de anticuerpos específicos de la EC como los hallazgos histológicos, por lo que hasta el final del proceso de diagnóstico debe consumirse una dieta que contenga cantidades normales de gluten para evitar falsos negativos (Husby et al., 2012; Rubio-Tapia et al., 2013; Malamut & Cellier, 2015; Nardecchia et al., 2019). Aun así, hay un pequeño grupo de pacientes que a pesar de seguir una DSG, acaban desarrollando la EC refractaria (ECR) (Malamut & Cellier, 2015).

2.1.2. ETIOPATOGENIA

2.1.2.1. INMUNOLOGÍA DEL TRACTO DIGESTIVO

La función principal del intestino delgado es la absorción de nutrientes de los alimentos ingeridos. Los componentes de los alimentos se descomponen en pequeños fragmentos mediante enzimas digestivas en la luz intestinal para permitir el transporte a través del epitelio. El intestino delgado tiene protuberancias largas denominadas vellosidades, que aumentan el área de superficie disponible para la absorción de nutrientes. El intestino delgado está recubierto por una sola capa de células epiteliales, y esto está sujeto a estrés mecánico y exposición constante a una amplia gama de componentes foráneos. Mantener un epitelio saludable es importante no solo para la

absorción de nutrientes, sino también para prevenir la invasión de patógenos. Por lo tanto, las células epiteliales tienen una alta tasa de rotación y toda la capa de células epiteliales se repone completamente en un plazo de tres a cinco días (Barker, 2014; Stammaes & Sollid, 2015).

El intestino delgado debe poder clasificar correctamente una variedad de antígenos; debe tolerar los alimentos ingeridos y los microbios beneficiosos y, al mismo tiempo, reconocer y mantener bajo control a los patógenos potenciales. Esta es una tarea extremadamente compleja que requiere un esfuerzo coordinado de las células epiteliales y el sistema inmunológico de la mucosa. Los sitios principales para la inducción de la respuesta inmunitaria intestinal son los parches de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos que drenan el tejido. La producción de IgA secretora constituye una primera línea de defensa a través de su secuestro en la luz intestinal, después del transporte a través del epitelio por el receptor de Ig polimérico. Además de la protección lumínica conferida por la IgA secretora, la capa de células epiteliales es patrullada continuamente por los linfocitos intraepiteliales (LIE) que se colocan entre las células epiteliales. La mayoría de estas células son receptores de células T CD8 + (TCR) + y algunas son TCR +. Estas células desempeñan un papel vital como primera línea de defensa contra las infecciones (Hayday et al., 2001; Abadie et al., 2012). En la lámina propia, debajo de la capa epitelial, las células CD11c + CX3CR1 + patrullan el tejido y la muestra de antígenos lumbinales a través de la captación directa (Rescogno et al., 2001) o a través de células caliciformes (McDole et al., 2012; Howe et al., 2014). El antígeno también es captado a través de las células M, que son células epiteliales especializadas ubicadas directamente sobre los parches de Peyer. Las células M

permiten la captación de componentes grandes, incluidas las bacterias intactas, y se cree que los parches de Peyer son los principales sitios inductivos para las respuestas de IgA hacia los antígenos microbianos (Pabst & Mowat, 2012; Stammaes & Sollid, 2015).

Los pacientes con EC que siguen una DSG, generalmente se recuperan según lo determinado, tanto por la histología como por los análisis serológicos. Sin embargo, en la mayoría de estos pacientes, las células T CD4 + específicas al gluten aún pueden detectarse en el intestino delgado, aunque a baja frecuencia (Bodd et al., 2013). Estas células constituyen un conjunto de células de memoria residentes en tejidos. Además, los pacientes bajo tratamiento con una DSG tienen un fuerte compartimento de memoria efectora, que se recupera rápidamente con la exposición oral al gluten y se puede detectar en la sangre después de seis días (Raki et al., 2007). Curiosamente, las células T CD8 + y las células TCR + también se encuentran en la sangre después de la exposición al gluten en concierto con las células T CD4 + (Han et al., 2013). Probablemente, éstas no son reactivas al gluten, pero pueden estar involucrados en la posterior destrucción de la mucosa intestinal. El hecho de que sigan la misma cinética puede indicar que su activación está controlada por las células T CD4 + activadas (Stammaes & Sollid, 2015).

2.1.2.2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD CELIACA

La digestión incompleta del gluten por las peptidasas gástricas, pancreáticas y del borde en cepillo intestinal, conduce a la formación de péptidos de gran tamaño, alguno de los cuales contiene 33 aminoácidos (Shan et al., 2002), que pueden atravesar el epitelio intestinal por las vías transcelular o paracelular (Matysiak-Budnik et al.,

2008; Schumann et al., 2017) y llegar a la lámina propia de la mucosa donde activan una respuesta inmunitaria adaptativa dependiente de la desamidación de estos péptidos por la enzima transglutaminasa tisular de tipo 2 (TG2), que es el principal autoantígeno en la EC (Dieterich et al., 1997). La acción de la TG2 aumenta la inmunogenicidad de estos péptidos y favorece su unión a las moléculas HLA DQ2 (DQ2.5 y DQ2.2) y HLA DQ8 de la membrana de las células presentadoras de antígeno (Molberg et al., 1998), y su presentación a los linfocitos T CD4 + específicos de gluten del intestino (Lundin et al., 1993). Las células T CD4+ son reproinflamatorias, promueven el daño intestinal (Lundin et al., 1993, Molberg et al., 1997), y son muy específicas de la EC. Tras la activación, éstas adquieren un fenotipo proinflamatorio y albergan la lámina propia del intestino delgado donde sirven como células T efectoras y producen grandes cantidades de interferon- γ (IFN- γ) e interleuquina-21 (IL-21), lo que contribuye a la EC en parte al promover la activación de los LIE citotóxicos (Nilsen et al., 1995; Fina et al., 2008; Zeng et al., 2005, Ebert, 2009). Al mismo tiempo, se genera una respuesta de autoanticuerpos específicos para la TG2 (Dieterich et al., 1997), que son producidos principalmente por células plasmáticas localizadas en la lámina propia (Marzari et al., 2001; Niro et al., 2012). Se piensa que la alteración del ambiente tolerogénico del intestino delgado promueve la activación de las células T CD4 + (Jabri & Sollid, 2009, Stammaes & Sollid, 2015).

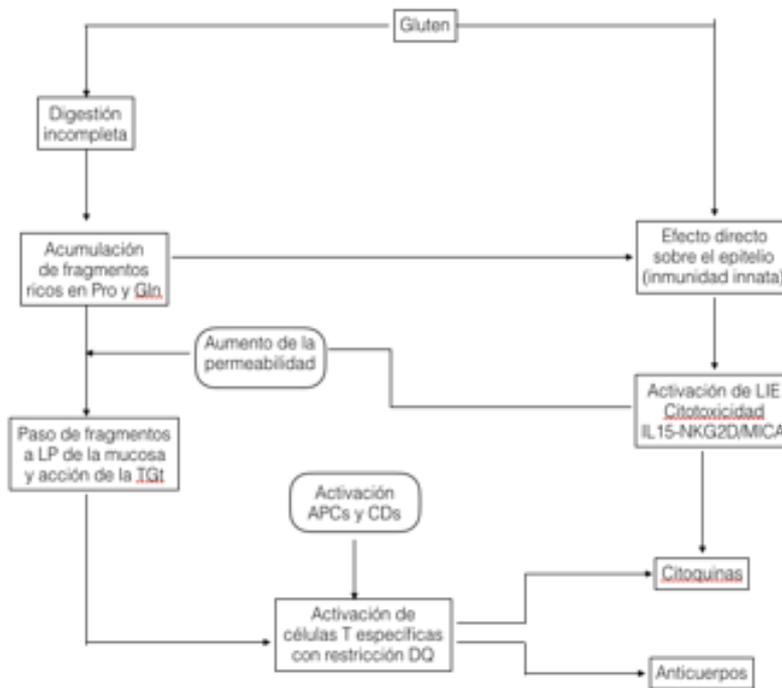
La respuesta adaptativa frente al gluten y la TG2 no explican la lesión intestinal caracterizada por la destrucción de las células del epitelio y la remodelación tisular. En el compartimento epitelial, se produce una activación aberrante de un subtipo de linfocitos T CD8+ intraepiteliales secundario a la pérdida de la expresión de receptores

inhibidores NKG2A (NK: *Natural killer*-citotóxica natural) y al aumento de los activadores NKG2D y NKG2C (Meresse et al., 2004; Meresse et al., 2006). Por otro lado, las células epiteliales muestran en la superficie una expresión aumentada de moléculas de estrés MIC-A y MIC-E, lo que convierte a estas células en diana de la citotoxicidad mediada por los LIE (Malamut et al., 2010). El gluten y otras proteínas del trigo podrían contribuir a aumentar la expresión de estas moléculas de estrés en los enterocitos (Londei et al., 2005; Junker et al., 2012), aunque se cree que las infecciones virales tendrían un papel central en el inicio de estas respuestas, al inducir la expresión aberrante de IL-15 y de interferones de tipo I (Kim et al., 2015).

La inflamación de la mucosa y el desarrollo de la lesión intestinal son secundarios a la activación secuencial y la superposición de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, que conducen a la alteración de la producción local de citoquinas por los linfocitos T locales (Jabri & Sollid, 2006; Meresse et al., 2009; Arranz & Garrote, 2009).

La patogenia de la EC incluye varios factores que afectan tanto a nivel del epitelio como de la lamina propia, como son la digestión incompleta y el transporte transepitelial de péptidos (Matysiak-Budnik et al., 2003; Shan et al., 2002), el efecto tóxico del gluten sobre el epitelio, la proliferación y activación de LIE (Maiuri et al., 2003; Meresse et al., 2006), y el reconocimiento de péptidos de gluten por los linfocitos T específicos con restricción HLA-DQ2 tras ser modificados por la TG2 (Sollid, 2002; Kagnoff, 2007; Arranz & Garrote, 2009).

Figura 1. Representación esquemática de los principales procesos implicados en la patogenia de la EC. Tomado de Arranz & Garrote, (2009).



2.1.2.3. FACTORES AMBIENTALES: EL GLUTEN

El gluten es una proteína que se encuentra en el trigo, la cebada y el centeno, cereales que, sobre todo el primero, están presentes en la dieta habitual de todos los pueblos de origen indoeuropeo. Se trata de una intolerancia permanente a las proteínas del gluten del trigo (gliadina) y todas sus variedades (trigo duro, kamut, espelta) (Kupper, 2005), del centeno (secalina), de la cebada (hordeína) y del triticale (híbrido de trigo y centeno) (Rostom et al., 2006; Polanco Allué, 2008; Gujral et al., 2012; Castillo

et al, 2015). Existe una porfía en cuanto a la toxicidad de la avenina, proteína del gluten de la avena, en la EC. Esta ha sido cuestionada en los últimos años y algunos grupos clínicos, sobre todo en el norte de Europa, permiten su consumo (Ribes Koninckx, 2008). Según evidencian algunos estudios, la avena en estado puro (no contaminada por harina de trigo) no influiría en la patogénesis de la enfermedad (Van Heel & West, 2006). El gluten es el principal factor ambiental responsable de la EC y se relaciona tanto con la cantidad como con la frecuencia de la ingestión (Navalón-Ramon et al., 2016).

Figura 2. Proteínas del trigo y estructura y composición del gluten.



Toxicidad del gluten

El proteoma del gluten es altamente complejo (Ribeiro et al., 2013). Las proteínas gliadina y glutenina tienen largos tramos de áreas muy ricas en prolina. Estas áreas son altamente resistentes a la degradación proteolítica por proteasas intestinales y sobreviven como polipéptidos grandes en el intestino (Shan et al., 2005). Es importante destacar que la unión del péptido a las moléculas MHC de clase II requiere un mínimo

de 9 aminoácidos. De acuerdo con esto, todos los epítomos inmunogénicos dominantes identificados en la EC hasta la fecha residen en tramos ricos en prolina del proteoma del gluten (Hausch et al., 2002; Shan et al., 2002; Stammaes & Sollid, 2015).

Las principales familias de proteínas del gluten de trigo (gliadinas y gluteninas), y sus homólogos en la cebada y centeno, denominadas prolaminas por su alto contenido en los aminoácidos glutamina y prolina (Shewry & Halford, 2003), contienen fragmentos nocivos para el intestino celiaco. Se han identificado 2 tipos de péptidos:

- 1) Los péptidos inmunogénicos, que estimulan linfocitos T del intestino o sangre periférica de los pacientes celiacos con restricción DQ2/DQ8, y pueden ser epítomos inmunodominantes (como los residuos 57-75 de alfa-gliadina); (Anderson et al., 2000; Arentz Hansen et al., 2002; Vader et al., 2002; Kagnoff, 2007).
- 2) Los péptidos tóxicos (residuos 31- 43/49) de acción directa sobre el epitelio, que son independientes de los linfocitos T (Maiuri et al., 2003; Jabri & Sollid, 2006).

No todos los cereales contienen la misma proporción de péptidos de cada tipo ni la misma cantidad relativa de gluten, de ahí las variaciones en su capacidad patogénica (Arranz & Garrote, 2015).

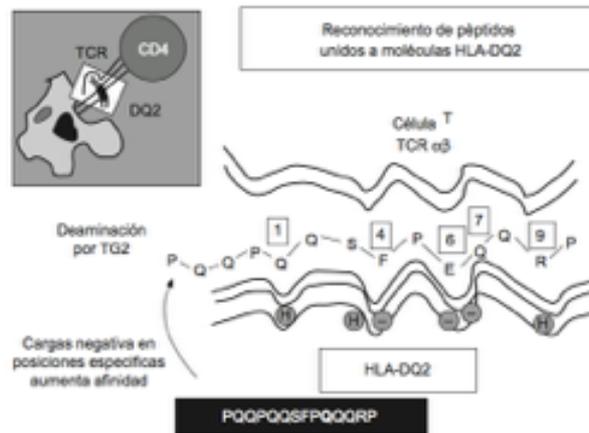
La principal forma de entrada de los péptidos de gliadina a través del epitelio es la transcitosis (Merese et al., 2009). En la EC se ha observado un aumento del

transporte transepitelial dependiente del IFN- γ , pero el procesamiento de estos péptidos por las células del epitelio está también alterado, de forma que los péptidos tóxicos (19-mer) y los inmunogénicos (33-mer), tanto en forma intacta como parcialmente degradada, podrían pasar al interior (Shan et al., 2002; Matysiak-Budnik et al., 2003). Por otro lado, en situaciones de inflamación, como cuando la EC afecta al epitelio intestinal, se ha observado un aumento de la difusión paracelular pasiva de péptidos debido a la liberación de zonulina inducida por los péptidos de gliadina, que actúa sobre las uniones estrechas del epitelio (Fasano et al., 2000; Arranz & Garrote, 2010).

Otros mecanismos activos que podrían contribuir también al paso de péptidos intactos de las gliadinas a través del epitelio intestinal son los que dependen de la presencia de un receptor, por ejemplo, mediante una vía que utiliza al receptor de la transferrina CD71 expresado por los enterocitos, y que permite el paso de complejos formados por péptidos de gliadina y anticuerpos específicos de IgA secretora, protegidos de la degradación por las enzimas lisosomales (Matysiak-Budnik et al., 2008), o mediante la captación directa de estos péptidos por células dendríticas mieloides de la lámina propia (Arranz & Garrote, 2010).

Figura 3. El gluten tiene un efecto doble sobre el intestino: algunos péptidos, como el fragmento p31-43 de la α -gliadina induce estrés de los enterocitos, que expresan IL-15 y moléculas MICA, y activa a los LIE para expresar el receptor NKG2D y activar la citotoxicidad contra la célula epitelial. El paso de péptidos inmunogénicos a la lámina propia estimula a linfocitos T CD4 + específicos cuando se presentan junto a

moléculas HLA-DQ2/DQ8, tras tener una modificación por parte de la TG2. Se activan respuestas de citoquinas proinflamatorias y mecanismos causantes de la transformación mucosa. Tomado de Arranz & Garrote, (2010).



Otros factores ambientales

Además del gluten, se han propuesto otros factores ambientales que pueden contribuir al desarrollo de la EC, aunque no se les da tanta importancia porque los datos disponibles hasta el momento son contradictorios. Algunos de éstos son:

- El momento y la forma de introducción del gluten en la dieta del niño (Szajewska et al., 2016)
- El tipo de parto (por vía vaginal o por cesárea) (Dominguez-Bello et al., 2010)
- El comienzo y la duración de la lactancia materna (Szajewska et al., 2016)
- La exposición a antibióticos en edad temprana (Mårild et al., 2013)
- La situación socioeconómica (Canova et al., 2014)

- La estación del año del nacimiento (Ivarsson et al., 2003; Lebwohl et al., 2013b; Tanpowpong et al., 2013)
- Las infecciones virales agudas en niños (Troncone & Auricchio, 2007; Myléus et al., 2012)
- La variedad de trigo consumido (Szajewska et al., 2016)
- La microbiota (Konturek et al., 2011)
- Infecciones parasitarias intestinales (Szajewska et al., 2016)

2.1.2.4. INMUNOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD CELIACA

A nivel molecular, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la EC, especialmente con la identificación de los heterodímeros HLA-DQ2 y DQ8, su papel en la presentación del gluten a los linfocitos T CD4 + específicos (Sollid, 2002) y de la acción directa de ciertos fragmentos de las gliadinas sobre el epitelio (Maiuri et al., 2003; Hue et al., 2004; Meresse et al., 2006; Arranz & Garrote, 2009).

El factor genético más importante es el MHC de clase II (Trynka et al., 2011). La EC está fuertemente asociada con genes HLA (locus CELIAC1, cromosoma 6p21): la mayoría de los pacientes celíacos muestra una variante de la molécula HLA-DQ2 codificada por los alelos DQA1*05 y DQB1*02 en posición cis (haplotipo DQ2.5), más común en el centro y norte de Europa, o en posición trans, (combinación de los haplotipos DQ7.5 [alelos DQA1*05 y DQB1*03:01] y DQ2.2 [alelos DQA1*02 y

DQB1*02]), más frecuente en la cuenca mediterránea y el resto son DQ8 (DQA1*03, DQB1*0302) en posición cis (Oberhuber, 2000; Murray & Rubio-Tapia, 2012).

Se ha demostrado un fuerte efecto de dosis mediado por una presentación de péptidos, ya que los individuos homocigóticos para HLA-DQ2 tienen un mayor riesgo de desarrollar la EC que los heterocigóticos (Ploski et al., 1993). Las moléculas HLA-DQ predisponen a la EC por la presentación preferencial de antígenos del gluten a las células CD4 +, aunque estos haplotipos son necesarios, pero no suficientes, para el desarrollo de la EC (Lundin et al., 1993; Lundin et al., 1994; Bodd et al., 2012). Aunque entre el 25 y el 30% de la población es portadora de DQ2, solo el 1% desarrolla la EC (Oberhuber, 2000; Barker, 2014; Stamnes & Sollid, 2015).

La base estructural para la asociación de HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 y HLA-DQ8 con la EC se relaciona con sus preferencias comunes y fuertes para unir péptidos con aminoácidos cargados negativamente (Johansen et al., 1996; Van de Wal et al., 1996; Vartdal et al., 1996; Van de Wal et al., 1997; Lee et al., 2001a; Kim et al., 2004). Los péptidos de gluten ricos en prolina tienen pocos residuos cargados, si es que tienen alguno, y los residuos de prolina impiden la formación eficaz de enlaces de hidrógeno entre el péptido y la molécula de MHC de clase II. Sin embargo, estos péptidos son muy buenos sustratos para TG2, que introducen cargas negativas por desamidación en una forma altamente dependiente de la secuencia. Esto se guía por el posicionamiento de los residuos de prolina. Esta desamidación específica del sitio genera residuos de glutamato que sirven como anclajes en las bolsas del surco de unión al péptido de HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 y HLA-DQ8. Por lo tanto, los péptidos de

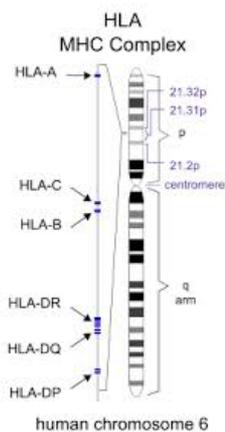
gluten desamidados por TG2 se convierten en buenos aglutinantes para las moléculas de HLA-DQ asociadas a la EC, pero no están bien acomodadas por otras moléculas de HLA (Sollid & Lie, 2005; Bourgey et al., 2007; Bergseng et al., 2008; Stamnes & Sollid, 2015). La mayoría de los pacientes DQ2 positivo son portadores del haplotipo ancestral 8.1 (B8-DR3-DQ2.5), que incluye otros alelos capaces de conferir riesgo o de modificar el efecto del DQ2, y está asociado con otras enfermedades autoinmunes (EAI) (Medrano et al., 2012). Dentro de la región HLA, los genes del factor de necrosis tumoral (TNF) α y de la linfotoxina a (LTa) pueden tener también una implicación funcional, y se han descrito asociaciones con los genes que codifican las moléculas MIC-A y MIC-B, y moléculas de la familia de proteínas de estrés HSP-70 (Partanen et al., 1993; Setty et al., 2008).

En los últimos años, se han identificado otras zonas del genoma fuera de la región del HLA que contienen genes candidatos y podrían participar en la susceptibilidad a la EC (en la actualidad, más de cincuenta). Estas nuevas regiones de asociación relacionadas con la funcionalidad inmunológica contienen posibles genes candidatos que pueden ser agrupados de acuerdo a la función de las moléculas que codifican:

- 1) Genes que intervienen en la señalización por quimiocinas, como las regiones génicas CCR3 y RGS1, que resaltan la importancia de los mecanismos de reclutamiento celular al epitelio intestinal (no observado antes en modelos inmunológicos) y que podría explicar la expansión de los LIE en la EC.

2) Genes implicados en la activación y diferenciación de los linfocitos T, que confirmaría el papel central de estas células en la respuesta inmunitaria adaptativa frente al gluten mediada por la diferenciación de linfocitos T CD4 + específicos de gluten de la lámina propia mucosa, que reconocen antígeno en el contexto de las moléculas HLA DQ2 (DQ2.5 y DQ2.2) y HLA DQ8, y son responsables de la producción de citoquinas enteropatógenas, y de proporcionar ayuda a los linfocitos B para producir anticuerpos específicos. Algunos genes intervienen en la activación celular (IL2, IL21, TAGAP, SH2B3), y otros en la función de los linfocitos T reguladores (IL2) y en la diferenciación hacia células efectoras Th1 (IL12A, IL18RAP) (Dubois et al., 2010; Abadie et al., 2011; Trynka et al., 2011; Kumar et al., 2012).

Figura 4. Imagen del par cromosómico 6 que es el que codifica HLA.



2.1.2.5. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE TG2 EN EL INTESTINO DELGADO

Un sello distintivo de la EC es la producción dependiente de gluten de autoanticuerpos IgA hacia la autoproteína TG2. Esto no es casual, ya que la actividad enzimática de TG2 está implicada en la modificación postraduccional de los péptidos de gluten, un proceso crucial para su inmunogenicidad (Molberg et al., 1998; Van del Wal et al., 1998). La TG2 pertenece a una familia de enzimas dependientes de Ca^{2+} que se conservan filogenéticamente y evolutivamente (Lorand & Graham, 2003). Estas enzimas modifican específicamente las cadenas laterales de residuos de glutamina a través de la reticulación covalente a los residuos de aminas primarias (transamidación) formando enlaces isopeptídicos o mediante reacción con agua, que genera ácido glutámico (desamidación) (Folk, 1980). Mientras que muchos miembros de esta familia de enzimas tienen patrones de expresión restringidos a los tejidos, la TG2 se expresa de forma constitutiva en muchos tejidos y tipos de células y puede inducirse en respuesta a lesiones o estímulos inflamatorios (Kin, 2006). La TG2 se expresa en el citosol celular y aproximadamente el 70% de la proteína reside allí (Lorand y Graham, 2003). La TG2 también puede entrar en el núcleo celular o ser externalizada a la superficie celular y la matriz extracelular (Zemskov et al., 2011; Nurminskaya & Belkin, 2012; Stammaes & Sollid, 2015).

La TG2 está presente en gran cantidad en el intestino delgado y se cree que está asociada predominantemente con fibronectina (Fn), en particular en la membrana basal debajo de las células epiteliales. La expresión de TG2 en las células epiteliales intestinales parece mayor en pacientes con EC que en los controles, aunque se han

encontrado resultados contradictorios (Esposito et al., 2003; Sakly et al., 2005; Biagi et al., 2006; Villanacci et al., 2009). Además, también se observa una mayor expresión de TG2 en la membrana basal subepitelial. Sin embargo, esto no es exclusivo de la EC y también se ha observado en otras afecciones inflamatorias del intestino delgado (Gorgun et al., 2009). Por lo tanto, la mayor expresión de TG2 probablemente no explica por qué TG2 se convierte en el autoantígeno de células B en la EC (Stamnaes & Sollid, 2015).

Los anticuerpos anti-TG2 desaparecen del suero al comenzar una DSG (Sulkanen et al., 1998). Después de un desafío de gluten oral a corto plazo reaparecen en sangre en un periodo de dos a cuatro semanas (Leffler et al., 2013). Aunque se ha encontrado que los títulos séricos se correlacionan con la gravedad de la EC (Alessio et al., 2012), estos anticuerpos también pueden detectarse en pacientes con poco o ningún hallazgo histológico (Kaukinen et al., 2005; Paparo et al., 2005; Salmi et al., 2006; Tosco et al., 2008; Stamnaes & Sollid, 2015).

En el intestino, se encuentran anticuerpos anti-TG2 como depósitos de IgA en la membrana basal (Shiner & Ballard, 1972; Korponay-Szabo et al., 2004). Dichos depósitos pueden estar presentes incluso en ausencia de títulos de suero anti-TG2 detestables y parecen tener un valor predictivo para el desarrollo de la EC (Salmi et al., 2006). Por lo tanto, los anticuerpos anti-TG2 están presentes muy cerca del inicio de la patogénesis de la EC y las células B específicas de TG2 autorreactivas deben activarse en respuesta al gluten de la dieta antes de la inflamación intestinal manifiesta y la destrucción de tejidos (Stamnes & Sollid, 2015).

2.1.2.6. INMUNIDAD INNATA FRENTE AL GLUTEN

Los péptidos de gluten, como el p31-43/49 de la alfa- gliadina, pueden dañar directamente el epitelio intestinal al activar mecanismos de la inmunidad innata, con producción de IL-15 e inducción de apoptosis en los enterocitos, que alteran la función barrera epitelial y aumentan la permeabilidad (Hue et al., 2014; Maiuri et al., 2003; Matysiak-Budnik et al., 2003; Escudero-Hernández et al., 2017). La IL-15 induce la proliferación y la activación de LIE T CD8⁺ que expresan receptores de células NK tipo NKG2D y CD94-NKG2A, cuyos ligandos son las moléculas de estrés MICA/B y HLA-E, respectivamente, expresadas por los enterocitos en situaciones de estrés (Jabri et al., 2000; Mention et al., 2003; Meresse et al., 2004). La IL-15 promueve en los LIE la producción del IFN- γ y la citotoxicidad dependiente de proteínas citolíticas, como perforinas o granzima (Olaussen et al., 2002; Di Sabatino et al., 2006; Escudero-Hernández et al., 2017). La lesión del epitelio depende de los LIE que expresan el receptor de célula T-ab, que descienden tras la restricción de gluten, mientras que los LIE receptores de célula T gd NKG2A tienen una función reguladora (Bhagat et al., 2008) y se mantienen elevados durante la DSG (Arranz & Garrote, 2009).

Se ha comprobado que los péptidos de gliadina captados por las células epiteliales mediante endocitosis son capaces de llegar hasta las vesículas paranucleares de estas células (endosomas tardíos y lisosomas); sin embargo, en vez de ser degradados en los lisosomas, el péptido p31-43 se acumula allí por causas aún desconocidas, lo que provoca un microambiente prooxidativo que induce la activación de la TG2 y la

degradación del “peroxisome proliferator-activated receptor” (PPAR α), que es una molécula capaz de modular la inflamación intestinal. Este mecanismo podría explicar por qué los pacientes celíacos recaen tras la reintroducción del gluten, incluso antes de que aparezcan signos de inflamación (Arranz & Garrote, 2009; Luciani et al., 2009).

2.1.2.7. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA FRENTE AL GLUTEN

Los linfocitos T CD4 + específicos de la lámina propia reconocen péptidos sólo cuando se presentan mediante células dendríticas junto a moléculas HLA-DQ2/DQ8 (Lundin et al., 1993; Sollid, 2002). Estas moléculas disponen de un bolsillo de unión a péptidos con propiedades únicas para acomodar secuencias peptídicas: DQ2 tiene preferencia por aminoácidos de carga negativa en posiciones centrales (P4, P6 o P7), y en el caso de DQ8, las posiciones son más externas (P1 o P9) (Van de Wal et al 1998). De forma natural, las proteínas del gluten tienen pocas cargas negativas; sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la TG2 liberada durante la inflamación es capaz de inducir la conversión de residuos de glutamina en ácido glutámico en secuencias del tipo glutamina, prolina u otro aminoácido (Molberg et al., 1998; Fleckenstein et al., 2004; Arranz & Garrote, 2009).

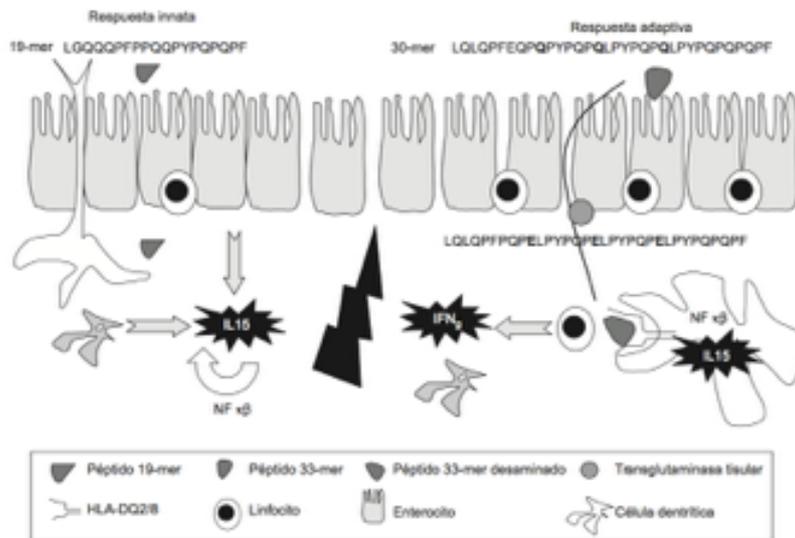
Precisamente por su alto contenido en glutamina y prolina, los péptidos de gluten son resistentes a la proteólisis por enzimas digestivas, y se forman fragmentos grandes que contienen glutamina, prolina u otro aminoácido, que son los substratos preferidos de la TG2 (Arentz-Hansen et al., 2000; Hausch et al., 2002), como el péptido de 33 aminoácidos (p57–89 de la alfa-gliadina) que contiene seis copias de tres epítopos

T, y cuya inmunogenicidad para los linfocitos T del intestino celiaco aumenta tras la deamidación por TG2 (Shan et al., 2002). La activación de estos linfocitos T CD4 + reactivos al gluten conduciría una respuesta proinflamatoria dominada por la producción de IFN- γ . Algunas enzimas bacterianas, como la prolilendopeptidasa, inducen la degradación de estos fragmentos e impiden que se formen epítomos T capaces de activar respuestas de la inmunidad adaptativa (Piper et al., 2004; Arranz & Garrote, 2009).

La respuesta adaptativa humoral parece tener una contribución directa menor en la patogenia de la EC, aunque los anticuerpos de IgA secretora específicos de gliadina podrían favorecer la translocación o el paso de péptidos de gliadina intactos desde la luz intestinal hasta el interior por una vía en la que intervendría el receptor de la transferrina CD71 (Meresse et al., 2009). No se han identificado linfocitos T específicos de TG2 y falta por explicar aún por qué la ingestión de una proteína de la dieta, el gluten, promueve la producción de autoanticuerpos frente a la TG2 (Sollid, 2002; Jabri & Sollid., 2006). Como posible explicación se ha propuesto un modelo en el que los linfocitos T CD4+ reactivos al gluten podrían proporcionar la ayuda necesaria a las células B específicas de TG2 para la síntesis de anticuerpos vía formación de complejos formados por TG2 y péptidos de gliadina (Sollid et al., 1997; Arranz & Garrote, 2009).

Figura 5. La molécula HLA-DQ sirve de elemento de restricción en el reconocimiento de epítomos de gluten por los linfocitos T CD4+. Representación esquemática de la interacción entre un epítomo (PQQPQQSFPQQR) de la α -gliadina y la molécula HLA-DQ2, con posiciones de anclaje (Matysiak-Budnik et al., 2003; Hue et al., 2004; Meresse et al., 2006) que tienen preferencia por cargas negativas. La TG2

induce la sustitución de glutamina de carga positiva por ácido glutámico de carga negativa (glutamina, ácido glutámico o prolina). Tomada de Arranz & Garrote, (2009).



2.1.3. PREVALENCIA Y EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la EC ha sido comparada gráficamente con la figura de un iceberg por muchos expertos. En esta imagen la prevalencia sería el total de hielo del iceberg; la masa de hielo hundida representaría los casos no diagnosticados de EC en una población determinada en un momento dado, y el hielo que sobresale del agua correspondería a los casos clínicamente diagnosticados (Bai et al., 2013; Navalon-Ramon et al., 2016).

Actualmente la EC afecta a un 0,5-1% de la población mundial, siendo uno de los trastornos digestivos crónicos más comunes (Rubio-Tapia et al., 2009b; Kang et al., 2013; Plugis & Khosla, 2015). Los nuevos diagnósticos han aumentado

sustancialmente, debido a una mayor conciencia y mejores herramientas de diagnóstico y al probable aumento real de la incidencia (Kelly et al., 2015). Las tasas de prevalencia oscilan entre 1:100 cuando los pacientes son diagnosticados por métodos de detección y 1:1000 cuando se diagnostican según los síntomas (Wagner et al., 2016).

En general, la EC afecta a todos los grupos de edad, incluidos los ancianos, teniendo una incidencia mayor en las mujeres que en los hombres (Jeremy, 2015), con una proporción de 2:1 (Thomas et al., 2009; Gujral et al., 2012). La proporción entre casos diagnosticados y no diagnosticados de EC es muy variable entre los diferentes países (Catassi et al., 2014) (1:2 en Finlandia (Fasano et al., 2003), 1:20 en Argentina (Mäki et al., 2003) o Estados Unidos (Gómez et al., 2001)), lo que demuestra que muchos casos de EC podrían permanecer sin diagnosticar sin un cribado activo. La prevalencia de la EC se sitúa en torno al 1% en los países occidentales (Lohi et al., 2007; Lionetti & Catassi, 2011).

En España, en cuanto a la prevalencia de la EC, sólo existen los estudios realizados por Riestra et al., (2000) en Asturias, García Novo et al. (2007) en Madrid (quienes con métodos serológicos hallaron una prevalencia global del 0,26 y del 0,27%, respectivamente), Fernández et al. (2010) en Galicia y Ferreira Lasso et al. (2008) en La Rioja, cuyo estudio descriptivo fue sobre casos previamente diagnosticados. También existe en la bibliografía el estudio realizado por Mariné et al. (2011) sobre población catalana, aunque en este caso no se realizó sobre pacientes previamente diagnosticados, sino sobre donantes de sangre. El estudio más reciente fue realizado por Navalón-Ramon et al. (2016) en municipios de la Comunidad Valenciana, donde hallaron una

prevalencia del 0,26% (igual que en los casos anteriormente nombrados). En la población pediátrica (0-14 años) la prevalencia fue del 0,62%, mientras que en los mayores de 14 años la prevalencia fue del 0,20%.

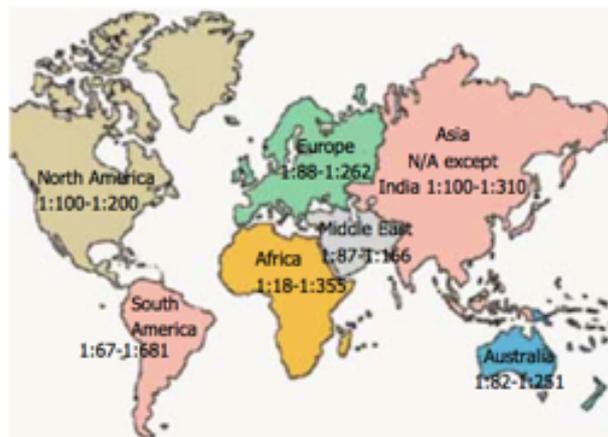
Originalmente, se pensaba que la EC afectaba casi exclusivamente a población caucásica; ahora se sabe que está ampliamente distribuida por todo el mundo (Fasano & Catassi, 2001; Gujral et al., 2012). La proporción de casos diagnosticados de EC frente a los no diagnosticados varía notablemente de un país a otro, situación que sugiere que la mayoría de los casos de EC permanecen sin ser detectados (Fasano & Catassi, 2001; Fasano et al., 2003; Mäki et al., 2003).

Estudios epidemiológicos realizados en áreas supuestamente libres de EC, incluyendo África, Oriente Medio, Asia y América del Sur, muestran que la EC, de alguna manera, sí ha sido diagnosticada en estas zonas. Esto proporciona evidencia de que la EC es una de las enfermedades genéticas más comunes (Gujral et al., 2012).

La distribución mundial de la EC parece haber seguido el paso del consumo de trigo de la humanidad y los flujos migratorios. El hombre se alimentaba originalmente de carne, frutas y verduras, sin exposición a los cereales que contenían gluten. Hace unos 10.000 años, en una pequeña región llamada "Fertile Crescent" del Oriente Medio (incluida Anatolia (Turquía meridional), Líbano, Siria, Palestina e Iraq), se cultivaron el trigo silvestre y los granos de cebada con éxito y en condiciones ambientales favorables. En Fertile Crescent, algunas tribus cambiaron de estilo de vida nómada a estable, porque el cultivo de la tierra permitió el almacenamiento de alimentos y más tarde emigraron hacia el oeste para obtener nuevas tierras para cultivar. Estas personas se

extendieron por la zona mediterránea (África septentrional, Europa meridional) y Europa central. La expansión continuó del año 9000 al año 4000 aC, momento en el cual el cultivo de trigo y cebada se había extendido por todo el Viejo Continente, llegando también al norte de Europa (Irlanda, Dinamarca y los países escandinavos). Esta expansión en la agricultura se debió a la difusión de las prácticas agrícolas y a la sustitución de los habitantes locales por descendientes de Oriente Medio. Por lo tanto, las poblaciones europeas y norteafricanas comparten antecedentes genéticos con los pueblos de Oriente Medio (Gujral et al., 2012).

Figura 6. Rango de estimación de la prevalencia de EC en los diferentes continentes y países. Tomado de Gujral et al., (2012).



2.1.3.1. GRUPOS DE RIESGO

Existen pruebas y estudios de una mayor prevalencia de EC en determinados grupos de población. El principal grupo de riesgo son los familiares de primer grado de pacientes con EC, seguido de otras enfermedades asociadas que suelen preceder a la EC, aunque también pueden manifestarse simultáneamente o incluso después del diagnóstico, algunas de ellas estrechamente relacionadas con la EC por ser EAI (Gujral et al., 2012; Husby et al., 2012).

- Familiares de primer grado de enfermos celíacos: constituyen un grupo de riesgo principal ya que la prevalencia de sufrir EC está entre el 10-20%. Se recomienda un control de esta población, ya que en muchos casos son latentes o asintomáticos (Polanco & Ribes, 1991; Husby et al., 2012). Algunos autores han observado una mayor prevalencia en los hermanos con EC en comparación con los padres (Farré et al., 1999; Book et al., 2003; Rubio-Tapia et al., 2008; Gujral et al., 2012). El riesgo exacto es más alto en gemelos monocigóticos, seguidos en hermanos con igualación de antígenos de leucocitos humanos (HLA), hermanos, y finalmente padres e hijos de pacientes con EC (Rubio-Tapia et al., 2008, Rubio-Tapia et al., 2013). Los parientes de segundo grado tienen una tasa de probabilidad más baja que los casos anteriores (2,59%) (Fasano et al., 2003, Rubio-Tapia et al., 2013; Navalon-Ramon et al., 2016). Los miembros de las familias con más de un individuo ya diagnosticado con EC están en mayor riesgo de padecerla y las recomendaciones para el cribado deben extenderse a todos los demás miembros, incluyendo parientes de segundo grado (Book et al., 2003; Rubio-Tapia et al., 2013).

- Déficit selectivo de IgA: se estima que alrededor de un 4% de los pacientes celíacos presentan también un déficit selectivo de IgA (Polanco y Ribes, 1991; Fasano et al., 2003; Husby S et al., 2012).
- Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1): en general, las EAI como la DMT1 tiene una estrecha relación con la EC ya que comparten una combinación de factores genéticos y mecanismos patogénicos comunes (Nardocchia et al., 2019). La prevalencia de EC en pacientes con DMT1 se ha investigado ampliamente y es del 3-12% (Polanco & Ribes, 1991; Fasano et al., 2003; Rostom et al., 2004; Hansen et al., 2006; Salardi et al., 2008; Husby et al., 2012; Navalon-Ramon et al., 2016).
- Enfermedad tiroidea autoinmune: es frecuente tanto en niños como en adultos. La EC se observa en aproximadamente el 7% de los pacientes con trastornos autoinmunes de tiroides (Polanco & Ribes, 1991; Fasano et al., 2003; Husby et al., 2012; Kelly et al., 2015).
- Síndrome de Down: la asociación con la EC es superior al 15% (Polanco & Ribes, 1991; Fasano et al., 2003; Husby et al., 2012).
- Otras enfermedades asociadas menos frecuentes como Síndrome de Turner, Enfermedad de Addison, Síndrome de Williams, Enfermedad Hepática Autoinmune y Síndrome de Sjögren (Fasano et al., 2003; Husby et al., 2012; Navalon-Ramon et al., 2016).

2.1.4. CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD CELIACA

2.1.4.1. FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD CELIACA

Las manifestaciones clínicas de la EC pueden ser muy diferentes. Se han agrupado bajo tres tipos de presentación clínica de la EC:

- La EC silenciosa, silente o asintomática: los pacientes no presentan ninguna sintomatología, incluso aunque se les interrogue detalladamente, a pesar de la presencia de lesiones intestinales características. De todas formas, los estudios sobre los efectos de una DSG en pacientes asintomáticos en el momento del diagnóstico demuestran mejoría en su calidad de vida (Nachman et al., 2009), por lo que está indicada la dieta a largo plazo (Navalon-ramon et al., 2016). Además, también se ha visto que un retraso en el diagnóstico de la EC empeora la calidad de vida de los pacientes (Nörstrom et al., 2011). En estos individuos hay presencia de anticuerpos específicos de la EC, de haplotipos HLA-DQ2/ HLA-DQ8 y hallazgos de biopsia de intestino delgado compatibles con la EC (Husby et al., 2012). Es recomendable un seguimiento clínico atento a los familiares directos de estos pacientes (Polanco & Ribes, 1991).
- La EC clásica: en ella los pacientes presentan síntomas gastrointestinales clásicos, es decir, diarrea, malnutrición, pérdida de peso, esteatorrea y edema secundario a hipoalbuminemia, así como malabsorción intestinal con atrofia de las vellosidades totalmente desarrollada inducida por el gluten, y otras características histológicas

clásicas (Rostom et al., 2004; Medical Advisory Secretariat, 2011; Navalón-Ramon et al., 2016).

- La EC no clásica: los pacientes pueden presentar síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, síntomas de reflujo gastroesofágico, vómitos, estreñimiento, sintomatología semejante a la del síndrome de intestino irritable, distensión abdominal, borborigmos) o manifestaciones extraintestinales (anemia ferropénica, migraña crónica, dermatitis herpetiforme, neuropatía periférica, déficit de ácido fólico, densidad ósea disminuida, infertilidad inexplicada, menarquia tardía, abortos inexplicables). Estos pacientes son habitualmente oligosintomáticos o monosintomáticos. En estos casos existe una atrofia vellosa inducida por el gluten totalmente desarrollada (Rostom et al., 2004; Medical Advisory Secretariat, 2011; Navalón-Ramon et al., 2016).

2.1.4.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD CELIACA

La EC puede aparecer en la infancia, la niñez, la adolescencia o la edad adulta (Fernández et al., 2005; Husby et al., 2012); en esta última la presentación clínica difiere considerablemente del patrón clásico descrito en la infancia. La sintomatología clásica de la EC incluye sobre todo manifestaciones digestivas e intestinales, que son los llamados síntomas clásicos, sin embargo, cada vez son más frecuentes los síntomas extraintestinales, conocidos como síntomas no clásicos (Nardecchia et al., 2019).

La presentación clásica de la EC es más común en niños pequeños y consiste principalmente en síntomas gastrointestinales y malabsorción. En estas edades, la sintomatología de la EC se inicia con la introducción en la dieta de alimentos que contienen gluten y se suele observar un retraso en el crecimiento, que fue la primera manifestación extra intestinal identificada, diarrea, vómitos y dolor y distensión abdominal (Nardecchia et al., 2019).

Con la edad, estos síntomas van variando, con una sintomatología menos típica, más sutil o incluso los individuos carecen de síntomas gastrointestinales evidentes, lo que lleva a que habitualmente sea confundida con otras enfermedades. Los adolescentes y adultos, presentan deficiencias nutricionales, síntomas extraintestinales, o en algunos casos son asintomáticos, siendo los síntomas aun más inespecíficos (Polanco & Ribes, 1991; Husby et al., 2012; Kelly et al., 2015; Moscoso & Quera, 2015; Wagner et al., 2016). Los síntomas extraintestinales más comunes son cefaleas, trastornos en el comportamiento, menarquia retrasada, irregularidades menstruales, complicaciones microvasculares, fibromialgia, hepatitis celiaca, infertilidad y abortos espontáneos y anemia ferropénica, entre otros que se muestran en la Tabla 1, muchos de los cuales se ha demostrado que mejoran con la DSG (Ameghino et al., 2019; Nardecchia et al., 2019).

Los síntomas extraintestinales pueden ser derivados en gran medida de la malabsorción de micronutrientes, sustancias que en pequeñas cantidades son esenciales para la vida (vitaminas, minerales y oligoelementos) y/o de condiciones autoinmunes relacionadas o no con la EC. También pueden estar asociados con el depósito de IgA en

la TGt extracelular en el hígado, los riñones, los ganglios linfáticos y los músculos de los pacientes con EC (Caputo et al., 2009; Gujral et al., 2012; Nardecchia et al., 2019).

En los adultos, los síntomas gastrointestinales no específicos que se observan más frecuentemente incluyen pirosis, que se alivia también notablemente con la DSG, más incluso que con la administración de inhibidores de la bomba de protones (IBP), dispepsia manifestada tanto en forma de plenitud postprandial como de dolor epigástrico, sensación de malestar abdominal pobremente definido, flatulencia, meteorismo, distensión abdominal y cambios frecuentes en el ritmo intestinal, simulando, por tanto, las características de un trastorno funcional digestivo, aspecto que explica el retraso en el diagnóstico de muchos pacientes, especialmente los seronegativos. En estos casos, la seronegatividad es asumida como ausencia de EC, sin proceder a nuevas investigaciones. Por otro lado, la mejoría de estos síntomas tras una retirada empírica del gluten por parte del propio paciente, no asegura que el enfermo padezca una EC, ya que este fenómeno es común en el síndrome de sensibilidad al gluten no celiaca (Ludvigsson et al., 2013; Sainsbury et al., 2013; Kelly, 2016; Esteve & Carrasco, 2017).

Tabla 1. Síntomas y signos de la EC según la edad. Modificado de Polanco y Ribes, (1991).

Niños	
Síntomas	Signos
Diarrea Vómitos Dolor abdominal Anorexia Tristeza Irritabilidad Apatía Introversión	Distensión abdominal Malnutrición Hipotrofia muscular Anemia ferropénica Retraso ponderoestatural
Adolescentes	
Síntomas	Signos
Frecuentemente asintomáticos Dolor abdominal Cefalea Artralgias Menarquía retrasada Irregularidades menstruales Estreñimiento Hábito intestinal irregular	Aftas orales Hipoplasia del esmalte Distensión abdominal Debilidad muscular Talla baja Artritis, osteopenia Queratosis folicular Anemia por déficit de hierro
Adultos	
Síntomas	Signos
Dispepsia Diarrea crónica Dolor abdominal Síndrome de intestino irritable Dolores óseos y articulaciones Infertilidad y abortos recurrentes Parestesias, tetania Ansiedad, depresión eilepsia, ataxia	Malnutrición con o sin pérdida de peso Edemas periféricos Talla baja Neuropatía periférica Miopatía proximal Anemia ferropénica Hipertransaminemia Hipoesplenismo

Alteraciones gastrointestinales

La enteropatía de la EC es predominantemente proximal. La lesión característica se describe como una atrofia de las vellosidades de la lámina propia, hiperplasia de criptas, en las que se estimula la división de las células madre para reponer los enterocitos superficiales, e infiltración de las células inflamatorias, tanto en el epitelio del intestino delgado como en la lámina propia. Los LIE están aumentados (Marsh, 1992; Plugis & Khosla 2015; Woodward, 2015).

La presentación clínica de la EC a nivel gastrointestinal en el adulto es heterogénea y depende en gran medida de la longitud del intestino afectado y de la intensidad de las lesiones histológicas (Argüelles & Quero, 2017). Los pacientes con afectación de extensas áreas de intestino es más probable que presenten diarrea con esteatorrea y pérdida de peso (síntomas clásicos). Existen varios mecanismos que intervienen en la patogénesis de la diarrea: a) atracción de fluido a la luz intestinal debida a la presencia de hidratos de carbono no absorbibles osmóticamente activos; b) secreción activa de agua y electrolitos derivados de la hidroxilación bacteriana de los ácidos grasos no absorbidos; c) déficit en la secreción de bilis y fermentos pancreáticos debidos a una liberación defectuosa de colecistoquinina y secretina; d) cuando existe afectación del íleon, se añade el efecto catártico de las sales biliares no absorbidas sobre la mucosa del colon (diarrea colerética). La esteatorrea en pacientes con afectación limitada al intestino proximal es excepcional. La presencia de dolor abdominal relevante es poco habitual en la EC del adulto y su presencia debería sugerir la existencia de una

complicación grave, tal como invaginación, yeyunoileitis ulcerativa o linfoma intestinal (Kelly, 2016). Algunos pacientes desarrollan una estomatitis aftosa recurrente.

Manifestaciones extraintestinales y extradigestivas de la enfermedad celiaca

Tabla 2. Manifestaciones extraintestinales y extradigestivas de la EC.

Modificado de Kelly, (2016).

Manifestación	Causa probable
Cutáneas	
Edema Dermatitis herpetiforme Equimosis y petequias Hiperqueratosis folicular y dermatitis	Hipoproteinemia Autoinmunidad epidérmica mediada por TG2, deficiencia de zinc Deficiencia de vitamina K Malabsorción de vitamina A y del complejo B
Endocrinológicas	
Amenorrea, infertilidad, impotencia Hiperparatiroidismo secundario	Disfunción hipotálamo-hipofisaria-malnutrición Disfunción inmune Malabsorción de vitamina D y calcio
Hematológicas	
Anemia Hemorragia Trombocitosis, Cuerpos de Howell-Jolly	Déficit de hierro, folato, vitamina B12 o piridoxina Deficiencia de vitamina K, trombopenia secundaria y déficit de folato Hipoesplenismo
Hepáticas	
Elevación de transaminasas Hepatitis autoinmune	Hepatitis linfocítica Autoinmunidad
Musculares	
Sarcopenia Tetania Debilidad	Malnutrición debido a malabsorción Malabsorción de calcio, vitamina D y/o magnesio Atrofia muscular

Neurológicas	
Neuropatía periférica	Deficiencia de complejo B (B ₁₂ y tiamina)
Ataxia	Daño de cordones posteriores medulares y cerebral
Lesiones desmielinizantes del SNC	Disfunción neurológica inmunomediada
Vértigos	
Esqueléticas	
Osteopenia, osteomalacia, osteoporosis	Inflamación del intestino, malabsorción de calcio y vitamina D, hiperparatiroidismo secundario
Osteoartropatía	Desconocido
Fracturas	Osteopenia- osteoporosis
TG2: transglutaminasa tisular; SNC: Sistema nervioso central	

2.1.5. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA

La tasa de diagnóstico de la EC está aumentando en todo el mundo debido, en parte, a una mayor apreciación de la variabilidad en la presentación clínica. Hasta la década de 1950, la EC se diagnosticó sobre la base de observaciones clínicas centradas en las características de malabsorción. El desarrollo de la biopsia intestinal peroral (1955-1956) produjo un cambio sustancial en el paradigma del diagnóstico. En los años ochenta se desarrollaron pruebas serológicas sensibles y específicas para la EC (Kelly et al., 2015).

Aunque la EC se puede diagnosticar en cualquier momento de la vida, se realiza principalmente durante la primera infancia (entre 9 y 24 meses) o en la tercera o cuarta década de vida (Mäki, 1997; Feighery, 1999; Ciclitira et al., 2001; Fasano & Catassi, 2001; Gujral et al., 2012). Al contrario que en los niños, que la proporción de

diagnóstico en cuanto al sexo es 1/1, en personas adultas se diagnostica dos veces más en las mujeres, como ya se ha dicho anteriormente (Gujral et al., 2012).

El diagnóstico de la EC exige de un alto índice de sospecha por parte del clínico. De hecho, a pesar de la elevada sensibilidad y especificidad de las herramientas no invasivas disponibles, hasta un 70% de los celíacos permanecen sin diagnóstico (Polanco et al., 2006; Catassi et al., 2007). Ésto, obedece en gran medida a la heterogeneidad en los diferentes patrones de presentación, incluyendo aquellos que permanecen asintomáticos en el momento del diagnóstico.

Hoy en día, el diagnóstico puede llevarse a cabo mediante la conjunción de datos clínicos, serológicos, genéticos e histopatológicos. De acuerdo con las recomendaciones establecidas por la ESPGHAN (Husby et al., 2012; Ministerio de Sanidad, 2018), las biopsias intestinales pueden omitirse en niños y adolescentes claramente sintomáticos, con niveles de anti-TG2 ≥ 10 veces al valor de referencia en dos momentos distintos, verificados por anti-EmA y presencia de HLA DQ2 (DQ2.5 y/o DQ2.2) y/o HLA DQ8. En todos los demás casos la biopsia intestinal es necesaria para evitar diagnósticos incorrectos.

Ya que la EC puede presentarse con una gran variedad de signos y síntomas inespecíficos, es importante diagnosticar la EC no sólo en niños con síntomas gastrointestinales evidentes, sino también en niños que presenten un cuadro clínico menos claro para evitar consecuencias negativas para su salud. Por lo tanto, las pruebas de diagnóstico deben ofrecerse a los siguientes grupos de población:

- Niños y adolescentes con síntomas inexplicables y signos de diarrea crónica o intermitente, falta de crecimiento, pérdida de peso, crecimiento atrofiado, pubertad retardada, amenorrea, anemia ferropénica, náuseas o vómitos, dolor abdominal crónico, calambres o distensión, estreñimiento crónico, fatiga crónica, estomatitis aftosa recurrente (úlceras en la boca), dermatitis herpetiforme, erupción cutánea, fractura con traumas inadecuados, osteopenia u osteoporosis y bioquímica hepática normal (síntomas clásicos).
- Niños y adolescentes asintomáticos con patologías que aumenten el riesgo de padecer EC, como DMT1, Síndrome de Down, Enfermedad Tiroidea Autoinmune, Síndrome de Turner, Síndrome de Williams, deficiencia selectiva de IgA, Enfermedad Hepática Autoinmune, y parientes de primer grado con EC (Husby et al., 2012).

La mayoría de los pacientes adultos, como se ha dicho anteriormente, no presentan los síntomas gastrointestinales clásicos, por lo que el diagnóstico requiere que los médicos tengan una alta sospecha clínica de la EC (Hernández & Green, 2006; Castillo et al., 2015).

Figura 7. Secuencia de actuación diagnóstica de la EC en Atención Primaria.

Tomado de Ministerio de Sanidad, (2018).

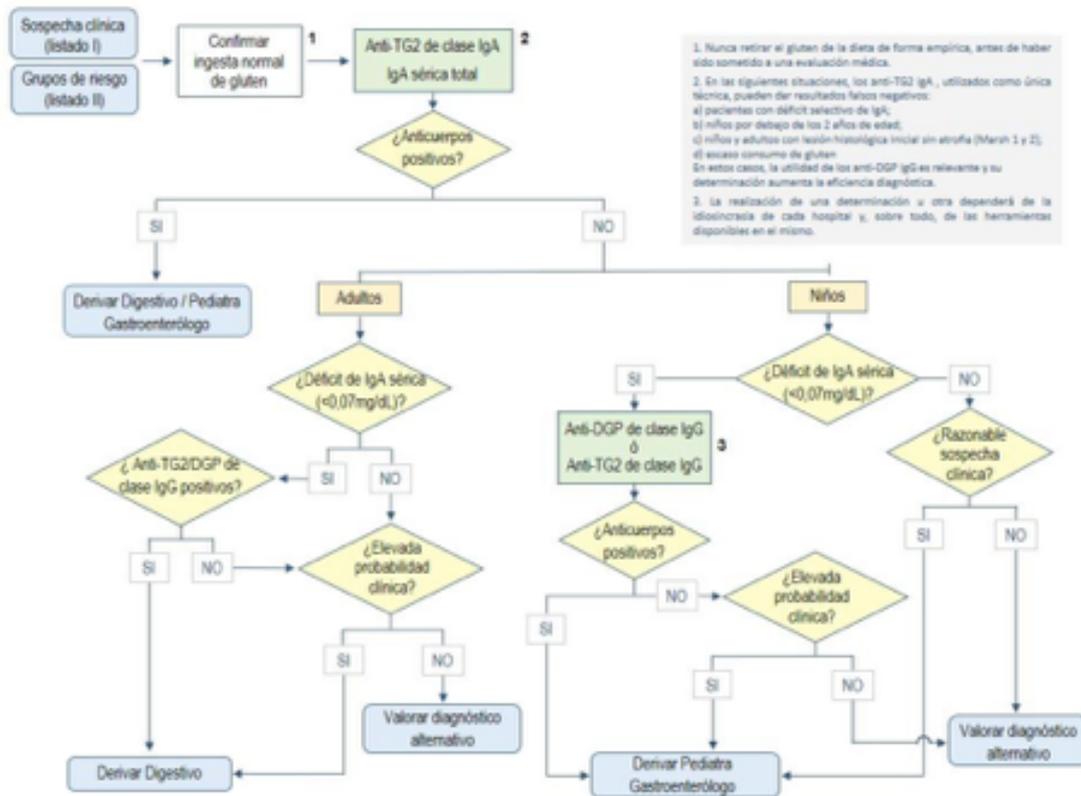
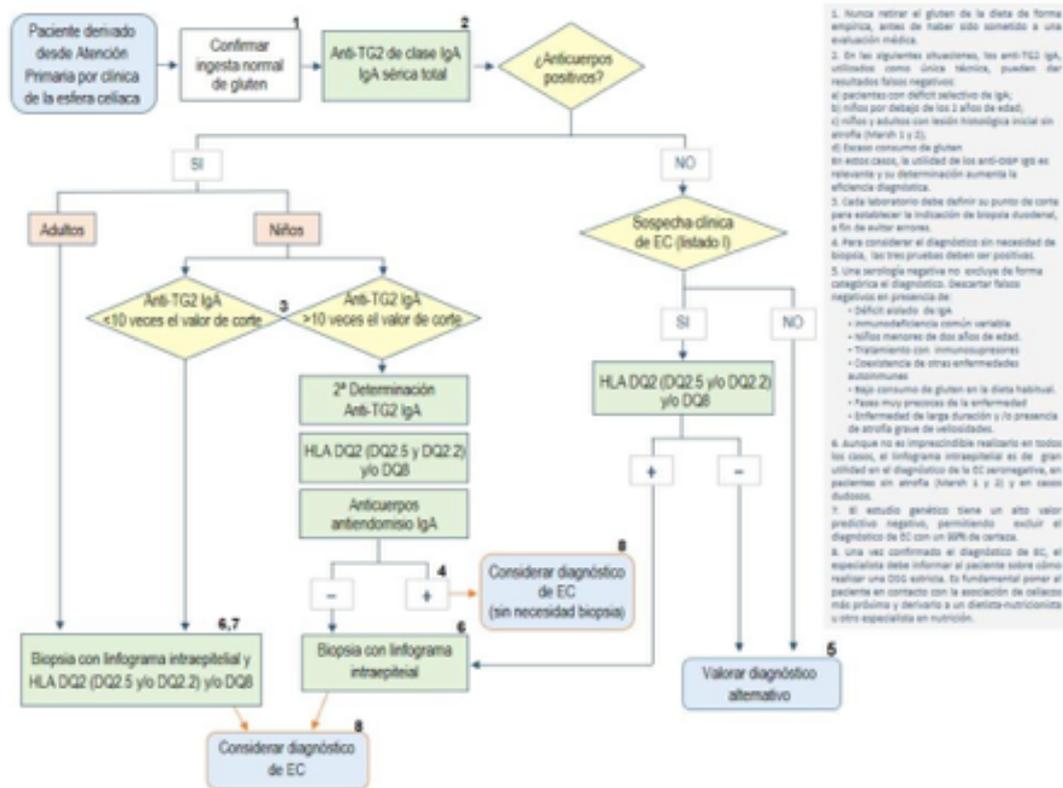


Figura 8. Secuencia de actuación diagnóstica de la enfermedad celiaca en Atención Especializada. Tomado de Ministerio de Sanidad, (2018).



2.1.5.1. ESTUDIO SEROLÓGICO

El diagnóstico de la EC ha cambiado como resultado de la disponibilidad de pruebas de anticuerpos específicos de la EC. Estas pruebas actuales basadas en los marcadores serológicos son extremadamente precisas, por lo que deben ser el enfoque inicial para evaluar individuos en los que se está considerando la EC. Antes de realizar

este tipo de pruebas, los pacientes deben llevar tomando una dieta que contenga gluten durante al menos un mes, ya que los anticuerpos séricos tienen una vida media de 30-60 días (Schuppan & Zimmer, 2013; Castillo et al., 2015; Sur et al., 2019).

Anticuerpos disponibles para el diagnóstico:

- *Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular 2 (anti-TG2) isotipo Inmunoglobulina A (IgA)*

Los anticuerpos anti-TG2 son los marcadores de elección para la detección serológica de la EC en individuos mayores de 2 años (Rubio-Tapia et al., 2013; Castillo et al., 2015; Sur et al., 2019). La TG2 es una enzima dependiente de calcio que desempeña un papel crucial en la patogénesis de la EC. Cuando se consume gluten, la mucosa del intestino delgado produce anti-TG2, que son detectados también en el suero de estos pacientes, pero desaparecen lentamente de la circulación cuando se empieza a seguir una DSG (Folk & Finlayson, 1977; Gujral et al., 2012).

Con la puesta a punto de un método enzimático para la determinación de anti-TG2, se ha extendido su uso en la práctica clínica debido a la alta sensibilidad y especificidad, en manos expertas por encima del 95%, las ventajas metodológicas, ya que se determinan mediante técnicas de enzimoanálisis, ELISA (“ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas”), más económicas y ecológicas que la inmunofluorescencia indirecta, y refleja con mayor exactitud el estado de la mucosa (Rostom et al., 2005; Castillo et al., 2015).

Sin embargo, se ha descrito que un 2-3% de los pacientes con EC tienen déficit de IgA, lo que puede dar lugar a falsos negativos. En estos casos se recomienda la determinación de anti-TG2 de tipo IgG o de anti DGP. Sólo en estos casos está recomendada la determinación de anti-TG2 de tipo IgG, ya que aunque en pacientes con deficiencia de IgA tenga una especificidad y sensibilidad del 95%, en pacientes con niveles normales de IgA tiene un rendimiento bajo (Rostom et al., 2005; Castillo et al, 2015).

- Anticuerpos anti-endomisio (anti-EmA) isotipo IgA

Antes del desarrollo de anti-TG2, el anticuerpo anti-EmA era la herramienta diagnóstica preferida para el diagnóstico de la EC. Su sensibilidad es más baja (80-90%), pero su especificidad es próxima al 100%, pues sólo reconocen epítomos de TG2 relacionados con la EC. Estos anticuerpos son detectados por métodos de inmunofluorescencia, una técnica subjetiva y semicuantitativa. Por ello, en la mayoría de los centros se reservan para confirmar resultados positivos de anti-TG2, especialmente cuando los títulos de anti-TG2 no son muy altos. Estos anticuerpos puede no detectarse en niños menores de dos años al igual que sucede con los anti-TG2 (Polanco & Ribes, 1991; Korponay-Szabó et al., 2003; Leffler & Schuppan, 2010; Kelly et al., 2015; Sur et al., 2019).

- *Anticuerpos anti-péptidos de gliadina desamidada (anti-DGP) isotipos IgG e IgA*

Son anticuerpos dirigidos frente a péptidos inmunodominantes producidos durante la digestión de la gliadina y desamidados en la submucosa intestinal por TG2. Se determinan por técnicas objetivas y cuantitativas (ELISA). Tanto los IgG como los IgA presentan una sensibilidad diagnóstica del 80-95% y una especificidad del 80-90%. En casos de déficit selectivo de IgA, pueden ser útiles los de clase IgG aunque no hay evidencia de una mayor eficacia comparados con los anti-TG2 IgG o los EmA IgG (Giersiepen et al., 2012). En niños menores de 2 años puede ser el primer marcador en positivizarse (Lagerqvist et al., 2008; Leffler & Shuppan, 2010; Rubio-Tapia et al., 2013; Castillo et al, 2015).

Circunstancias especiales

1. Deficiencia IgA coexistente. Los pacientes con deficiencia de IgA tienen un riesgo 10-20 veces mayor de desarrollar EC (Meini et al., 1996; Castillo et al, 2015). Lo ideal es evaluar inicialmente la IgA sérica en pacientes con alta sospecha de padecer EC. En pacientes con niveles bajos de IgA, las pruebas de anti-DGP y/o anti-TG2 basadas en IgG deben considerarse como parte de la evaluación serológica (Rubio-Tapia et al., 2013; Castillo et al, 2015).
2. Falsos positivos. A pesar de tener alta sensibilidad y especificidad, una prueba serológica positiva no confirma el diagnóstico de EC. En la mayoría de los

individuos, la prueba de anticuerpos IgA-anti-TG2 tiene un valor predictivo negativo muy alto. En raras circunstancias, IgA-anti-TG2 produce un resultado falso positivo debido a la reacción cruzada de anticuerpos. Algunas condiciones que pueden producir un resultado falso positivo son, pero no se limitan, a una infección entérica, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad hepática crónica e hipergammaglobulinemia (Leffler & Schuppan, 2010; Castillo et al, 2015).

3. Resultados falsos negativos. La razón más común para un anti-TG2 falso negativo es que el paciente ya esté siguiendo una DSG. Como se ha descrito anteriormente, la prueba de anticuerpos IgA-anti-TG2 es menos sensible en niños más pequeños (menores de 2 años) debido a que el sistema inmune es inmaduro, al igual que la deficiencia primaria de IgA, que es otra condición médica que podría potencialmente mostrar una prueba negativa basada en IgA (Leffler & Schuppan., 2010; Castillo et al, 2015).

De este modo, ya están disponibles una serie de valiosos marcadores serológicos que se usan rutinariamente para el diagnóstico y la monitorización de la EC. Sin embargo, es importante señalar que el 2-3% de las personas con EC, sobre todo niños, tienen resultados negativos en pruebas serológicas, debido a que tienen bajos títulos de anticuerpos o títulos que fluctúan entre los niveles positivos y negativos con el tiempo, lo que enfatiza la necesidad de repetir las pruebas cuando el primer resultado es negativo pero los síntomas persisten (Van Kalleveen et al., 2019). Las pruebas serológicas también varían en calidad, y algunas no han sido bien estandarizadas debido a obstáculos en la práctica clínica. La determinación simultánea o consecutiva de IgA-

TGt y IgG-DGP puede ser considerada como un predictor fuerte de la EC en la mayoría de los casos (Kelly et al., 2015).

2.1.5.2. ESTUDIO GENÉTICO

Los tipos HLA de clase II DQ2 y/o DQ8 se encuentran en casi todos los pacientes con EC, pero también en una parte importante de la población sana; sólo el 1% de los individuos con estos haplotipos desarrollan EC (Ludvigsson et al., 2014; Kelly et al., 2015). Esta prueba es ideal como apoyo al diagnóstico de la EC y tiene un alto valor predictivo negativo, es decir, la ausencia de HLA-DQ2 o HLA-DQ8 permite excluir la EC con un 99% de certeza (Sur et al., 2019).

Este estudio puede realizarse en pacientes con un diagnóstico incierto de EC, en pacientes asintomáticos con afecciones relacionadas con la EC para descartarla, o para realizar pruebas adicionales en el caso de ser positivos (Husby et al., 2012; Liu et al., 2014; Kelly et al., 2015). La prueba HLA tiene utilidad clínica determinadas situaciones como:

- Excluir la EC en familiares de primer grado y pacientes con enfermedades asociadas.
- Excluir la EC en pacientes sintomáticos con serología negativa y biopsia normal.
- Excluir la EC en pacientes con biopsia intestinal compatible con EC y serología dudosa o negativa.
- Celiaquía latente.

- Pacientes asintomáticos a los que se les ha retirado el gluten sin biopsia intestinal previa.
- Personas con anticuerpos positivos que rehacen la biopsia para reforzar el diagnóstico (Fasano et al., 2003).

2.1.5.3. BIOPSIA DE INTESTINO DELGADO

Las biopsias intestinales con fines diagnósticos deben realizarse en pacientes que consumen gluten, ya que pacientes con EC que siguen una DSG antes de realizarse las pruebas de diagnóstico por lo general dan serologías negativas e histologías duodenales normales, por lo que debe reintroducirse el gluten antes de realizarse la biopsia intestinal (Bao et al., 2012, Castillo et al, 2015).

La confirmación del diagnóstico de EC debe basarse en una combinación de hallazgos de la historia clínica, el examen físico, la serología y la endoscopia alta con toma de biopsias múltiples del duodeno (Rubio-Tapia et al., 2013). En las personas sometidas a una endoscopia alta en quienes las pruebas de laboratorio, los síntomas o las características endoscópicas sugieren EC, se debe considerar la biopsia duodenal (Ludvigsson et al., 2014). La endoscopia permite identificar los cambios macroscópicos de la mucosa, que son marcadores de enteropatía, a veces incluso en pacientes evaluados por razones distintas a la sospecha de EC (Kelly et al., 2015).

La biopsia de confirmación, ante una clínica y serología sugerentes de EC, asegura un diagnóstico correcto de EC antes de iniciar una DSG para toda la vida

(Lebwohl et al., 2018). Además, la biopsia de seguimiento contribuye a esclarecer el diagnóstico en pacientes seronegativos que responden bien a la retirada del gluten y proporciona una referencia basal cuando no se produce una buena respuesta a la dieta (Lebwohl et al., 2018).

En niños, se ha propuesto una estrategia de diagnóstico de EC sin biopsia (Husby et al., 2012). Para ello, es necesario que se cumplan una serie de condiciones: 1) síntomas propios de la enfermedad; 2) la presencia de títulos de anti-TG2 10 veces por encima del límite superior de referencia para el test utilizado; 3) un resultado de anti-EmA positivo en una muestra de sangre separada, y 4) la presencia de HLA DQ2 (DQ2.5 y/o DQ2.2) y/o DQ8. Esta estrategia es apropiada en niños cuidadosamente seleccionados por su especialista. La posible utilización de esta estrategia en adultos es motivo de debate pero los datos disponibles hasta el momento hacen aún prematuro la implementación de esta práctica (Lebwohl et al., 2018). Asimismo, su aplicabilidad sería baja ya que las formas de presentación clásica son mucho menos frecuentes en adultos que en niños.

Los cambios histológicos asociados a la EC son parcheados, por lo que se recomienda tomar biopsias duodenales múltiples para realizar el diagnóstico de la EC. La lesión de la mucosa está generalmente más pronunciada en el intestino proximal, y es leve o ausente en la parte distal. Es importante señalar que la ubicación, el número y la calidad (tamaño y orientación) de las biopsias pueden afectar al correcto del diagnóstico. Para maximizar la precisión diagnóstica, es recomendable tomar una o dos muestras de la región superior del bulbo, que deben ser cuidadosamente interpretadas,

ya que otras condiciones pueden presentar hallazgos histológicos similares a los observados en la EC (Bao et al., 2012; Castillo et al., 2015), y las otras cuatro biopsias deben ser de la segunda o tercera porción del duodeno (Husby et al., 2012; Husby et al., 2012; Rubio-Tapia et al., 2013; Ludvigsson et al., 2014; Kelly et al., 2015). Hay estudios que han estimado que hasta el 13% de los pacientes tienen la enteropatía característica localizada solamente en el bulbo duodenal (Nenna et al., 2012; Kelly et al., 2015).

Bajo microscopía óptica, los hallazgos histológicos más característicos de la EC son las vellosidades atrofiadas, hiperplasia de criptas, aumento del número de LIE, especialmente en la punta de la vellosidad, infiltración de la lámina propia por células mononucleares y anomalías estructurales en las células epiteliales. El informe patológico debe incluir una descripción del estado histológico intestinal según según la clasificación de Marsh-Oberhuber (Husby et al., 2012).

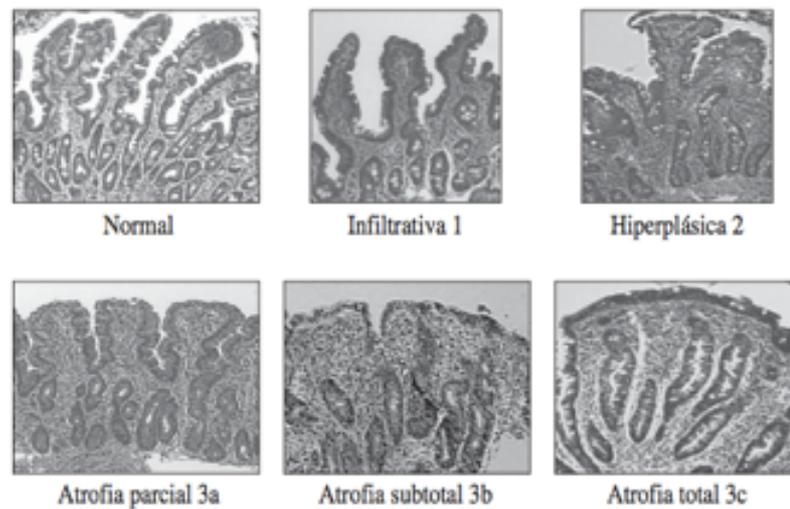
Clasificación de Marsh

Marsh estudió la teoría de una progresión de la lesión de la mucosa del intestino delgado en la EC (Marsh, 1992; Gujral et al., 2012).

De acuerdo con la clasificación de Marsh modificada, la mucosa normal se clasifica como Marsh 0, la linfocitosis intraepitelial como Marsh I, la linfocitosis intraepitelial con hiperplasia de criptas como Marsh II, y linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de criptas y atrofia vellositaria como Marsh III (Rostami et al., 1999; Gujral

et al., 2012). Posteriormente se desarrolló el sistema Marsh-Oberhuger, donde la etapa 3 se dividió en tres sub etapas (atrofia vellositaria parcial [3a], atrofia vellositaria subtotal [3b] y atrofia vellositaria total [3c]) (Marsh, 1992; Oberhuber et al., 1999; Gujral et al., 2012).

Figura 9. Tipos de lesión según Marsh. Tomado de Polanco y Ribes, (1991).



Aunque las lesiones Marsh 1, 2 y 3 se consideran compatibles con el diagnóstico, ningún tipo de lesión histológica descrita para la EC es específica (patognomónica) de esta entidad y ello comporta el riesgo de diagnosticar erróneamente a un paciente si no se realiza un correcto diagnóstico diferencial. Este riesgo es particularmente elevado en pacientes con lesiones clasificadas como tipo Marsh 1 que, si bien pueden observarse en algunos pacientes celíacos, también pueden corresponder a algunas de las siguientes patologías: infección por *Helicobacter pylori*, consumo

frecuente de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), estados de sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI), gastroenteritis por virus, infestación por *Giardia lamblia* o enfermedad de Crohn. Estas situaciones constituyen ejemplos de causas frecuentes de enteritis (o duodenosis) linfocítica y deben tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de la EC. Sin embargo, en pacientes sintomáticos con lesión tipo Marsh I, en los que se demuestre depósitos subepiteliales de TG2 o presencia de un linfograma intraepitelial con patrón inmunofenotípico característico (aumento de células $\gamma\delta$), hay que mantener un alto índice de sospecha de EC. La respuesta clínica y serológica tras la supresión del gluten de la dieta, permitirá confirmar el diagnóstico.

De acuerdo con las recomendaciones establecidas por la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) (Husby et al., 2012; Ministerio de Sanidad, 2018), las biopsias intestinales únicamente pueden omitirse en niños y adolescentes claramente sintomáticos, con niveles de anti-TG2 ≥ 10 veces al valor de referencia en dos momentos distintos, verificados por anticuerpos anti-endomisio (anti-EmA) y positividad de HLA DQ2 (DQ2.5 y/o DQ2.2) y/o DQ8. En todos los demás casos la biopsia intestinal es necesaria para evitar diagnósticos incorrectos (Elli et al., 2017; Sur et al., 2019).

En resumen, el diagnóstico de la EC se basa en la historia clínica de los pacientes, la serología y la endoscopia duodenal. El estudio genético de HLA se considera sólo para situaciones de dificultad diagnóstica o para descartar la EC (Kaukinen et al., 2002; Bourgey et al., 2007; Rubio-Tapia et al., 2009b; Kang et al.,

2013; Pallav et al., 2014; Castillo et al, 2015; Moscoso & Quera, 2015; Plugis & Khosla, 2015).

2.1.5.4. OTRAS PRUEBAS

- Cápsula endoscópica

En la actualidad, el uso de la cápsula endoscópica para el diagnóstico de la EC se limita a los pacientes que se niegan a la endoscopia superior, sobre todo si tiene una serología positiva (Rubio-Tapia et al., 2013; Kelly et al., 2015; Pennazio et al., 2015). Por otro lado, la cápsula endoscópica debería ser considerada para la evaluación de pacientes con EC complicada (salvo en casos con sospecha de estenosis). En este sentido, la Sociedad Europea de Gastroenterología Endoscópica (ESGE) recomienda la evaluación inicial mediante cápsula endoscópica seguida de enteroscopia por doble-balón ante la sospecha de EC complicada (Pennazio et al., 2015). Esta última técnica endoscópica permite obtener biopsias si se han apreciado lesiones significativas con la cápsula endoscópica. Si las biopsias se realizan con cápsula es necesario disponer de un estudio de coagulación previo, ya que algunos pacientes pueden tener un déficit de protrombina secundario a la malabsorción de vitamina K.

- Prueba de provocación

Hoy en día, en niños solo se contempla una prueba de provocación cuando el diagnóstico es dudoso (Husby et al., 2012). Tal es el caso de lesiones histológicas de

bajo grado (Marsh 1), individuos que no presentan las variantes de riesgo HLA DQ2 (DQ2.5 y/o DQ2.2) y/o HLA DQ8 o marcadores serológicos negativos en el momento de la sospecha clínica.

En la infancia, durante la prueba de provocación, la elevación de los autoanticuerpos junto con la recaída clínica permiten confirmar el diagnóstico (Husby et al., 2012).

En general, la prueba de provocación con gluten es necesaria cuando el paciente ha iniciado una DSG por cuenta propia, sin tener un diagnóstico formal de EC y refiere una mejoría sintomática con la retirada del gluten (Rubio-Tapia et al., 2013). Cabe destacar que la respuesta clínica a una DSG no permite realizar el diagnóstico de EC.

Existe controversia acerca de la cantidad de gluten necesaria y el tiempo de administración para realizar la prueba de provocación. En la práctica clínica, parece razonable administrar 10 g de gluten al día durante al menos 2 semanas y, si el paciente lo tolera clínicamente, mantener la pauta durante un mes antes de realizar una serología (anti-TG2) y una biopsia intestinal.

2.1.6. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD CELIACA: LA DIETA SIN GLUTEN

El único tratamiento disponible para la EC es una DSG estricta de por vida, que requiere evitar el trigo, la cebada, y el centeno, lo que da lugar a la remisión

sintomática, serológica e histológica, mejora el estado nutricional, incluyendo el peso corporal y la densidad ósea. La adherencia estricta a esta dieta es esencial para prevenir complicaciones a largo plazo (Green & Jabri, 2006; Kelly et al., 2015; Wagner et al., 2016; Nardecchia et al., 2019).

Willem-Karel Dicke comenzó esta terapia de la DSG en los Países Bajos en 1933 (Van Berge.Henegouwen y Mulder, 1993; Mulder et al., 2015), informando de que los pacientes con EC no podían tomar alimentos, bebidas o medicamentos que contuviesen cualquier cantidad de gluten de trigo, centeno, cebada, espelta, cebada, kamut u otros cereales que contuviesen gluten, ya que incluso pequeñas cantidades podrían ser dañinas (Mulder et al., 2015).

Con una DSG estricta, los niveles de anticuerpos disminuyen muy rápidamente (Tack et al., 2010; Mulder et al., 2015). Sin embargo, la normalización histológica tarda de 2 a 5 años, especialmente en los adultos (Wahab et al., 2002; Mulder et al., 2015). En los niños, la normalización histológica se alcanza cuando se lleva siguiendo la DSG de 3 a 6 meses, aunque en este grupo, los niveles de anticuerpos pueden tardar un año, o incluso un año y medio, en alcanzar unos niveles normales (Mulder et al., 2015).

Si la dieta es variada y equilibrada no suelen producirse carencias nutricionales (Ciacci et al., 2015), aunque no siempre es así (Vici et al., 2016). Además, al eliminar el gluten de la dieta, se dejan de consumir algunos productos que son ricos en fibra. Por este motivo, la DSG con frecuencia comporta una alteración del ritmo intestinal con tendencia al estreñimiento, tanto en la población infantil como en la adulta. Un mayor

consumo de legumbres, hortalizas, verduras y frutas puede subsanar este problema (Polanco, 2008; Nardecchia et al., 2019).

Etiquetado de alimentos sin gluten

La espiga barrada (Figura 10) es el símbolo internacional sin gluten y está actualmente regulado por la Sociedad de Asociaciones de Celiacos de Europa (AOECS), quien delega en sus asociaciones miembro la concesión de su uso y control. Por tanto, aquellas industrias interesadas en emplear este símbolo en sus productos deben solicitar certificarse bajo el Sistema de Licencia Europeo (ELS-European Licensing System) “Espiga Barrada”. Estas industrias pueden ser tanto empresas fabricantes de productos alimenticios específicos para personas celiacas como aquellas empresas fabricantes de productos alimenticios ordinarios o convencionales que, sin ser específicos para personas celiacas, puedan ser consumidos por éstas. Siempre debe quedar garantizada la seguridad de ausencia de contaminación por gluten en el producto alimenticio.

Figura 10. Símbolo internacional Sin gluten.



En España además existe la Marca de Garantía “Controlado por FACE” (Federación de Asociaciones de Celiacos de España), creada en el año 1999 debido al gran interrogante existente acerca de la dosis diaria de gluten que una persona celiaca podía tolerar, de forma que se garantiza al consumidor celiaco que los productos que portan este símbolo cumplen los requisitos que la FACE establece respecto a los niveles máximos de gluten, garantizando que los productos verificados son aptos para el consumo de personas celiacas.

Figura 11. Símbolo de Marca de Garantía “Controlado por FACE”



Según la directiva Europea, cualquier alimento etiquetado como “sin gluten” pueden contener hasta 20 mg de gluten por kg de producto (20 ppm) según establece el Reglamento Europeo (UE) No 828/2014 (Gujral et al., 2012; Reglamento 818/2014; Mulder et al., 2015; Woodward, 2015), que es la cantidad que se ha estimado como ingesta máxima permitida.

Dado el carácter permanente de la DSG, es fundamental que el paciente celiaco se acostumbre a revisar el listado de ingredientes y la composición nutricional de los productos que compra. Estos deben estar etiquetados “sin gluten”, ya que de esta forma

garantizan, según la legislación vigente, que el contenido en gluten está dentro de los límites permitidos, así como la ausencia de contaminación cruzada. No obstante, la composición de los productos “sin gluten” no siempre es la más adecuada, ya que, al no utilizar gluten, se incorporan otros ingredientes para mejorar su aspecto y palatabilidad, empleando en muchos casos grasas saturadas y azúcares. La elaboración de estos productos en casa es una buena opción, ya que de esta forma se puede controlar la calidad de los ingredientes.

Finalmente hay que tener en cuenta que algunos medicamentos pueden contener gluten como excipiente. Los prospectos de las especialidades afectadas deben incluir una advertencia del contenido de gluten, ya que su declaración es obligatoria (*Artículo 34 del Real Decreto 1345/2007 y Circular 02/2008 de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios*) (Circular 2/2008, AEMS).

Contaminación cruzada

Los productos manufacturados como salsas, caldos preparados, helados, embutidos, golosinas, postres, néctares de fruta, etc., aunque en origen partan de ingredientes sin gluten, siempre tienen riesgo, ya que en su proceso de fabricación se puede producir una contaminación con otros ingredientes que contienen gluten, al compartir las líneas de producción, de embalaje, entre otras (Lerner et al., 2019).

Por otro lado, los productos especiales artesanales como pan, tartas, etc., se deben comprar en obradores certificados que se dediquen exclusivamente a la

elaboración de productos sin gluten (PSG), ya que si son elaborados en panaderías o pastelerías donde trabajan con cereales con gluten, el riesgo de contaminación es muy alto (Lerner et al., 2019).

En cuanto a la ingesta de avena, la comunidad científica realiza actualmente estudios ya que existe controversia sobre si es bien tolerada o no, y si el hecho de que no sea bien tolerada está relacionado con la composición del cereal o con la contaminación cruzada con el trigo, el centeno o la cebada durante el cultivo, transporte, almacenamiento y tratamiento de los cereales (Comino et al., 2015). Aun así, la avena sin gluten certificada es bien tolerada por la mayoría de personas con EC y es aceptada ya como parte de la DSG (Koskinen et al., 2009; Kelly et al., 2015). Otros cereales como el arroz, el maíz o el mijo no contienen gluten (Woodward, 2015).

2.1.6.1. CUMPLIMIENTO Y DIFICULTADES DE LA DIETA SIN GLUTEN

La formación de las familias para adherirse a la DSG es muy importante, así como las consultas con gastroenterólogos y dietistas, que deben ser más frecuentes durante el primer año. Las familias en las que ya haya algún miembro celiaco y posteriormente se diagnostique a algún pariente, necesitan en general menos controles, ya que están más familiarizadas con la DSG (Mulder et al., 2015).

El incumplimiento de la DSG, llamado comunmente como transgresión, es extremadamente variable y oscila entre el 36% y el 95% (Rashid et al., 2005, Hall et al., 2009; Errichiello et al., 2010; Roma et al. 2010; Mazzone et al., 2011; Wagner et al.,

2016) . Se ha detectado que existen mayores dificultades para el cumplimiento dietético en adolescentes (Edwards George et al., 2009; Kautto et al., 2014; Wagner et al., 2016; Nardecchia et al., 2019). Entre las barreras que existen para el seguimiento de la DSG se encuentra la menor palatabilidad de los alimentos sin gluten, el etiquetado inexacto de los alimentos, la ausencia de síntomas tras el incumplimiento de la dieta y los problemas psicológicos (Edwards George, et al. 2009; Wagner et al., 2016; Nardecchia et al., 2019). No se ha encontrado asociación entre el incumplimiento de la dieta y los factores demográficos o inherentes a la enfermedad, concluyendo que las características cognitivas y emocionales podrían influir en la adherencia a la DSG (Hall et al., 2009; Wagner et al., 2016).

Durante la adolescencia, la influencia dentro del grupo de amigos y el compromiso en comportamientos de riesgo son típicos y pueden conducir a consecuencias perjudiciales en el contexto del tratamiento y el cumplimiento (Nardecchia et al., 2019). La adhesión estricta a la DSG requiere una atención constante y un mayor control sobre los alimentos. Una importante dificultad son las opciones limitadas de comida en contextos sociales, por ejemplo en un restaurante. Esto puede ser particularmente difícil en los períodos de transición como la adolescencia (Edwards George, et al., 2009; Wagner et al., 2016). Las dificultades con la adherencia a la DSG son más prominentes en el ambiente del grupo de amigos y menos en el ambiente familiar (Cinquetti et al., 1999; Wagner et al., 2016).

El "afrentamiento", ampliamente definido como un comportamiento para manejar situaciones estresantes, puede tener un impacto o modificar la adherencia a la

DSG, sin embargo muy pocos estudios han examinado esto y los estudios se limitan principalmente a las poblaciones adultas (Wagner et al., 2016).

En otro contexto, la dieta es extremadamente difícil de seguir para los hablantes no nativos, los inmigrantes, los analfabetos, los ancianos y los pacientes con un presupuesto bajo. Esto es aún problemático en el Medio Oriente, África del Norte, el subcontinente indio y América Latina (Makharia et al., 2014; Mulder et al., 2015).

Otra de las limitaciones actuales en el tratamiento de la EC en todo el mundo es la falta de especialización del personal médico. El número de gastroenterólogos especializado en EC es limitado, y, en muchos casos la experiencia es insuficiente. Lo ideal sería poder organizar el seguimiento en atención primaria, para lo que sería necesaria una formación y experiencia suficiente. Actualmente el acceso de un paciente celíaco a un gastroenterólogo bien entrenado es limitado (Mulder et al., 2010; Mulder et al., 2015).

2.1.6.2. DIETA SIN GLUTEN Y SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICA Y DE OTROS MICRONUTRIENTES

Los pacientes con EC con frecuencia tienen deficiencias nutricionales, más comúnmente en hierro, vitamina D, folato, vitamina B₁₂, vitamina B₆ y zinc (Wierdsma et al., 2013; Kelly et al., 2015; Nardecchia et al., 2019). Algunos pacientes con deficiencia de folato o vitamina B₁₂ desarrollan anemia macrocítica, que puede ser difícil de detectar en paciente que también tengan deficiencia de hierro. También se han

descrito trastornos neurológicos en asociación con la malabsorción de vitamina B₁₂, folato, cobre y vitamina D (McKeon et al., 2014; Kelly et al., 2015; Nardecchia et al., 2019). La DSG conduce generalmente a la recuperación de la anemia por deficiencia de hierro entre los 6-12 meses posteriores, mientras que la deficiencia de zinc mejora a las semanas. La adherencia a la DSG también conlleva una mejoría en la densidad mineral ósea en una proporción importante de casos (Valdimarsson et al., 1996; Mautalen et al., 1997; Sategna-Guidetti et al., 2000; Vázquez et al., 2000; Blazina et al., 2010; Nardecchia et al., 2019). A ello debe asociarse un conjunto de medidas relacionadas con el estilo de vida (Thompson et al., 2005; Passananti et al., 2012): evitar el consumo de tabaco y el abuso de alcohol, evitar la vida sedentaria, realizar ejercicio regular y ejercicios soportando peso, así como realizar una ingesta mínima diaria de 1500 mg de calcio. Los pacientes con osteoporosis graves que no responden a la DSG, estilo de vida saludable y reposición de calcio y vitamina D pueden requerir formas más avanzadas de tratamiento (Nardecchia et al., 2019).

En algunos casos los pacientes con EC requieren reponer otros micronutrientes tales como vitamina A, complejo B (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina), así como vitamina C y E, generalmente en forma de multivitamínico, dada la predisposición a desarrollar déficits de estos minerales y vitaminas. Algunos pacientes pueden beneficiarse igualmente de la reposición de cobre, zinc y magnesio (Jones & Peters, 1981).

2.1.7. SEGUIMIENTO

El carácter sistémico de la EC aconseja un abordaje multidisciplinar. La consulta con el gastroenterólogo es necesaria inicialmente durante todo el proceso diagnóstico de la EC, y posteriormente, para la monitorización y adecuada interpretación de los resultados de las pruebas solicitadas durante el seguimiento, así como para la identificación y correcto manejo de las complicaciones asociadas.

Existe un acuerdo general en las pautas que los pacientes deben seguir después de su diagnóstico. Hay evidencias de que la adherencia a una DSG mejora al tener un seguimiento regular (Mulder et al., 2015). Un seguimiento médico periódico ayuda a valorar la evolución de los síntomas, controlar el crecimiento en niños, a vigilar el cumplimiento de la dieta y detectar la posible aparición de complicaciones (Husby et al., 2012; Rubio-Tapia et al., 2013; Ludvigsson et al., 2014; NICE, 2015; Pennazio et al., 2015; Snyder et al., 2016; Nardecchia et al., 2019).

La frecuencia de los controles varía con la evolución clínica de la EC, independientemente de la edad. Al principio del tratamiento, si es necesario, se deben hacer mensualmente hasta la desaparición de los síntomas. El tiempo necesario hasta que los títulos de autoanticuerpos se normalizan depende del nivel inicial, pero, en general, se consigue en los 6-12 meses posteriores al inicio de la exclusión del gluten de la dieta. No obstante, su negativización puede ser más lenta, pero la disminución significativa durante el primer año es un signo de adherencia a la DSG. Los pacientes cuyas características serológicas no mejoran deben ser reevaluados, por si siguiese

existiendo una exposición continua al gluten de la que el individuo no sea consciente, que en la mayoría de los casos suele ser la causa de que persistan sintomáticos o mantengan títulos elevados de autoanticuerpos (Husby et al., 2012; Bai et al., 2013; Rubio-Tapia et al., 2013; Kelly et al., 2015).

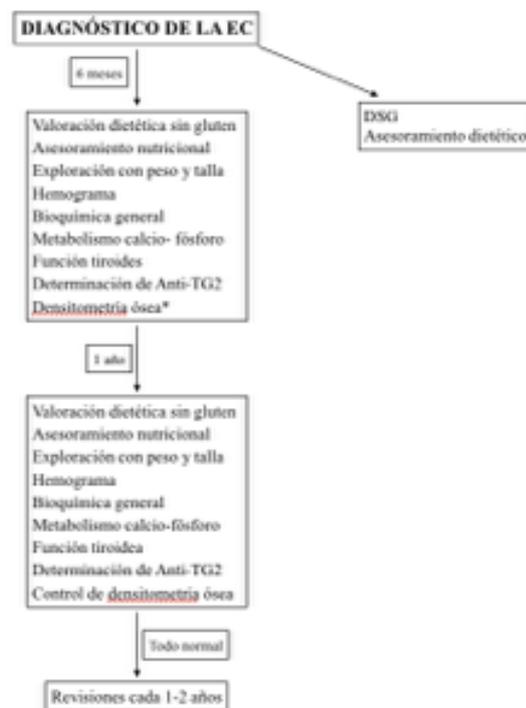
Los puntos clave en el seguimiento clínico en un primer momento son la normalización del peso, la prevención del sobrepeso y la cicatrización de la mucosa, lo que significa una normalización de la histología a Marsh 0-1 (Mulder et al., 2015). La baja densidad mineral ósea es también una de las manifestaciones extra-intestinales más comunes de la EC, por lo que, generalmente, durante el primer año después del diagnóstico, se recomienda la evaluación DXA (Rubio-Tapia et al., 2013). Otros objetivos son la confirmación del diagnóstico mediante la evaluación de la respuesta a una DSG estricta, la monitorización del grado de adherencia a las recomendaciones dietéticas, reforzando siempre la importancia de su cumplimiento, la educación sobre la enfermedad y medidas de soporte y la detección precoz de enfermedades asociadas o complicaciones (Kelly et al., 2015; Nardecchia et al., 2019).

En el adolescente, la transferencia al especialista de adultos debe realizarse en una época de la vida en la que el paciente presente estabilidad social y emocional, evitando periodos más inestables. Un proceso de transición, planificado, continuo y con participación de los médicos, enfermeros, dietistas-nutricionistas, psicólogos, familia y paciente facilita la continuidad asistencial, mejora la confianza del adolescente celiaco y asegura un adecuado seguimiento, mejorando la calidad de vida del paciente en un momento crítico de su vida. La participación de dietistas-nutricionistas profesionales es

de gran importancia en el manejo de la enfermedad a largo plazo y ayuda a que los pacientes sigan una dieta equilibrada, calibrada y nutricionalmente correcta.

A su vez, es de gran utilidad la colaboración desinteresada de las Asociaciones de Celiacos, que ofrecen a padres y pacientes información y asesoramiento sobre cómo llevar a cabo una dieta correcta, a la vez que facilitan una mejor comprensión y adaptación a la enfermedad.

Figura 12. Protocolo general de actuación tras el diagnóstico de la EC en la infancia. Ministerio de Sanidad, (2018).



2.1.7.1. SEGUIMIENTO SEROLÓGICO

Los anticuerpos IgA anti-TG2 son el método preferido para controlar la calidad del cumplimiento de la DSG aunque los errores dietéticos puntuales no son detectados por este método. Interpretando esta prueba directa, un paciente celiaco que lleva siguiendo una DSG durante al menos 6-12 meses debe dar un resultado negativo. Los niveles de IgA anti-TG2 deben ser tan cercanos a cero como sea posible, lo que indica una respuesta mínima de anticuerpos al gluten, o mostrar al menos una disminución significativa y continua. El anti-EmA puede permanecer positivo durante el seguimiento de la DSG incluso durante años. Ésta es la manera más fiable de supervisar el cumplimiento de una DSG (Mulder et al., 2015).

2.1.7.2. SEGUIMIENTO MEDIANTE ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE SANGRE

Hasta finales de los años ochenta, el sello de control era la disminución significativa o normalización de los marcadores de malabsorción, como la grasa en las heces. Para los pacientes que presentan desnutrición grave o pérdida de peso en curso, es muy importante evaluar de manera exhaustiva el estado nutricional y la capacidad de absorción intestinal. Basándose en la experiencia de varios estudios, se ha comprobado que la mayoría de los pacientes adultos, dentro de un diagnóstico precoz, con presentación no clásica de la EC, en el momento del diagnóstico presentan deficiencia de vitaminas y minerales séricos (Wierdsma et al; 2013; Mulder et al., 2015).

Por lo tanto, se recomienda controlar el peso corporal y algunos parámetros nutricionales como la vitamina B₆, el ácido fólico, la vitamina B₁₂, e zinc, el calcio, la fosfatasa alcalina, la vitamina D, la hemoglobulina, el hierro (vitaminas liposolubles), y la hormona paratiroidea al inicio del diagnóstico; así como hacer un seguimiento más exhaustivo hasta que los valores se encuentren en niveles satisfactorios o próximos lo ideal. Con frecuencia se revisan también las llamadas condiciones autoinmunes asociadas, como la hormona tiroidea (Mulder et al., 2015).

2.1.7.3. SEGUIMIENTO MEDIANTE ESTUDIO HISTOLÓGICO

En el pasado, se repetían biopsias intestinales después de un año de estar siguiendo la DSG, sin embargo, hoy en día, sólo se repiten en pacientes con anomalías graves, o por falta de mejoría o quejas persistentes (Mulder et al., 2015).

2.1.8. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Las limitaciones de la DSG han llevado a una búsqueda de otras terapias alternativas (Leffler et al., 2007; Aziz et al., 2011; Singh et al., 2011; Mukherjee et al., 2012; Lebwohl et al., 2013a; MacCulloch & Rashid, 2014; Shah et al., 2014; Kelly et al., 2015). Los avances en la comprensión de la inmunopatogénesis de la EC han contribuido al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que podrían mejorar la salud general y la calidad de vida de estas personas. Estas estrategias incluyen:

- Desintoxicación del gluten

Consiste en el desarrollo de reactivos para degradar o alterar el gluten dietético, como las prolil-endoropeptidasas (PEPs) recombinantes de una variedad de bacterias y de hongos, que son capaces de proteolizar los péptidos de gliadina tanto in vivo como in vitro (Shan et al., 2004; Mitea et al., 2008; Plugis & Khosla, 2015). Un dato importante es que estas enzimas mantienen tanto la función como la estructura en el rango de pH del tracto gastrointestinal humano (Gujral N et al., 2012; Mooney et al., 2014; Castillo et al, 2015; Plugis & Khosla, 2015).

- Modulación de la permeabilidad intestinal

Los recientes descubrimientos sobre el intrincado mecanismo que regula las vías paracelulares epiteliales intestinales han llevado al descubrimiento de la zonulina, una proteína ampliamente investigada en una gran variedad de condiciones clínicas incluyendo la EC (Sapone et al., 2006; Castillo et al, 2015). Otro descubrimiento ha sido el acetato de larazotide, un péptido regulador de unión y que controla los cambios celulares inducidos por la gliadina y las citoquinas, que inhibe la translocación de un péptido de la gliadina altamente implicado en la EC (Gopalakrishnan et al., 2012; Castillo et al, 2015). Los datos obtenidos sobre la seguridad y eficacia del acetato de larazotide sugieren que puede ser un agente prometedor para el tratamiento de la EC (Gujral et al., 2012).

- Glucocorticoides con baja biodisponibilidad sistémica

Los glucocorticoides se utilizan frecuentemente para inducir la remisión o reducir la morbilidad de enfermedades inmunomediadas, como el asma. Aunque los efectos secundarios limitan su utilidad en el tratamiento de trastornos crónicos, puede ser posible utilizar glucocorticoides tópicamente activos con efectos farmacológicos sobre la mucosa intestinal (Plugis & Khosla, 2015).

- Modulación de la respuesta inmune

La inducción de la tolerancia a través de la vacunación ha sido también ampliamente considerada. En la EC, la respuesta proinflamatoria a lo largo de la vía inmunogénica da lugar a la producción de citoquinas, tales como TNF- α , IFN- γ e IL-15, lo que sugiere un enfoque plausible con terapias basadas en anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra el TNF- α (infliximab) han sido ampliamente estudiados en la enfermedad inflamatoria intestinal, y, anecdóticamente, el infliximab ha tenido éxito en el tratamiento de algunos casos de ECR (Malamut et al., 2010; Gujral et al., 2012; Castillo et al, 2015; Plugis & Khosla, 2015).

- Polímeros secuestrantes de gluten

Consiste en la utilización de resinas poliméricas administradas oralmente, que secuestran péptidos de gliadina en el lumen del intestino delgado antes de que puedan inducir sus efectos inmunotóxicos en la lámina propia (Plugis & Khosla, 2015).

- Probióticos para la proteólisis de gluten

Estudios in vitro han demostrado que varias bifidobacterias son capaces de hidrolizar los péptidos de gliadina en péptidos menos inmunogénicos (Angelis et al., 2006; Gujral et al., 2012; Plugis y Khosla, 2015).

De todas estas opciones, sólo dos agentes se encuentran en la fase 2 de ensayos clínicos. Una de ellas, dos proteasas específicas de gluten que administradas oralmente se ha demostrado que reducen la lesión de la mucosa del intestino delgado causada durante 6 semanas de prueba de provocación de gluten (Lahdeaho et al., 2014; Kelly et al., 2015;). La otra, el acetato de larazotide, que modula las uniones intestinales estrechas, que ha demostrado que reduce los síntomas en los pacientes en respuesta a la prueba de provocación de gluten. Se están llevando a cabo estudios adicionales para determinar si estos fármacos son seguros y eficaces para pacientes con síntomas persistentes y lesiones en la mucosa a pesar de seguir una DSG continuada. Estas u otras terapias eficaces podrían reducir la carga de la DSG al disminuir los efectos de la exposición inadvertida al gluten (Kelly et al., 2015).

2.1.9. MANIFESTACIONES SISTÉMICAS DE LA ENFERMEDAD CELIACA

La EC es una patología que no sólo afecta a nivel intestinal, sino que, en ocasiones, tiene una serie de complicaciones y de efectos a nivel sistémico. Estos efectos que se describen a continuación están estrechamente relacionados con:

- El daño ocasionado por el estrés oxidativo (EO) y el estado inflamatorio al que los pacientes se someten cuando todavía no están siguiendo la DSG. La alteración del estado inflamatorio se ha demostrado que persiste incluso después del seguimiento a largo plazo de la DSG.
- Las deficiencias nutricionales relacionadas con la falta de absorción que existe en general debido a la atrofia de las vellosidades intestinales en situaciones en las que no se ha seguido una DSG o cuando no ha pasado el tiempo suficiente para que éste se recupere (Nardecchia et al., 2019).
- La falta ingestión de nutrientes durante el seguimiento de la DSG por una importante restricción de alimentos. Las deficiencias nutricionales más frecuentes son el hierro, la vitamina D, el folato, la vitamina B₁₂, la vitamina B₆ y el zinc (Kelly et al., 2015).

La EC es una patología autoinmune. Las EAI son, en muchos casos, debidas a una predisposición genética que hace a los individuos susceptibles a padecer patologías de este tipo, como son la DMTI, la tiroiditis autoinmune, la artritis reumatoide, la hepatitis autoinmune, el síndrome de Sjogren, el lupus sistémico, el síndrome antifosfolípido o la miastenia gravis, pudiendo, de esta forma, estar relacionadas todas ellas (Nardecchia et al., 2019).

En los pacientes con EC también se han descrito trastornos neurológicos que están principalmente relacionados con la malabsorción de vitamina B₁₂, folato, cobre, y vitamina D. Las carencias vitamínicas y nutricionales están relacionadas con muchas

patologías neuropsiquiátricas. Estos trastornos albergan también en algunas ocasiones aspectos como alteraciones en el sueño, sentimientos de ansiedad, preocupación por el estado de salud, depresión y exclusión social (Black & Orfila, 2011; McKeon et al., 2014; Kelly et al., 2015; Nardecchia et al., 2019).

Otras alteraciones que se encuentran en individuos con EC, pero que se normalizan tras el seguimiento de la DSG, son la función esplénica, que puede traducirse en un mayor riesgo de sufrir algunas enfermedades bacterianas (Shuppan & Zimmer, 2013; Woodward, 2015) y la elevación de las transaminasas (Polanco & Ribes, 1991).

- Osteoporosis

Entre el 50-70% de los pacientes con EC sufren osteoporosis en el momento del diagnóstico (Malamut & Cellier, 2015), de forma que la densidad ósea es un parámetro que debe medirse en todos los pacientes.

La aparición de osteopenia u osteoporosis es una de las consecuencias más frecuentes de la EC y su origen es igualmente multifactorial: interferencia en el balance entre la actividad de los osteoblastos y osteoclastos debido al efecto de citoquinas proinflamatorias liberadas desde el intestino inflamado, la malabsorción de calcio y vitamina D, el secuestro de calcio y magnesio en los ácidos grasos (AG) no absorbidos en la luz intestinal y la movilización del calcio almacenado en el hueso por los efectos del hiperparatiroidismo secundario a la hipovitaminosis D (Corazza et al., 1995;

Kemppainen et al., 1999; Di Stefano et al., 2013; Nardecchia et al., 2019). Es importante considerar que algunos pacientes alcanzan la edad adulta sin haber presentado síntomas digestivos relevantes en la infancia. Tales casos acuden al médico por dolores óseos, especialmente en la columna lumbar, la caja torácica y la pelvis, descubriendo imágenes de colapsos o acuñaamientos vertebrales en las radiografías simples de la columna que habían pasado inadvertidos. Algunos pacientes son finalmente diagnosticados de osteoporosis idiopática del adulto joven, sin haber considerado la posibilidad de una biopsia duodeno-yeyunal. La prevalencia de osteopenia y osteoporosis es alta entre la población de celíacos diagnosticados en la edad adulta y se correlaciona con la gravedad histológica (Cellier et al., 2000; García-Manzanares et al., 2012; Nardecchia et al., 2019). El riesgo aumentado de fracturas en los pacientes celíacos es controvertido y no ha sido completamente establecido (Vázquez et al., 2000; Thomason et al., 2003; Olmos et al., 2008; Kelly, 2016).

Hay autores que han demostrado que la disminución de la absorción de calcio conduce a una baja densidad ósea y a un mayor riesgo de fractura, siendo el lugar de fractura más común el antebrazo, donde la osteopenia es mayor (Thomason et al., 2003; Malamut & Cellier, 2015).

La DSG a largo plazo produce un aumento significativo de la densidad ósea (West et al., 2003; Woodward, 2015), aunque raramente se alcance su normalización (Corazza et al., 1995; Malamut & Cellier, 2015). Durante el seguimiento, se debe medir la fosfatasa alcalina de calcio, la vitamina D y la hormona paratiroidea para el aumento compensatorio de la masa ósea. De esta forma, en numerosas ocasiones, si los niveles

séricos son insuficientes, además de la DSG, este tipo de pacientes son tratados con calcio y suplementos de vitamina D para tratar la osteopenia, evitar el riesgo de fracturas e intentar alcanzar una normalización de la densidad ósea (Malamut & Cellier, 2015; Mulder et al., 2015; Nardecchia et al., 2019).

- Dermatitis herpetiforme (DH)

La dermatitis herpetiforme (DH) es la manifestación cutánea de la EC. Ambas se consideran ambas EAI con un desencadenante específico (el gluten) y un fondo genético común (HLA-DQ2/DQ8). La DH es una agrupación de pápulas herpetiformes urticadas con extrema picazón, especialmente en el lado extensor de los codos y rodillas, espalda, nalgas y en el cuero cabelludo. La erupción es crónica, puede continuar durante un periodo de tiempo prolongado. La mejora con la DSG tarda varios meses, y la remisión total puede tardar años (Cardones & Hall, 2012; Mulder et al., 2015; Nardecchia et al., 2019).

En un estudio realizado por Lombardo et al. (2019), han demostrado una diferencia en el daño basal del ADN entre los fibroblastos cutáneos de pacientes con DH y controles, y un aumento significativo de este daño después de la exposición al gluten.

La dapsona (diamonodifenilsulfona) y la sulfapiridina son los medicamentos primarios para tratar la DH. Normalmente se inicia con dapsona, aunque deben controlarse los efectos secundarios, y para los pacientes que no la toleran, se sustituye el tratamiento por la sulfapiridina, aunque el cumplimiento de la DSG puede curarla a

largo plazo o mantenerla controlada (Mulder et al., 2015). Lombardo et al. (2019) han demostrado que el daño al ADN en los fibroblastos cutáneos de pacientes celíacos con DH tratados con dapsona, al contrario de los no tratados, es similar al del grupo control, lo que demuestra la efectividad del tratamiento con este medicamento respecto al EO y al daño al ADN.

- Anemia o ferropenia

La anemia es una manifestación común en la EC (Karnam et al., 2004; Lau et al., 2016; Peters y Tighe, 2017; Spencer et al., 2017) y su patogénesis puede ser multifactorial, incluyendo la malabsorción de hierro y folato en el intestino proximal y la malabsorción de vitamina B₁₂ en los casos de afectación ileal. La disbiosis comúnmente observada en la EC contribuye igualmente al hiperconsumo de cobalamina en la luz intestinal. La ferropenia sin anemia puede ser también un rasgo típico en pacientes con EC. La ferropenia es aquella condición clínica en la que el hierro disponible es insuficiente para satisfacer los requerimientos metabólicos del organismo, pudiendo cursar con o sin anemia y por sí misma puede producir síntomas, tales como debilidad, fatiga, baja tolerancia al ejercicio y falta de concentración que, si bien pueden deteriorar profundamente la calidad de vida del individuo, a menudo solo llegan a reconocerse cuando los depósitos de hierro han sido restablecidos. Especial atención requieren aquellos pacientes diagnosticados de EC en quienes el déficit de hierro no se resuelve tras el correcto seguimiento de la DSG (Efthymakis et al., 2017; Nardecchia et al., 2019).

- Enfermedades autoinmunes

El vínculo entre la EC y las EAI está firmemente establecido, de hecho, como se ha dicho anteriormente, existen genotipos que las asocian.

Entre el 15-20% de los pacientes con EC presentan o desarrollarán EAI (Cosnes et al., 2008; Malamut & Cellier, 2015). A demás de la dermatitis herpetiforme, las EAI más frecuentes asociadas a la EC son la DMTI y la tiroiditis autoinmune, seguidas, en menos proporción de artritis reumatoide, hepatitis autoinmune, síndrome de Sjogren, lupus sistémico, síndrome antifosfolípido o miastenia gravis (Collin et al., 1994; Cosnes et al., 2008; Iqbal et al., 2013; Malamut & Cellier, 2015; Nardecchia et al., 2019).

- Síntomas neurológicos y psiquiátricos

Determinadas enfermedades neurológicas aparecen con mayor frecuencia en adultos con EC y, de hecho, forman parte del espectro clínico de su presentación (Lewis & Pallis, 1974; Bushara, 2005; Freeman, 2008; McKeon et al., 2014; Tarabzouni & AlKhairallah, 2017). Entre ellas se citan la ataxia no hereditaria, conocida como gluten-ataxia (Hadjivassiliou et al., 1998; Hadjivassiliou et al., 2015), que puede ser incluso la única manifestación de la enfermedad y que se atribuye a un daño inmunológico del cerebelo, cordones posteriores de la médula y nervios periféricos; diversas formas de neuropatía periférica con parestesias, debilidad muscular y pérdida de sensibilidad, asociada a fenómenos de desmielinización focal y parcheada de la médula espinal, encefalopatía de Wernicke, y epilepsia con calcificaciones cerebrales parieto-occipitales bilaterales (Gobbi et al., 1992; Gobbi, 2005), distonía orofacial idiopática (Tarabzouni

& AlKhairallah, 2017) y demencia vascular (Lebwohl et al., 2016). Aunque se ha postulado que el déficit de absorción del complejo vitamínico B (B₁₂, tiamina, riboflavina y piridoxina) puede jugar un papel en la patogénesis de estos trastornos, ciertamente la neuropatía periférica y la ataxia a menudo no revierten con la DSG (Hadjivassiliou et al., 2015; Nardecchia et al., 2019).

En cuanto a otras manifestaciones psiquiátricas (autismo, trastornos del carácter y psicosis, dolores de cabeza), no existe suficiente evidencia de su posible relación con la EC (Ergün et al., 2017; Brietzke et al., 2018) ni tampoco hay evidencia sobre cuales son los mecanismos patogénicos y la influencia de la DSG sobre la calidad de vida de estos pacientes (Peters et al., 2014; Cossu et al., 2017; Nardecchia et al., 2019). En cambio, son muchos autores los que han valorado cambios en el comportamiento de pacientes con EC, trastornos depresivos o insomnio pero casi siempre se los ha relacionado con las dificultades para el afrontamiento de la DSG al llegar a la adolescencia (Peters et al., 2014).

Existe un estudio (Konturek et al., 2011), que relaciona la exposición al estrés (especialmente al estrés crónico) como un factor de riesgo importante en la patogénesis de diferentes enfermedades del tracto gastrointestinal, incluida la EC entre otras (Figura 13). Este estudio dice que el estrés aumenta la permeabilidad intestinal, la sensibilidad visceral, la alteración de la motilidad gastrointestinal y conduce a una activación profunda de los mastocitos que produce la liberación de muchos mediadores proinflamatorios (Figura 14), lo que debería ser motivo de estudio para la relación que

pueda tener el estrés en la no mejoría o empeoramiento de los síntomas gastrointestinales de la EC y en la recuperación inflamatoria.

Figura 13. Consecuencias fisiopatológicas de la alteración del eje cerebro-intestino-microbiota por el estrés. La exposición al estrés conduce a la alteración del eje cerebral (BGA), lo que resulta en el desarrollo de diferentes enfermedades del tracto gastrointestinal, incluida la enfermedad por reflujo gastroesofágico, enfermedad de úlcera péptica, enfermedad del intestino irritable, enfermedad inflamatoria del intestino y alergia a los alimentos que pueden ser confundidas con la EC o puede afectar a en la recuperación de los síntomas gastrointestinales de la EC. Tomado de Konturek et al., (2011).

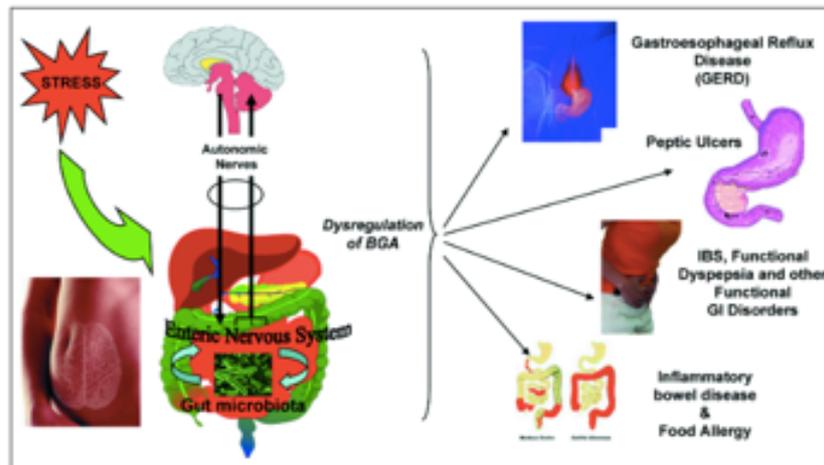
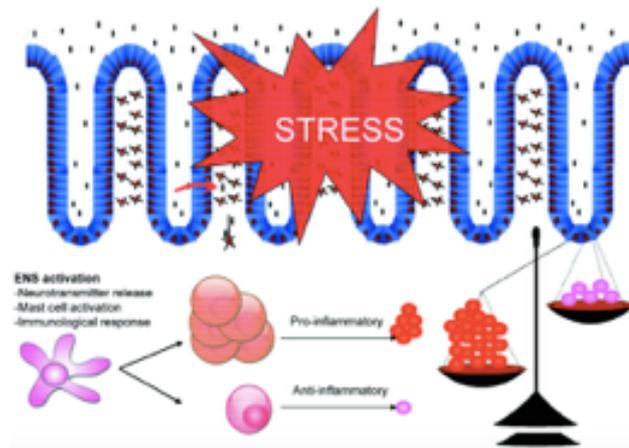


Figura 14. El estrés conduce al cambio hacia una mayor expresión de las citocinas proinflamatorias en la mucosa colónica. Tomado de Konturek et al., (2011).



- Riesgo de enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares que se han asociado con la EC incluyen la cardiopatía isquémica, los eventos cerebrovasculares y la miocardiopatía. Como en la artritis reumatoide, el riesgo de cardiopatía isquémica puede estar relacionado con las células inmunitarias proinflamatorias activadas, algunas de las cuales continúan alteradas después del seguimiento de la DSG (Choy et al., 2014; Mulder et al., 2015), y con el bajo estado de ácido fólico, que podría afectar al desarrollo de lesiones arterioscleróticas (Mulder et al., 2015).

- Infertilidad

Entre las mujeres celiacas no tratadas son frecuentes la menarquia tardía, abortos recurrentes, partos prematuros, menopausia precoz y dificultades para la fecundación (Molteni et al., 1990; Collin et al., 1996; Gasbarrini et al., 2000; Di Simone et al., 2010; Özgör & Selimoğlu, 2010; Soni & Badawy, 2010; Tersigni et al., 2014).

Por otra parte, en hombres con EC no tratada, se ha descrito una mayor incidencia de impotencia y anomalías en el recuento de espermatozoides como causas de infertilidad. La malabsorción de folato, alteraciones en el control hipotálamo-hipofisario de la función gonadal y/o resistencia de las gónadas a los andrógenos se han postulado como mecanismos plausibles de tales trastornos y, de hecho, éstos pueden revertir tras iniciar una DSG a partir del diagnóstico de la EC (Farthing et al., 1983).

- Enfermedad celiaca refractaria

Algunos pacientes con EC experimentan una recaída de los síntomas y del daño intestinal a pesar de la retirada del gluten. En la mayoría de estos casos, existe alguna fuente de gluten que puede ser identificada en la dieta, sin embargo, algunos pacientes albergan una población atípica de células T intraepiteliales de la superficie celular que carecen de expresión CD3 o CD8 y comparten un reordenamiento clonal del receptor de células T. Este hallazgo se considera pre-maligno, ya que existe una alta progresión de estos pacientes a desarrollar linfoma de células T asociado a enteropatía (Cellier et al., 2000; Woodward, 2015).

La ECR se define como la persistencia de la malabsorción y atrofia de las vellosidades después de un año siguiendo una DSG estricta determinada por un dietista. De hecho, el primer paso para su diagnóstico es descartar la mala adherencia a una DSG, a demás de otras causas que también deben excluirse (Vahedi et al., 2003; Ludvigsson et al., 2013; Kelly et al., 2015; Malamut & Cellier, 2015). Cuando se determina el diagnóstico de la ECR, el siguiente paso es definir el tipo de ECR, analizando el fenotipo y la clonalidad de los LIE del intestino delgado. La ECR I se define por el aumento del número de LIE con un fenotipo normal con expresión de CD3 y CD8 de superficie; mientras que la ECR II se caracteriza por la expresión clonal de LIE anormal que carece de marcadores de superficie CD3, CD8 y receptores de células T y la expresión preservada de CD3 intracelular (Cellier et al., 1998; Cellier et al., 2000; Malamut & Cellier, 2015; Mulder et al., 2015).

Los pronósticos para los pacientes con ECR I y ECR II difieren significativamente, teniendo ésta última una mayor tasa de mortalidad (Cellier et al., 2000; Malamut et al., 2009; Rubio-Tapia et al., 2009a; Roshan et al., 2011; Arguelles-Grande et al., 2013; Kelly et al., 2015; Malamut & Cellier, 2015). La ECR I se asocia con síntomas severos y malabsorción, pero la esperanza de vida no se reduce mucho; a menudo responde al tratamiento con esteroides tópicos y con administración entérica de budesonida (Brar et al., 2007; Kelly et al., 2015). Raramente se requiere tratamiento con un esteroide sistémico, un inmunosupresor o un agente biológico (por ejemplo, prednisona, azatioprina o inflixamab). Se debe mantener una DSG estricta y administrar suplementos nutricionales cuando sea necesario (Hollon et al., 2013; Kelly et al., 2015).

En cambio, la tasa de mortalidad de la ECR II después de los cinco años del diagnóstico es de aproximadamente el 50% (Cellier et al., 2000; Malamut et al., 2009; Roshan et al., 2011; Kelly et al., 2015). La ECR II suele complicarse por la transición al linfoma de células T asociado a la enteropatía, la jejunoileitis ulcerativa y la malabsorción grave con insuficiencia intestinal que requiere la nutrición parenteral total (Cellier et al., 2000; Malamut et al., 2009; Rubio-Tapia et al., 2009a; Roshan et al., 2011; Argüelles-Grande et al., 2013; Kelly et al., 2015). Los enfoques iniciales de tratamiento son los mismos que para la ECR I, pero los pacientes con ECR II no responden igual (Kelly et al., 2015; Malamut & Cellier, 2014). Debido a la mala respuesta al tratamiento y a la alta mortalidad, se ha propuesto que la ECR II se trate con un agente quimioterapéutico citotóxico tal como cladribina (2-clorodesoxiadenosina). Sin embargo, no se han realizado ensayos controlados de tratamientos para la ECR II (Gujral et al., 2012; Malamut & Cellier, 2014; Kelly et al., 2015).

La edad media de diagnóstico de la ECR son 50 años. Cualquiera que sea su tipo, la ECR se produce entre dos y tres veces más en mujeres que en hombres (Al-Toma et al., 2007; Malamut et al., 2009; Malamut & Cellier, 2015) y aparece en el 1-2% de pacientes con EC. La ECR I es más comúnmente diagnosticada en los Estados Unidos, mientras que la ECR II predomina en Europa (Kelly et al., 2015).

- Pacientes asintomáticos con atrofia vellosa persistente en una dieta libre de gluten

La atrofia de las vellosidades persistente a pesar de una DSG estricta no es una situación rara dentro de la ECR. La anemia por deficiencia de hierro se observa más a

menudo en los pacientes con atrofia de las vellosidades. Del mismo modo, la baja ferritinemia es mas frecuente en pacientes con atrofia vellosa (Saadi et al., 2014; Malamut & Cellier, 2015;). La atrofia de las vellosidades persistente no parece estar asociada con el aumento de la mortalidad, pero sí con un mayor riesgo de neoplasias proliferativas (Lebwohl et al., 2013a; Malamut & Cellier, 2015).

- Malignidad

A pesar de que hoy en día la EC sea algo común, la malignización es rara (Mulder et al.,2015). El mayor riesgo de mortalidad en la EC se le atribuye en gran medida a la malignidad (Corrao et al., 2001; Woodward, 2015). Desde hace mas de 50 años, se sabe que los pacientes que padecen EC tienen una mayor probabilidad de sufrir enfermedades malignas debido al EO al que han estado sometidos y al estado inflamatorio del que no se llegan a recuperar completamente a pesar de la retirada del gluten de la dieta. Aun así el riesgo es mayor en pacientes que no cumplen la DSG (Williams et al., 1963; Mulder et al., 2015).

Los linfomas intestinales de células B y T surgen con mayor frecuencia en la EC. El linfoma de las células T asociado con la enteropatía (EATL) lo desarrollan entre el 33 y el 52% de los pacientes con ECR II dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico (Al-Toma et al., 2007; Malamut et al., 2009; Malamut & Cellier, 2015). El inicio de una EATL en un paciente con ECRI es mucho menor que en un paciente con ECR II. El tratamiento de la EATL está basado en la quimioterapia, como se ha dicho en uno de los apartados anteriores (Malamut et al., 2009; Malamut & Cellier, 2015;).

Suele aparecer en pacientes de edad avanzada, con diagnóstico de EC muy tardío y puede presentar síndrome hemofagocítico (Mulder et al., 2015; Woodward, 2015).

El linfoma de no Hodgkin es la neoplasia más frecuente asociada a la EC. Recientes estudios han estimado un aumento de 2 a 3 veces en el riesgo de padecer linfoma de no Hodgkin en pacientes con EC (Elfstrom et al., 2011; Grainge et al., 2012; Kelly et al., 2015). El riesgo de malignidad es mayor en los primeros cinco años después del diagnóstico y la mortalidad disminuye a niveles normales o casi normales cinco años después del diagnóstico.

El cáncer de esófago, a pesar de estar relacionado con aspectos generales del estilo de vida, tales como el alcohol, el tabaco, la dieta y el sobrepeso, también es mayor en las personas con EC (Landgren et al., 2011; Mulder et al., 2015). Es un factor de riesgo pero a un nivel mucho menor, por lo que no se suele controlar, a excepción de los pacientes con esófago de Barret, ya que en este tipo de pacientes, el riesgo de padecer cáncer de esófago es de por sí ya diez veces mayor (Mulder et al., 2015).

El riesgo de adenocarcinoma de intestino delgado (SBA) también aumenta en estos casos. En un estudio realizado por Ciao et al. (2019) se ha demostrado que la SBA en EC tiene una prevalencia del 0,65%, lo que indica una frecuencia mucho mayor de SBA en comparación con la estimada en la población general (5,7 casos / 1.000.000 de personas) (Howdle et al., 2003; Jeremy, 2015).

El SBA puede ocurrir de forma esporádica o puede estar asociada con una serie de afecciones predisponentes, como síndromes hereditarios y trastornos intestinales inmunomediados, como la EC. Los casos de SBA relacionados con EC se caracterizan por una edad más temprana de inicio, una mayor prevalencia en el sexo femenino y una mejor supervivencia general en comparación con la SBA relacionada con el síndrome esporádico, de Crohn y hereditario. La SBA dentro de la EC está relacionada con un retraso en el diagnóstico de la EC y un incumplimiento de la DSG (Ciao et al., 2019).

Un hallazgo reciente sobre la localización de el SBA es que en contraste con la literatura actual, que informa de una localización predominante de todos los subtipos de SBA (esporádicos, asociados con síndromes hereditarios y trastornos inmunitarios mediados) en el duodeno en hasta el 60% de los casos, la SBA relacionada con el CD se localiza en la gran mayoría de los casos en el yeyuno (Ciao et al., 2019).

2.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO

2.2.1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres (RL) son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados o libres (Stojiljković et al., 2012b). La presencia de este electrón los hace altamente reactivos, ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar la estabilidad electroquímica, lo que significa que pueden reaccionar con la mayoría de las moléculas circundantes, incluyendo proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, provocando un daño en ellos (Odetti et al., 1998; Ozcetin et al., 2011; Stojiljković et al., 2012b). Cuando la molécula "atacada" pierde el electrón, se convierte en un RL, iniciando una reacción en cadena que puede terminar con la destrucción de una célula viva. La vida media biológica del RL es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello & Suwalsky, 2006). Aunque los RL sean potencialmente perjudiciales, también tienen funciones beneficiosas para nuestro organismo, es decir, su producción de forma controlada sirve como mecanismo de protección frente a virus y bacterias, así como formar parte de la señalización celular (Avello & Suwalsky, 2006; Stojiljković et al., 2012a).

Es muy importante que todos estos procesos estén controlados por una adecuada protección antioxidante. En condiciones normales, los daños causados por RL se controlan por un conjunto de mecanismos de defensa antioxidante muy eficaz, que neutralizan la acción oxidante de los RL mediante la liberación de electrones a la

sangre, que son captados por los RL, convirtiéndolos en metabolitos inofensivos (Katar et al., 2014). El problema para la salud aparece cuando este equilibrio oxidante-antioxidante se rompe, y nuestro organismo tiene que soportar un exceso de RL provenientes de diversas fuentes; esta situación es la que conocemos como EO.

El EO es, por tanto, una situación de desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la defensa antioxidante del organismo, que tiene como consecuencia la posible inducción de una serie de daños a las moléculas biológicas al deteriorar su organización estructural. Este equilibrio puede alterarse en diversas condiciones patológicas (Katar et al., 2014).

2.2.2. TIPOS DE RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

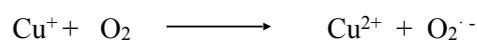
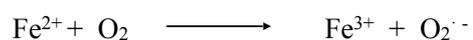
Los organismos aeróbicos requieren, de manera indispensable oxígeno para vivir, pero a su vez, el uso de oxígeno durante el metabolismo normal es una fuente de RL, que, si no se neutralizan, pueden perjudicar a la función celular. Muchos autores utilizan el término genérico EROs, ya que ciertas moléculas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete no son radicales. De manera que, de forma general, se denominan EROs a las moléculas, radicales y no radicales, que contienen oxígeno y que son agentes oxidantes o son fácilmente convertidos en radicales, lo que hace que tengan una alta reactividad hacia moléculas inorgánicas, así como biomoléculas (Mayor- Oxilia, 2010).

Tabla 3. Compuestos reactivos derivados del oxígeno. (Modificado de Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay et al., 2002).

RADICAL	NOMBRE	SUSTRATO	VIDA MEDIA
OH ·	Hidroxilo	Cualquier molécula	10-9 s
RO·	R-oxilo	LH (linoleato)	10-6 s
ROO ·	R-peroxilo	LH	7s
ROOH	Hidroperóxido	LH	-
L ·	Linoleil	LH	10-6 s
O₂ · -	Superóxido	Enzimas	Dismutación espontánea y enzimática
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	LH	Estable; Reducción enzimática

2.2.2.1. ANIÓN SUPERÓXIDO

El anión superóxido (O₂^{·-}) se produce en la reducción de oxígeno (O₂) por la transferencia de un electrón o por autooxidación de metales de transición (Fridovich, 1983; Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay et al., 2002):

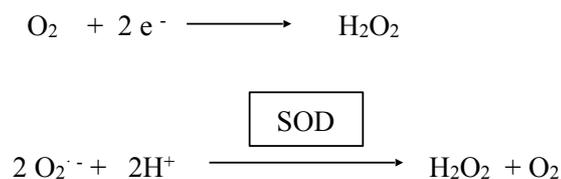


El $O_2^{\cdot-}$, a pesar de no ser particularmente dañino, tiene importancia por ser fuente de H_2O_2 y como reductor de metales de transición. La principal fuente de esta especie reactiva se produce en la mitocondria de forma accidental a nivel de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico, describiéndose que del 2-5% del oxígeno se reduce de forma incompleta hasta este radical. Debido a que la formación de esta especie depende del flujo de la cadena de transporte de electrones, cualquier situación que aumente el consumo de oxígeno, aumentará proporcionalmente la generación del $O_2^{\cdot-}$ (Finkel & Holbrook, 2000; Camougrand & Rigoulet, 2001; Barbi de Moura et al., 2010).

Entre otras acciones, esta especie reactiva reacciona con el óxido nítrico (NO) (factor de relajación derivado del endotelio), mostrando un efecto vasoconstrictor. Éste podría ser un mecanismo de regulación del tono vascular, aunque puede tener efectos adversos en algunas situaciones clínicas (Muggli, 1993; Saran et al., 1993).

2.2.2.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La génesis de H_2O_2 proviene de la reducción espontánea con dos electrones del oxígeno, pudiendo ser también generado en los sistemas biológicos por la reacción de dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$, catalizada por la superóxido dismutasa (SOD):

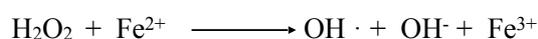


El H_2O_2 no es un RL pero está dentro de las EROs y envuelto en la producción de otros RL. En presencia de iones metálicos, produce el radical más reactivo y dañino, el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay et al., 2002).

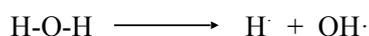
2.2.2.3. RADICAL HIDROXILO

El $\text{OH}\cdot$ es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula (Halliwell & Gutteridge, 1989; Barbi de Moura et al., 2010). No tiene gran poder de difusión y su vida media es corta, pero produce gran daño a moléculas de alrededor de su lugar de producción. Los mecanismos de generación de este radical son:

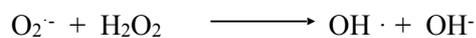
(a) Por la descomposición del H_2O_2 en presencia de metales de transición, principalmente hierro (Fe^{2+}) (Aust et al., 1985; Minotti & Aust, 1987; Soule et al., 2007; Wilcox & Pearlman, 2008) y cobre (Cu^{2+}) (Auroma et al., 1991). En el caso del hierro se trata de la denominada reacción de Fenton:



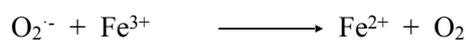
(b) Cuando se exponen los tejidos a radiaciones γ , la mayor parte de la energía captada es absorbida por el agua (H_2O) de las células. Se produce entonces la separación de una de las uniones covalentes entre el oxígeno y el hidrógeno del agua, dejando un único electrón en el hidrógeno, formando el radical $\text{H}\cdot$, y uno en el oxígeno, $\text{OH}\cdot$:



(c) En la reacción llamada de Haber-Weiss, no catalizada por metales de transición, o también en la denominada reacción de Fenton conducida por el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ reacciona con el H_2O_2 (Halliwell et al., 1992; Soule et al., 2007; Wilcox & Pearlman, 2008):



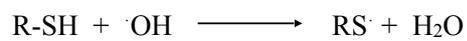
La reacción de Haber-Weiss, se podría entender como el resultado de la unión o colaboración de Fenton con la capacidad del $\text{O}_2^{\cdot-}$ para reducir metales iónicos de transición:



Los $\text{OH}\cdot$ son los más reactivos que se conocen en química, teniendo capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Cadenas et al., 2000; Halliwell, 2001; Remmen & Richardson, 2001; Barbi de Moura et al., 2010).

Otros RL importantes son los radicales que se centran en el átomo de carbono ($\text{R}\cdot$) formados a partir del ataque sobre moléculas (RH) como los lípidos, que producen

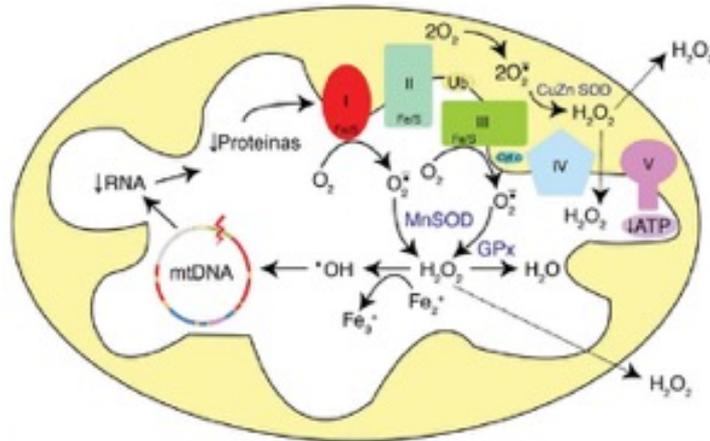
la peroxidación lipídica (PL) y atacan las cadenas de AG, ácidos nucleicos, hidratos de carbono o proteínas. Estas EROs reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Y, a su vez, estos pueden reaccionar y generar radicales alcoxilo ($\text{RO}\cdot$). Los átomos con sulfuro también son atacados por RL para producir el radical thiilo ($\text{RS}\cdot$), formado a partir de la oxidación del glutatión (GSH) (Asmus, 1990):



Durante la respiración mitocondrial, una pequeña cantidad del oxígeno molecular consumido por las células es convertido en el $\text{O}_2\cdot^-$ mediante los complejos I y III. Las enzimas SOD (MnSOD y Cu/Zn SOD) convierten el $\text{O}_2\cdot^-$ en H_2O_2 , que será secuencialmente transformado en agua mediante la glutatión peroxidasa (GPx). Por otra parte el H_2O_2 puede reaccionar con hierro para generar $\text{OH}\cdot$. Este radical ataca fácilmente las moléculas, incluyendo el ADN mitocondrial (ADNmt) y consecuentemente altera la expresión de proteínas mitocondriales necesarias para la síntesis de ATP (Barbi de Moura et al., 2010).

Figura 15. Modelo esquemático de la producción de EROs a nivel mitocondrial.

(Modificado de Barbi de Moura et al., 2010).



2.2.3. DAÑOS CELULARES PROVOCADOS POR LOS RADICALES LIBRES

2.2.3.1. EFECTOS SOBRE LOS LÍPIDOS: PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Uno de los efectos más importantes de las EROs es el daño oxidativo a los AG de la membrana celular. Las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular, cuya estructura básica es una bicapa lipídica rica en AG poliinsaturados (PUFAs) que son vulnerables al ataque de RL, lo que da lugar a la PL (Halliwell, 1996; Stojiljkovic et al., 2007).

La peroxidación lipídica (PL) es la destrucción de los PUFAs en una reacción autocatalítica e incontrolada donde se forman hidroperóxidos y productos secundarios

(Halliwell y Chirico, 1993). Las membranas biológicas y las lipoproteínas plasmáticas son susceptibles de peroxidación porque contienen los sustratos necesarios para ello, como el ácido linoleico, araquidónico y docosahexaenoico (Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay et al., 2002).

En la PL se produce la oxigenación de PUFAs (con 18 ó más átomos de carbono y con dos o más dobles enlaces conjugados en cis tanto en la forma libre como esterificada) generándose peróxidos de AG (Niki, 1987). La peroxidación de los AG modifica la estructura molecular de los lípidos que los contienen y provoca un cambio conformacional que será más importante cuando los lípidos sean integrantes de membranas y, sobre todo, en la membrana mitocondrial ya que el mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa se asocia a destrucción de la membrana por alteraciones en la fluidez y la pérdida de AG (Muggli, 1993; Lenaz, 1998).

Existe un mecanismo reparador del daño oxidativo de los lípidos que parece estar relacionado con la fosfolipasa A2, ya que su actividad en la membrana interna mitocondrial parece incrementarse en situaciones asociadas a un aumento de la producción de EROs como tratamientos con endotoxinas bacterianas (Hatch et al., 1993). También se han observado aumentos de la fosfolipasa A2 en mitocondrias aisladas de ratas alimentadas con aceite de pescado (Malus et al., 1999), asociado a un incremento en la PL. Por tanto, la fosfolipasa A2 parece ser una enzima reparadora que lleva a cabo la supresión de los lípidos oxidados de membrana (Van den Berg et al., 1993). Sin este mecanismo reparador, los lípidos peroxidados se acumularían y las

consecuencias de esto podrían ser, entre otras, un aumento de la permeabilidad de la membrana y una pérdida del control de la respiración mitocondrial.

Clásicamente el proceso de PL consta de tres etapas:

1. Iniciación:

El mecanismo más frecuente tiene lugar a partir de los radicales $\text{OH}\cdot$, generados a través de la vía de Fenton (Soule et al., 2007; Wilcox & Pearlman, 2008). La PL comienza con la sustracción de un átomo de hidrógeno (H) de un AG (LH) para formar un radical lipídico (L \cdot). El radical iniciador debe ser una especie lo suficientemente oxidante como para reaccionar con los PUFAs, por ejemplo el $\text{OH}\cdot$, la mayoría de los radicales peroxilo ($\text{LOO}\cdot$), y la mayoría de los alcoxilo ($\text{RO}\cdot$). El radical $\text{O}_2\cdot^-$ no es lo suficientemente oxidante, pero su forma protonada ($\text{HO}_2\cdot$) si es capaz de promover la iniciación, si bien, a pH fisiológico se encuentra a bajas concentraciones. Algunos complejos metálicos también son capaces de iniciar la PL (Halliwell & Chirico, 1993).

Existe otro mecanismo de iniciación de las reacciones de peroxidación, como es la ruptura de enlaces químicos por acción fotolítica (Elgandy & Abou-Seif, 1998). No se debe olvidar el papel de las radiaciones ionizantes como mecanismo iniciador del daño tisular. Es un hecho suficientemente conocido no sólo en la patología clínica, sino también en la industria de síntesis de polímeros, el papel de las radiaciones ionizantes y las especies intermediarias reactivas en dichos procesos (Bertsche, 1984).

Finalmente, hay que mencionar el papel de las reacciones tóxicas desencadenadas por diversos xenobióticos como el tetracloruro de carbono, o fármacos antitumorales como la adriamicina, en cuyo mecanismo de acción farmacológica está implicada la formación de especies moleculares activadas.

El producto de la reacción da rápidamente un dieno conjugado que reacciona rápidamente para formar un radical peroxilo (LOO \cdot). Este radical puede reaccionar con otros e iniciar una nueva cadena, que formará un hidroperóxido lipídico (LOOH) sobre el ácido graso poliinsaturado original, considerado el primer producto de peroxidación.

La PL en membranas biológicas provoca desajustes en el funcionamiento de las mismas, cambios de la fluidez, inactivación de enzimas y receptores ligados a la membrana, así como un aumento no específico de la permeabilidad a iones tipo calcio (Halliwell & Chirico, 1993; Littarru & Battino, 1994).

2. Propagación:

La propagación implica inicialmente la reacción del radical lipídico centrado en el átomo de carbono con oxígeno molecular para generar un ROO \cdot , altamente reactivo (Girrotti, 1985):



El ROO \cdot formado va a atacar a cualquier compuesto peroxidable que esté a su alcance. Puede actuar sobre una molécula lipídica, generando un nuevo radical centrado

en el carbono, que iniciaría a su vez la cadena de propagación; también puede actuar adicionándose a un doble enlace:



Los hidroperóxidos poliinsaturados se oxidan generando gran número de productos de reacción monoméricos y poliméricos (Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay et al., 2002). La magnitud de la cadena de propagación depende de muchos factores, entre ellos el índice de lípidos/proteínas de la membrana (a mayor cantidad de proteína mayor nivel de reacción con ella), la composición en AG, la concentración de oxígeno, así como la presencia de antioxidantes que rompen la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica (Halliwell & Chirico, 1993).

Esta etapa tiene la capacidad aparente para consumir todos los AG disponibles en un sistema, aunque esto no suele ocurrir, gracias a las reacciones de terminación. Es obvio por tanto el daño potencial de la PL (Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay et al., 2002).

3. Terminación:

Las células tienen defensas contra los RL como la eficiencia de la cadena de transporte de electrones, para evitar la escapada de éstos y la formación de O_2^- , el cual es eliminado por la SOD, la catalasa (CAT) y la GPx.

Las defensas antioxidantes juegan un papel preventivo en la PL (Viña et al., 1993). Las células vivas poseen una significativa defensa que es la GPx selenio dependiente (Cheeseman & Slater, 1993) la cual reduce los hidroperóxidos lipídicos a AG hidroxilados. Es activa frente a hidroperóxidos de AG libres pero no de los unidos a fosfolípidos, con lo cual, necesita la acción de la fosfolipasa A2. También se ha descrito una GPx que no necesita previa acción de esta enzima, se trata de una enzima dependiente de fosfolípido la cual actúa sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y es exclusiva de membrana mitocondrial (Ursini & Bindoli, 1987).

La transferrina y la ferritina secuestran metales, lo que hace inviable la rotura de hidroperóxidos (Halliwell & Gutteridge, 1986; Auroma et al., 1991). La ceruloplasmina también juega un papel importante al unir cobre y oxida al hierro a su forma férrica que es menos reactiva (Halliwell & Gutteridge, 1984).

Una forma de apagar la cadena es utilizando antioxidantes por ejemplo, α -tocoferol, β -tocoferol y ubiquinona. La vitamina E intercepta un ROO \cdot y se convierte en un RL fenoxilo. Este radical puede interceptar otro igual y terminar la reacción y también puede regenerarse con ascorbato o GSH (Kelso et al., 2002; Lenaz et al., 2002, Miyadera et al., 2002).

El α -tocoferol está presente en las membranas en proporción 1/100 e los PUFAs, siendo muy efectivo por varias razones, por su cola liposoluble que hace que se intercale en la membrana, por la estabilidad del radical que previene la iniciación y su capacidad para regenerar la membrana (Viña et al., 1993).

La finalización de la serie de reacciones en cadena, puede producirse por el emparejamiento de dos radicales o por transferencia de un grupo entre ambos y también cabe la posibilidad de que la reacción de dos peróxidos lipídicos de lugar a la formación del singlete de oxígeno (Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell & Chirico, 1993; Lindsay et al., 2002).

2.2.3.2. EFECTOS SOBRE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas también son objeto de daño oxidativo alterándose su funcionamiento normal y por tanto su actividad biológica (Cheeseman & Slater, 1993; Melov, 2002). Alteraciones como fragmentación, agregación y susceptibilidad a la degradación proteolítica (Griffiths et al., 1989). Así es conocida la fragmentación de la albúmina (Marx & Chevion, 1986) colágeno y γ -globulina (Wolf & Dean, 1986) como consecuencia del daño oxidativo. Los daños oxidativos en las proteínas originan agregación de las mismas por desnaturalización, tal y como ocurre en la ceruloplasmina (Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay et al., 2002). Otro ejemplo de la importancia de la oxidación de proteínas lo representan las lipoproteínas de baja densidad (LDL), donde las histidinas y lisinas son modificadas por oxidación, lo que causa una alteración en el reconocimiento del receptor (Griffiths et al., 2002).

Entre las proteínas existe una gran diferencia en la susceptibilidad frente al daño oxidativo. Por ejemplo, en una minuciosa comparación se demostró que la albúmina bovina (BSA) se oxidaba dos veces más rápido que la glutamina sintasa, y que,

proteínas intactas son menos sensibles a la oxidación que proteínas parcialmente desnaturalizadas (Beckman & Ames, 1998).

La oxidación proteica causa un aumento de la degradación proteolítica, incrementando la actividad de atrapadores de EROs. Además, los procesos de oxidación proteica introducen frecuentemente nuevos grupos funcionales como grupos hidroxilos y grupos carbonilos, que contribuyen a alterar la movilidad y la función proteica. Una mejora en la caracterización de los efectos ha permitido identificar varios procesos secundarios que incluyen la fragmentación, el entrecruzamiento y el desdoblamiento, que puede acelerar o impedir la proteólisis mediada por proteosomas, de acuerdo con la gravedad del daño oxidativo (Griffiths et al., 2002).

2.2.3.3. EFECTOS SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO

El ADN es un polinucleótido que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos y es el responsable de la transmisión hereditaria.

Otro de los efectos de los RL es la reacción de algunos oxidantes fuertes con los componentes de la molécula de ADN. El daño en el ADN puede conducir a la detención de ciclo celular, producir una mutación o la muerte de la célula. La mayoría de mutaciones no causan la muerte celular, pero cuando se acumulan en número suficiente pueden conducir a la desregulación de patrones de transcripción, baja actividad

metabólica y en última instancia, generar un fenotipo envejecido y poco funcional (Díaz-Castro et al., 2008).

La acumulación de lesiones del ADN nuclear (fragmentaciones y deleciones) producidas por los agentes endógenos, producen alteraciones somáticas que contribuyen al envejecimiento. Según la teoría de los RL, la acumulación de EROs y el daño que producen sobre el ADN puede ser la causa fundamental de los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. El ADN nuclear aislado de varios tejidos de ratas, muestra un aumento del daño oxidativo con la edad, medido con el biomarcador 8-hidroxi-guanosina (8-OH-dG) (Lenaz, 1998). En una célula humana cualquiera, alrededor de 500 bases sufren daño oxidativo cada día. De estas lesiones oxidativas, las más peligrosas son las roturas de doble hélice, ya que son difíciles de reparar y pueden producir mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de la secuencia de ADN, así como translocaciones cromosómicas (Valerie & Povirk, 2003; Stojiljković et al., 2012b).

El daño en el ADN inicia una respuesta que activa diferentes mecanismos de reparación que reconocen lesiones específicas en el ADN, que son reparadas en el momento para recuperar la secuencia original del ADN. Asimismo, el daño en el ADN provoca una parada en el ciclo celular, que conlleva la alteración de numerosos procesos fisiológicos que, a su vez, implica síntesis, transporte y degradación de proteínas. Alternativamente, si el daño genómico es demasiado grande para que pueda ser reparado, los mecanismos de control inducirán la activación de una serie de rutas celulares que culminarán en la muerte celular.

Las modificaciones permanentes del material genético representan el primer paso hacia la mutagénesis, la carcinogénesis y el envejecimiento.

Como consecuencia final de los efectos deletéreos de las EROs y los cambios en el estado redox celular, pueden iniciarse procesos asociados con la apoptosis celular (Kroemer et al., 1998; Mignotte y Vayssiere, 1998; Stojiljković et al., 2012b).

Mecanismos de reparación del material genético

El daño en el ADN puede conducir a la detención de ciclo celular, producir una mutación o la muerte de la célula. La mayoría de mutaciones no causan la muerte celular, pero cuando se acumulan en número suficiente pueden conducir a la desregulación de patrones de transcripción, baja actividad metabólica y en última instancia, generar un fenotipo envejecido y poco funcional (Díaz-Castro et al., 2008).

Dada la importancia del ADN, molécula que codifica la información vital acerca del contenido celular y su función, existen varias rutas a través de las cuales la célula puede reparar daños intrínsecos en el material genético a lo largo de su vida. Estas rutas principalmente son: la ruta de reparación de errores de apareamiento o Mismatch Repair Pathway (MMR), la ruta de reparación de la escisión de bases o Base Excision Repair (BER), la ruta de reparación de la escisión de nucleótidos o Nucleotide Excision Repair (NER) y la ruta de reparación de fracturas de la doble hélice o Doble Strand Break Repair (DSBR) (Díaz-Castro et al., 2008).

- *Ruta de reparación de errores de apareamiento o Mismatch Repair Pathway (MMR)*

La ruta MMR elimina bases desapareadas que son el resultado de errores de replicación, recombinación entre secuencias imperfectamente emparejadas y desaminación de la 5-metil-citosina. La replicación del ADN tras un par de bases desapareadas causaría una mutación puntual. El sistema MMR también desempeña un papel en la reparación de daño oxidativo por mecanismos que todavía no están bien dilucidados (Díaz-Castro et al., 2008). Varias líneas de evidencia indican la importancia del sistema MMR en el proceso de envejecimiento celular. La MMR es esencial para el mantenimiento de secuencias repetidas, puesto que las mutaciones en genes MMR se asocian a una desestabilización sustancial de microsatélites, y la inestabilidad de los microsatélites se incrementa con el envejecimiento (Neri et al., 2005).

- *Ruta de reparación de la escisión de bases o Base Excision Repair (BER)*

Esta ruta suprime las lesiones que afectan sólo a una de las hebras de ADN, lo que permite la supresión de la lesión y el empleo subsecuente de la hebra complementaria para rellenar el hueco. La BER corrige las pequeñas alteraciones de ADN que no deforman completamente la estructura de la doble hélice de ADN, como son las bases oxidadas, o la incorporación de uracilo. La BER es crucial para reparar el daño inducido por especies reactivas del oxígeno en las bases que componen el ADN. La BER posee dos sub rutas: rama corta de la BER (mecanismo por el cual sólo un nucleótido es sustituido) o rama larga de la BER (mecanismo por el cual de dos a trece nucleótidos son sustituidos). La BER es iniciada por ciertas ADN-glicosilasas, que

separan el resto N-glicosílico de bases dañadas dejando el lugar apurínico/apirimidínico. Este sitio entonces es procesado por una endonucleasa, dejando un hueco en la cadena de ADN.

Este hueco es rellenado por la ADN-polimerasa β y ligado por la ADN-ligasa (Almeida & Sobol, 2007).

- Ruta de reparación de la escisión de nucleótidos o Nucleotide Excision Repair (NER)

La NER elimina pequeños oligonucleótidos de ADN que contienen una base dañada (Hanawalt, 2002). La NER reconoce lesiones considerables causadas por compuestos cancerígenos y enlaces covalentes entre pirimidinas adyacentes resultantes de la exposición a la radiación UV. Esta ruta se clasifica en reparación genómica global (GG-NER) que ocurre a lo largo de todo el genoma y reparación de emparejamiento transcripcional (TCR-NER) que elimina lesiones en las cadenas transcritas de genes activos. La ruta NER es un proceso multiseccional que involucra a múltiples proteínas (Hanawalt, 2002). En la ruta GG-NER, el ADN es desenrollado por unas helicasas, eliminando la cadena dañada y la reparación se completa por una ADN-polimerasa y una ADN-ligasa. En la ruta TCR-NER la ARN-polimerasa II inicia la reparación en la cadena dañada (Díaz-Castro et al., 2008).

- Ruta de reparación de fracturas de la doble hélice o Doble Strand Break Repair (DSBR)

Una rotura en la doble hélice del ADN es la más letal de todas las posibles lesiones del material genético. Si no se repara, una rotura en la doble hélice conduce a la pérdida de segmentos del cromosoma y pone en peligro la supervivencia celular. Igualmente dañinos para los organismos son los errores de reparación de las fragmentaciones en la doble hélice, puesto que desestabilizan el genoma y causan reestructuración del mismo. La reestructuración genómica es bastante común en organismos envejecidos, lo que conduce a desregulación en la transcripción y malignidad. Las rupturas de la doble hélice son reparadas por dos mecanismos: recombinación homóloga y asociación final no homóloga. Durante la recombinación homóloga, la cromátida hermana se usa como molde para copiar la información perdida en el lugar dañado. Puesto que las cromátidas hermanas son idénticas, el daño en el ADN puede ser reparado fielmente sin consecuencias genéticas. Por el contrario, en la asociación final no homóloga, simplemente une dos extremos rotos, sin tener en cuenta la secuencia homóloga. Normalmente, esta ruta suele introducir errores en la secuencia del ADN (Díaz-Castro et al., 2008).

Determinación de la estabilidad del material genético mediante el ensayo “Comet alcalino”

El ensayo de electroforesis en gel de células individuales (single cell gel electrophoresis assay) o “Ensayo Comet” es un método simple, rápido y sencillo para

medir daño en el ADN de células eucariotas (animales y vegetales) individuales, así como en pequeñas muestras de tejido (Duthie, 2003). Ha sido un método estándar para evaluar el daño a nivel de ADN en las pasadas décadas, con aplicaciones en epidemiología molecular y biomonitorización humana, comprobación de genotoxicidad, ecogenotoxicología, estudios de apoptosis, así como en la investigación básica de daño y reparación del ADN. Es una herramienta ampliamente difundida en la comunidad científica usada para la detección de fracturas en la doble hélice del ADN, resultantes de daños producidos por factores genotóxicos (Collins, 2004; Moller, 2006).

Se trata de un método adaptado de la técnica de electroforesis en microgel de Östling y Johanson (1984) quienes observaron que, el ADN de células de linfoma de ratones previamente irradiadas con radiación gamma, suspendidas en gel de agarosa en un portaobjetos, lisadas con un detergente neutro y expuesto a un campo eléctrico débil, migró más hacia el ánodo que el ADN de aquellas células no irradiadas. Propusieron que la radiación produce roturas en la doble hélice de ADN, permitiendo la relajación del ADN superenrollado y dando lugar a una migración más pronunciada de éste en el gel, dando como resultado una imagen muy particular, semejante a un cometa.

Las variantes más comunes de ensayo comet son: comet alcalino, comet neutro, y uso de enzimas lesión-específicas. El ensayo comet alcalino fue descrito por primera vez como método para evaluar el daño en el ADN (Singh et al., 1988; Olive, 1989), quienes optimizaron la desnaturalización alcalina del ADN y las condiciones de electroforesis, permitiendo la evaluación del daño de una de las cadenas de ADN y de los lugares sensibles a un medio alcalino. Actualmente el protocolo empleado tiene

ligeras variaciones técnicas del ensayo original, encaminadas a reducir el tiempo de exposición del ADN y agilizar la técnica, evitando el daño inducido por la manipulación del material genético (Duthie, 2003; Collins, 2004; Moller, 2006). Otras variantes menos comunes son: marcaje con Bromodeoxiuridina para detectar ADN replicante, detección de intermediarios en la reparación de ADN, comets FISH (Fluoresce In Situ Hybridation) (Collins, 2004).

La técnica usada en nuestro estudio es el Ensayo Comet Alcalino (Alkaline single-cell gel electrophoresis), ya que permite cuantificar la estabilidad del ADN con mayor precisión. De forma general, el ensayo comet alcalino cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación de éstas en agarosa, lisis con detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN, electroforesis, neutralización, tinción y cuantificación.

Cuando se deposita una célula aislada en el gel de agarosa, se crea una cavidad. Tras la lisis, todas las proteínas se liberan y se diluyen en el gel, permaneciendo únicamente las proteínas de andamiaje nucleares o *nuclear scaffold proteins*, expandiéndose todo el ADN superenrollado o “nucleoide” por la cavidad (Östling & Johanson, 1984). El ADN queda negativamente cargado tras el desenmarañamiento alcalino, y en la electroforesis se dirige hacia el ánodo, excepto aquellos lazos del ADN que contienen fracturas, que son liberados de la estructura superenrollada y van quedando atrapados en la estructura reticular del gel. Estos lazos quedan extendidos desde la cabeza del nucleoide formando la cola del cometa (Duthie, 2003).

Estas estructuras se marcan posteriormente con colorantes fluorescentes que se unen al ADN para poder ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. El bromuro de etidio (BE) es probablemente el colorante más usado, seguido del 4,6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (Collins, 2004). También hay otros colorantes como el yoduro de propidio, naranja de acridina, Hoechst 33258 (Duthie, 2003), SYBR Green I y YOYO-I (Hartmann et al., 2003).

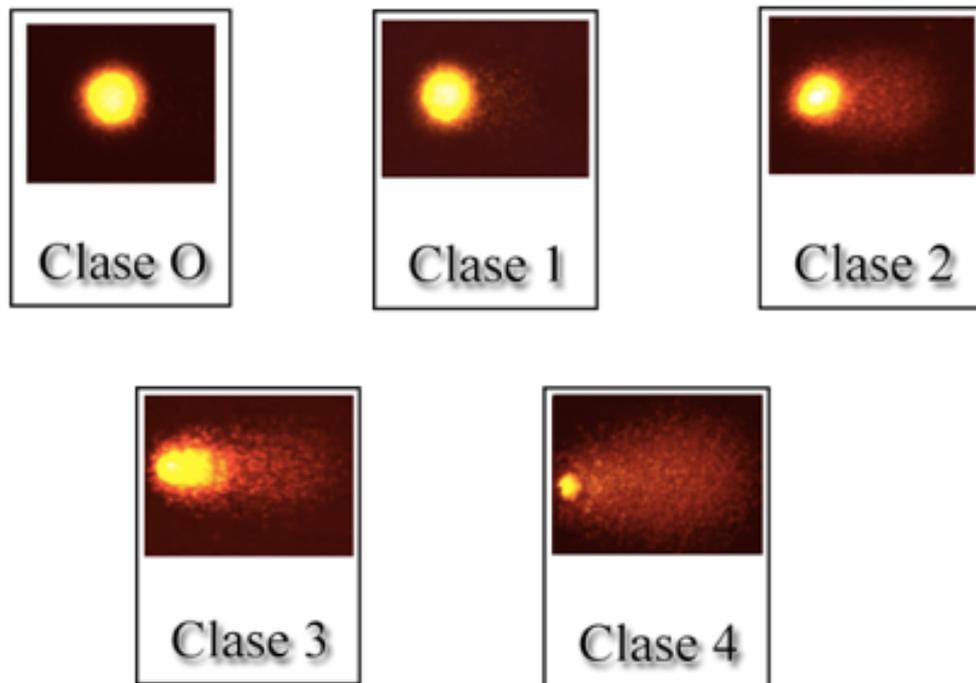
La medida de los *comets* se puede llevar a cabo mediante un recuento manual o bien haciendo un análisis de imagen. Es posible calcular el daño del ADN de manera visual. Con un entrenamiento adecuado, visualmente se puede discriminar diferentes grados de daño en función del aspecto que presente el *comet* que se encuentra en ese momento en el campo de visión. De forma general, tenemos cinco clases de *comets*, numerados del 0 al 4 (Duthie, 2003; Collins, 2004), en función de la ausencia de cola (0) y de la forma, tamaño, e intensidad de la cabeza y la cola (1 al 4), como se muestra en la Figura 16.

Sin embargo, el recuento mediante análisis de imagen es bastante más fiable, ya que se evita cualquier tipo de subjetividad del investigador y se hace a través de una serie de paquetes de software disponibles en el mercado. En nuestro estudio el análisis se realizó con una cámara Hitachi (Satandard Video with Meteor II) empleando el paquete informático para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Estos programas nos dan una gran variedad de parámetros relativos a los *comets*. Los más usados son la longitud de la cola, intensidad relativa de fluorescencia (normalmente expresado como porcentaje de ADN en la cola), Olive Tail

Moment (definido como el producto de la longitud de la cola del comet y la fracción de ADN en la misma, $OTM = [Media\ de\ la\ cola - Media\ de\ la\ cabeza] \times \% \text{ ADN en cola} / 100$) y porcentaje de ADN en la cabeza. De ellos, el porcentaje de ADN en la cola representa el parámetro más útil, ya que guarda una relación lineal con la frecuencia de rotura, se afecta relativamente poco por los ajustes del umbral, y permite la discriminación del daño por encima del rango más amplio posible (en teoría, desde 0 a 100 % de ADN en la cola). Se recomienda contar al menos 50 *comets* por muestra (Collins, 2004).

Figura 16. Clasificación de los tipos de *comets* en función del daño en el ADN.

Clase 0: Todo el ADN se encuentra en la cabeza del comet indicando que el daño en el material genético es prácticamente nulo. Clase 1: Podemos observar pequeños y escasos fragmentos de ADN en la cola del comet. Presentan una cola tan pequeña que se asemeja a una aureola y una alta intensidad en la cabeza, el daño sigue siendo prácticamente nulo. Clase 2: Podemos observar mayor cantidad de fragmentos de ADN en la cola, por tanto la fluorescencia de la misma es mayor. Este tipo de *comet* corresponde a un nivel de daño moderado. Clase 3: La cola del *comet* es altamente fluorescente y redondeada, revelando que existe un alto porcentaje de ADN en la misma. La cabeza es mucho más pequeña que en los anteriores y con una intensidad mucho menor. Este tipo de *comet* corresponde a un nivel de daño alto. Clase 4: Prácticamente todo el ADN se encuentra en la cola y tienen una cabeza pequeña, con intensidad de fluorescencia muy baja, se considera que el daño en el ADN es máximo. Tomado de Hijano, (2010).



2.2.4. FUENTES DE RADICALES LIBRES Y SU RELACIÓN CON LAS PATOLOGÍAS

Los radicales libres relacionados con las enfermedades humanas derivan de cuatro fuentes:

- a) Generados en los procesos biológicos intracelulares normales, pero de forma exagerada e inadecuada
- b) Liberados por células inflamatorias en su entorno
- c) Secundarios a xenobióticos
- d) Otros mecanismos fisiopatológicos que participan en el envejecimiento, así como con otras enfermedades relacionadas con la edad (Halliwell & Gutteridge, 1999),

tales como arteriosclerosis, cataratas, Diabetes mellitus tipo II (DMTII), inflamaciones crónicas de tracto digestivo y trastornos degenerativos del sistema nervioso como el Parkinson o el Alzheimer (Multhaup & Rupper, 1997; Kester & Scheltens, 2009)

Las EROs se originan mediante la acción de diversos factores, tanto endógenos como exógenos. Las fuentes endógenas de EROs son la autooxidación de diferentes moléculas orgánicas e inorgánicas, la oxidación enzimáticamente catalizada y la explosión respiratoria (Stojiljković et al., 2012a). En las células que utilizan el oxígeno para su metabolismo, éste es el principal responsable de la producción de EROs. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno con la formación de agua, sin formación de intermediarios tóxicos, pero un pequeño porcentaje, en torno al 5%, forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son el O_2^- , y el $OH\cdot$. En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica, como en procesos inflamatorios, ocurre una mayor demanda tisular de oxígeno, y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes (Avello & Suwalsky, 2006).

La segunda gran fuente de EROs endógena es el metabolismo de células defensivas como los macrófagos o eosinófilos, cuyas vías metabólicas para cumplir su misión en el organismo generan especies químicamente agresivas, ya mencionadas anteriormente, como H_2O_2 , el O_2^- y el $OH\cdot$ (Avello & Suwalsky, 2006).

Algunas fuentes exógenas de EROs son la radiación solar, pesticidas o xenobióticos (ciertos medicamentos), toxinas fúngicas, metales pesados o el humo del tabaco (Avello & Suwalsky, 2006; Stojiljković et al., 2012a).

2.2.4.1. PAPEL DE LA ALIMENTACIÓN

El EO esta asociado al proceso normal de envejecimiento así como a numerosas enfermedades que afectan a diferentes órganos y sistemas, como es el caso de la EC (Halliwell & Whiteman, 2004; Stojiljkovic et al., 2007; Ozcetin et al., 2011). Se ha demostrado que la concentración de EROs está elevada en pacientes con diversas enfermedades y que, la terapia antioxidante tiene efectos protectores (Dryden et al., 2005; Stojiljković et al., 2012a).

Existen nutrientes que ejercen efectos antioxidantes e influyen en la expresión genética, por lo tanto, representan un enfoque útil para la intervención nutricional de sujetos con EC. Componentes de la dieta como polifenoles vegetales, carotenoides y AG, tienen el potencial de modular la predisposición a las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales y podrían tener un papel en la terapia nutricional de la EC, protegiendo contra el efecto tóxico de la gliadina y ejerciendo también un efecto protector (Calder et al., 2009; Calder, 2011; Ferreti et al., 2012; Piatek-Guziewicz et al., 2017). Estos componentes actúan a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la disminución de la producción de mediadores inflamatorios, a través de efectos en la señalización celular y en la expresión de genes, la reducción de la producción de

oxidantes nocivos y la promoción de la función de barrera del intestino y las respuestas antiinflamatorias.

Vitaminas antioxidantes

Las vitaminas C y E son capaces de modular la respuesta inmune de varias formas, una de ellas mediante la modulación de la función de los leucocitos y de su proliferación (Goetzl et al., 1974; Ferreti et al., 2012). Las vitaminas C y E también ejercen una actividad antioxidante, y por lo tanto, modulan el proceso inflamatorio. También se ha demostrado en presencia de vitamina E (particularmente de γ -tocoferol) una disminución de la activación de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) con la consiguiente disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-8 y PAI-1) (Cook-Mills & McCary, 2010; Ferreti et al., 2012). Bernardo et al. (2012) observaron que la administración de vitamina C en un medio de cultivo de biopsia de mucosa de intestino delgado impide la secreción aumentada de IFN- γ , TNF- α , e IL-6 y aumenta la expresión de IL-15 desencadenada por la gliadina (Ferreti et al., 2012). Del mismo modo, la vitamina A tiene un fuerte efecto antioxidante sobre el ADN dañado por oxidación (Foksinski et al., 2007; Szaflarska-Poplawska et al., 2010), lo que sugiere que la suplementación con vitamina A, C y E podría ser beneficiosa para los pacientes celíacos (Bernardo et al., 2012; Ferreti et al., 2012).

Los fitoquímicos: polifenoles y carotenoides

Las frutas y las verduras contienen varios polifenoles y carotenoides que producen distintos efectos biológicos en las células epiteliales intestinales. Los polifenoles y los carotenoides tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Un objetivo probable de estos compuestos parece ser la cascada de transducción de señales que conduce a la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B (Hecket et al., 1996; Di Carlo et al., 1999; Heber y Lu., 2002; Ferreti et al., 2012). Los flavonoides tienen actividad antiinflamatoria a través de varios mecanismos de acción que implican la reducción de la concentración de prostanoïdes y leucotrienos mediante la inhibición de enzimas generadoras de eicosanoïdes tales como la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX), y la inhibición de la inducción de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Di Carlo et al., 1999; Calder et al., 2009; Ferreti et al., 2012). También los carotenoides son capaces de inhibir la expresión de enzimas y proteínas relacionadas con la inflamación, en parte, por la supresión de la activación de NF- κ B, un efecto potencialmente mediado por la inhibición de diferentes proteínas quinasas implicadas en la transducción de señales (Heber & Lu, 2002; Karell et al., 2003; Ferreti et al., 2012).

Otros autores han comprobado que el licopeno, la quercetina, y el tirosol disminuyen la expresión génica de iNOS y ciclooxigenasa-2 (COX-2) inducida por la gliadina en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con IFN- γ . La inhibición de la expresión génica de iNOS y COX-2 se produce a nivel transcripcional mediante la prevención de la activación de NF- κ B, IRF-1 y STAT-1 α , y se correlacionó con la

inhibición de la generación de EROs inducidas por la gliadina y por IFN- γ (De Stefano et al., 2007; Ferreti et al., 2012).

Los flavonoides como el galato de epigallocatequina, la genisteína, la miricetina y la quercetina también tienen un efecto protector sobre la función barrera de las uniones intestinales (Suzuki & Hara 2011; Ferreti et al., 2012). Como se mencionó anteriormente, las uniones estrechas tienen funciones cruciales en el transporte paracelular de gluten, así como en la función de barrera en el intestino. Suzuki et al. (2011), también han comprobado que los flavonoides mejoran la disfunción de la barrera de las uniones intestinales inducida por el EO y por las citoquinas inflamatorias (Ferreti et al., 2012). Se ha observado que la quercetina mejora la función barrera de las uniones intestinales, mediante el ensamblaje y la expresión de las proteínas de unión. El cambio en el estado de fosforilación es responsable del ensamblaje de proteínas de uniones estrechas mediado por quercitina (Suzuki et al., 2011; Ferreti et al., 2012).

Ácidos grasos

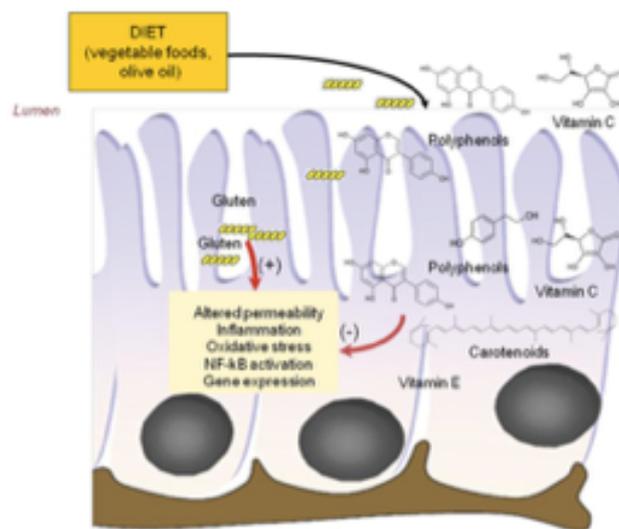
Los AG pueden influir en la inflamación a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la actuación a través de la superficie celular y receptores intracelulares que controlan las señales inflamatorias de las células y los patrones de expresión de los genes (Calder, 2011; Ferreti et al., 2012). Los eicosanoides producidos a partir de AG n-6, como el ácido araquidónico (AA), tienen un papel proinflamatorio. De manera inversa, los AG n-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA), dan lugar a eicosanoides con propiedades antiinflamatorias (Calder, 2011; Ferreti et al., 2012). Un

excelente ejemplo de la nutrigenómica es la influencia de los AG n-3 sobre la expresión génica. En particular, los AG n-3 han sido reportados como inhibidores de la activación del factor de transcripción NF- κ B con la consiguiente inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias.; en cambio, los AG saturados, especialmente el ácido láurico (12:0), mejora la activación de NF- κ B en los macrófagos y en las células dendríticas (Lee et al., 2001b; Ferreti et al., 2012).

El efecto de los AG sobre la expresión génica podría ser mediado también a través de los sensores o receptores de AG como PPAR γ (receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma). De hecho, los PUFAs y sus derivados son ligandos endógenos para PPAR- γ , y se ha demostrado que el PPAR- γ inducido por los PUFA está asociado a una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α y IL-6) (Zapata-González et al., 2008; Ferreti et al., 2012).

En lo que a la EC se refiere, se ha demostrado que la fosfolipasa citosólica A2 (cPLA2)-dependiente, la liberación de AA de los linfocitos intraepiteliales después de la incubación con gliadina, contribuye a la citólisis de linfocitos. Por otra parte, el uso de una línea de células intestinales epiteliales (Caco-2) expuestas a los péptidos de la gliadina, ha demostrado que el ácido docosahexaenoico (DHA), PUFA n-3 de cadena larga, es capaz de contrarrestar muchos de los efectos proinflamatorios del AA. De hecho el DHA impidió la liberación de AA, la expresión de ciclooxigenasa-2, la actividad de cPLA2 y la liberación de prostaglandina (PG) E2 e IL-8 en medio de cultivo, lo que sugiere que el DHA inhibe la liberación de AA por estas células (Vincentitni et al., 2011; Ferreti et al., 2012).

Figura 17. Efecto protector de fitonutrientes en la citotoxicidad de los péptidos del gluten. Las vitaminas antioxidantes (vitamina C y E), polifenoles y carotenoides de los alimentos vegetales de la dieta y el aceite, fueron absorbidos por las células intestinales y pueden ejercer efectos protectores frente a los efectos tóxicos ejercidos por péptidos de gluten en las células intestinales. Tomado de Ferreti et al., (2012).



Alteraciones dietéticas

Existen estudios, (Grehn et al., 2001), en los que se ha encontrado una baja ingesta diaria de fibra dietética y vitaminas del grupo B en pacientes con EC bajo tratamiento con una DSG a largo plazo (Hallert et al., 2009). Como consecuencia, la mitad de estos adultos muestran niveles sanguíneos reducidos de folato y vitamina B₆, lo que representa un nivel elevado de homocisteína plasmática total (tHcy) (Hallert et

al., 2002; Hallert et al., 2009). Este aspecto es importante ya que un nivel elevado de tHcy plasmático, además de ser indicativo de un estado vitamínico deficiente, puede implicar un mayor riesgo independiente de enfermedad cardiovascular en el mismo rango que la hipercolesterolemia y la hipertensión (Nygard et al., 1999; Hallert et al., 2002; Wals et al., 2006; Hallert et al., 2009). El nivel de vitamina B₁₂ está un poco al margen de esto ya que el estado de vitamina B₁₂ depende más de la absorción intestinal que de la ingesta.

Esta alteración es de fácil tratamiento, ya que existen estudios que han demostrado que la suplementación diaria con 0.5-5 mg de ácido fólico o 0.5 mg de vitamina B₁₂ pueden normalizar la concentración de tHcy (Hallert et al., 2002).

En conclusión, se debe considerar un suplemento multivitamínico completo estándar (100% -300% de la cantidad diaria recomendada (CDR)) para cada paciente con EC en el momento del diagnóstico, en algunos aspectos de forma general para seguir una dieta rica y equilibrada dentro las posibilidades, y según sus carencias. El tiempo de continuación de una suplementación concreta aún no se ha determinado, ya que los pacientes podrían estar en riesgo de carencias de vitaminas, incluso después de 10 años de seguir una DSG (Hallert et al., 2002; Wierdsma et al., 2013), aunque debe hacerse un seguimiento para evitar la hipervitaminosis, en particular con respecto a la vitamina B₆ o piridoxina y el hierro (Snodgrass, 1992; Gdynia et al., 2008; Wierdsma, 2013).

2.2.5. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Los RL se producen continuamente en el cuerpo humano (Ozcetin et al., 2011). La desintoxicación de las EROs es una condición sin la cual no existiría vida aeróbica, por lo tanto, debido a las presiones evolutivas se ha desarrollado un complejo sistema antioxidante para prevenir la formación de EROs y el deterioro debido a su efecto. Las EROs son eliminadas completamente por este sistema de defensa antioxidante o convertidos en metabolitos inocuos (Stojiljković et al., 2012a; Piatek-Guziewicz et al., 2017).

La capacidad antioxidante celular consiste en mecanismos a través de los cuales se anula la reactividad y se inhibe por tanto la generación de RL. Estos mecanismos comprenden moléculas tanto endógenas como exógenas que, en resumen, eliminan las EROs, inhiben su producción y reparan el daño que éstas puedan causar, aunque no todos actúen de la misma manera (Thornalley & Vasak, 1985; Greenwald, 1990; Palamanda & Kehrer, 1992; Avello & Suwalsky, 2006; Stojiljković et al., 2012a; Piatek-Guziewicz et al., 2017).

Los antioxidantes enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL (Mayor-Oxilia, 2010), mientras que otros antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas A y E actúan como rompedores de cadena pudiendo prevenir el daño causado por la PL, aunque la PL avanzada puede agotar los antioxidantes celulares reduciendo de forma dramática la capacidad

antioxidante de la célula (Goode et al., 1995; Stojiljkovic et al., 2007; Stojiljković et al., 2009).

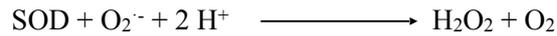
Los antioxidantes endógenos pueden distribuirse en dos grupos, antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes endógenos enzimáticos son la SOD, la CAT, la GPx, y los no enzimáticos más destacados son el GSH, la Coenzima Q, y la melatonina. Los antioxidantes exógenos son la vitamina C, la vitamina E, la vitamina A, el beta-caroteno, los flavonoides y los licopenos (Mayor-Oxilia, 2010; Stojiljković et al., 2012b).

Dentro de los antioxidantes, también hay que destacar a ciertos oligoelementos, como el cobre, el zinc, el selenio, el magnesio y el hierro, cuya incorporación al organismo es necesaria ya que forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (Mayor-Oxilia, 2010).

- Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima SOD fue descrita por McCord y Fridovich en 1968. La SOD se considera como la principal enzima antioxidante intracelular, está presente en la mayoría de los organismos aeróbicos y contiene en su estructura metales esenciales para su función catalítica, según los cuales hay varios tipos que catalizan la misma reacción (Gutteridge & Halliwell, 1994; Piatek-Guziewicz et al., 2017).

Los metales de la SOD reaccionan con O_2^- y con H^+ , para formar H_2O_2 y O_2 . La rotura no enzimática del O_2^- ocurre también lentamente a pH 7.4, pero la enzima la acelera 10.000 veces (Fridovich, 1974).

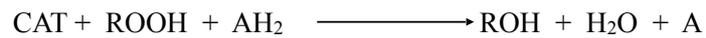
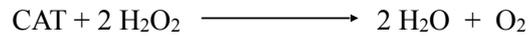


En humanos, la SOD-Mn en la mitocondria elimina el O_2^- producido por la cadena de transporte de electrones y por las oxidasas mitocondriales. La SOD-Cu,Zn remueve el O_2^- de oxidasas citosólicas y de las enzimas del citocromo P450 presentes en el retículo endoplásmico de la célula. Algunas SOD-Cu,Zn pueden estar presentes en peroxisomas. La SOD debe actuar en conjunto con otras enzimas que descompongan el H_2O_2 , porque puede éste formar $HO\cdot$ cuando contacta con iones metálicos produciendo daño tisular. A su vez altos niveles de H_2O_2 pueden inhibir a la enzima (Cheeseman & Slater, 1993).

- Catalasa (CAT)

La CAT es una enzima presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos que se encuentra localizada en pequeñas orgánulos llamados peroxisomas (80%) y en el citosol (20%) (Nieto, 1993), aunque también se halla a baja concentración en la mitocondria en tejido cardíaco (Roberfroid & Buc-Calderon, 1995) donde ejerce un importante papel antioxidante (Radi et al., 1993). La CAT elimina el H_2O_2 rompiéndolo directamente hasta oxígeno. También tiene actividad peroxidante (Aeibi, 1984)

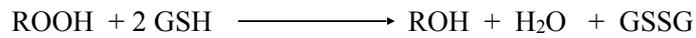
produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el etanol, metanol, ácido fórmico y fenoles con el consumo de un mol de peróxido.



La actividad predominante depende de la concentración del donador de hidrógeno y de la concentración o producción de H_2O_2 en el sistema. La CAT tiene enorme capacidad para destruir el H_2O_2 , es una de las enzimas conocidas más activas. De todas formas su afinidad por el H_2O_2 es también baja y necesita elevadas concentraciones de H_2O_2 para actuar rápidamente (McCord, 1989; Cheeseman & Slater, 1993; Roberfroid & Buc-Calderon, 1995).

- **Glutation Peroxidasa (GPx)**

Se trata de una familia de enzimas que utilizan GSH como donador de hidrógeno y que pueden aceptar otros peróxidos orgánicos además del H_2O_2 como sustratos (Flohé & Wolfgang, 1984; Sjodin et al., 1990; Cheeseman & Slater, 1993). El radical R puede ser un grupo alifático, un grupo orgánico aromático o simplemente hidrógeno. Los productos de reacción son H_2O y un alcohol (ROH) o una segunda molécula de agua, cuando el sustrato es H_2O_2 .



Los tejidos humanos contienen GPx, como la mayor enzima eliminadora de peróxidos. La regeneración del GSH oxidado es efectuada por la enzima glutathion reductasa.



Hay dos grandes grupos de GPx, un primer grupo contiene selenocisteína en su centro activo, siendo una enzima activa frente a hidroperóxidos y a H₂O₂, y el segundo grupo de enzimas no depende de selenio para su catálisis y no es activa frente a H₂O₂ (Lawrence & Burk, 1976; Flohé & Wolfgang, 1984).

En humanos se ha hallado GPx a nivel subcelular en el citosol y en la matriz mitocondrial para los dos tipos y aunque tiene mayor afinidad por el H₂O₂ que la CAT (Roberfroid & Buc-Calderon, 1995), presenta menor actividad que ésta a elevadas concentraciones (Chance et al., 1979). Esto podría implicar que la GPx está más adaptada a eliminar el H₂O₂ que se produce en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

- Melatonina

La melatonina es una hormona que, además de regular los ritmos circadianos, el sueño, el apetito e incluso la reproducción, tiene un alto potencial antioxidante en el organismo. La melatonina es un potente eliminador de radicales libres y un antioxidante de amplio espectro (Caffarelli et al., 2014).

En relación con la EC, se ha demostrado que la melatonina, es un importante mediador del eje intestinal cerebral y muestra importantes efectos protectores contra las lesiones inducidas por el estrés en el tracto gastrointestinal (Konturek et al., 2011).

La melatonina también reacciona con el sistema inmune al mejorar las citoquinas antiinflamatorias y puede ser útil en la lucha contra las enfermedades infecciosas (Caffarelli et al., 2014).

2.2.6. MARCADORES DEL DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS

Estas sustancias se definen como marcadores de EO para medir el daño de los RL a las biomoléculas. Entre las más importantes encontramos el cortisol, la 8-hidroxoguanosina, y los isoprostanos.

- **Cortisol**

El cortisol es una hormona esteroidea o glucocorticoide que es producida por la zona fasciculada de la corteza suprarrenal. Se libera en respuesta al estrés o a la hipoglucemia. El cortisol estimula la gluconeogénesis y activa las vías antiestrés y antiinflamatorias. También desempeña un papel importante en la glucogenólisis, la descomposición del glucógeno en glucosa-1-fosfato y glucosa. Además, el cortisol inhibe la producción de las citoquinas IL-12, IFN γ , IFN α y TNF α pero aumenta la de IL-4, IL-10 e IL-13 por las células Th2. Se cree que esto es un mecanismo de protección contra la activación excesiva de la respuesta inmune (Siddiqui et al., 2019).

- **Isoprostanos**

Los isoprostanos son compuestos de tipo prostaglandina formados in vivo a partir de la peroxidación catalizada por radicales libres de ácidos grasos esenciales. Debido a su alta estabilidad química y sensibilidad a los cambios en el EO, son considerados como marcadores muy fiables del EO in vivo. Altas concentraciones de isoprostanos se correlacionan con el daño en el organismo. Los isoprostanos funcionan a su vez como mediadores inflamatorios (Frijhoff et al., 2015).

- **8- hidroxiguanosina**

La 8- hidroxiguanosina (8-OHdG) es un nucleósido oxidado del ADN, escindido durante la reparación del daño oxidativo a los sitios de desoxiguanosina en el ADN y

que se ha utilizado ampliamente como biomarcador del daño oxidativo del ADN (Szaflarska-Popławska et al., 2010).

2.2.7. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD CELIACA

Hay un creciente número de pruebas que demuestran que el EO está involucrado en la patogénesis de la EC (Halliwell & Gutteridge, 1989; Al- Mashhadani et al., 2009; Ozcetin et al., 2011; Stojiljković et al., 2012a). Los resultados de varias investigaciones informan de que el gluten induce un desequilibrio en la mucosa intestinal de las personas con EC probablemente debido a la sobreproducción de RL (Dugas et al., 1995; Odetti et al., 1998; Boda et al., 1999; Dugas et al., 2003; Diosdado et al., 2005; Stojiljkovic et al., 2007; Szaflarska-Popławska et al., 2010; Stojiljković et al., 2012a). Algunos péptidos de la gliadina poseen la capacidad de penetrar en las células, son internalizados por captación endocítica, y su acumulación en los lisosomas conduce a la activación de algunas vías de transducción de señales y a un aumento de los niveles de RL (Maiuri et al., 1996; Schumann et al., 2008; Heyman & Menard, 2009; Zimmer et al., 2010; Ferretti et al, 2012).

La exposición al gluten y la consiguiente producción de EROs dan lugar a un desequilibrio oxidativo intracelular, caracterizado por un incremento de los niveles hidropéroxidos lipídicos (LOOH) así como perturbaciones estructurales importantes de la membrana plasmática celular, pudiendo llegar a dañar la mucosa intestinal y aumentar su permeabilidad (Rao et al., 1997; Riedle & Kerjaschki, 1997; Ferretti et al, 2012; Stojiljković et al., 2012a). El hecho de que el EO esté presente en el intestino

delgado antes del inicio de la cascada inflamatoria sugiere que las EROs no son exclusivamente productos colaterales del proceso inflamatorio, pero lo que sí está claro es que juegan un papel importante en la patogénesis de este tipo de enfermedades (Fries et al., 2006; Stojiljković et al., 2012a).

Existen estudios que han demostrado que la capacidad antioxidante de los pacientes con atrofia de las vellosidades se ve gravemente alterada, es decir, está notablemente reducida en comparación con controles sanos (Disdado et al., 2005; Stojiljkovic et al., 2009; Szaflarska-Popławska et al., 2010).

La mucosa intestinal está constantemente expuesta a oxidantes, mutágenos y carcinógenos de la dieta, así como a EROs endógenas (Ames, 1983; Stojiljković et al., 2009). La integridad celular y la homeostasis de los tejidos se conservan gracias a estos mecanismos de defensa: el intestino es capaz de regular a las enzimas antioxidantes y de mantener las altas concentraciones de estos antioxidantes, mientras que en los enterocitos gastados o dañados se induce la apoptosis (Aw, 1999; Stojiljković et al., 2009; Stojiljković et al., 2012b). El ciclo redox del GSH juega un papel fundamental en la eliminación de LOOH en el intestino. La deficiencia de GSH y la disminución de las actividades de las enzimas dependientes de GSH reducen significativamente la capacidad antioxidante de estos pacientes, lo que se refleja en niveles elevados de LOOH. Hay estudios que muestran que el estado antioxidante de los pacientes con lesiones más leves de la mucosa (grupo Marsh 1 + 2) no se altera significativamente en comparación con los pacientes con mucosa normal. Sin embargo, en este grupo la concentración de LOOH sí está significativamente elevada, lo que señala la incapacidad

del ciclo redox del GSH para eliminar eficientemente los peróxidos. Todo esto puede desencadenar perturbaciones en la proliferación normal de células intestinales, en la diferenciación y en las respuestas apoptóticas, lo que contribuye al aumento del riesgo de malignidad en pacientes celíacos no tratados (Stojiljković et al., 2012b).

También cabe destacar que el intestino difiere de otros órganos por tener una tasa de renovación celular muy alta. La vida útil de los enterocitos es de sólo 4-6 días (Iatropoulos, 1986). Debido a la alta tasa de división celular, la probabilidad de propagar una mutación en las siguientes generaciones de células es mucho mayor que en células con una baja tasa de división, lo que hace que el intestino sea muy susceptible a la mutagénesis y la cancerogénesis (Stojiljković et al., 2012a).

2.2.7.1. ALTERACIÓN DEL EQUILIBRIO REDOX EN LA ENFERMEDAD CELIACA

- El glutatión (GSH)

El GSH es un poderoso antioxidante que además de actuar como cofactor enzimático, puede reaccionar directamente con los RL. Existen datos de estudios anteriores que indican que las células epiteliales del intestino delgado y del intestino grueso son altamente dependientes del GSH (Mårtensson et al., 1990). El ciclo redox del GSH es un mecanismo clave para proteger las membranas celulares de los daños causados por la PL, una reacción en cadena en la que los PUFA en la membrana de los lípidos son oxidados por las EROs, y para la eliminación de LOOH en el intestino (Aw,

2005; Stojiljković et al., 2012b). Este ciclo implica a la enzima GPx, que utiliza GSH para reducir los peróxidos orgánicos y el H₂O₂, y los LOOH, y a la GR que regenera al GSH de su forma oxidada (GSSG) con la oxidación concomitante de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El GSH también tiene un papel importante en la regeneración de formas activas de otros antioxidantes como las vitaminas E y C y los carotenoides (Jones et al., 2000; Stojiljkovic et al., 2007; Stojiljković et al., 2009; Stojiljković et al., 2012a; Stojiljković et al., 2012b).

El GSH está presente en las células en su mayoría en su forma reducida; en una célula sana el glutatión oxidado (GSSG) rara vez supera el 10% del conjunto total de GSH. La disminución de la relación GSH/GSSG es una muy buena indicación de EO (Hwang et al., 1992; Stojiljković et al., 2012b).

Se demostró que en ratones tratados con L-butilionina SR-sulfoximina (BSO), un inhibidor específico de la síntesis de GSH, se induce una degeneración significativa de enterocitos, como consecuencia de la deficiencia de GSH (Mårtensson et al., 1990; Stojiljković et al., 2012-b).

Hay estudios que han encontrado una concentración significativamente menor de GSH (~ 40-50%) en la mucosa intestinal con atrofia vellosa en comparación con la mucosa normal y la mucosa con lesiones más leves. La disminución de la concentración de GSH es seguida por la disminución de las actividades de GPx y GR y el aumento de la concentración de LOOH en la mucosa (Ståhlberg et al., 1988; Dolfini et al., 2002; Dolfini et al., 2005; Stojiljković et al., 2009). Los experimentos de Rivabene et al. 1999

y sus colaboradores han demostrado que los efectos antiproliferativos de la gliadina están asociados con cambios pro-oxidativos en la célula, tales como niveles elevados de LOOH, disminución de la concentración de GSH y pérdida de grupos tiol (SH-) en proteínas.

Existen estudios que demuestran que altas concentraciones de GSH podrían, al menos en parte, modificar la susceptibilidad celular a los efectos tóxicos de la gliadina (Rivabene et al., 1999; Stojiljković et al., 2009).

- Glutation Peroxidasa y Glutation Reductasa (GPx y GR)

Hay estudios que han determinado que la actividad de la GPx, que es una enzima antioxidante, disminuye significativamente en la EC (Ozçetin et al., 2011). La disminución de la actividad de GPx y GR puede ser una consecuencia de la deficiencia de GSH. Además, la GPx es una enzima dependiente de selenio, numerosos estudios muestran la fuerte correlación entre la actividad de GPx y el nivel de selenio en la sangre, por lo que los bajos niveles de selenio (<80 µg/L) también pueden influir en su actividad (McKenzie et al., 1978; Lloyd et al., 1989). La deficiencia de selenio ya ha sido reportada en pacientes celíacos (Yüce et al., 2004; Stazi & Trinti, 2010; Stojiljković et al., 2012a).

- Superóxido Dismutasa y Catalasa (SOD y CAT)

Hay estudios que han encontrado correlaciones positivas entre las actividades de ambos tipos de SODs y el grado de lesión de la mucosa, lo que indica la asociación entre un daño más severo de la mucosa y las actividades enzimáticas aumentadas. Esto puede representar una respuesta fisiológica a una mayor tasa de producción de EROs (Ozcetin et al., 2011). Sin embargo, se ha demostrado que la actividad de CAT se correlaciona inversamente con la lesión en la mucosa, lo que puede ser una consecuencia de las características cinéticas de esta enzima. Es decir, debido a su alta constante de Michaelis-Menten, la CAT es más eficiente en altas concentraciones de H_2O_2 ; cuando las concentraciones de H_2O_2 son más bajas, la GPx, también desintoxicante del H_2O_2 , confiere una mayor protección (Eaton, 1991; Stojiljković et al., 2012a).

Dado que la actividad de GPx, el principal eliminador de H_2O_2 en tejido gastrointestinal, disminuye significativamente en pacientes con atrofia de vellosidades (Marsh 3a y Marsh 3b), el desequilibrio entre la producción de H_2O_2 y la eliminación provoca un cambio pro-oxidante, que resulta en un aumento de la concentración de PL y de LOOH, casos en los que la concentración de LOOH es $\sim 80\%$ mayor que en pacientes con mucosa normal (Stojiljković et al., 2009; Stojiljković et al., 2012a).

A pesar de que los procesos oxidativos sean contrarrestados por el sistema de defensa antioxidante, el incremento de las concentraciones plasmáticas de LOOH indica

que la protección no es suficiente, como en el caso de la EC activa (Stojiljkovic et al., 2007).

- Xantina Oxidasa (XO)

La activación de la Xantina Oxidasa (XO) es uno de los mecanismos de sobreproducción de RL y de EROs en la mucosa del intestino delgado de pacientes celíacos (Stojiljković et al., 2012b). El sistema xantina oxidoreductasa se localiza principalmente en la mucosa intestinal y en el hígado (Sarnesto et al., 1996; Stojiljković et al., 2012a). La distribución de esta enzima en el intestino delgado no es uniforme. Estudios histológicos demuestran que la mayor parte de XO está localizada en las células epiteliales en la parte superior de las vellosidades intestinales, mientras que no se detecta actividad de XO en la base de criptas (Pickett et al., 1970; Stojiljković et al., 2012b). Los resultados de Boda y colaboradores (1999) indican que en pacientes con EC, la ingesta de gluten, junto con la inflamación resultante, provoca la activación de XO en los enterocitos, lo que resulta en la sobreproducción de EROs y el daño adicional a la mucosa. Estos procesos pro-oxidantes son contrarrestados por las enzimas antioxidantes MnSOD y CuZnSOD (Stojiljković et al., 2012b) cuyas actividades se han visto elevadas en pacientes con EC (Stojiljković et al., 2009).

- Creatinina y albúmina

Los niveles de creatinina y albumina total, que actúan como antioxidantes, en algunos estudios se han encontrado bajos frente a los controles, pero sin alcanzar niveles

significativos, lo que en general indica una disminución de la actividad antioxidante en pacientes celíacos (Halliwell, 1988; Templar et al., 1999; Al- Mashhadani et al., 2009).

- Glutation S- transferasa (GST)

Wahab y colaboradores (2001) encontraron niveles y actividades disminuidas de glutatión S-transferasa (GST) en la mucosa del intestino delgado de pacientes celíacos en comparación con los individuos sanos, que eran proporcionales al grado de daño de la mucosa, al igual que otros estudios que han encontrado estos mismos resultados (Stojiljković et al., 2012a).

Los datos anteriores relativos a las correlaciones entre las actividades de las enzimas antioxidantes y los cambios histológicos característicos de la EC son limitados, aun así, muchos de estos resultados pueden concluir en que con el seguimiento de la DSG, al recuperarse el daño en la mucosa intestinal, la actividad antioxidante y EO se recuperen (Stojiljković et al., 2012a).

Los pacientes celíacos están en un estado de alta producción de RL con baja capacidad antioxidante, pero si el EO es una causa o un resultado de la EC es incierto y de necesitan estudios (Stojiljković et al., 2012a).

2.3. LA INFLAMACIÓN

2.3.1. EL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es un proceso fisiológico complejo cuya función es combatir agentes patógenos externos y/o remodelar los tejidos dañados mediante la secreción de diversos mediadores inflamatorios y el reclutamiento de células inmunes. El proceso inflamatorio se caracteriza por la extravasación de líquido al sitio donde se ubica el daño, que produce edema (tumor), aumento del flujo sanguíneo (rubor), aumento en la temperatura local (calor) y activación de terminales aferentes (dolor), así como, ocasionalmente, la pérdida de la función local. Por su duración, la inflamación puede clasificarse en aguda y crónica. La inflamación aguda es crucial para la reparación del tejido, involucra el aumento en el calibre vascular, el incremento de la permeabilidad para proteínas plasmáticas, así como la activación y migración de leucocitos al sitio lesionado. Cuando el estímulo dañino persiste o no hay resolución satisfactoria de la inflamación, se convierte en inflamación crónica. Aunque la inflamación es importante para inducir la reparación del tejido y erradicación de patógenos, la no resolución de la inflamación lleva a un proceso crónico y se convierte en un proceso deletéreo para el huésped. El proceso inflamatorio requiere una regulación muy precisa, de hecho, tanto deficiencias como excesos en esta respuesta pueden causar morbilidad y mortalidad (Tracey, 2002).

En respuesta al daño tisular, se produce el reclutamiento y activación de leucocitos polimorfonucleares y de monocitos en el área afectada. Estas células inician

la cascada inflamatoria mediante la producción de una gama diversa de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias que están implicadas en la comunicación autocrina, paracrina y endocrina. Las citoquinas estimulan la producción de reactantes de fase aguda y a través de la vía endocrina, consiguen expandir la respuesta inflamatoria a nivel sistémico (Koj, 1996).

En el curso natural de la respuesta inmune, las células circulantes inmunocompetentes reconocen el antígeno generando una respuesta inflamatoria rápida y eficaz que limita la agresión. Cuando cesa el estímulo antigénico se detiene la producción de señales proinflamatorias desencadenando una respuesta antiinflamatoria en la que las células inmunocompetentes mueren por apoptosis. Si el estímulo antigénico perdura en el tiempo o la red de control no actúa de manera eficaz, las células inflamatorias prolongan su supervivencia haciendo que la respuesta sea crónica (Nathan, 2002).

2.3.1.1. MARCADORES BIOLÓGICOS DE LA INFLAMACIÓN

Un marcador biológico o biomarcador se define como "una característica que es objetivamente medible y evaluada como un indicador de los procesos normales biológicos, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica objetiva". En definitiva, es una proteína medida en la sangre cuya concentración refleja la presencia y/o la gravedad de un estado de enfermedad. El biomarcador ideal debe ser preciso, reproducible, medible a un coste razonable y debe

añadir información pronóstica relevante por encima de la proporcionada por factores de riesgo convencionales (Park et al., 2012).

Los conocimientos fisiopatológicos de la inflamación proporcionan objetivos potenciales de diferentes moléculas que pueden ser medidas. Así, es posible determinar citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- α , moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y selectinas; citoquinas con efecto a nivel hepático como es la IL-6 y otros reactantes de fase aguda. Por último, pueden ser evaluados otros indicadores de la respuesta celular a la inflamación, como es el recuento elevado de leucocitos. La IL-6, citoquina proinflamatoria, es considerada clave en el proceso de inflamación. Es sintetizada localmente en el área de daño o de infección por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF- α . Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, células plasmáticas y modula la hematopoyesis. Sus niveles aumentan rápidamente, típicamente a las 1,5-3 horas después del estímulo. Constituye el más poderoso inductor de la síntesis de reactantes de fase aguda por parte del hígado (Panichi et al., 2004; Rao et al., 2005; Tripepi et al., 2005; Kaptoge et al., 2012).

2.3.1.2. LAS CITOQUINAS

Las citoquinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria (Filella et al., 2002).

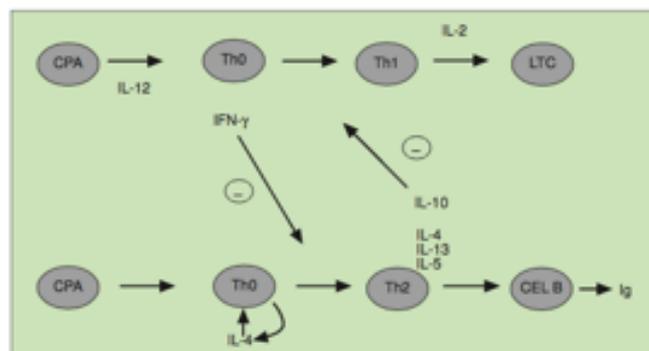
Constituyen una compleja red de interacciones que conecta distintos tipos celulares y en la cual cada citoquina actúa al inducir o suprimir su propia síntesis, la de otras citoquinas o sus receptores. Las citoquinas a su vez pueden favorecer sinérgicamente la acción de otras citoquinas o bien pueden actuar como verdaderos antagonistas de sus efectos biológicos y se caracterizan por su efecto redundante, hecho que subraya la importancia de su función reguladora. Por otro lado, las citoquinas se caracterizan por su capacidad para actuar pleiotrópicamente sobre diversos tejidos y producir múltiples efectos biológicos. Todo ello las define como una red dotada de gran flexibilidad y capaz de compensar la falta de uno de sus componentes. Por otro lado, debe considerarse que la solubilización de los receptores de las citoquinas tras su unión con la correspondiente citoquina, interviene también en este entramado biológico y pueden actuar como inhibidores de la correspondiente citoquina o como agonistas (Filella et al., 2002).

Citoquinas de tipo Th1 y Th2

La citometría de flujo ha sido particularmente utilizada para diferenciar los linfocitos T colaboradores en los subtipos Th1 y Th2. La expresión diferencial de la cadena $\beta 2$ del receptor de la IL-12 permite caracterizar de forma diferencial las células de tipo Th1 y de tipo Th2. El IFN- γ , la IL-2 y el TNF- β constituyen el patrón de expresión característico de las células Th1, mientras que las células de tipo Th2 expresan IL-4, 5, 10 y 13. Las células dendríticas (CD) están especializadas en la presentación del antígeno a las células Th decidiendo si serán activadas las células de

tipo Th1 o Th2. Así las células CD1 secretan IL-12, que favorece la diferenciación de las células Th0 en Th1, mientras que las CD2, probablemente a través de la producción de IL-4, facilitan la diferenciación en el sentido Th2. Por otro lado, según indica el denominado paradigma Th1/Th2 las citoquinas, al interactuar entre sí, constituyen un mecanismo de regulación indispensable en el balance entre inmunidad celular y humoral. Así, el IFN- γ inhibe la proliferación de células Th2 y las IL-4 y 10 inhiben la proliferación de células Th1. La respuesta de tipo Th1 se caracteriza por la activación de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos que expresan IFN- γ y perforina. Las células de tipo Th1 intervienen en la respuesta frente a patógenos intracelulares, incluyendo bacterias, parásitos y virus, así como frente a tumores, y su hiperactivación está implicada en el rechazo de injertos y en diversas EAI como la esclerosis múltiple o la DMTI. Por otro lado, la respuesta de tipo Th2 interviene en la erradicación de infecciones por parásitos intracelulares, como los helmintos. Su activación descontrolada está implicada en la esclerosis sistémica o en la progresión a SIDA en la infección por VIH (Filella et al., 2002).

Figura 18. Citoquinas de tipo Th1 y Th2. CPA: célula presentadora de antígenos; LTC: linfocitos T citotóxicos. Tomado de Filella et al., (2002).



Citoquinas en la inflamación

Las citoquinas desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio que es definido por el balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Filella et al., 2002).

Entre las citoquinas proinflamatorias destacan las quimocinas, que son un grupo de péptidos de bajo peso molecular, que están implicados en la quimiotaxis y en la activación de los distintos tipos celulares que participan en la inflamación. Las quimiocinas proinflamatorias son producidas por las células principalmente para reclutar leucocitos a los sitios de infección o lesión (Constantin et al., 2000). Aunque la quimiotaxis es la característica cardinal de las quimiocinas, su rol fisiológico es más complejo, y muchas tienen homeostático adicional o funciones intrínsecas en la hematopoyesis, inicio de respuestas inmunitarias adaptativas y vigilancia inmunitaria (Filella et al., 2002; Moser et al., 2004).

Por otro lado, la IL-1 y el TNF- α tienen un efecto sinérgico sobre la inflamación, que también es promovido por el IFN- γ a través del aumento del TNF- α . Existen numerosas citoquinas antiinflamatorias, entre las que destacan la IL-10, el IL-1ra (receptor del antagonista de la IL-1) y los receptores solubles de la IL-1 (p68) y del TNF (p55 y p75). Por su lado, la IL-6 tiene a la vez propiedades proinflamatorias (es uno de los principales inductores de las proteínas de fase aguda) y antiinflamatorias, y en este sentido es capaz de promover la síntesis de IL-1Ra y de los receptores solubles del TNF (Filella et al., 2002).

Principales marcadores biológicos de la inflamación

Tabla 4. Principales marcadores inflamatorios determinados; nombre, y principales funciones (Carpenter & Cohen, 1990; Shweiki et al., 1992; Cook et al., 1996; Waldman & Tagaya, 1999; Baggiolini, 2001; Dufour, 2002; Filella et al., 2002; Deshmane, 2009; Ren et al., 2010; Pagliari et al., 2013; Adar et al., 2014; Escudero-Hernández et al., 2017).

MARCADOR	FUNCIÓN BIOLÓGICA
Interleuquina 1 (IL-1)	La familia de la IL-1 incluye a IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36, IL-37 e IL-1Hy2 . Estas citoquinas son expresadas por numerosos tipos de células, incluidos macrófagos y monocitos. La IL-1 β es una potente citoquina proinflamatoria que tiene un efecto estimulante en células T CD4+ y promueve la diferenciación en los linajes de células T auxiliares. Mientras que la expresión de IL-1 α es constitutiva en muchos tipos de células, la expresión de IL-1 β es inducida principalmente en respuesta a moléculas microbianas, aunque también puede estimular su propia expresión.
Antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra)	Miembro de la familia de las citoquinas IL-1, secretado por células inmunes, epiteliales y adipocitos e inhibidor de la actividad de la IL-1, modulando por tanto respuestas inmunes e inflamatorias.
Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα)	Factor de necrosis tumoral derivado de monocitos. Es un potente mediador inflamatorio que es fundamental para la acción inflamatoria del sistema inmune innato, incluida la inducción de citoquinas, activación o expresión de moléculas de adhesión, y estimulación del crecimiento. Estimula la proliferación normal de células, ejerce actividad citolítica o citostática contra las células tumorales, y causa efectos inflamatorios, antivirales e inmunorreguladores.
Interleuquina 6 (IL-6)	Tiene su origen en diversos tipos celulares, entre los que destacan macrófagos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Interviene regulando la respuesta inmunológica, en la hematopoyesis y en las reacciones de fase aguda. Tiene efectos proinflamatorios y antiinflamatorios.
Interleuquina 8 (IL-8)	Quimioquina que actúa como factor quimiostático para los leucocitos, fundamentalmente neutrófilos. Igualmente actúa al favorecer su degranulación y estimular la fagocitosis.
Interleuquina 15 (IL-15)	La IL-15 activa las vías de señalización que conducen a la activación, proliferación y supervivencia celular. Esta familia, conocida también como la familia IL-2, incluye IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. La IL-15. Como miembro de la familia IL-2, las propiedades de la IL-15 pueden evaluarse en comparación con la IL-2. La IL-2 y la IL-15 comparten funciones que incluyen la estimulación de la proliferación de células T, la generación de linfocitos T citotóxicos, la estimulación de la síntesis de inmunoglobulina por parte de las células B y la generación y persistencia de las células NK.
Interleuquina 2 (IL-2)	La IL-2 actúa al promover la proliferación de células T. Es producida principalmente por los linfocitos T activados, formando parte de la respuesta de tipo Th1.

Eotaxina	Quimiocina con actividad preferencial sobre los eosinófilos. Pertenecen a la familia de las quimiocinas (citoquinas quimiotácticas), regulan la quimioatracción de los leucocitos y son importantes moduladores inmunitarios.
Interleuquina 10 (IL-10)	Está producida por los linfocitos T de tipo Th2 y con capacidad de inhibir la síntesis de IFN- γ y de IL-2 por parte de los linfocitos T. Es la principal citoquina antiinflamatoria, actúa a través de la inhibición de la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF- α por parte de los macrófagos.
Proteínas inflamatorias de macrófagos MIP-1α y MIP-1β	Son quimioquinas cruciales para las respuestas inmunes hacia la infección y la inflamación. Exhiben una variedad de actividades proinflamatorias in vitro que incluyen la quimiotaxis de leucocitos. La MIP-1 α , además de sus actividades proinflamatorias, inhibe la proliferación de células madre hematopoyéticas in vitro e in vivo.
Interleuquina 3 (IL-3)	Producida fundamentalmente por los linfocitos T e interviene en los estadios iniciales de la hematopoyesis, estimulando el crecimiento y la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas.
Interleuquina 5 (IL-5)	Producida por los linfocitos T activados, actúa como factor estimulador de la activación, crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, siendo el principal factor regulador de la eosinofilia. Puede ser producida por algunos tumores.
Interleuquina 13 (IL-13)	Producida por las células T y regula la función de monocitos y células B. Disminuye la producción de interleuquinas proinflamatorias y de quimiocinas, a la vez que aumenta la producción de IL-1-Ra.
Interleuquina 17A (IL-17A)	Glucoproteína producida por células T CD4+ estimuladas. La IL-17 aumenta la expresión de ICAM-1 en los fibroblastos y es capaz de estimular la secreción de IL-6, IL-8 y G-CSF por parte de células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos.
Interleuquina 12P40 y 12P70 (IL-12P40 y IL-12P70)	Glucoproteína es producida por linfocitos B y, en menor cantidad, por linfocitos T. Actúa sobre linfocitos T de tipo Th1 induciendo la síntesis de IFN- γ y de IL-2, y también es capaz de reducir la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 por parte de las células Th2.
Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	Glucoproteína producida por monocitos, células endoteliales y células epiteliales. Interviene tardíamente en la hematopoyesis induciendo de forma específica la formación de colonias de granulocitos.
Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF)	Glucoproteína producida por linfocitos T, monocitos, células endoteliales y fibroblastos. Estimula de forma preferencial la formación de colonias de granulocitos y macrófagos, y en menor medida la formación de colonias de eosinófilos. Igualmente, en combinación con la eritropoyetina, interviene en el desarrollo de los eritrocitos.
Proteína inducible por interferón humano 10 (IP-10)	La IP-10 inducible por IFN- γ , una quimiocina secretada a partir de células estimuladas con IFN y LPS de tipo I y II, es un quimioatrayente para las células T activadas. Se observa en muchas enfermedades inflamatorias de tipo Th1, donde se cree que desempeña un papel importante en el reclutamiento de células T activadas en sitios de inflamación tisular.
Proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1)	Quimiocina clave que regulan la migración e infiltración de monocitos/macrófagos. Se ha demostrado que tanto ella como su receptor están inducidos e implicados en diversas enfermedades. La migración de los monocitos del torrente sanguíneo a través del endotelio vascular es necesaria para la vigilancia inmunológica de rutina de los tejidos, así como en respuesta a la inflamación.
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Molécula de naturaleza proteica que juega un importante papel en la regulación del crecimiento celular, proliferación, diferenciación y supervivencia. Su actividad mitogénica es importante en la cicatrización de heridas, situación en la que macrófagos, queratinocitos y otras células dañadas migran a la zona dañada y segregan EGF.

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Forma secretada del factor de crecimiento y estimula la proliferación, de células endoteliales. Es una proteína ampliamente implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis.
Interferón alfa-2 (IFN-α2) Interferón gamma (IFN-γ)	Los interferones son un amplio grupo de proteínas caracterizadas por tener una potente acción antiviral y antineoplásica, así como por su efecto regulador de las células del sistema inmunitario. La familia del IFN- α está constituida por unas 14 proteínas que mantienen una elevada homología entre sí, siendo producidas por una amplio grupo de células que incluye macrófagos y linfocitos B. El IFN- γ es producido por los linfocitos T activados y por las células NK, e inhibe la proliferación de células de tipo Th2, induce la expresión de los antígenos HLA de clase I y II y aumenta la actividad citolítica de células LAK y células T citotóxicas.
Interleuquina 4 (IL-4)	Tiene su origen en los linfocitos T activados y actúa preferentemente promoviendo la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Interviene de forma decisiva en la inducción de las células Th2 que regulan la inmunidad humoral.
Interleuquina 7 (IL-7)	Citoquina que actúa estimulando el desarrollo de las células precursoras de los linfocitos B y T. Asimismo, tiene actividad antitumoral, al aumentar la producción de linfocitos T citotóxicos y de células NK.
Factor de necrosis tumoral beta (TNF-β)	Citoquina, también llamada linfotóxina, secretada por los linfocitos T activados, destacando por su actividad citotóxica sobre algunos tipos tumorales, en los que produce una necrosis hemorrágica.

2.3.2. ENFERMEDAD CELIACA E INFLAMACIÓN

En la EC la mucosa del intestino delgado no es el único objetivo del daño, sino que la incidencia de trastornos autoinmunes extraintestinales también aumenta en las personas con esta patología (Hernández & Green, 2006). En general, se acepta que la EC está mediada por células T en la que los péptidos derivados de la gliadina se desaminan por la TG2 y se presentan por las células presentadoras de antígenos a los linfocitos auxiliares de la lámina propia. Tras la activación, tanto estos últimos como los macrófagos liberan citoquinas proinflamatorias que conducen a la activación de los LIE y dan lugar a las alteraciones histológicas características de la EC (MacDonald y Spencer, 1988; Al-Dawoud et al., 1992; Gianfrani et al., 2005). También se ha

demostrado que los niveles de elevación de citoquinas se correlacionan con la actividad de la EC (Cataldo et al., 2003; Sollid, 2000). En la EC, las células T activadas en la mucosa del intestino delgado producen el interferon de citoquinas Th1 IFN- γ y expresan T-bet, un factor de transcripción Th1 (Nilsen et al., 1998; Monteleone et al; 2004). También hay un aumento en la producción de IL-15 por las células epiteliales intestinales, lo que influye en los LIE para la producción de IFN- γ (Hüe et al., 2004; Meresse et al., 2004; Escudero-Hernández et al., 2017). También se ha descubierto una función de la IL-1 y el TNF- α en la mediación del daño de la mucosa, ya que se ha demostrado que estas citoquinas aumentan la expresión de ciertas metaloproteinasas (MMP-1 y MMP- 3) con la consiguiente degradación de los componentes de la matriz extracelular (Mauviel, 1993; Graham et al., 1996; Daum et al., 1999). La activación y síntesis de enzimas que degradan la matriz extracelular inmediatamente debajo del epitelio está asociada con la remodelación tisular y podría contribuir a las anomalías arquitectónicas, es decir, la atrofia vellosa y la hiperplasia de criptas en la EC (Manavalan et al., 2010).

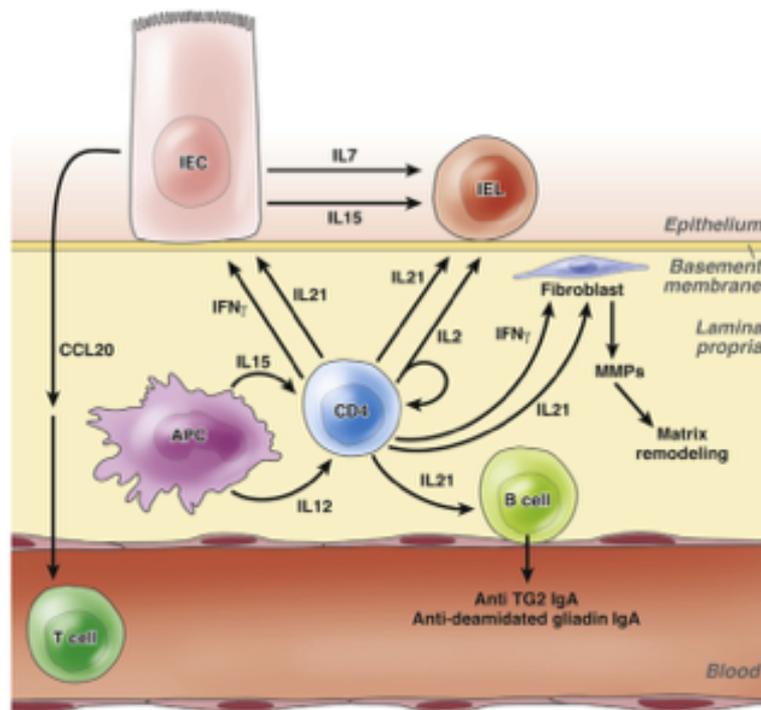
Existen estudios que han medido la elevación de las citoquinas inflamatorias en la EC, tanto a nivel local, en la mucosa del intestino delgado (Kontakou et al., 1994; Przemioslo et al., 1994; Kerttula et al., 1995; Kontakou et al., 1995; Becket et al., 1996; Chowers et al., 1997) como a nivel sistémico. Tales estudios han demostrado niveles aumentados de IL-2, de sIL-2R, la forma soluble de su receptor de superficie, de IL-18, IFN- γ y TNF- α en individuos con EC (Oenedo-Pita & Peteiro Cartelle, 1991; Blanco et al., 1992; Cataldo & Marino, 2003). Lahat et al. (1999), también informaron una alta expresión de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en pacientes con EC. También se ha demostrado

in vitro que la gliadina estimula la producción de IL-8 y TNF- α por monocitos de sangre periférica de pacientes con EC (Cinova et al., 2007; Manavalan et al., 2010).

Las citoquinas están implicadas tanto en la mejora como en la supresión de las respuestas inmunitarias a través de su influencia en las células T y otros efectores inmunitarios. IL-2, IL-12, INF- γ y TNF- α activan los linfocitos Th1, mientras que IL-4, IL-5 e IL-10 conducen a la activación de las células Th2 (Cherwinski et al., 1987). En la EC, se ha observado que, tanto las citoquinas Th1 como Th2, están elevadas (Karban et al., 1997). La gliadina del gluten induce la producción sostenida de citoquinas proinflamatorias Th1 (Kontakou et al., 1995; Nilsen et al., 1996; Fornari et al., 1998; Lio et al., 1998; Lahat et al., 1999; Sollid, 2000). La respuesta Th1 al gluten en la dieta en la mucosa del intestino delgado es la causa más probable de la infiltración linfocítica y monocítica de la lámina propia (Manavalan et al., 2010). Aunque se superponen en su función, las citoquinas derivadas de Th1 y Th2 median funciones diferentes. La respuesta Th1 es un aumento de la inmunidad mediada por células y respuestas proinflamatorias, mientras que las citoquinas Th2 afectan predominantemente a la respuesta inmune humoral y desempeñan un papel en la regulación a la baja de los procesos inflamatorios (Manavalan et al., 2010).

Figura 19. Posibles interacciones entre la lámina propia y el epitelio. Las células presentadoras de antígeno producen IL12 e IL15, que promueven la diferenciación Th1, la supervivencia y la proliferación de células T CD4 + específicas para el gluten. Estas células T proporcionan ayuda a las células B, lo que resulta en la producción de anticuerpos IgA específicos para TG2 o gliadina desamidada. Tras el reconocimiento de

los péptidos derivados de glutentina unidos a HLA-DQ2 y / o HLA-DQ8 en células presentadoras de antígeno o B, las células T CD4 + producen IFN- γ , IL-2 e IL-21. Estas citoquinas no solo actúan localmente, sino que también pueden atravesar la membrana basal y unirse a los receptores en las células epiteliales intestinales y en los LIE. El IFN- γ induce la producción de MMP, que descomponen la matriz extracelular, mediante fibroblastos locales de la lámina propia. En el epitelio, promueve la muerte de las células epiteliales intestinales y posiblemente la producción de IL-15 por parte de las células epiteliales intestinales. La IL-2 actúa como un factor de crecimiento autocrino, pero también puede alcanzar el epitelio y activar los LIE. La IL-21 tiene muchas funciones. En el epitelio, induce la producción de CCL20, un quimioatrayente de células T, por las células epiteliales intestinales y aumenta la citotoxicidad de los LIE. En la lámina propia, induce la producción de MMP por fibroblastos y ayuda al crecimiento y diferenciación de las células B. Finalmente, IL-7 e IL-15 producidos por las células epiteliales intestinales promueven la activación y supervivencia de los LIE. Los LIE activados a su vez tienen la capacidad de matar a las células epiteliales intestinales. Estos procesos contribuyen potencialmente a las múltiples características de la patología de la EC: mayor número de LIE, atrofia vellosa y producción de anticuerpos específicos de la enfermedad. (Tomado de Van Bergen et al., 2015).



2.3.3. ALTERACIÓN DE LA RED DE CITOQUINAS Y MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

La tolerancia a los antígenos de la dieta se relaciona con la activación de células T reguladoras y la producción de citoquinas de efecto inmunosupresor (IL-10 o TGF- β) que previenen las respuestas inadecuadas de los linfocitos Th efectores (Mowat, 2003). En la EC, los linfocitos T CD4⁺ de la lámina propia y los LIE CD8⁺ contribuyen a desencadenar una respuesta Th1 dominada por el IFN- γ , el factor de transcripción T-bet y otras citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-18, IL-21), junto a un descenso de IL-10 e TGF- β (Nilsen et al., 1995; Forsberg et al., 2002; Leon et al., 2006), y la producción de IL-15 por los enterocitos (Maiuri et al., 2003; Escudero-Hernández et al., 2017). Este

perfil de tipo proinflamatorio, activa mecanismos efectores del daño tisular, en los que interviene el factor de crecimiento de queratinocitos (Salvati et al., 2001), y metaloproteinasas de matriz (Bajaj-Elliot et al., 1998; Daum et al., 1999), implicados en la degradación de la matriz extracelular y la transformación mucosa (Arranz & Garrote, 2009).

Al contrario de otras enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, en la EC no se describe un aumento de IL-12, principal citoquina inductora de la respuesta Th1, por lo que otras citoquinas deberían inducir la diferenciación Th1, como el IFN- α , producido por células dendríticas plasmacitoides (Monteleone et al., 2001; Di Sabatino et al., 2007), o la IL-21 (Fina et al., 2008; Garrote et al., 2008), cuyo gen se localizó en una región ligada a la susceptibilidad de la EC (Van Heel et al., 2007). Estas citoquinas producidas por células de la inmunidad adaptativa (IFN- γ , IL-21), o innata (IFN- α , IL-15), podrían determinar el desarrollo de la inflamación y la enteropatía en la EC (Garrote et al., 2008), además de contribuir a la pérdida de tolerancia al gluten, debido al bloqueo de la vía de señalización del TGF- β , por la IL-15 (Benahmed et al., 2007), o por inhibición de la supresión de los linfocitos T efectores por linfocitos T reguladores a través de la IL-21 (Arranz & Garrote, 2009; Meresse et al., 2009; Escudero-Hernández et al., 2017).

2.3.4. RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN

La condición inflamatoria puede estar directamente relacionada, entre otros factores, con el aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor

de IFN- γ y el TNF- α en pacientes con EC (Nilsen et al., 1995). Curiosamente, algunas de las citoquinas pueden producir grandes cantidades de EROs (Ohba et al., 1993; Kayanoki et al., 1994). Los niveles elevados de TNF- α en plasma son responsables de un aumento de EO y de daño al ADN por oxidación de las células CD34+ (Peddie et al., 1997) y, algunas evidencias experimentales, indican que el EO es uno de los principales mecanismos que pueden estar implicados en la patogénesis de la EC (Diosdado et al., 2005; Szaflarska-Popławska et al., 2010).

La asociación entre la inflamación y el EO está bien documentada (Halliwell & Gutteridge, 1999; Wiseman & Halliwell, 1996; Szaflarska-Popławska et al., 2010). La respuesta inflamatoria puede conducir al reclutamiento de leucocitos activados, lo cual puede, a su vez, dar lugar a un "estallido respiratorio", que es un aumento del consumo de oxígeno que provoca la liberación de grandes cantidades de EROs, tales como O₂⁻ y H₂O₂, con la posible producción posterior de daños en el ADN (Cooke et al., 2006; Szaflarska-Popławska et al., 2010). Las células inflamatorias activadas producen EROs por la vía de explosión respiratoria, así como el metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas (Cadenas et al., 1989; Schulze-Osthoff et al., 1992; Al-Mashhadani et al., 2009).

Se ha estimado que la inflamación crónica puede estar implicada en el desarrollo de alrededor de un tercio de todos los casos de cáncer en todo el mundo (Ames et al., 1993; Coussens y Werb, 2002). Aunque la EC se desencadena por el gluten de la dieta, es un trastorno genético autoinmune multisistémico que parece estar relacionado con un estado de EO e inflamación crónica que a su vez puede estar asociado con un mayor

riesgo de neoplasias malignas. Hay evidencias de que el daño oxidativo del ADN puede utilizarse como un marcador predictivo del desarrollo de cáncer (Olinski et al., 2003; Szaflarska-Popławska et al., 2010).

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se llevo a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Materno Infantil Virgen de las Nieves de Granada (HUVN) (Ref. 201202400000697). El consentimiento informado por escrito se obtuvo de todos los padres.

Se realizó un estudio transversal descriptivo en 80 niños con edad de 7 a 18 años, que se dividieron, no aleatoriamente, en dos grupos:

- a) Grupo celiaco: incluyó a 40 niños diagnosticados de EC, de ellos 18 eran niñas (45%) y 22 niños (55%).
- b) Grupo control sano: incluyó 40 controles sanos de los que 19 eran niñas (48%) y 21 niños (52%), que habían acudido al HUVN por problemas menores.

Los niños con EC habían sido diagnosticados de acuerdo con la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN, 2012), con los siguientes criterios: 1) presencia de síntomas clínicos, 2) presencia de autoanticuerpos, 3) dependencia del gluten del título de autoanticuerpos, 4) observación de la mejoría de los síntomas y la reducción en el título de anticuerpos anti-TG2 en una DSG, y 5) en niños, crecimiento de recuperación cuando corresponda. Estos niños llevaban siguiendo una DSG estricta durante al menos dos años (y, por tanto, durante el

estudio) como lo demuestra la ausencia de anticuerpos IgA en suero e IgG anti-TG2 en al menos el último año.

El grupo control de niños sanos, presentaron serología negativa para EC y no tenían antecedentes de ninguna enfermedad crónica. Estos niños asistieron a este servicio debido a síntomas menores relacionados con gastroenteritis o diarrea y, al verificar que su evolución se debió a síntomas gastrointestinales transitorios (relacionados con el rotavirus), se incluyeron en el grupo de control. Una vez que se superó la infección, se evaluó la ausencia de anticuerpos séricos IgA e IgG anti-TG2. Los criterios de inclusión para el grupo de control fueron: edad entre 7 y 18 años, ausencia de anticuerpos séricos IgA e IgG anti-TG2, peso normal para la edad, ausencia de trastornos gastrointestinales en el año anterior y apetito normal.

Los criterios de exclusión para ambos grupos fueron: enfermedades hepáticas o renales, inflamación aguda y crónica, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, asma crónica, consumo de suplementos dietéticos que contuviesen sustancias con actividad antioxidante. También excluimos a los pacientes obesos (según los criterios del Grupo de trabajo internacional) (Cole et al., 2000), y aquellos que no firmaron el consentimiento informado.

Tras la aceptación por parte de los padres o tutores a participar en el estudio, los niños fueron citados dos veces; la primera en el servicio de Gastroenterología Pediátrica del HUVN en ayunas para obtención de muestra de sangre y orina y estudio clínico. La segunda vez se les citó en el Instituto Mixto Universitario de Deporte y Salud (IMUDS)

de la Universidad de Granada, para estudio antropométrico, realización de las encuestas y obtención de una muestra de sangre periférica.

3.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para las determinaciones de los parámetros oxidativos e inflamatorios, se tomaron 5 mL de sangre venosa de los pacientes, a primera hora de la mañana, en ayunas, en el Servicio de Extracciones del HUVN. La sangre fue recogida en tubos con EDTA como anticoagulante. Seguidamente se prosiguió a la obtención del plasma de las mismas, para lo que se centrifugó la sangre a 2500 x g a 4°C durante 10 minutos (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania), y se tomó el sobrenadante. El plasma se congeló en tubos eppendorf a -80°C hasta futuras mediciones adicionales una vez recolectadas las muestras de todos los pacientes.

Las muestras de orina también fueron tomadas de primera hora de la mañana, en ayunas, en el Servicio de Extracciones del HUVN y congeladas y almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.3.1. SOD1 Y SOD2 SOLUBLES

Las proteínas enzimáticas SOD1 y SOD 2 contrarrestan la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), metabolizan los radicales superóxido a oxígeno

molecular y peróxido de hidrógeno o eliminan los radicales de oxígeno producidos por las amplias reacciones de oxidación-reducción y transporte de electrones que se producen en las mitocondrias (Nojima et al., 2015).

La SOD1 citoplásmica soluble es una enzima que contiene cobre y zinc mientras que la SOD2 es una enzima de la matriz mitocondrial que elimina los radicales de oxígeno producidos por las extensas reacciones de óxido-reducción y transporte de electrones que ocurren en las mitocondrias. Estas proteínas SOD pertenecen a la familia de las metaloenzimas y se distribuyen ampliamente en procariotas y eucariotas, clasificándose como SOD de cobre / zinc (SOD Cu / Zn; SOD1) y SOD de manganeso (MOD SOD; SOD2) (Miller, 2012; Nojima et al., 2015).

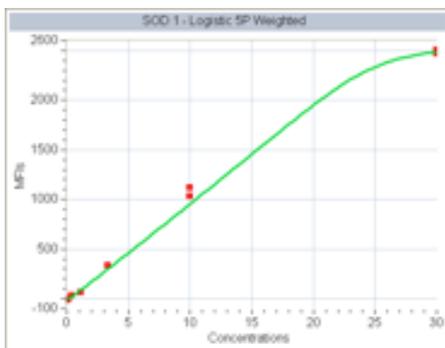
Las isoformas solubles de SOD1 y SOD2 se determinaron en plasma utilizando el panel HND3MAG-39K Milliplex MAP Human Neurological Disorders Magnetic Bead Panel 3 (Millipore Corporation, Missouri, EE.UU.), basada en inmunoensayos en la superficie de perlas codificadas con fluorescencia (microesferas) siguiendo las especificaciones del fabricante. La tecnología MILLIPLEX® MAP presenta ventajas de rendimiento evaluadas durante el proceso de validación que incluyen: reactividad cruzada, linealidad de dilución, estabilidad del kit y comportamiento de la muestra (detectabilidad, reproducibilidad y estabilidad). Durante la ejecución de la técnica se emplean numerosos controles de calidad que aseguran la viabilidad de los resultados:

- Controles de calidad proporcionados para calificar el rendimiento del ensayo.

- Comparación de lotes estándar (calibrador) y control de calidad con un lote de referencia para asegurar la consistencia lote a lote.
- Matriz sérica optimizada para imitar el ambiente nativo del analito.

Las curvas de calibración fueron las siguientes (Figura 20):

SOD 1



SOD 2

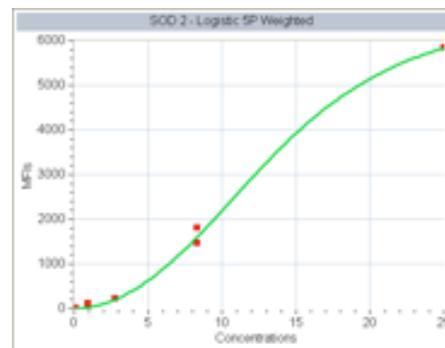


Figura 20. Curvas de calibración de SOD1 y SOD 2.

Esta tecnología está construida sobre tecnologías existentes y probadas, la citometría de flujo, uso de microesferas, tecnología láser, procesamiento de las señales digitales y la química tradicional del inmunoensayo. El sistema Luminex es la combinación de tres tecnologías xMAP básicas. La primera es la de microesferas xMAP, una familia de 100 microesferas de poliestireno de 5.6 micrómetros, coloreadas mediante fluorescencia, que actúan como identificador, y superficie sólida para desarrollar el ensayo. La segunda, es un instrumento basado en citometría de flujo, que integra componentes como láseres, óptica, fluidos avanzados y procesadores de señal

digital de alta velocidad. El tercer componente es el software, diseñado para la adquisición de datos, con un sólido análisis de regresión de datos. Esta tecnología presenta ciertas ventajas como reducción de coste y trabajo, reducción de tiempo y resultados más reproducibles. La mezcla de reacción se incubó con el conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, para completar la reacción en la superficie de cada microesfera. Una vez incubados los paneles, la placa se leyó en el analizador LABScan 100 (Luminex Corporation, Texas, EE. UU.), utilizando el software xPONENT para la adquisición de datos. Los valores promedio para cada conjunto de muestras o estándares duplicados estaban dentro del 15% de la media. Los valores se expresaron en pg/mL. El intervalo de la curva estándar fue de 0.04 - 30 ng/mL para SOD 1 y de 0,03 - 25 ng/mL para SOD 2. Las concentraciones de enzimas solubles en muestras de plasma se determinaron comparando la media de muestras duplicadas con la curva estándar para cada ensayo.

3.3.2. 15- F2t-isoprostanos

Los isoprostanos son compuestos de tipo prostaglandina formados in vivo a partir de la peroxidación catalizada por RL de AG esenciales. Estos compuestos poseen una potente actividad biológica como mediadores inflamatorios y son marcadores precisos del estrés oxidativo en humanos.

Los isoprostanos en orina se midieron utilizando el kit comercial “Enzyme Immunoassay for Urinary Isoprostane (Oxford Biomedical Research, Oxford, England), que es un ensayo ELISA, (“enzyme-linked immunoassay”, en español, “ensayo por

inmunoabsorción ligado a enzimas”) para determinar los niveles de 15-IsoP F2t (el isoprostano mejor caracterizado) en muestras de orina. La técnica ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como en este caso, un cambio de color.

Las muestras de orina se mezclaron con un tampón de dilución mejorado que esencialmente elimina las interferencias debidas a las uniones no específicas. El 15-F2t-isoprostano en las muestras o estándares compite con el 15-F2t-isoprostano conjugado a la peroxidasa HRP para unirse a un anticuerpo policlonal específico para el 15-F2t-isoprostano recubierto en la microplaca. La actividad de HRP produce un desarrollo de color cuando se agrega el sustrato, con la intensidad del color proporcional a la cantidad de 15-F2t-Isoprostano-HRP unida, e inversamente proporcional a la cantidad de 15-F2t-Isoprostano no conjugado en las muestras o estándares.

La curva de cuatro parámetros de nuestra curva estándar fue la siguiente (Figura 21):

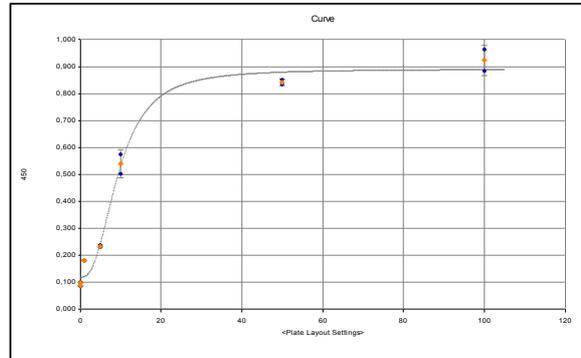


Figura 21. Curva estándar de isoprostanos

La placa se leyó espectrofotométricamente (Bio-tek, Vermont, EE. UU.) a 450 nm, y los valores se expresaron en pg/mL. El intervalo de la curva estándar fue de 0,05 a 100 ng/mL .

Todas las mediciones fueron hechas por duplicado y el promedio fue el resultado final. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores del 10%.

3.3.3. ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL (TAS)

Para determinar la capacidad antioxidante total de las muestras (niveles plasmáticos de TAS), se utilizaron muestras de plasma de cada paciente previamente obtenidas y almacenadas a -80°C. Las muestras de plasma recién descongeladas se

analizaron usando el TAS Randox kit (Randox laboratories, Ltd, Crumlin, Reino Unido).

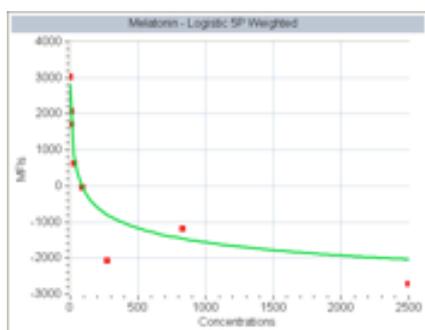
Esta técnica está basada en el principio de la formación del radical catión 2,2'azino-di- (3- etilbenzotiazohín sulfonato) (ABTS⁺), a raíz de la incubación del ABTS con una peroxidasa (metamioglobina) y H₂O₂. Este radical presenta un color verde-azulado relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra agregada causa la supresión de la formación del radical, y por tanto, de esta coloración, siendo, por tanto la intensidad del color proporcional a su concentración, es decir, proporcional a la actividad antioxidante. Éste método utiliza el Trólox (derivado sintético de la vitamina E) como patrón.

Los resultados se expresaron en mM de equivalentes de Trolox. El rango de referencia para plasma sanguíneo humano lo proporciona el fabricante como 1.30–1.77 mmol/L. La linealidad de calibración se extiende a 2.5 mmol/L de Trolox. Las mediciones por duplicado se utilizaron para determinar la variabilidad intraensayo.

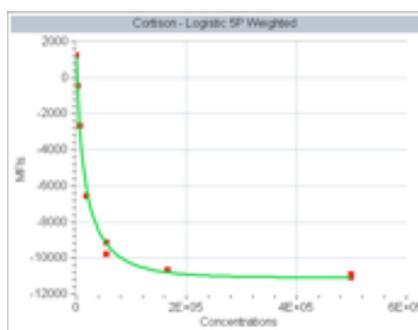
3.3.4. MELATONINA Y CORTISOL

El cortisol y la melatonina se determinaron en plasma utilizando el Panel HNCSMAG-35K Milliplex MAP Human Circadian/Stress Magnetic Bead Panel (Millipore Corporation, Missouri, EE.UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. La placa se leyó en el analizador LABScan 100 (Luminex Corporation, Texas, EE. UU.) con el software xPONENT para la adquisición de datos.

El intervalo de la curva estándar para el cortisol fue de 686-500000 pg/mL; y para la melatonina de 3.4- 2500 pg/mL. Las concentraciones de analitos en muestras de plasma se determinaron comparando la media de las muestras duplicadas con la curva estándar para cada ensayo (Figura 22). Los valores de ambas se expresaron en pg/mL.



Melatonina



Cortisol

Figura 22. Curvas estándar de melatonina y cortisol

3.3.5. 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

La 8-OHdG es un nucleósido oxidado del ADN, escindido durante la reparación del daño oxidativo a los sitios de desoxiguanosina en el ADN y que se ha utilizado ampliamente como biomarcador del daño oxidativo del ADN.

La 8-OHdG en plasma se midió utilizando un kit comercial (8OHdG Check, Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japón). El 8OHdG Check es un

ensayo ELISA (“enzyme-linked immunoassay”, en español, “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) competitivo para la detección cuantitativa del aducto de ADN oxidativo 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG). Para separar las sustancias interferentes, se realizó una filtración del suero con un ultrafiltro (corte de peso molecular 10000).

La técnica ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como en este caso, un cambio de color.

El anticuerpo monoclonal 8OHdG y la muestra se agregan a la placa de microtitulación cubierta previamente con 8OHdG. El anticuerpo monoclonal 8OHdG reacciona competitivamente con la 8OHdG unida a la placa y la 8OHdG de las muestras. Por lo tanto, concentraciones más altas de 8OHdG en la solución de las muestras, conducen a una unión reducida del anticuerpo a la 8OHdG de la placa. Los anticuerpos que se unen a la 8OHdG de la muestra se eliminan de los anticuerpos que se han unido a la 8OHdG unida a la placa. Un anticuerpo secundario marcado con enzimas, que se agrega a la placa, se une al anticuerpo monoclonal que estaba unido a la 8OHdG de la placa. El anticuerpo secundario marcado con enzimas que no se ha unido, se elimina mediante una etapa de lavado.

Figura 23. Representación esquemática de la reacción competitiva de el anticuerpo monoclonal 8OHdG con la 8OHdG unida a la placa y la 8OHdG de las muestras.



La adición de un sustrato cromático, da como resultado el desarrollo de color en proporción a la cantidad de anticuerpo unido a la placa. Una vez terminada la reacción colorimétrica, se mide la absorbancia.

Los resultados se leyeron a 450 nm en un lector de microplacas (Bio-tek, Vermont, EE. UU.). Los valores se expresaron en pg/mL. El intervalo de la curva estándar fue de 0,125 a 10 ng/mL (Figura 24).

Todas las mediciones fueron hechas por duplicado y el promedio fue el resultado final.

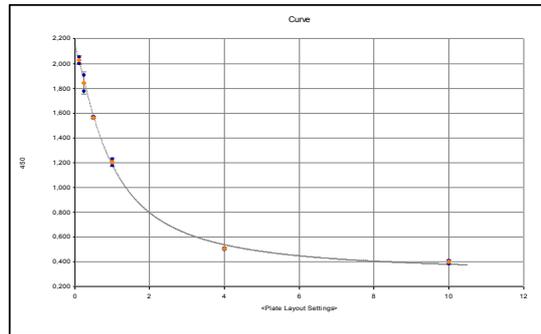


Figura 24. Curva estándar de 8-OHdG

3.3.6. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS AISLADAS (ENSAYO COMET ALCALINO)

La técnica usada en nuestro estudio es el Ensayo Comet Alcalino (Alkaline single-cell gel electrophoresis). De forma general, el ensayo Comet Alcalino cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación de éstas en agarosa, lisis con detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN, electroforesis, neutralización, tinción y cuantificación (Díaz-Castro et al., 2008).

- Aislamiento de linfocitos de sangre periférica

Se utilizan portas de cristal donde se depositan 85 μ L de agarosa HMP (High Melting Point) al 1% en PBS que es desecada previamente en la estufa a 40° C. De esta manera se consigue que las sucesivas capas de agarosa queden fijadas al portaobjetos. Una vez desecada, se depositan 85 μ l de agarosa HMP al 1% en PBS a 37°C y pH= 7.4. Se coloca un cubreobjetos y se deja el porta en la nevera (5 minutos) para que solidifique. Se retiran los cubres después de la solidificación.

Para el aislamiento de los linfocitos se toman 50 μ L de sangre de un pinchazo en el dedo y se introducen en un eppendorf con EDTA como anticoagulante y completando hasta un volumen final de 1 mL con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, EE.UU) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Gibco, Scotland, Reino Unido).

Posteriormente se depositan suavemente en el fondo del eppendorf 100 μ l de Histopaque-1077-1 y se centrifuga a 200 g durante 3 minutos (4° C y oscuridad). A continuación se procede al lavado de las células (retirada del Histopaque que es tóxico para los linfocitos), para ello se recogen los 100 μ l de la interfase rosa (corresponde a linfocitos) y se llevan a un tubo eppendorf con 900 μ l de PBS (37oC y pH=7.4), volviendo a centrifugar a 200 g durante 3 minutos (4° C y en oscuridad).

- Inclusión de linfocitos en agarosa

Cuando se procede a la inclusión de linfocitos en agarosa se ha de recoger la mayor cantidad de células que se encuentran en una de las paredes del tubo. Para ello se pipetea 85 µl de agarosa LMP (Low Meeting Point) al 1% precalentada a 37° C, y se mezclan con las células; esta mezcla se ha de depositar en la capa de agarosa HMP que se elaboró en el primer paso.

- Lisis de las membranas celulares con detergente

Para conseguir la ruptura de las membranas celular y nuclear, se colocan los portas en solución de lisis [2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA, NaOH to pH=10 y 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, EE.UU)] durante al menos 1 hora, con lo cual se consigue que se desestructuren las membranas plasmáticas y se eliminan las proteínas celulares, así queda al descubierto el nucleóide con el material genético, donde finalmente se evalúa el daño.

- Tratamiento alcalino

Posteriormente, los portas se colocan de forma ordenada (asegurando el contacto entre ellos, para que la migración de los fragmentos de ADN sea correcta) en una cubeta de electroforesis que contiene tampón alcalino (0.3 M NaOH y 1 mM Na₂EDTA)

durante 40 minutos a 4° C, con el fin de que se produzca la desnaturalización o separación de las cadenas de ADN.

- Electroforesis en gel de las células aisladas

Transcurridos los 40 minutos de tratamiento alcalino, se inicia el proceso de electroforesis durante 30 minutos a un voltaje constante de 25 V y 300 mA, donde el ADN migra hacia el ánodo, en cantidad y velocidad dependiente del número de lesiones existentes en la doble hélice.

- Neutralización

Una vez terminada la electroforesis, se necesita neutralizar el álcali de los geles lavando los portaobjetos con una tampón adecuado (0.4M Tris base a pH 7.5). Se someten a tres lavados consecutivos de 5 minutos cada uno manteniendo la temperatura de 4° C y oscuridad.

- Tinción y cuantificación del ensayo mediante microscopía y software

Finalizado el proceso de neutralización, se realiza la tinción de las muestras colocando una alícuota de 20 µL de 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) en cada gel a una concentración de 5 µg/mL.

Los nucleoides teñidos con DAPI se examinan bajo un microscopio-UV Leica DMLS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400. El análisis se realizó con una cámara Hitachi (Satandard Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Se contabilizaron un total de 100 *comets* por cada gel (seleccionados al azar en diversos campos). Los parámetros usados para la cuantificación del daño en el ADN han sido: el porcentaje de fluorescencia en la cola del *comet* (representando la fracción de ADN en la misma), porcentaje de ADN en la cabeza (representando la fracción del material genético en la misma) y el *Olive Tail Moment* (definido como el producto de la longitud de la cola del *comet* y la fracción de ADN en la misma, $OTM = [\text{Media de la cola} - \text{Media de la cabeza}] \times \% \text{ ADN en cola} / 100$). El OTM es un buen índice para cuantificar el daño en el ADN, porque evalúa no sólo que cantidad de ADN ha migrado desde la región de la cabeza, sino que además indica la distancia que ha recorrido ese fragmento de ADN.

Figura 25. Representación de los índices empleados para la determinación del OTM (Hijano, 2010).

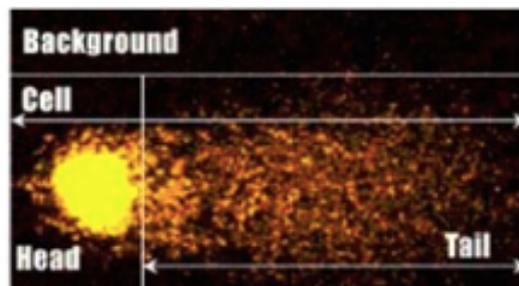
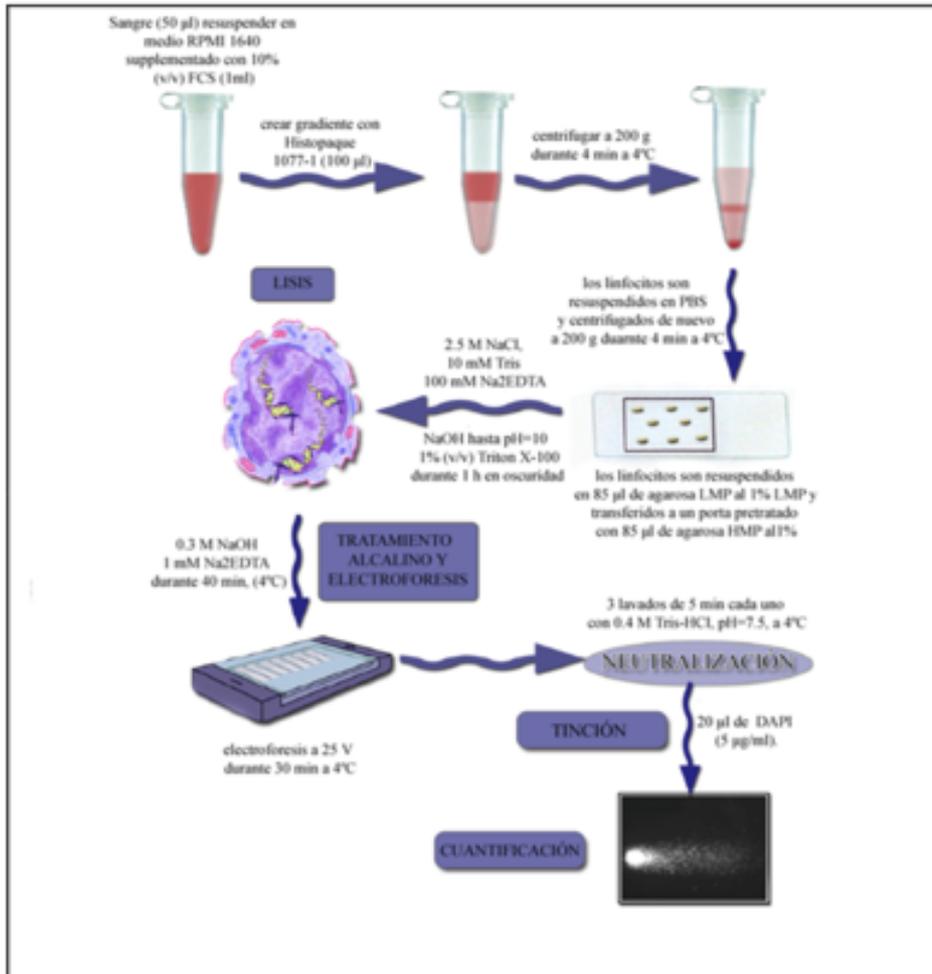


Figura 26. Esquema simplificado de las diferentes fases del Ensayo *Comet* Alcalino (Hijano, 2010).



3.3.7. PARÁMETROS INFLAMATORIOS

Se determinaron en muestras de plasma de los pacientes Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Eotaxina, Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF),

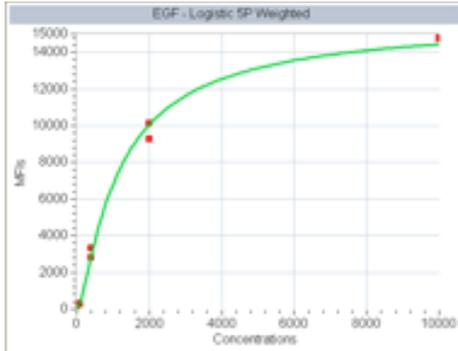
Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), Interferón (IFN)- α 2, IFN- γ , Interleuquina (IL)-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, Proteína inducible por interferón (IP)-10, Proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β , Factor de necrosis tumoral (TNF)- α El TNF- β y el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) utilizando el panel de perlas magnéticas de citoquinas/quimiocinas HCYTMAG-60K-PX29 Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore Corporation, Missouri, EE.UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Este panel permite centrarse en el potencial terapéutico de las citoquinas, así como en la modulación de la expresión de las mismas, y la cuantificación simultánea de las quimiocinas.

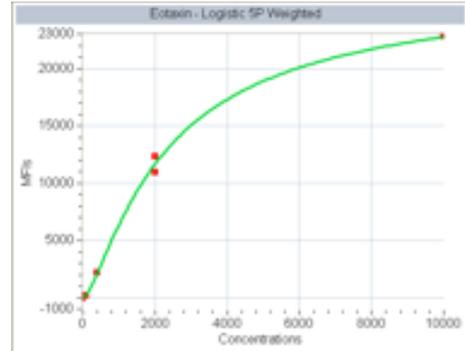
La placa se leyó en el analizador LABScan 100 (Luminex Corporation, Texas, EE. UU.) con el software xPONENT para la adquisición de datos. Los valores se expresaron en pg/ml. El intervalo de la curva estándar fue de 3.2 a 10.000 pg/mL. Las concentraciones de citoquinas en muestras de plasma se determinaron comparando la media de las muestras duplicadas con la curva estándar para cada ensayo (Figura 27).

Figura 27. Curva estándar de cada uno de los parámetros inflamatorios determinados.

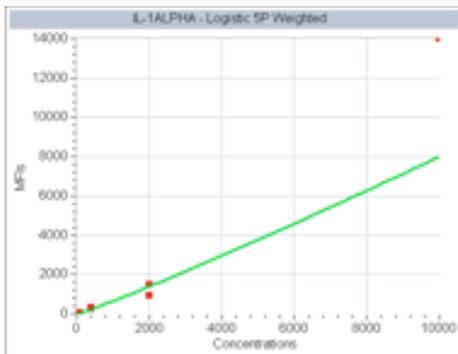
EGF



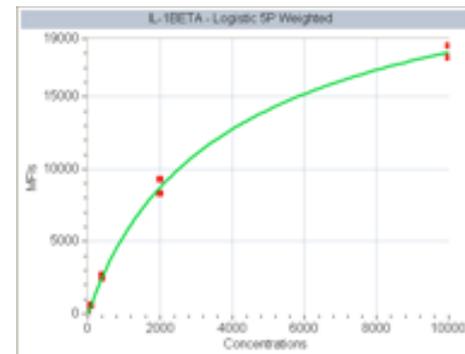
Eotaxin



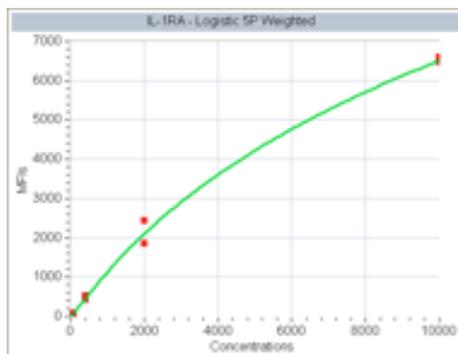
IL- 1 ALPHA



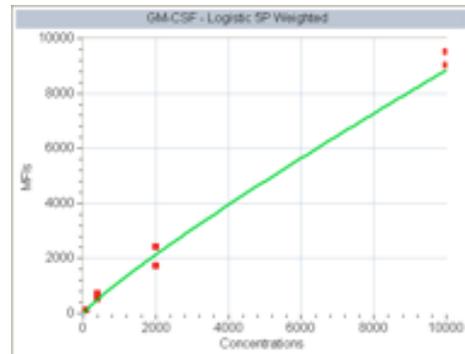
IL-1BETA



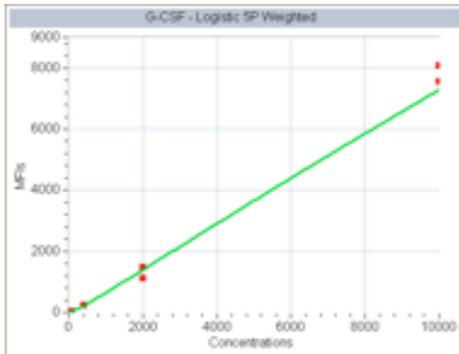
IL- 1 RA



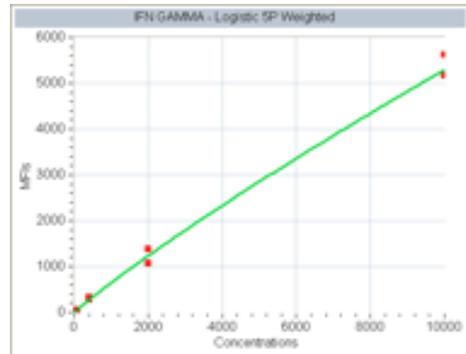
GM- CSF



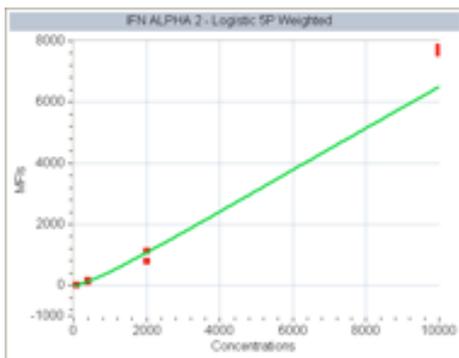
G-CSF



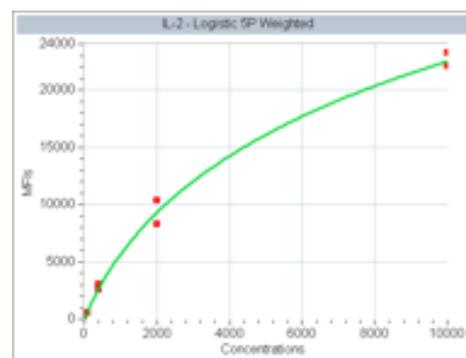
IFN GAMMA



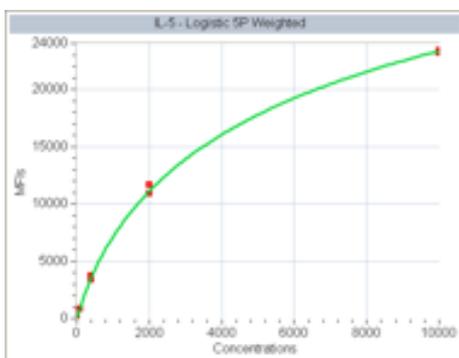
IFN ALPHA 2



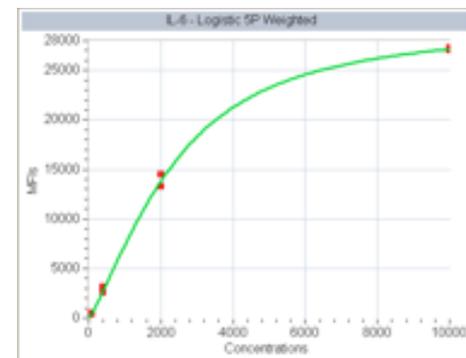
IL- 2



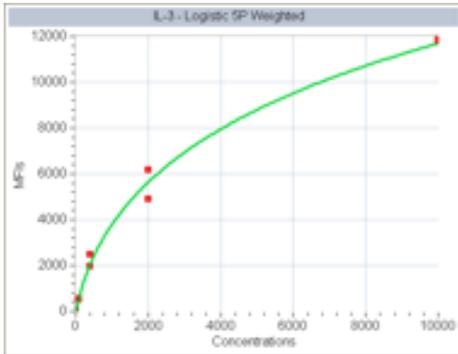
IL- 5



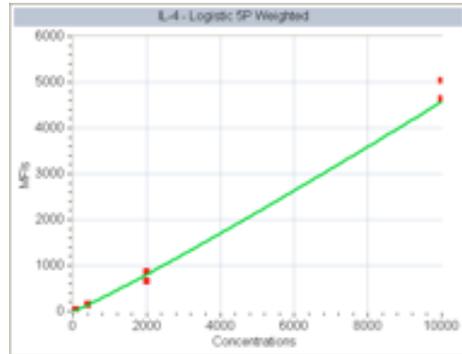
IL- 6



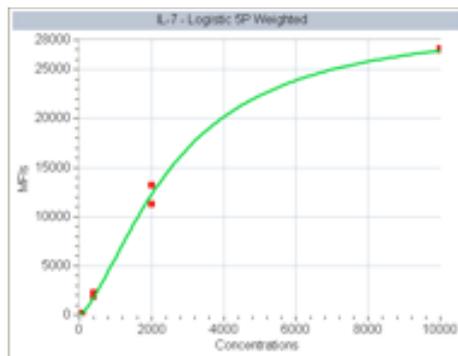
IL- 3



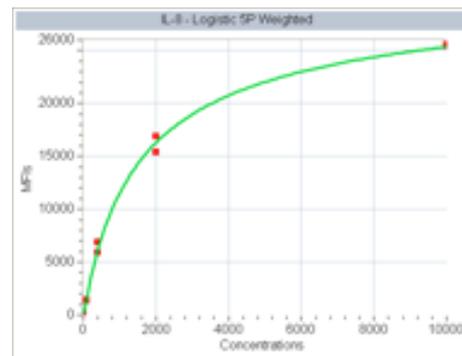
IL- 4



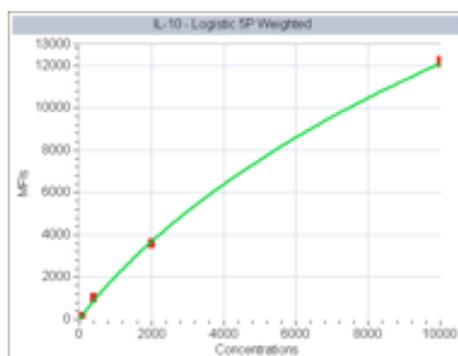
IL- 7



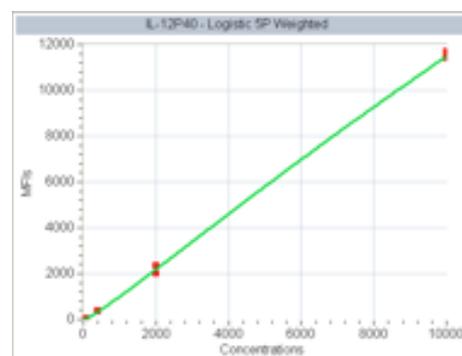
IL- 8



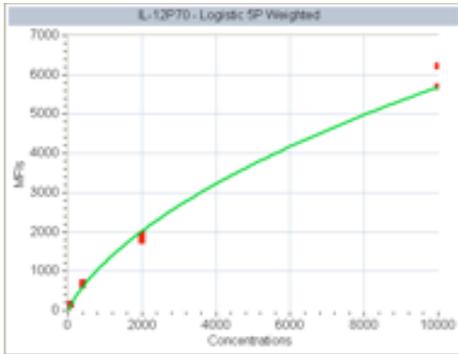
IL- 10



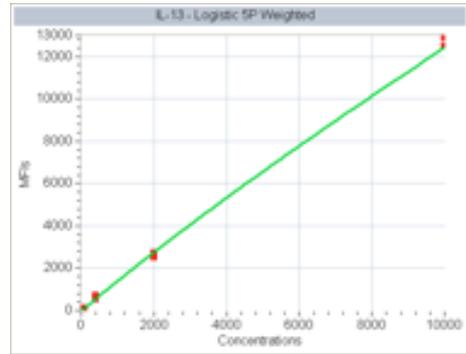
IL- 12P40



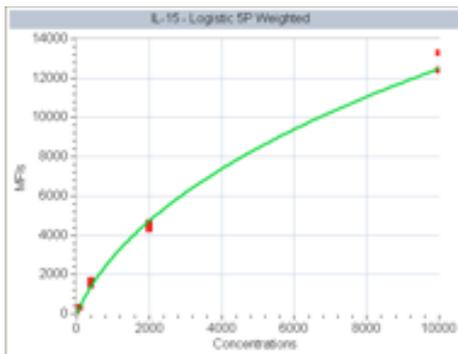
IL- 12P70



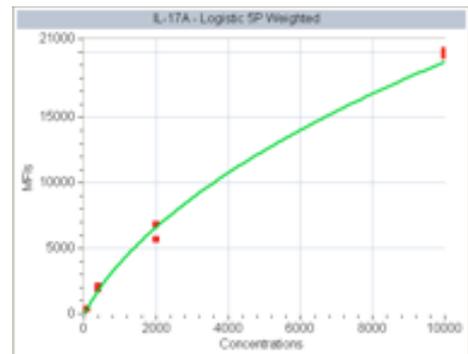
IL- 13



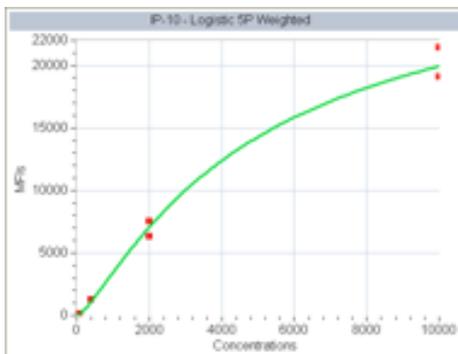
IL-15



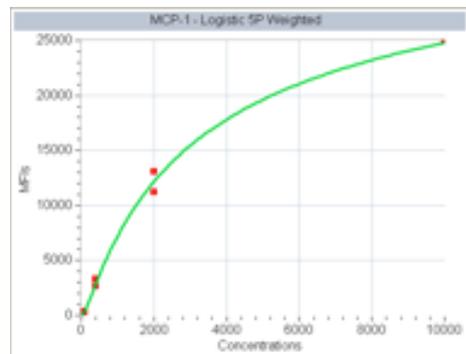
IL-17A



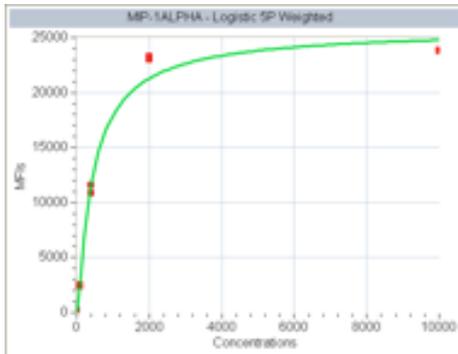
IP-10



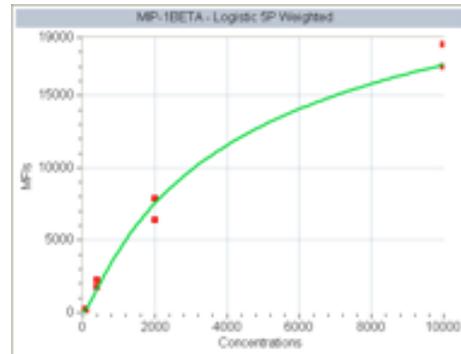
MCP-1



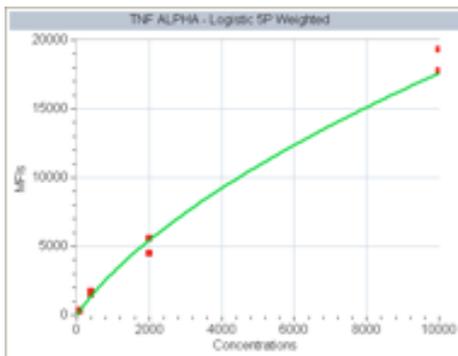
MIP-1ALPHA



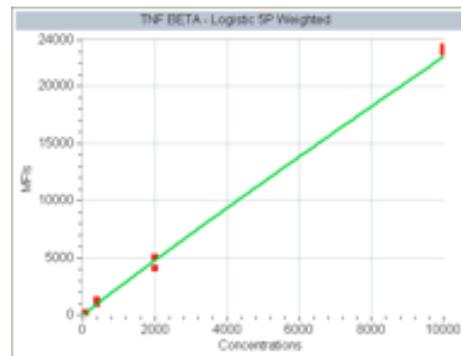
MIP-1BETA



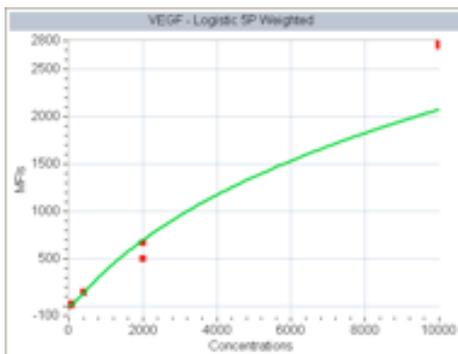
TNF ALPHA



TNF BETA



VEGF



3.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como medias \pm error estándar de la media (EEM). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático “Statistical Package for Social Sciences” (versión 24.0, 2016, SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Para evaluar las diferencias entre los niños con EC y los controles se utilizaron los análisis estadísticos apropiados, como la prueba *t* de Student no pareada para variables con distribución normal y homogeneidad de varianza y la prueba U de Mann-Whitney para variables con distribución no normal. Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de $P < 0.05$.

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

Las características antropométricas de los sujetos participantes en el estudio se resumen en la Tabla 5. No hay diferencias estadísticamente significativas en la edad, el sexo, el peso y la altura entre los pacientes de los grupos control y celíacos de manera que ambos grupos experimentales se pueden considerar homogéneos desde el punto de vista antropométrico.

Tabla 5. Características antropométricas de los sujetos controles y celíacos.

		Grupo control (n=40)	Grupo celíaco (n=40)
Edad (años)		11,42 ± 3,55	10,06 ± 3,12
Sexo	masculino (%)	52	55
	femenino (%)	48	45
Peso (kg)		41,86 ± 13,77	34,75 ± 10,53
Altura (cm)		147,25 ± 19,16	138,88 ± 15,58
Los datos de muestran como valores medios ± error estándar de la media			

Con respecto a los antioxidantes plasmáticos determinados (SOD1, SOD2, melatonina y TAS) y los biomarcadores relacionados con el daño oxidativo a las prostaglandinas (15-F2t-isoprostanos), no se han observado diferencias significativas

entre los grupos control y con EC ni tampoco se muestran diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cortisol. La Tabla 6 muestra estos resultados.

Tabla 6. Marcadores oxidativos y antioxidantes en sujetos controles y celíacos.

	Grupo control (n=40)	Grupo celíaco (n=40)
SOD1 (pg/mL)	52,52 ± 1,62	52,77 ± 1,37
SOD2 (pg/mL)	61,03 ± 5,04	57,25 ± 3,05
15-F2t-isoprostanos (pg/mL)	8,99 ± 0,25	9,03 ± 0,26
TAS (mmol/L)	1,69 ± 0,06	1,57 ± 0,05
Melatonina (µg/mL)	639,88 ± 110,44	477,02 ± 97,71
Cortisol (µg/mL)	49,55 ± 6,14	53,33 ± 40,25
Los datos se muestran como valores medios ± error estándar de la media. SOD1 Superóxido Dismutasa 1, SOD2 Superóxido dismutasa 2, TAS Capacidad antioxidante total (Total Antioxidant Status)		

No se encontraron diferencias en el daño al ADN (medido a través de la cuantificación de los sitios de desoxiguanosina (8-OHdG) (Tabla 7) ni tampoco en la estabilidad del ADN en linfocitos de sangre periférica (Tabla 8 y Figura 28).

Tabla 7. Daño al ADN medido a través de la 8-hidroxiguanosina en sujetos controles y celíacos.

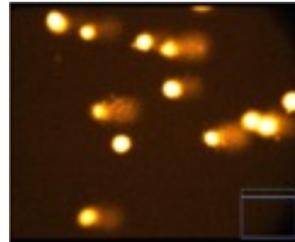
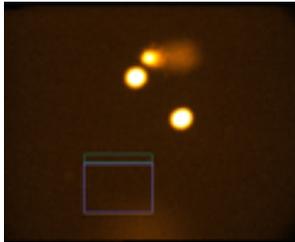
	Grupo control (n=40)	Grupo celíaco (n=40)
8-hidroxiguanosina (ng/mL)	4,44 ± 0,51	4,83 ± 0,45
Los datos de muestran como valores medios ± error estándar de la media.		

Tabla 8. Estabilidad del ADN en linfocitos de sangre periférica medida a través del ensayo comet alcalino en sujetos controles y celíacos.

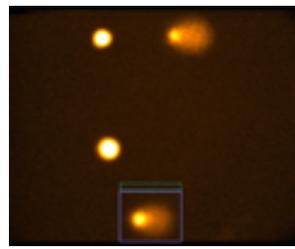
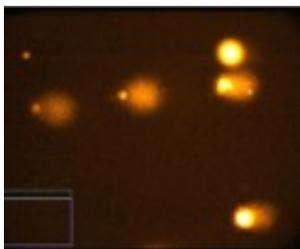
	Grupo control (n=40)	Grupo celíaco (n=40)
ADN Cabeza (%)	81,39 ± 1,23	81,62 ± 1,26
ADN Cola (%)	18,61 ± 1,23	18,38 ± 1,26
OTM	0,383 ± 0,045	0,353 ± 0,034
Los datos de muestran como valores medios ± error estándar de la media.		

Figura 28. Imagen representativa de comet de paciente celiaco (A y B) y paciente control en C y D.

(A y B)



(C yD)



Las señalización pro- y antiinflamatoria evaluadas a través de las citoquinas se muestran en la Tabla 9. IL-1 α , TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-12, IL-18 y G-CSF, GM-CSF e IP-10 son mediadores celulares bien caracterizadas como citoquinas proinflamatorias, mientras que IL4, IL-10, IL-13 e IFN- α 2 son reconocidas como citoquinas antiinflamatorias, aunque esta clasificación es algo difusa, ya que una citoquina puede comportarse como pro y como antiinflamatoria. De hecho, el nivel de citoquinas, la naturaleza de la señal de activación y el tiempo de liberación plasmática son parámetros que influyen notablemente en las propiedades de las citoquinas. No se encontraron diferencias en la mayoría de los biomarcadores estudiados; sin embargo, la eotaxina (P <0.01), IFN- γ (P <0.001), IL-1 α (P <0.001), IP-10 (P <0.01), TNF- β (P <0.01) y VEGF

(P <0.05)) fueron mayores en el grupo celiaco en comparación con el grupo control (Figura 29).

Tabla 9. Señalización inflamatoria en sujetos controles y celíacos.

	Grupo control (n=40)	Grupo celiaco (n=40)
EGF (pg/mL)	18,67 ± 1,52	20,77 ± 1,82
Eotaxina (pg/mL)	79,83 ± 3,91	96,63 ± 4,66 **
G-CSF (pg/mL)	50,35 ± 5,98	57,47 ± 5,98
GM-CSF (pg/mL)	12,95 ± 1,54	15,22 ± 1,94
IFN-α2 (pg/mL)	134,19 ± 9,77	130,94 ± 7,98
IFN-γ (pg/mL)	34,18 ± 2,38	51,01 ± 3,51***
IL-10 (pg/mL)	12,02 ± 1,43	14,90 ± 1,72
IL-12P40 (pg/mL)	38,34 ± 4,45	38,91 ± 3,83
IL-12P70 (pg/mL)	8,77 ± 0,94	9,67 ± 0,82
IL-13 (pg/mL)	45,19 ± 15,65	50,49 ± 12,05
IL-15 (pg/mL)	5,71 ± 0,63	6,17 ± 0,78
IL-17A (pg/mL)	9,75 ± 3,45	9,49 ± 1,55
IL-1ra (pg/mL)	47,86 ± 4,08	51,71 ± 3,69
IL-1α (pg/mL)	31,05 ± 2,76	42,23 ± 2,35***
IL-1β (pg/mL)	4,82 ± 0,46	4,95 ± 0,50
IL-2 (pg/mL)	3,29 ± 0,37	3,67 ± 0,38
IL-3 (pg/mL)	9,66 ± 0,95	9,10 ± 0,84
IL-4 (pg/mL)	25,49 ± 3,72	23,76 ± 4,32
IL-5 (pg/mL)	3,17 ± 0,52	3,98 ± 0,60
IL-6 (pg/mL)	15,20 ± 4,64	17,05 ± 3,67
IL-7 (pg/mL)	21,00 ± 1,66	19,90 ± 1,38
IL-8 (pg/mL)	7,65 ± 1,22	8,06 ± 0,90
IP-10 (pg/mL)	505,17 ± 21,19	599,33 ± 20,99**

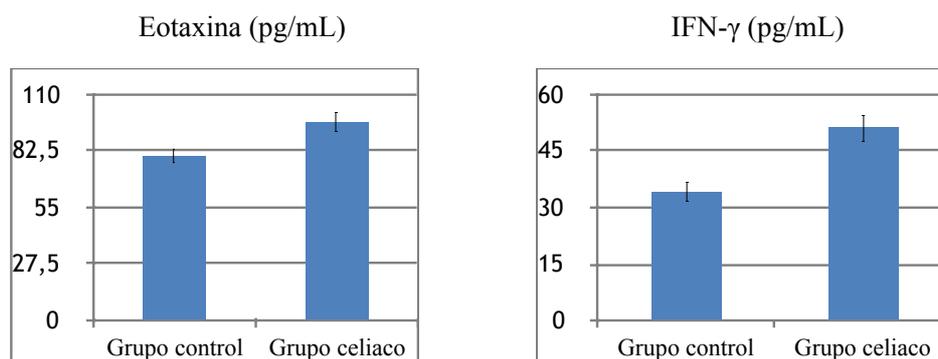
MCP-1 (pg/mL)	312,57 ± 17,02	357,03 ± 23,18
MIP-1α (pg/mL)	6,40 ± 0,62	7,53 ± 0,95
MIP-1β (pg/mL)	28,58 ± 1,59	31,94 ± 1,51
TNF-α (pg/mL)	23,79 ± 1,10	26,27 ± 1,71
TNF-β (pg/mL)	18,29 ± 2,94	28,42 ± 2,78**
VEGF (pg/mL)	81,32 ± 6,70	98,95 ± 8,37*

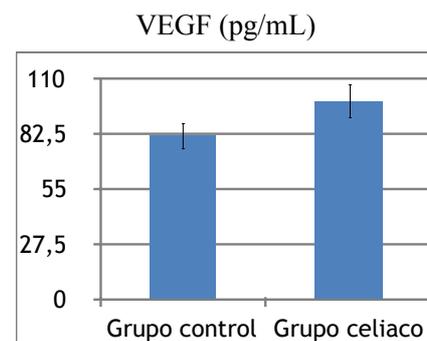
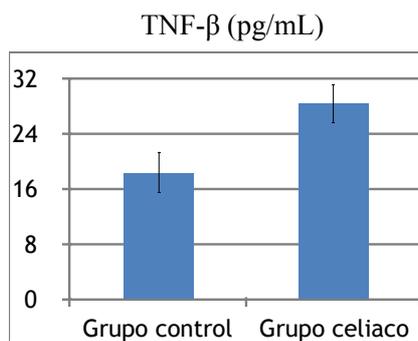
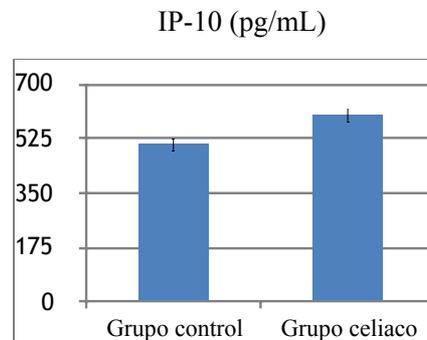
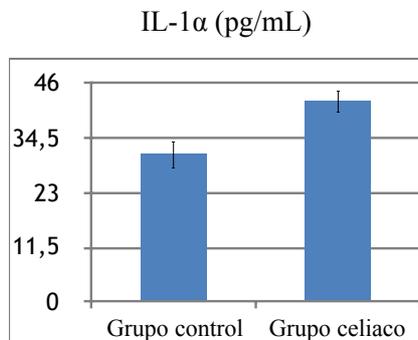
Los datos de muestran como valores medios ± error estándar de la media.

EGF Factor de Crecimiento Endotelial, *G-CSF* Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos, *GM-CSF* Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos, *IFN* Interferon, *IL* Interleuquina, *IP10* Proteína 10 Inducida por Interferón Gamma, *MCP* Proteína 1 Quimioatrayente de Monocitos, *TNF* Factor de Necrosis Tumoral, *VEGF* Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

* Diferencia significativa con el grupo control ($P < 0,05$, *t* de Student)
 **Diferencia significativa con el grupo control ($P < 0,01$, *t* de Student)
 ***Diferencia significativa con el grupo control ($P < 0,001$, *t* de Student)

Figura 29. Biomarcadores inflamatorios con diferencias significativas entre el grupo control y el grupo celiaco.





4.2. DISCUSIÓN

El EO es una situación de desequilibrio entre la producción de EROs y la defensa antioxidante del organismo, que tiene como consecuencia inducción de una serie de daños a las moléculas biológicas al deteriorar su organización estructural (Katar et al., 2014). Hay estudios han demostrado que el EO es uno de los principales mecanismos implicados en la patogenia de muchas enfermedades, incluidas algunas

patologías gastrointestinales, entre las que se encuentra la EC (Dugas et al., 2003; Piatek-Guziewicz et al., 2017). El gluten es considerado un factor ambiental necesario en el desarrollo de la EC. Particularmente, algunos péptidos de la gliadina captados por las células epiteliales mediante endocitosis son capaces de llegar hasta las vesículas paranucleares de estas células (endosomas tardíos y lisosomas); sin embargo, en vez de ser degradados en los lisosomas, el péptido p31-43, se acumula allí, provocando un microambiente prooxidativo y que conduce a la activación de las vías de transducción con un aumento de los niveles de RL (Arranz y Garrote, 2009; Luciani et al., 2009; Luciani et al., 2010). Por lo tanto, parece que las EROs tienen un papel clave en la patogénesis de la EC.

El deterioro del equilibrio redox induce daños severos los principales constituyentes celulares incluyendo en proteínas, lípidos y ADN. Uno de los efectos más importantes de los EROs es el daño a los AG de la membrana celular. Las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular, cuya estructura básica es una bicapa lipídica rica en PUFAs, que son vulnerables al ataque de RL, lo que da lugar a la PL (Stojiljkovic et al., 2007). La PL es la destrucción de los PUFAs en una reacción autocatalítica incontrolada donde se forman hidroperóxidos y otros productos secundarios altamente reactivos. La peroxidación de los AG modifica la estructura molecular de los lípidos que los contienen y provoca un cambio conformacional muy importante en los lípidos integrantes de todas las membranas y, sobre todo, en la membrana mitocondrial, ya que el mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa se asocia a la destrucción de la membrana por alteraciones en la fluidez y la pérdida de AG

(Lenaz, 1998). La exposición al gluten produce un desequilibrio oxidativo intracelular, caracterizado por el aumento de los niveles de productos de la PL (Katar et al., 2014).

Otro de los efectos de los RL es la reacción de algunos oxidantes potentes con los componentes de la molécula de ADN. El daño al ADN puede conducir a la detención del ciclo celular, mutaciones puntuales o la muerte de la célula. La mayoría de las mutaciones no causan la muerte celular pero cuando se acumulan en número suficiente, pueden conducir a la desregulación de patrones de transcripción, baja actividad metabólica y en última instancia, generar un fenotipo envejecido y poco funcional (Díaz-Castro et al., 2008).

La desintoxicación de las EROs es una condición sin la cual no existiría vida aeróbica, por lo tanto, los individuos han ido desarrollando un complejo sistema de defensa antioxidante para prevenir la formación de EROs y el deterioro debido a su efecto. La capacidad antioxidante celular consiste en mecanismos a través de los cuales se anula la reactividad y, por tanto, se inhibe la generación de RL. Estos mecanismos comprenden moléculas tanto endógenas como exógenas. Los antioxidantes exógenos más importantes son la vitamina C, la vitamina E, la vitamina A, el beta-caroteno, los flavonoides y los licopenos. Los antioxidantes endógenos se dividen en dos grupos, enzimáticos y no enzimáticos; los antioxidantes endógenos enzimáticos más destacados son la SOD, la CAT, la GPx, y los no enzimáticos, el GSH y la Coenzima Q. Sin embargo, se ha comprobado que los pacientes con EC presentan una reducción severa de la capacidad antioxidante (incluidas las vitaminas antioxidantes) (Diosdado et al., 2005).

Teniendo en cuenta la estrecha relación entre señalización inflamatoria y daño oxidativo, en el presente estudio, se ha evaluado la señalización pro- y antiinflamatoria y dos tipos de parámetros en relación al EO:

- Marcadores del estado antioxidante, que dan una visión general de cómo el organismo se enfrenta al EO al que está sometido; que son la SOD1, la SOD2, el TAS y la melatonina.
- Marcadores de EO, que miden el daño de los RL a biomoléculas; que son el cortisol, los isoprostanos, la 8-OHdG y el ensayo comet alcalino.

Marcadores del estado antioxidante

En primer lugar se evaluaron la SOD1 y la SOD2. La enzima SOD es considerada como la primera línea de defensa antioxidante intracelular, seguida de otras enzimas como la CAT y la GPx. La SOD está presente en la mayoría de los organismos aeróbicos. La SOD1 y la SOD2 contrarrestan la generación de EROs, metabolizan los radicales superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno y eliminan los radicales de oxígeno producidos por las amplias reacciones de oxidación-reducción y transporte de electrones que se producen en las mitocondrias (Piatek-Guziewicz et al., 2017).

La SOD1 citoplásmica soluble es una enzima que contiene cobre y zinc mientras que la SOD2 es una enzima de la matriz mitocondrial que elimina los RL del oxígeno

producidos por las extensas reacciones de óxido-reducción y transporte electrónico mitocondrial (Miller, 2012; Nojima et al., 2015). En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con EC en los niveles de SOD1 y SOD2. Nuestro grupo de individuos con EC, como se ha descrito anteriormente, llevaban siguiendo una DSG durante al menos dos años antes del estudio, de forma que se puede pensar que la DSG tiene un importante papel protector con respecto al EO y hace que los pacientes se recuperen alcanzando unos niveles muy similares al grupo control. Resultados de varias investigaciones disponibles en la literatura científica avalan que el gluten induce un desequilibrio en la mucosa intestinal de las personas con EC probablemente debido a la sobreproducción de RL (Dugas et al., 1995; Odetti et al., 1998; Boda et al., 1999; Dugas et al., 2003; Diosdado et al., 2005; Stojiljkovic et al., 2007; Szaflarska-Popławska et al., 2010; Stojiljković et al., 2012a). Algunos péptidos de la gliadina penetran en las células y se acumulan en los lisosomas, lo que conduce a la activación de vías de transducción de señales y al aumento de los niveles de RL (Maiuri et al., 1996; Schumann et al., 2008; Heyman & Menard, 2009; Zimmer et al., 2010; Ferretti et al., 2012). En nuestro estudio, con la DSG se evita este proceso de formación de RL, lo que da lugar a que los pacientes con EC se recuperen y no haya diferencias estadísticamente significativas en el EO en ambos grupos de estudio.

En un estudio realizado recientemente por Piatek-Guziewicz et al., (2017), donde se midió la actividad de la SOD en varios grupos de pacientes, se encontraron diferencias significativas entre pacientes celíacos recién diagnosticados y pacientes que llevaban siguiendo durante años la DSG, debido a que los pacientes recién

diagnosticados sí están expuestos a un EO que desaparece al tiempo de estar bajo el tratamiento de la DSG, como ocurre en el presente estudio; en cambio, en dicho estudio también encontraron diferencias significativas en el nivel de actividad de la SOD entre controles sanos y pacientes que llevaban siguiendo una DSG durante años, al igual que en otro estudio realizado por Kumar et al., (2017), lo que no estaría de acuerdo con nuestros resultados, probablemente debido a factores psicológicos como el estrés por la adherencia a la DSG.

Se determinó también el TAS, para evaluar la caracterización general de la capacidad antioxidante del organismo. En nuestro estudio tampoco se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante total entre el grupo de controles sanos y el grupo con EC, hecho que confirma los resultados obtenidos sobre la SOD1 y la SOD2, y con lo que se decidió no medir por separado el resto de enzimas antioxidantes.

Otro marcador del estado antioxidante que se midió fue la melatonina. La melatonina es una hormona que, además de regular los ritmos circadianos, tiene un alto potencial antioxidante en el organismo y es un potente eliminador de RL (Caffarelli et al., 2014). En nuestro estudio no hemos obtenido diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de melatonina entre el grupo control y el grupo con EC, lo que podría explicar la ausencia de diferencias en el estado antioxidante entre ambos grupos. No hemos encontrado estudios que midan la melatonina como marcador del estado antioxidante en pacientes celíacos, sin embargo, un estudio realizado por Konturek et al., (2011), reveló que la melatonina es un importante mediador del eje

intestino-cerebro y que muestra importantes efectos protectores contra las lesiones inducidas por el estrés en el tracto intestinal. Este efecto tiene elevada importancia dado el estrés emocional que causa la adherencia a la DSG.

Marcadores de estrés oxidativo

También se determinó el cortisol, que es una hormona que se libera en respuesta al estrés físico o emocional. El cortisol es una hormona esteroidea o glucocorticoide producida en la corteza suprarrenal, que estimula la gluconeogénesis y tiene importantes efectos deletéreos en el organismo (Siddiqui et al., 2019). Se consideró un marcador interesante, ya que se ha comprobado que los pacientes con EC pueden experimentar estrés psicológico y emocional causado por las implicaciones diarias de la DSG debido a razones sociales y económicas (Makharia, 2014); sin embargo, en el estudio actual, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cortisol entre el grupo control y el grupo con EC. Esta ausencia de diferencias en los niveles de cortisol también podría explicar la ausencia de diferencias en el estado antioxidante entre ambos grupos. Peters et al., (2014), estudiaron en pacientes con intolerancia al gluten no celiaca y síntomas de depresión los niveles de cortisol, con respecto a un grupo control, y tampoco encontraron diferencias significativas, coincidiendo con los resultados de nuestro estudio.

También hemos determinado los 15-Ft-isoprostanos, que son compuestos de tipo prostaglandina con una alta estabilidad química y son considerados marcadores muy fiables del estrés oxidativo (Frijhoff et al., 2015). Los isoprostanos miden el daño

directo a las prostaglandinas que se producen en los vasos sanguíneos. En nuestro estudio no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con EC, ni hemos encontrado estudios que hayan determinado este parámetro en pacientes celíacos con anterioridad, lo que reitera la recuperación del EO bajo el seguimiento de la DSG.

En relación con el daño al ADN hemos determinado la 8-OHdG y hemos realizado en ensayo comet alcalino.

Las EROs pueden inducir la formación de productos de lesión oxidativa del ADN (8-OHdG), fracturas de cadenas simples o dobles, mutaciones y anomalías cromosómicas (Marnett, 2000). La acumulación de este tipo de lesiones producen alteraciones somáticas que contribuyen al envejecimiento, así como a numerosas enfermedades que afectan a numerosos órganos y sistemas, como es el caso de la EC. De estas lesiones oxidativas, las más peligrosas son las roturas de doble hélice, ya que son difíciles de reparar y pueden producir mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de la secuencia de ADN, así como translocaciones cromosómicas (Stojiljkovic et al., 2012).

La 8- hidroxiguanosina (8-OHdG) es un nucleósido oxidado del ADN, escindido durante la reparación del daño oxidativo a los sitios de desoxiguanosina en el ADN (Szaflarska-Popławska et al., 2010). La 8-OHdG es un biomarcador directo del daño oxidativo a las bases del ADN. En nuestro estudio no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo control y el grupo celíaco, ya que el daño oxidativo que

pueda haber sufrido el ADN se ha recuperado bajo el tratamiento de la DSG. En cambio, hemos encontrado algún estudio como el de Szaflarska-Popławska et al., (2010) en el que sí se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo celiaco bajo tratamiento de DSG durante años; el mismo resultado que se obtuvo un estudio *in vitro* recientemente (Monguzzi et al., 2019), aunque en este último los resultados no son comparables ya que las condiciones de los ensayos son diferentes al ser un estudio *in vitro*.

El ensayo comet alcalino es un marcador del daño a la doble hélice del ADN que mide el número de fracturas. En este ensayo tampoco se mostraron diferencias significativas en cuanto al daño entre el grupo control y el grupo celiaco por el mismo motivo que en el caso anterior, existen una serie de mecanismos de reparación del ADN por los que este daño desaparece y no vuelve a producirse mientras que el individuo con EC siga de forma estricta y continuada la DSG. No hemos encontrado estudios que valoren el daño al ADN en pacientes celiacos mediante en ensayo comet a excepción de un estudio *in vitro* (Monguzzi et al., 2019), en el que si obtuvieron diferencias significativas, aunque no comparable con nuestro estudio, ya que las condiciones de ensayo son diferentes, nuestro estudio es un estudio *in vivo* en pacientes jóvenes.

En resumen, los resultados del presente estudio han demostrado que la DSG en los pacientes con EC podría ayudar, al menos parcialmente, a reducir los niveles de gliadina y, por lo tanto, a reducir la cantidad de EROs producidos en el intestino. La DSG es el único tratamiento actual para tratar la EC, y consiste en eliminar de la dieta todos aquellos alimentos que puedan contener gluten en su composición.

Este fenómeno, junto con la capacidad antioxidante total (TAS) y los niveles de SOD1 y SOD2, que son similares al grupo de control, explica la protección de la DSG, que reduce los niveles de RL, lo que lleva a la integridad celular. Este mecanismo está vinculado a la reducción de peróxidos y RL que dañan diferentes componentes celulares, incluidas las proteínas, los lípidos y el ADN, evitando la formación de un gran número de lesiones de pirimidina y purina en el ADN (Olinski et al., 2003).

La expresión de 8-OHdG y 15-Ft isoprostanos en el grupo de pacientes con EC, también similar a la de los controles, sugiere una vez más que el EO no está presente debido a la efectividad de la DSG.

Marcadores inflamatorios

Las citoquinas son un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores en condiciones normales y patológicas para modular las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Estas proteínas también median las interacciones directas entre las células y regulan los procesos que tienen lugar en el entorno extracelular. Las citoquinas difieren de las hormonas en que actúan sobre un espectro más amplio de células diana y están organizadas en glándulas especializadas.

Se sabe que la señalización de las EROs puede mejorar la síntesis de mediadores inflamatorios como TNF α e IL-1 (Haddad et al., 2000), que, en nuestro estudio, aumentan en el grupo de individuos con EC. Sin embargo, en nuestro caso, la síntesis de

estos mediadores proinflamatorios no está mediada por el EO, ya que, como hemos mencionado anteriormente, no hay diferencias significativas en los niveles de los marcadores del EO debido a la protección de la DSG. Los datos disponibles sobre la apoptosis en pacientes con EC son contradictorios, pero existe un aumento de la muerte celular apoptótica de las células epiteliales intestinales en la EC no tratada, según lo detectado por el daño del ADN en biopsias de intestino delgado; sin embargo, la apoptosis y el daño en el ADN volvieron a la normalidad en los pacientes tratados con DSG (Moss et al., 1996), como ocurre en el presente estudio, por lo que podemos suponer que la fuente de las citoquinas proinflamatorias nocivas es la mucosa inflamada remanente y la atrofia de las microvellosidades duodenales.

Los pacientes con EC muestran una reacción autoinmune a la gliadina. La digestión incompleta del gluten conduce a la formación de péptidos de gran tamaño, alguno de los cuales de 33 aminoácidos, que pueden atravesar el epitelio intestinal por las vías transcelular o paracelular y llegar a la lámina propia de la mucosa, donde activan una respuesta inmunitaria adaptativa dependiente de la desamidación de esos péptidos por la enzima TG2, que es el principal autpantígeno de la EC (Schumann et al., 2017). La TG2 liberada durante la inflamación induce la conversión de glutamina de carga positiva en ácido glutámico de carga negativa, acción que aumenta la inmunogenicidad de estos péptidos y favorece su unión a las moléculas HLA DQ2 y DQ8 y su presentación, a continuación, por las células presentadoras de antígenos a las células T CD4 + específicas del gluten en la lámina propia (Jabri y Sollid, 2017). Este paso induce una fuerte respuesta inflamatoria que resulta en una enteropatía intestinal pequeña (Green y Cellier, 2007), ya que estas células dirigen la inflamación de la

mucosa mediante la secreción de un patrón de citoquinas en el que predomina el $\text{INF}\gamma$. Curiosamente, aunque no hay células T intraepiteliales específicas para el gluten (Meresse et al., 2012), la EC se asocia con cambios profundos en la función de las células T intraepiteliales, lo que resulta en un aumento de la función del efecto citotóxico y un aumento del estado proinflamatorio (Abadie et al., 2012). Además, los estudios histológicos han sugerido un cambio en la distribución de células T intraepiteliales en pacientes con EC. En la EC, se observó un aumento en el número de células T intraepiteliales en las puntas de las vellosidades (Goldstein y Underhill, 2001; Steenholt et al., 2017) y esto ocurre incluso antes de que aparezcan los síntomas de la EC. Teniendo en cuenta los resultados del estudio actual, parece que estos cambios en las células T intraepiteliales se mantienen, al menos en parte incluso después de adherirse a la DSG, porque $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\alpha$, IP-10 y $\text{TNF-}\beta$ están todavía elevados en los pacientes con EC en comparación con los controles. Esto se puede explicar porque, incluso después de la recuperación de la estructura de las vellosidades intestinales, la linfocitosis duodenal puede persistir durante más de 10 años (Tuire et al., 2012), por lo que se mantiene un estado proinflamatorio remanente. Después de la recuperación de la estructura vellosa normal, las células T intraepiteliales permanecen elevadas (Kutlu et al., 1993), lo que podría contribuir al restablecimiento de la homeostasis epitelial (Chen et al., 2002). Por lo tanto, aunque existe un claro papel patógeno para este estado proinflamatorio, el aumento de las células T intraepiteliales y las citoquinas liberadas podrían tener un papel importante en la reparación epitelial. Además, también se ha demostrado que los pacientes con EC que siguen una DSG muestran un daño duodenal a pesar de la mejoría clínica y la disminución evidente de los anticuerpos presentes en la EC (Piatek-Guziewicz et al., 2017).

Una de las citoquinas clave en el desarrollo y la patología de la EC es el IFN- γ , que se ha encontrado elevado en el grupo de celíacos y también ha encontrado que se correlaciona con el daño tisular (Wapenaar et al., 2004). Un equilibrio entre los tipos de células T puede ser importante para mantener un sistema inmune adaptativo saludable. Hay informes sobre un desequilibrio entre las células T auxiliares Th1 y Th2 en la EC (Meresse et al., 2012). La respuesta Th1 se caracteriza por una alta secreción de IFN- γ , que produce la activación de las células T y el daño al tejido intestinal (Wapenaar et al., 2004). Nilsen et al. (1995) también estudiaron las células T específicas del gluten, comprobando que producen grandes cantidades de IFN- γ . En el estudio actual (Kumar et al., 2017), el IFN- γ permanece elevado a pesar de que los pacientes con EC sigan una DSG estricta, revelando una estrecha conexión con el deterioro del sistema inmunitario (Nilsen et al., 1995) y el daño tisular (Wapenaar et al., 2004), lo que indica una vez más que, a pesar del cumplimiento de una DSG estricta, la mucosa permanece dañada y la atrofia de las microvellosidades duodenales todavía está presente. Lo mismo pasa con la eotaxina, que también permanece elevada en el grupo celíaco respecto a los controles, lo que nos lleva a la misma conclusión.

Curiosamente, no hay correspondencia clínica entre la recuperación clínica y la recuperación de la mucosa, ya que cuando los pacientes con EC tratados remitieron, solo la mitad de ellos tenía la mucosa normal, a pesar de la negatividad de los anticuerpos celíacos (Lanzani et al., 2009; Lebwohl et al., 2013), por lo que también podría explicar la persistencia de algunas citoquinas proinflamatorias en el grupo celíaco en comparación con el grupo control. Después del seguimiento de la DSG, los

síntomas clínicos y la arquitectura de la mucosa generalmente mejoran muy rápidamente (McNicholl et al., 1996), sin embargo, hay individuos en los que la recuperación de la mucosa duodenal requiere más tiempo para su recuperación (Wahab et al., 2002). Estas observaciones previas están de acuerdo con los resultados de nuestro estudio porque algunas citoquinas proinflamatorias persistieron a pesar de la desaparición de anticuerpos específicos debido al cumplimiento de la DSG durante dos años.

Finalmente, el VEGF es el regulador principal del crecimiento vascular en la EC y al expresarse es capaz de iniciar la cascada de eventos que van desde la activación endotelial hasta la generación de nuevas redes vasculares funcionales y estables que inducen el crecimiento. Es un proceso que puede dirigirse para restaurar el suministro de sangre a los tejidos isquémicos (Yla-Herttuala et al., 2007), por lo que el aumento de este factor soluble en el grupo de pacientes con EC podría ser un mecanismo compensatorio para restaurar la mucosa dañada y la atrofia de las vellosidades duodenales.

Resumen y Conclusiones

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos estudiado el status oxidativo y la señalización inflamatoria en niños con EC, tras el consumo de DSG durante dos años. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Materno Infantil Virgen de las Nieves de Granada. Se realizó un estudio transversal descriptivo en 80 niños en un rango de edad de 0 a 14 años dividido en dos grupos, 40 niños, (18 niñas (45%) y 22 niños (55%)) diagnosticados de EC y 40 controles sanos (19 niñas (48%) y 21 niños (52%)). Los niños con EC habían sido diagnosticados de acuerdo con la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN). Estos niños llevaban siguiendo una DSG estricta durante al menos dos años (y, por tanto, durante el estudio) como lo demuestra la ausencia de anticuerpos IgA en suero e IgG anti-transglutaminasa en, al menos, el último año. El grupo control de niños sanos, presentaron serología negativa para EC y no tenían antecedentes de ninguna enfermedad crónica. Estos niños asistieron a este servicio debido a síntomas menores relacionados con gastroenteritis o diarrea y, al verificar que su evolución se debió a síntomas gastrointestinales transitorios (relacionados con el rotavirus), se incluyeron en el grupo de control.

Se tomaron 5 mL de sangre venosa de los pacientes, a primera hora de la mañana, en ayunas, recogida en tubos con EDTA como anticoagulante. Seguidamente se prosiguió a la obtención del plasma de las mismas. Además, se tomó una muestra de

sangre por punción digital (50 μ l) determinación de daño al ADN en linfocitos de sangre periférica mediante ensayo comet alcalino. Se realizó en el plasma un estudio completo del estado oxidativo/antioxidante (Superóxido dismutasa isoformas 1 y 2, 15-F2t-isoprostanos, capacidad antioxidante total, melatonina, cortisol, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) y de la señalización inflamatoria mediante la tecnología Luminex (Factor de crecimiento epidérmico, Eotaxina, Factor estimulante de colonias de granulocitos, Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, Interferón- α 2, Interferón- γ , Interleuquinas (IL) -10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL- 6, IL-7, IL-8, Proteína inducible por interferón (IP) -10, Proteína quimioatrayente de monocitos-1, Proteína inflamatoria de macrófagos-1 α , Proteína inflamatoria de macrófagos-1 β , Factor de necrosis tumoral- α , Factor de necrosis tumoral- β y el Factor de crecimiento endotelial vascular).

En este estudio no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo control y el grupo celiaco en los parámetros medidos para la determinación del estado oxidativo/antioxidante, resultados que demuestran que la DSG en los pacientes celiacos podría ayudar, a reducir los niveles de gliadina y, por lo tanto, a reducir la cantidad de EROs producidos en el intestino. En cambio, se han encontrado parámetros inflamatorios con diferencias significativas entre ambos grupos, con la persistencia de algunas citoquinas proinflamatorias en el grupo celiaco en comparación con el grupo control, lo que indica que, a pesar del cumplimiento de una DSG estricta, persiste el estado inflamatorio, con posibles efectos adversos a nivel sistémico.

Tras la discusión de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

CONCLUSIÓN PRIMERA

Los resultados del presente estudio han demostrado que la DSG seguida por los pacientes con EC es suficiente para reducir los niveles de gliadina y, por lo tanto, disminuir la producción de radicales libres en el epitelio intestinal. Este fenómeno, junto con la capacidad antioxidante total (TAS) y los niveles de SOD1 y SOD2 que son similares al grupo de control explican la protección de la DSG, que induce una mejora de la integridad celular, incluida la estabilidad del ADN.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

Los mediadores pro-inflamatorios se ven aumentados en el grupo celiaco. Sin embargo, la fuente principal de estos mediadores pro-inflamatorios no es el estrés oxidativo como hemos mencionado previamente, por lo tanto, el origen de estas citoquinas pro-inflamatorias podría ser la reacción inmune que aún permanece en la mucosa duodenal.

CONCLUSIÓN TERCERA

Los cambios infligidos por la reacción autoinmune a la gliadina durante el transcurso de la celiaquía en las células T intraepiteliales de la mucosa duodenal se

mantienen tras el consumo de la dieta sin gluten, porque IL-1 α , IP-10 y TNF- β todavía están elevados en estos pacientes en comparación con los controles, revelando una fuerte respuesta inflamatoria.

CONCLUSIÓN CUARTA

Después del consumo de una dieta sin gluten, el IFN- γ sigue estando elevado en los pacientes celíacos, lo que revela una estrecha relación con el deterioro del sistema inmunitario y afectación tisular en el intestino, indicando una vez más que a pesar del cumplimiento estricto de la DSG, la reacción inmune con posibles efectos sistémicos aún está presente.

CONCLUSIÓN QUINTA

El aumento de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el grupo celíaco podría ser un mecanismo compensatorio para restaurar la mucosa dañada y la atrofia de las vellosidades duodenales, debido a su papel en la activación endotelial, crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y generación de nuevas redes vasculares funcionales y estables que restablezcan el suministro sanguíneo a las vellosidades intestinales isquémicas.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados del estudio actual han demostrado que el seguimiento de la DSG en pacientes con EC es suficiente para reducir la producción de RL, induciendo un efecto beneficioso sobre las moléculas y los mediadores biológicos del estrés oxidativo, protegiendo la integridad celular y el material genético. Sin embargo, en el caso de la señalización inflamatoria, la reacción autoinmune a gliadina induce una potente respuesta inflamatoria que se mantiene, al menos en parte, incluso después de consumir la DSG, ya que IFN- γ , IL-1 α , IP-10 y TNF- β se encuentran aún elevados en los pacientes celíacos en comparación con los controles. Por otro lado, el aumento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el grupo celíaco podría ser un mecanismo compensador para restaurar la mucosa dañada y la atrofia de las vellosidades duodenales, debido a su papel en la activación endotelial y la generación de nuevas redes vasculares funcionales que restablecen el suministro sanguíneo a las vellosidades isquémicas.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

Abadie, V., Discepolo, V., Jabri, B.(2012). Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin. Immunopathol.*, 34(4), 551-566.

Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., Jabri, B. (2011). Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 29(1),493-525.

Adar, T., Shteingart, S., Ya'acov, A.B.,Shitrit, A.B., Goldin, E. (2014). From airway inflammation to inflammatory bowel disease: Eotaxin-1, a key regulator of intestinal inflammation. *Clinical Immunology*, 153, 199-208.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 150,121-127. AEMS. Circular 2/2008 “Información sobre los excipientes en el etiquetado, prospecto y ficha técnica de los medicamentos de uso humano”.

Al-Dawoud, A., Nakshabendi, I., Foulis, A., Mowat, A.M. (1992). Immuno histochemical analysis of mucosal gamma-interferon production in coeliac disease. *Gut.*, 33, 1482-1486.

Alessio, M.G., Tonutti, E., Brusca, I., Radice, A., Licini, L., Sonzogni, A., Florena, A., Schiaffino, E., Marus, W., Sulfaro, S., Villalta, D.; Study Group on Autoimmune Diseases of Italian Society of Laboratory Medicine. (2012). Correlation between IgA

tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease.*J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 55(1), 44-49.

Allegretti, Y.L., Bondar, C., Guzman, L., Cueto Rua, E., Chopita, N., Fuertes, M.,Zwirner, N.W., Chirido, F.G. (2013). Broad MICA/B Expression in the Small Bowel Mucosa: A Link between Cellular Stress and Celiac Disease. *PLoS ONE*, 8(9), 1-12.

Al-Mashhadani, W.M., Al-Musawi, A., Al-Auqbi, T.F.R., Hazim, H., Al-Salihi, H.H., Abdulnabi, S.A., Farhan, S., Najim, S. (2009). Celiac disease is a member of oxidative stress syndrome. *Iraqi J. Comm Med.*, 22(2), 88-91.

Almeida, K.H., Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*, 6(6),695-711.

Al-Toma, A., Verbeek, W.H., Hadithi, M., von Blomberg, B.M., Mulder, C.J. (2007). Survival in refractory coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma: retrospective evaluation of single centre experience. *Gut.*, 56, 1373-1378.

Ameghino, L., Farez, M.F., Wilken, M., Goicochea, M. (2019). Headache in patients with celiac disease in its response to gluten-free diet. *J Oral Facial Pain Headache*. doi: 10.11607.

Ames, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*;221(4617), 1256-64.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90,7915-7922.

Anderson, R.P., Degano, P., Godkin, A.J., Jewell, D.P., Hill, A.V. (2000). In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.*, 6, 337-342.

Angelis, M.D., Rizzello, C.G., Fasano, A., Clemente, M.G., Simone, C.D., Silano, M., De Vincenzi, M., Losito, I., Gobbetti, M. (2006). VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue probiotics and gluten intolerance. *Biochim Biophys Acta*,1762(1), 80-93.

Arentz-Hansen ,H., Korner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M., McAdam, SN. (2000). 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.*, 191(4),603-612.

Arentz-Hansen, H., McAdam, S.N., Molberg, O., Fleckenstein, B., Lundin, K.E., Jorgensen, T.J., Jung, G., Roepstorff, P., Sollid, L.M.(2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues.

Gastroenterology, 123(3), 803-809.

Argüelles, F., Quero, F. (2017). Manifestaciones clásicas de la enfermedad celiaca. In: Polanco Allué I, editor. *Enfermedad celiaca: presente y futuro*. Madrid: Ergon; p. 13-18.

Argüelles-Grande, C., Brar, P., Green, P.H., Bhagat, G. (2013). Immunohistochemical and T-cell receptor gene rearrangement analyses as predictors of morbidity and mortality in refractory celiac disease. *J Clin Gastroenterol.*, 47(7),593-601.

Arranz, E., Garrote, J.A. (2010). Inmunología de la enfermedad celiaca. *Gastroenterol Hepatol.*, 33 (9), 643-651.

Asmus, K.D. (1990). Sulphur centered free radicals. *Methods Enzymol.*, 186, 168-180.

Auroma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1991). Cooper ion dependent damage to the bases in DNA in the presense of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 273, 601-604.

Avello, M., Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494, 161-172.

Aw, T.Y. (1999). Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am J Clin Nutr.*, 70(4), 557-565.

Aw, T.Y. (2005). Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 320-328.

Aziz, I., Evans, K.E., Papageorgiou, V., Sanders, D.S. (2011). Are patients with coeliac disease seeking alternative therapies to a gluten-free diet? *J Gastrointestin Liver Dis.*, 20,27-31.

Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 250(2), 91-104.

Bai, J.C., Fried, M., Corazza, G.R., Shuppan, D., Farthing, M., Catassi, C., Greco, L., Cohen, H., Ciacci, C., Eliakim, R., Fasano, A., González, A., Krabshuis, J.H., LeMair, A. (2013). World Gastroenterology Organisation global guidelines on celiac disease. *J Clin Gastroenterol.*, 47(2),121-126.

Bajaj-Elliott, M., Poulson, R., Pender, S.L., Wathen, N.C., MacDonald, T.T. (1998). Interactions between stromal cell-derived keratinocyte growth factor and epithelial transforming growth factor in immune-mediated crypt cell hyperplasia. *J Clin Invest.*, 102(8),1473-1480.

Bao, F., Green, P.H., Bhagat, G. (2012). An update on celiac disease histopathology and the road ahead. *Arch Pathol Lab Med.*, 136,735-745.

Barbi de Moura M., Santana dos Santos L., Van Houten B. (2010).Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer".*Envirom. Mol. Mut.*, 51, 391-405.

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15(1), 19-33.

Beckett, C.G., Dell'Olio, D., Kontakou, M., Przemioslo, R.T., Rosen-Bronson, S., Ciclitira, P.J. (1996). Analysis of interleukin-4 and interleukin-10 and their association with the lymphocytic infiltrate in the small intestine of patients with coeliac disease. *Gut*, 39, 818-823.

Beckman K.B., Ames B.N. (1998). The free radicals theories of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78(2), 547-581.

Benahmed, M., Meresse, B., Arnulf, B., Barbe, U., Mention, J.J., Verkarre, V., Allez, M., Cellier, C., Hermine, O., Cerf-Bensussan, N. (2007). Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: A new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterol.*, 132(3), 994-1008.

Bergseng, E., Sidney, J., Sette, A., Sollid, L.M. (2008). Analysis of the binding of gluten T-cell epitopes to various human leukocyte antigen class II molecules. *Hum. Immunol.*, 69(2), 94-100.

Bernardo, D., Martínez-Abad, B., Vallejo-Diez, S., Montalvillo, E., Benito, V., Anta, B., Fernández-Salazar, L., Blanco-Quirós, A., Garrote, J.A., Arranz, E. (2012). Ascorbate-dependent decrease of the mucosal immune inflammatory response to gliadin in coeliac disease patients. *Allergol. Immunopathol.*, 40, 3-8.

Bertsche V. (1984). Induction and repair of x-ray damage in mammalian cell cultures treated with membrane-active drugs. *Br. J. Cancer.*, 49, 121-130.

Bhagat, G., Naiyer, A.J., Shah, J.G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T.C., Green, P.H., Manavalan, J.S. (2008). Small intestinal CD8 β TCR γ delta β NKG2A β intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest.*, 118(1), 281-293.

Biagi, F., Campanella, J., Laforenza, U., Gastaldi, G., Tritto, S., Grazioli, M., Villanacci, V., Corazza, G.R. (2006). Transglutaminase 2 in the enterocytes is coeliac specific and gluten dependent. *Dig. Liver Dis.* 38(9), 652-658.

Black, J.L., Orfila, C. (2011). Impact of coeliac disease on dietary habits and quality of life. *J Hum Nutr Diet*, 24, 582-587.

Blanco, A., Garrote, J.A., Arranz, E., Alonso, M., Clavo, C. (1992). Increased serum IL-2R levels in coeliac disease are related to CD4 but not CD8 antigens. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 15, 413-417.

Blazina, Š., Bratanič, N., Čampa, A.Š., Blagus, R., Orel, R. (2010). Bone mineral density and importance of strict gluten-free diet in children and adolescents with celiac disease. *Bone*, 47(3), 598-603.

Boda, M., Németh, I., Boda, D. (1999). The caffeine metabolic ratio as an index of xanthine oxidase activity in clinically active and silent celiac patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 29, 546-550.

Bodd, M., Kim, C.Y., Lundin, K.E., Sollid, L.M. (2012). T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterol.*, 142(3), 552-561.

Bodd, M., Ráki, M., Bergseng, E., Jahnsen, J., Lundin, K.E., Sollid, L.M. (2013). Direct cloning and tetramer staining to measure the frequency of intestinal gluten-reactive T cells in celiac disease. *Eur. J. Immunol.*, 43(10), 2605-2612.

Book, L., Zone, J.J., Neuhausen, S.L. (2003). Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families. *Am J Gastroenterol.*, 98, 377-381.

Boraschi, D., Lucchesi, S., Hainzl, M., Leitner, E., Maier, D., Mangelberger, G.J., Oostingh, T., Pfaller, C., Pixner, G., Posselt, P., Italiani, M.F., Nold, C.A., Nold-Petry, P., Bufler, C.A., Dinarello, (2011). IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur. Cytokine Netw.* 22, 127–147.

Bourgey, M., Calcagno, G., Tinto, N., Gennarelli, D., Margaritte-Jeannin, P., Greco, L., Limongelli, M.G., Esposito, O., Marano, C., Troncone, R., Spampinato, A., Clerget-

Darpoux, F., Sacchetti, L. (2007). HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*, 56(8),1054-1059.

Brar, P., Lee, S., Lewis, S., Egbuna, I., Bhagat, G., Green, P.H. (2007). Budesonide in the treatment of refractory celiac disease. *Am J Gastroenterol.*, 102(10), 2265-2269.

Brietzke, E., Cerqueira, R.O., Mansur, R.B., McIntyre, R.S. (2018). Gluten related illnesses and severe mental disorders: a comprehensive review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 84, 368-375.

Bushara, K.O. (2005). Neurologic presentation of celiac disease. *Gastroenterol.*,128(4 Suppl 1):S92-7.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 58, 79-110.

Caffarelli, C., Santamaria, F., Vottero, A., Dascola, C.P., Mirra, V., Sperli, F., Bernasconi, S. (2014). Progress in pediatrics in 2013: Choices in allergology, endocrinology, gastroenterology, hypertension, infectious diseases, neonatology, neurology, nutrition and respiratory tract illnesses. *Ital J Pediatr.*, 40,62.

Calder, P.C. (2011). Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *Eur. J. Pharmacol.*, 668, 50-58.

Calder, P.C., Albers, R., Antoine, J.M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G.A., Folkerts, G., Friedmann, P.S., Frost, G.S., Guarner, F.; Lovic, M., Macfarlane, S.,

Meyer, P.D., M'Rabet, L., Serafini, M., van Eden, W., van Loo, J., Vas Dias, W., Vidry, S., Winklhofer-Roob, B.M., Zhao, J. (2009). Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br. J. Nutr.*, 101, 1-45.

Camougrand, N., Rigoulet, M. (2001). Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Resp. Phys.*, 128, 393-401.

Canova, C., Zabeo, V., Pitter, G., Romor, P., Baldovin, T., Zanotti, R., Simonato, L. (2014). Association of maternal education, early infections, and antibiotic use with celiac disease: a population-based birth cohort study in northeastern Italy. *Am. J. Epidemiol.*, 180(1), 76-85.

Caputo, I., Barone, M.V., Martucciello, S., Lepretti, M., Esposito, C. (2009). Tissue transglutaminase in celiac disease: role of autoantibodies. *Amino Acids.*, 36, 693-699.

Cardones, A.R., Hall, R.P. (2012). Management of dermatitis herpetiformis. *Immunol Allergy Clin North Am.*, 32(2), 275-281.

Carpenter, G., Cohen, S. (1990). Epidermal Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(14), 7709-7712.

Castillo, N.E., Theethira, G.T., Leffler, D.A. (2015). The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterol report*, 3(1), 3-11.

Cataldo, F., Lio, D., Marino, V., Scola, L., Crivello, A., Corazza, G.R., Working Group of the SIGEP, Working Group of 'Club del Tenue'. (2003). Plasma cytokine profiles in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *Pediatr Allerg Immunol.*, 14,320-324.

Cataldo, F., Marino, V. (2003). Increased prevalence of autoimmune diseases in first-degree relatives of patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 36,470-473.

Catassi, C., Gatti, S., Fasano, A. (2014). The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 9 Suppl 1:S 7-9.

Catassi, C., Kryszak, D., Louis-Jacques, O., Duerksen, D.R., Hill, I., Crowe, S.E., Brown, A.R., Procaccini, N.J., Wonderly, B.A., Hartley, P., Moreci, J., Bennett, N., Horvath, K., Burk, M., Fasano, A. (2007). Detection of Celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. *Am. J. Gastroenterol.*, 102(7), 1454-1460.

Cellier, C., Delabesse, E., Helmer, C., Patey, N., Matuchansky, C., Jabri, B., Macintyre, E., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N. (2000). Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet*, 356(9225), 203-208.

Cellier, C., Flobert, C., Cormier, C., Roux, C., Schmitz, J. (2000). Severe osteopenia in symptom-free adults with a childhood diagnosis of coeliac disease. *Lancet*, 355(9206), 806.

Cellier, C., Patey, N., Mauvieux, L., Jabri, B., Delabesse, E., Cervoni, J.P., Burtin, M.L., Guy-Grand, D., Bouhnik, Y., Modigliani, R., Barbier, J.P., Macintyre, E., Brousse, N., Cerf-Bensussan, N. (1998). Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. *Gastroenterol.*, 114(3), 471-481.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 481-493.

Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W.L., Boismenu, R. (2002). Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 14338-14343.

Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D., Mosmann, T.R. (1987). Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med.*, 166, 1229-1244.

Chowers, Y., Marsh, M.N., De Grandpre, L., Nyberg, A., Theofilopoulos, A.N., Kagnoff, M.F. (1997). Increased proinflammatory cytokine gene expression in the colonic mucosa of coeliac disease patients in the early period after gluten challenge. *Clin*

Exp Immunol., 107, 141-147.

Choy, E., Ganeshalingam, K., Semb, A.G., Szekanecz, Z., Nurmohamed, M. (2014). Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment. *Rheumatol Oxf.*, 53(12),2143-2154.

Ciacci, C., Ciclitira, P., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Ludvigsson, J.F., McGough, N., Sanders, D.S., Woodward, J., Leonard, J.N., Swift, G.L. (2015). The gluten- free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis.*United Eur. Gastroenterol. J.*, 3(2),121-135.

Ciao, G., Volta, U., Ursini, F., Manfredini, R., De Giorgio, R. (2019). Small bowel adenocarcinoma as a complication of celiac disease: clinical and diagnostic features. *BMC Gastroenterology*. doi:10.1186.

Ciclitira, P.J., King, A.L., Fraser, J.S. (2001). AGA technical review on Celiac Sprue.American Gastroenterological Association.*Gastroenterol.*, 120, 1526-1540.

Cinova, J.,Palová-Jelínková, L.,Smythies, L.E.,Cerná, M.,Pecharová, B.,Dvorák, M. ,Fruhauf, P., Tlaskalová-Hogenová, H., Smith, P.D., Tucková, L. (2007). Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol.*, 27,201-209.

Cinquetti, M., Trabucchi, C., Menegazzi, N., Comucci, A., Bressan, F., Zoppi, G. (1999). Psychological problems connected to the dietary restrictions in the adolescent with coeliac disease. *La Pediatria medica e chirurgica: Medical and surgical pediatrics*, 21(6), 279-283.

Cole, T.J., Bellizzi, M.C., Flegal, K.M., Dietz, W.H. (2000). Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*, 320, 1240-1243.

Collin, P., Reunala, T., Pukkala, E., Laippala, P., Keyrilainen, O., Pasternack, A. (1994). Coeliac disease-associated disorders and survival. *Gut*, 35(9), 1215-1218.

Collin, P., Vilska, S., Heinonen, P.K., Hällström, O., Pikkarainen, P. (1996). Infertility and coeliac disease. *Gut*, 39(3), 382-384.

Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotech.*, 26(3), 249-261.

Comino, I., Moreno, M.L., Sousa, C. (2015). Role of oats in celiac disease. *World J. Gastroenterol.*, 21(41), 11825-11831.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio L., Kim J.Y., Butcher, E.C., Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, 13, 759-769.

Cook, D.N. (1996). The role of MIP-1 α in inflammation and hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 59, 61-66.

Cooke, M.S., Olinski, R., Evans, M.D. (2006). Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta*, 365, 30-49.

Cook-Mills, J.M., McCary, C.A. (2010). Isoforms of vitamin E differentially regulate inflammation. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 10, 348-366.

Corazza, G.R., Di Sario, A., Cecchetti, L., Tarozzi, C., Corrao, G., Bernardi, M., Gasbarrini, G. (1995). Bone mass and metabolism in patients with celiac disease. *Gastroenterol.*, 109(1), 122-128.

Corrao, G., Corazza, G.R., Bagnardi, V., Brusco, G., Ciacci, C., Cottone, M., Sategna Guidetti, C., Usai, P., Cesari, P., Pelli, M.A., Loperfido, S., Volta, U., Calabró, A., Certo, M., Club del tenue Study Group. (2001) . Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet.*, 358, 356-361.

Cosnes, J., Cellier, C., Viola, S., Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot, J.P., Ginies, J.L., Dabadie, A., Mouterde, O., Allez, M., Nion-Larmurier, I., Groupe D'Etude et de Recherche Sur la Maladie Coeliaque. (2008). Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6(7), 753-758.

Cossu, G., Carta, M.G., Contu, F., Mela, Q., Demelia, L., Elli, L., Dell'Osso, B. (2017). Coeliac disease and psychiatric comorbidity: epidemiology, pathophysiological mechanisms, quality-of-life, and gluten-free diet effects. *Int. Rev. Psychiatry*, 29(5), 489-503.

Coussens, L.M., Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.

Daum, S., Bauer, U., Foss, H.D., Schuppan, D., Stein, H., Riecken, E.O., Ullrich, R. (1999). Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut*, 44, 17-25.

De Stefano, D., Maiuri, M.C., Simeon, V., Grassia, G., Soscia, A., Cinelli, M.P., Carnuccio, R. (2007). Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. *Eur. J. Pharmacol.*, 566, 192-199.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(6), 313-326.

Di Niro, R., Mesin, L., Zheng, N., Stamnaes, J., Morrissey, M., Lee, J., Huang, M., Iversen, R., du Pré, M.F., Qiao, S.W., Lundin, K.E., Wilson, P.C., Sollid, L.M. (2012). High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nat. Med.*, 18(3), 441-445.

Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Cupelli, F., Cinque, B., Millimaggi, D., Clarkson, M.M., Paulli, M., Cifone, M.G., Corazza, G.R. (2006). Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*, 55(4), 469-477.

Di Sabatino, A., Pickard, K.M., Gordon, J.N., Salvati, V., Mazzarella, G., Beattie, R.M., Vossenkaemper, A., Rovedatti, L., Leakey, N.A., Croft, N.M., Troncone, R., Corazza, G.R., Stagg, A.J., Monteleone, G., MacDonald, T.T. (2007). Evidence for the role of interferon- α production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. *Gastroenterol.*, 133(4), 1175-1187.

Di Simone, N., Silano, M., Castellani, R., Di Nicuolo, F., D'Alessio, M.C., Franceschi, F., et al. (2010). Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients are responsible for trophoblast damage via apoptosis in vitro. *Am. J. Gastroenterol.*,

105(10), 2254-2261.

Di Stefano, M., Mengoli, C., Bergonzi, M., Corazza, G.R. (2013). Bone mass and mineral metabolism alterations in adult celiac disease: pathophysiology and clinical approach. *Nutrients*, 5(11),4786-4799.

Díaz-Castro, J., Alférez, M.J.M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Granados, S., Barrionuevo, M., Campos, M.S. (2008). Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition*, 24(11-12), 1167-1173.

DiCarlo,G., Mascolo,N., Izzo,A.A., Capasso,F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65, 337-353.

Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O., Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.*, 3(7),797-801.

Dinarello C.A.(2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.*, 27, 519-550.

Diosdado, B., Van Oort, E., Wijmenga, C. (2005). “Coelionomics”: towards understanding the molecular pathology of coeliac disease. *Clin Chem Lab Med.*, 43,685-695.

Dolfini, E., Elli, L., Dasdia, T. (2002). In vitro cytotoxic effect of bread wheat gliadin on the LoVo human adenocarcinoma cell line. *Toxicol In Vitro.*, 16(4), 331-337.

Dolfini, E., Elli, L., Roncoroni, L., Costa, B., Colleoni, M.P., Lorusso, V., Ramponi, S., Braidotti, P., Ferrero, S., Falini, M.L., Bardella, M.T. (2005). Damaging effects of gliadin on three- dimensional cell culture model. *World J Gastroenterol.*, 11(38), 5973–5977.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(26), 11971-11975.

Dubois, P.C.A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G.A., Adány, R., Aromaa, A., Bardella, M.T., van den Berg, L.H., Bockett, N.A., de la Concha, E.G., Dema, B., Fehrmann, R.S., Fernández-Arquero, M., Fiatal, S., Grandone, E., Green, P.M., Groen, H.J., Gwilliam, R., Houwen, R.H., Hunt, S.E., Kaukinen, K., Kelleher, D., Korponay-Szabo, I., Kurppa, K., MacMathuna, P., Mäki, M., Mazzilli, M.C., McCann, O.T., Mearin, M.L., Mein, C.A., Mirza, M.M., Mistry, V., Mora, B., Morley, K.I., Mulder, C.J., Murray, J.A., Núñez, C., Oosterom, E., Ophoff, R.A., Polanco, I., Peltonen, L., Platteel, M., Rybak, A., Salomaa, V., Schweizer, J.J., Sperandeo, M.P., Tack, G.J., Turner, G., Veldink, J.H., Verbeek, W.H., Weersma, R.K., Wolters, V.M., Urcelay, E., Cukrowska, B., Greco, L.,

Neuhausen, S.L., McManus, R., Barisani, D., Deloukas, P., Barrett, J.C., Saavalainen, P., Wijmenga, C., van Heel, D.A. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat. Genet.*, 42(4), 295-302.

Dufour, J.H., Dziejman, M., Liu, M.T., Leung, J.H., Lane, T.E., Luster, A.D. (2002). IFN- γ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *J Immunol*, 168,3195-3204.

Dugas, B., Debre, P., Moncada, S. (1995). Nitric oxide, a vital poison inside the immune and inflammatory network. *Res Immunol.*, 146, 664-670.

Dugas, B., Dugas, N., Conti, M., Calenda, A., Pino, P., Thomas, Y., Mazier, D., Vouldoukis, I. (2003). Wheat gliadin promotes the interleukin-4-induced IgE production by normal human peripheral mononuclear cells through a redox-dependent mechanism. *Cytokine*, 21,270-280.

Dugas, B., Dugas, N., Conti, M., Calenda, A., Pino, P., Thomas; Y., Mazier, D., Vouldoukis, I. (2003). Wheat gliadin promotes the interleukin-4-induced IgE production by normal human peripheral mononuclear cells through a redox-dependent mechanism. *Cytokine*, 21, 270-280.

Duthie, S.J. (2003). The comet assay: protective effects of dietary antioxidants against oxidative DNA damage measured using alkaline single cell gel electrophoresis. In: Cutle, R.G. and Rodríguez, H. Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances

in biological sciences, diagnostics and intervention. World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd., p. 309-323, Singapore.

Eaton, J.W. (1991). Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *J. Lab. Clin. Med.*, 118(1), 3-4.

Ebert, E.C. (2009). Interleukin 21 up-regulates perforin-mediated cytotoxic activity of human intra-epithelial lymphocytes. *Immunology*, 127(2), 206-215.

Edwards George, J.B., Leffler, D.A., Dennis, M.D., Franko, D.L., Blom-Hoffman, J., Kelly, C.P. (2009). Psychological correlates of gluten-free diet adherence in adults with celiac disease. *J of Clin Gastroenterol.*, 43(4), 301-306.

Efthymakis, K., Milano, A., Laterza, F., Serio, M., Neri, M. (2017). Iron deficiency anemia despite effective gluten-free diet in celiac disease: Diagnostic role of small bowel capsule endoscopy. *Dig. Liver Dis.*, 49(4), 412-416.

Elfstrom, P., Granath, F., Ekstrom Smedby, K., Montgomery, S.M., Askling, J., Ekbohm, A., Ludvigsson, J.F. (2011). Risk of lymphoproliferative malignancy in relation to small intestinal histopathology among patients with celiac disease. *J Natl Cancer Inst.*, 103(5), 436-444.

Elgendy F.M., Abou-Seif M.A. (1998). Photolysis and membrane lipid peroxidation of human erythrocytes by m-chloroperbenzoic acid. *Photochem. Photobiol.*, 277(1), 1-11.

Elli, L., Villalta, D., Roncoroni, L., Barisani, D., Ferrero, S., Pellegrini, N., Bardella, M.T., Valiante, F., Tomba, C., Carroccio, A., Bellini, M., Soncini, M., Cannizzaro, R., Leandro, G. (2017). Nomenclature and diagnosis of gluten-related disorders: A position statement by the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO). *Dig. Liver Dis.*, 49(2), 138-146.

Ergün, C., Urhan, M., Ayer, A. (2017). A review on the relationship between gluten and schizophrenia: Is gluten the cause? *Nutr. Neurosci.*, 21(7), 455-466.

Errichiello, S., Esposito, O., Di Mase, R., Camarca, M. E., Natale, C., Limongelli, M. G., Greco, L. (2010). Celiac disease: predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J of Ped Gastroenterol and Nut*, 50(1), 54-60.

Escudero-Hernández, C., Plaza-Izurieta, L., Garrote, J.A., Bolbao, J.R., Arranz, E. (2017). Association of the IL-15 and IL-15R α genes with celiac disease. *Cytokine*, 99, 73-79.

Esposito, C., Paparo, F., Caputo, I, Porta, R., Salvati, V.M., Mazzarella, G. Auricchio, S., Troncone, R. (2003). Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 98(8), 1813-1820.

Esteve, M., Carrasco, M. (2017). Peculiaridades de la enfermedad celiaca en el adulto.

In: Polanco Allué I, editor. Enfermedad celiaca: presente y futuro. Madrid: Ergon.

Farré, C., Humbert, P., Vilar, P., Varea, V., Aldeguer, X., Carnicer, J., Carballo, M., Gassull, M.A. (1999). Serological markers and HLA- DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. Catalanian Coeliac Disease Study Group. *Dig Dis Sci*, 44, 2344-2349.

Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R.B., Drago, S., Elitsur, Y., Green, P.H., Guandalini, S., Hill, I.D., Pietzak, M., Ventura, A., Thorpe, M., Kryszak, D., Fornaroli, F., Wasserman, S.S., Murray, J.A., Horvath, K. (2003). Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch. Intern. Med.*, 163(3), 286-292.

Fasano, A., Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterol.*, 120(3), 636-651.

Fasano, A., Not, T., Wang, W., Uzzau, S., Berti, I., Tommasini, A., Goldblum, S.E. (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*, 355(9214), 1518-1519.

Feighery, C. (1999). Fortnightly review: coeliac disease. *BMJ*, 319, 236-239.

Fernández, A., González, I., De la fuente, J. (2010). Coeliac disease: clinical features in adult populations. *Rev Esp Enferm Dig.*, 102, 466-471

Fernández, M.L., Vivas, S., Ruiz de Morales, J.M., Marugán, J.M. (2005). Utilidad de los anticuerpos antitransglutaminasa en el diagnóstico de la enfermedad celiaca. *Gastroenterol Hepatol*, 28(8), 437-440.

Ferreira Laso, L., Blanco Ramos, C., Montoro Hugué, M.Á., Albistur Lesmes, I., Alonso González, L., Arizti Martín, A. (2008). La enfermedad celiaca en La Rioja. *Semergen*. 34, 478-483.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., Saturni, L. (2012). Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients*, 4, 243-257.

Filella, X., Molina, R., Ballesta, A.M.(2002). Estructura y función de las citocinas. *Med Integral*, 39(2), 63-71.

Fina, D., Sarra, M., Caruso, R., Del Vecchio Blanco, G., Pallone, F., MacDonald, T.T., Monteleone, G. (2008). Interleukin-21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in celiac disease. *Gut.*, 57(7), 887-892.

Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000).Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.*Nature*, 408(6809),239-247.

Fleckenstein, B., Qiao, S.W., Larsen, M.R., Jung, G., Roepstorff, P., Sollid, L.M. (2004). Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *J Biol Chem.*, 79(17),17607-17616.

Flohé, L., Wolfgang, A.G. (1984). Assays of glutathione. *Methods Enzymology*, 105, 114-121.

Foksinski, M., Gackowski, D., Rozalski, R., Siomek, A., Guz, J., Szpila, A., Dziaman, T., Olinski, R. (2007). Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. *Eur J Nutr*, 46, 174-80.

Folk J.E. (1980). Transglutaminases. *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 517-531.

Folk, J.E., Finlayson, J.S. (1977). The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem.*, 31, 1-133.

Fornari, M.C., Pedreira, S., Niveloni, S., González, D., Diez, R.A., Vázquez, H., Mazure, R., Sugai, E., Smecuol, E., Boerr, L., Mauriño, E., Bai, J.C. (1998). Pre- and post-treatment serum levels of cytokines IL-1beta, IL-6, and IL-1 receptor antagonist in celiac disease. Are they related to the associated osteopenia? *Am J Gastroenterol.*, 93, 413-418.

Forsberg G, Hernell O, Melgar S, Israelsson A, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. (2002). Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterol.*, 123(3),667-678.

Freeman, H.J. (2008). Neurological disorders in adult celiac disease. *Can. J. Gastroenterol.*, 22(11), 909-911.

Fridovich, I. (1974). Superoxido dismutasa. *Ann. Rev. Biochem.*, 44,47-159.

Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: and endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*,23, 239-257.

Fries, W., Renda, M.C., Lo Presti, M.A., Raso, A., Orlando, A., Oliva, L., Giofr , M.R., Maggio, A., Mattaliano, A., Macaluso, A., Cottone, M. (2005).Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am. J. Gastroenterol*, 100(12), 2730-2736.

Frijhoff, J., Winyard, P.G., Zarkovic, N., Davies, S.S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A.R., Taylor, E.L., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A.C., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H.E., Grune, T., Schmidt, H.H.H.W., GhezziP., (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144-1170.

García-Manzanares, A., Tenias, J.M., Lucendo, A.J. (2012). Bone mineral density directly correlates with duodenal Marsh stage in newly diagnosed adult celiac patients. *Scand. J. Gastroenterol.*, 47(8–9),927-936.

García-Novo, M.D., Garfía, C., Acuña Quiros, M.D., Asensio, J., Zancada, G., Barrio Gutierrez, S., Manzanares, J., Solís-Herruzo, J.A. (2007). Prevalencia de la enfermedad celiaca en donantes de sangre de la Comunidad de Madrid. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 99, 337-342.

Garrote, J.A., Gómez-González, E., Bernardo, D., Arranz, E., Chirido, F. (2008). Celiac disease pathogenesis: The proinflammatory cytokine network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 47(1), S27-32.

Gasbarrini, A., Torre, E.S., Trivellini, C., De Carolis, S., Caruso, A., Gasbarrini, G. (2000). Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease. *Lancet*, 356(9227), 399-400.

Gdynia, H., Müller, T., Sperfeld, A., Kühnlein, P., Otto, M., Kassubek, J., Ludolph, A.C. (2008). Severe sensorimotor neuropathy after intake of highest dosages of vitamin B₆. *Neuromuscul. Disord.*, 18, 156–158.

Gianfrani, C., Auricchio, S., Troncone, R. (2005). Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett.*, 99,141-145.

Giersiepen, K., Lelgemann, M., Stuhldreher, N., Ronfani, L., Husby,S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.R.; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis. (2012). Accuracy of Diagnostic Antibody Tests for Coeliac Disease in Children: Summary of an Evidence Report. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 54(2), 229-241.

Gobbi, G. (2005). Coeliac disease, epilepsy and cerebral calcifications.*Brain Dev.*, 27(3), 189-200.

Gobbi, G., Bouquet, F., Greco, L., Lambertini, A., Tassinari, C.A., Ventura, A., Zaniboni, M.G. (1992). Coeliac disease, epilepsy, and cerebral calcifications.The Italian Working Group on Coeliac Disease and Epilepsy. *Lancet*, 340(8817), 439-443.

Goetzl, E.J., Wasserman, S.I., Gigli, I., Austen, K.F. (1974). Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid. *J. Clin. Invest.*, 53, 813-818.

Goldstein, N.S., Underhill, J. (2001). Morphologic features suggestive of gluten sensitivity in architecturally normal duodenal biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.*, 116, 63-71.

Gómez, J.C., Selvaggio, G.S., Viola, M., Pizarro, B., la Motta, G., de Barrio, S., Castelletto, R., Echeverría, R., Sugai, E., Vazquez, H., Mauriño, E., Bai, J.C. (2001). Prevalence of celiac disease in Argentina: Screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol.*, 96, 2700-2704.

Goode, H.F., Cowley, H.C., Walker, B.E., Howdle, P.D., Webster, N.R. (1995). Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med.*, 23, 646-651.

Gopalakrishnan, S., Durai, M., Kitchens, K., Tamoz, A.P., Somerville, R., Ginski, M., Paterson, B.M., Murray, J.A., Verdu, E.F., Alkan, S.S., Pandey, N.B.(2012). Larazotide acetate regulates epithelial tight junctions in vitro and in vivo. *Peptides.*, 35, 86-94.

Gorgun, J., Portyanko, A., Marakhouski, Y., Cherstvoy, E.(2009). Tissue transglutaminase expression in celiac mucosa: an immunohistochemical study. *Virchows Arch.*, 455, 363-373.

Graham, M.F., Willey, A., Adams, J., Yager, D., Diegelmann, RF. (1996). Interleukin 1beta downregulates collagen and augments collagenase expression in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology*, 110,344-350.

Grainge, M.J., West, J., Solaymani-Dodaran, M., Card, T.R., Logan, R.F.(2012). The long-term risk of malignancy following a diagnosis of coeliac disease or dermatitis herpetiformis: a cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.*, 35(6),730-739.

Green, P.H., Jabri, B. (2006). Celiac disease. *Annual Review of Medicine*, 57, 207-221.

Green, P.H.R., Cellier, C. (2007). Celiac Disease. *N. Engl. J. Med.*, 357(17),1731-1743.

Greenwald, R. (1990). Current approaches to the development of oxygen radical scavengers. *Drugs of Today*, 26, 299-307.

Grehn, S., Fridell, K., Lilliecreutz, M., Hallert, C. (2001). Dietary habits of Swedish adult coeliac patients treated by a gluten-free diet for 10 years. *Scand J Nutrition*, 45, 178-82.

Griffiths H.R., Moller L., Bartosz G., Bast A., Bertoni-Freddari C., Collins A., Cooke M., Coolen S., Haenen G., Hoberg A.M., Loft S., Lunec J., Olinski R., Parry J., Pompella A., Poulsen H., Verhagen H., Astley S.B. (2002). Biomarkers. *Mol. Asp. Med.*, 23, 101-208.

Griffiths, R.H., Unsworth, J., Blake, D.R., Lunec, J. (1988). Free Radicals in Chemistry, Pathology and Medicine. London: Richelieu Press. pp. 439-454.

Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celiaca. Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celiaca. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud (SESCS); 2018.

Gujral, N., Freeman, H.J., Thomson, A.B.R. (2012). Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*, 18(42), 6036-6059.

Gupta, S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exp. Gerontol.*, 37(2-3),293-299.

Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. *Oxford University Press*, 4, 63-81.

Haddad, J.J., Olver, R.E., Land, S.C. (2000). Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1alpha and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.*, 275, 21130-21139.

Hadjivassiliou, M., Grünewald, R.A., Chattopadhyay, A.K., Davies-Jones, G.A., Gibson, A., Jarratt, J.A., Kandler, R.H., Lobo, A., Powell, T., Smith, C.M. (1998). Clinical, radiological, neurophysiological, and neuropathological characteristics of

gluten ataxia. *Lancet*, 352(9140), 1582-1585.

Hadjivassiliou, M., Sanders, D.D., Aeschlimann, D.P. (2015). Gluten-Related Disorders: Gluten Ataxia. *Dig. Dis.*, 33(2), 264-268.

Hall, N.J., Rubin, G., Charnock, A. (2009). Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30(4), 315-330.

Hallert, C., Grant, C., Grehn, S., Grännö, C., Hultén, S., Midhagens, G., Ström, M., Svensson, H., Valdimarsson, T. (2002). Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Aliment Pharmacol Ther*, 16, 1333-1339.

Hallert, C., Svensson, M., Tholstrup, J., Hultberg, B. (2009). Clinical trial: B vitamins improve health in patients with coeliac disease living on a gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther*, 29, 811-816.

Halliwell, R. (1988). Albumin: an important extra cellular antioxidant. *Biochem pharmacol*, 37, 569-571.

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 16, 33–50 .

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18,685-716.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Edition, Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1-25.

Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(S),715-722.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 119(6), 598-620.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 1, 1396-1398.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 286,501-514.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Protection against oxidants in biological systems; the superoxide theory of oxygen toxicity. En: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Eds. *Free Rad. Biol. Med.* (2nded) Clarendon Press.; 152-156.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*", (3rded) Oxford Science Publications, New York.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.*, 142, 231-255.

Han, A., Newell, E.W., Glanville, J., Fernandez-Becker, N., Khosla, C., Chien, Y.H., Davis, M.M. (2013). Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4⁺ and CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(32), 13073-13078.

Hanawalt, P.C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*, 21(58), 8949-8956.

Hansen, D., Brock-Jacobsen, B., Lund, E., Bjorn, C., Hansen, L.P., Nielsen, C., Fenger, C., Lillevang, S.T., Husby, S. (2006). Clinical benefit of a gluten-free diet in type 1 diabetic children with screening-detected celiac disease: a population-based screening study with 2 years' follow-up. *Diabetes Care.*, 29,2452-2456.

Hartmann, A., Aguerri, E., Beepers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1),45-51.

Hatch, G.M., Vance, D.E., Wilton, D.C. (1993). Rat liver mitochondrial phospholipase A2 is an endotoxin-stimulated enzyme of kupffer cell which is released during liver perfusion. *Biochem J.*, 293(1), 143-150.

Hausch, F., Shan, L., Santiago, N.A., Gray, G.M., Khosla, C. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 283(4),996-1003.

Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E., Shires, J.(2001). Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat. Immunol.*, 2(11), 997-1003.

Heber, D., Lu, Q.Y. (2002). Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp. Biol. Med.*, 227, 920-923.

Hecker, M., Preiss, C., Klemm, V., Busse, R. (1996). Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: Role of nuclear factor kappa B and interferon regulatory factor 1. *Br. J. Pharmacol.*, 118, 2178-2184.

Hernandez, L., Green, P.H. (2006). Extra-intestinal manifestations of celiac disease. *Curr Gastroenterol Rep.*, 8, 383-389.

Heyman, M., Menard, S. (2009). Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1165, 274-278.

Hijano, S. (2010). Estudio de la estabilidad del ADN en situación de anemia ferropénica nutricional. Influencia del consumo de leche de cabra o vaca enriquecida o no en hierro. Universidad de Granada.

Hollon, J.R., Cureton, P.A., Martin, M.L., Leonard Puppa, E.L., Fasano, A. (2013). Trace gluten contamination may play a role in mucosal and clinical recovery in a subgroup of diet-adherent non-responsive celiac disease patients. *BMC Gastroenterol.*, 13,40.

Howdle, P.D., Jalal, P.K., Holmes, G.K.T., Houlston, R.S. (2003). Primary small bowel malignancy in the UK and its association with coeliac disease. *QJM.*, 96, 345-353.

Howe, S.E., Lickteig, D.J., Plunkett, K.N., Ryerse, J.S., Konjufca, V. (2014). The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine. *PLoS ONE* 9, e86656.

Hüe, S., Mention, J.J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., Caillat-Zucman, S. (2004). A direct role for

NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 21(3), 367-377.

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I.R., Mearin, M.L., Philips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, K.P. for the ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis, on behalf of the ESPGHAN Gastroenterology Committee (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 54(1),136-160.

Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-1502.

Iatropoulos, M.J. (1986). Morphology of the gastrointestinal tract. En: Rozman, K., Hannenen, O. (Eds.), *Gastrointestinal toxicology* (pp. 246-266). Amsterdam: Elsevier.

Iqbal, T., Zaidi, M.A., Wells, G.A., Karsh, J. (2013). Celiac disease arthropathy and autoimmunity study. *J Gastroenterol Hepatol.*, 28(1),99-105.

Ivarsson, A., Hernell, O., Nystrom, L., Persson, L.A. (2003). Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *J Epidemiol Community Heal.*, 57,36.

Jabri, B., De Serre, N.P., Cellier, C., Evans, K., Gache, C., Carvalho, C., Mougenot, J.F., Allez, M., Jian, R., Desreumaux, P., Colombel, J.F., Matuchansky, C., Cugnenc, H.,

Lopez-Botet, M., Vivier, E., Moretta, A., Roberts, A.I., Ellen C. Ebert, E.C., Guy-Grand, D., Brousse, N., Schmitz, J., Cerf-Bensussan, N. (2000). Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterol.*, 118(5), 867-879.

Jabri, B., Sollid, L.M. (2006). Mechanisms of disease: Immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.*, 3(9), 516-525.

Jabri, B., Sollid, L.M. (2009). Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(12), 858-870.

Jabri, B., Sollid, L.M. (2017). T Cells in celiac disease. *J Immunol* 198, 3005-3014.

Johansen, B.H., Jensen, T., Thorpe, C.J., Vartdal, F., Thorsby, E., Sollid, L.M. (1996). Both alpha and beta chain polymorphisms determine the specificity of the disease-associated HLA-DQ2 molecules, with beta chain residues being most influential. *Immunogenetics*, 45(2), 142-150.

Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J., Lynn, M.J., Sternberg, P. (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med*, 28(4), 625-635.

Jones, P.E., Peters, T.J. (1981). Oral zinc supplements in non-responsive coeliac syndrome: effect on jejunal morphology, enterocyte production, and brush border disaccharidase activities. *Gut.*, 22(3), 194-198.

Junker, Y., Zeissig, S., Kim, S.J., Barisani, D., Wieser, H., Leffler, D.A., Zevallos, V., Libermann, T.A., Dillon, S., Freitag, T.L., Kelly, C.P., Schuppan, D. (2012). Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, 209(13),2395-2408.

Kagnoff, M.F. (2007). Celiac disease: Pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest.*,117, 41-49.

Kang, J.Y., Kang, A.H.Y., Green, A., Gwee, K.A., Ho, K.Y. (2013). Systematic review:worldwidevariation in thefrequencyofcoeliacdisease and changes over time. *Aliment Pharmacol Ther.*, 38(3), 226-245.

Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Pennells, L., Wood, A.M., White, I.R., Gao, P., Walker, M., Thompson, A., Sarwar, N., Caslake, M., Butterworth, A.S., Amouyel, P., Assmann, G., Bakker, S.J., Barr, E.L., Barrett-Connor, E., Benjamin, E.J., Björkelund, C., Brenner, H., Brunner, E., Clarke, R., Cooper, J.A., Cremer, P., Cushman, M., Dagenais, G.R., D'Agostino, R.B., Dankner, R., Davey-Smith, G., Deeg, D., Dekker, J.M., Engström, G., Folsom, A.R., Fowkes, F.G., Gallacher, J., Gaziano, J.M., Giampaoli, S., Gillum, R.F., Hofman, A., Howard, B.V., Ingelsson, E., Iso, H., Jørgensen, T., Kiechl, S., Kitamura, A., Kiyohara, Y., Koenig, W., Kromhout, D., Kuller, L.H., Lawlor, D.A., Meade, T.W., Nissinen, A., Nordestgaard, B.G., Onat, A., Panagiotakos, D.B., Psaty, B.M., Rodriguez, B., Rosengren, A., Salomaa, V., Kauhanen, J., Salonen, J.T., Shaffer, J.A., Shea, S., Ford, I., Stehouwer, C.D., Strandberg, T.E.,

Tipping, R.W., Tosetto, A., Wassertheil-Smoller, S., Wennberg, P., Westendorp, R.G., Whincup, P.H., Wilhelmsen, L., Woodward, M., Lowe, G.D., Wareham, N.J., Khaw, K.T., Sattar, N., Packard, C.J., Gudnason, V., Ridker, P.M., Pepys, M.B., Thompson, S.G., Danesh, J. (2012). C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med.*, 367,1310-1320.

Karban, A., Lerner, A., Shapiro, S. (1997). *TH1/TH2* cytokine profile in celiac disease. *Isr J Med Sci.*, 33,209-214.

Karell, K., Louka, A.S., Moodie, S.J., Ascher, H., Clot, F., Greco, L., Ciclitira, P.J., Sollid, L.M., Partanen, J. (2003). European genetics cluster on celiac disease. *Hum. Immunol.*, 64, 469-477.

Karnam, U.S., Felder, L.R., Raskin, J.B. (2004). Prevalence of Occult Celiac Disease in Patients with Iron- Deficiency Anemia: A Prospective Study. *South. Med. J.*, 97(1), 30-34.

Katar, M., Ozugurlu, A.F., Ozyurt, H., Benli, I. (2014). Evaluation of glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzyme polymorphisms in celiac disease patients. *Genet Mol Res.*, 13(1),1030-1037.

Kaukinen, K., Partanen, J., Maki, M., Collin, P. (2002). HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.*, 97,695-699.

Kaukinen, K., Peräaho, M., Collin, P., Partanen, J., Woolley, N., Kaartinen, T., Nuutinen, T., Halttunen, T., Mäki, M., Korponay-Szabo, I. (2005). Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scand. J. Gastroenterol.*, 40(5), 564-572.

Kautto, E., Ryden, P. J., Ivarsson, A., Olsson, C., Norstrom, F., Hogberg, L., Hornell, A. (2014). What happens to food choices when a gluten-free diet is required? A prospective longitudinal population-based study among Swedish adolescent with coeliac disease and their peers. *Journal of Nutritional Science*, 3, e2.

Kayanoki, Y., Fuji, J., Suzuki, K., Kawata, S., Matsuzawa, Y., Taniguchi, N. (1994). Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor- β 1 in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 269, 15488-15492.

Kelly, C.P. (2016). Celiac disease. In: Feldman M, Friedman L, Brandt L, editors. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Philadelphia: Elsevier-SANDERS; p. 1849-1872.

Kelly, C.P., Bai, J.C., Liu, E., Leffler, D.A. (2015). Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 148(6), 1175-1186.

Kelso, G.F., Porteous, C.M., Hughes, G., Ledgerwood, E.C., Gane, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P. (2002). Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959, 263-274.

Kemppainen, T., Kröger, H., Janatuinen, E., Arnala, I., Kosma, V.M., Pikkarainen, P., Julkunen, R., Jurvelin, J., Alhava, E., Uusitupa, M. (1999). Osteoporosis in adult patients with celiac disease. *Bone*, 24(3), 249-255.

Kerttula, T.O., Hallstrom, O., Maki, M. (1995). Phenotypical characterization of peripheral blood T cells in patients with coeliac disease: Elevation of antigen-primed CD45RO⁺T lymphocytes. *Immunology*, 86, 104-109.

Kester M.I., Scheltens P. (2009). Dementia: The bare essentials. *Pract. Neurol.*, 9,241-251.

Kim, C.Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C., Sollid, L.M. (2004). Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(12), 4175-4179.

Kim, S.M., Mayassi, T., Jabri, B. (2015). Innate immunity: Actuating the gears of celiac disease pathogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 29(3),425-435.

Kim, S.Y. (2006). Transglutaminase 2 in inflammation. *Front. Biosci.*, 11, 3026- 3035.

Koj A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta*, 317,84-94.

Kontakou, M., Przemioslo, R.T., Sturgess, R.P., Limb, G.A., Ellis, H.J., Day, P., Ciclitira, P.J. (1995). Cytokine mRNA expression in the mucosa of treated coeliac patients after wheat peptide challenge. *Gut*, 37, 52-57.

Kontakou, M., Sturgess, R.P., Przemioslo, R.T., Limb, G.A., Nelufer, J.M., Ciclitira, P.J. (1994). Detection of interferon gamma mRNA in the mucosa of patients with coeliac disease by *in situ* hybridisation. *Gut*, 35(8), 1037-1041.

Konturek, P.C., Brzozowski, T., Konturek, S.J. (2011). Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of physiology and pharmacology*, 62(6), 591-599.

Korponay-Szabó, I.R., Dahlbom, I., Laurila, K., Koskinen, S., Woolley, N., Partanen, J., Kovács, J.B., Mäki, M., Hansson, T. (2003). Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut*, 52(11), 1567-1571.

Korponay-Szabó, I.R., Halttunen, T., Szalai, Z., Laurila, K., Király, R., Kovács, J.B., Fésüs, L., Mäki, M. (2004). In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut*, 53(5), 641-648.

Koskinen, O., Villanen, M., Korponay-Szabo, I., Lindfors, K., Mäki, M., Kaukinen, K. (2009). Oats do not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 48, 559-565.

Kumar, S., Lal, S., Bhatnagar, A. (2017). Regulatory T cell subsets in peripheral blood of celiac disease patients and TLR2 expression: correlation with oxidative stress. *APMIS*, 125(10), 888-901.

Kumar, V., Wijmenga, C., Withoff, S. (2012). From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Semin.Immunopathol.*, 34(4), 567-580.

Kupper, C. (2005). Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterol.*, 128(4 supp 1), S121-127.

Kutlu, T., Brousse, N., Rambaud, C., Le Deist, F., Schmitz, J., Cerf-Bensussan, N. (1993). Numbers of T cell receptor (TCR) alpha beta+but not of TCR gamma delta +intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut*, 34, 208-214.

Lagerqvist, C., Dahlbom, I., Hansson, T., Jidell, E., Juto, P., Olcén, P., Stenlund, H., Hernell, O., Ivarsson, A. (2008). Antigliadin immunoglobulin A best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 47(4),428-435.

Lahat, N., Shapiro, S., Karban, A., Gerstein, R., Kinary, A., Lerner, A. (1999). Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol.*, 49,441-446.

Lahdeaho, M.L., Kaukinen, K., Laurila, K., Vuotikka, P., Koivurova, O.P., Kärjä-Lahdensuu, T., Marcantonio, A., AdelmN, D.C., Mäki, M. (2014). Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterol.*, *146(7)*, 1649-1658.

Landgren, A.M., Landgren, O., Gridley, G., Dores, G.M., Linet, M.S., Morton, L.M. (2011). Autoimmune disease and subsequent risk of developing alimentary tract cancers among 4.5 million US male veterans. *Cancer.*, *117(6)*, 1163-1171.

Lanzini, A., Lanzarotto, F., Villanacci, V., Mora, A., Bertolazzi, S., Turini, D., Carella, G., Malagoli, A., Ferrante, G., Cesana, B.M., Ricci, C. (2009). Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther.*, *29*, 1299-1308.

Lau, M.S.Y., Hopper, A.D., Sanders, D.S. (2016). Improving the detection of coeliac disease. *Practitioner*, *260(1795)*, 13-17.

Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *71(4)*, 952-958.

Lebwohl, B., Granath, F., Ekbom, A., Montgomery, S.M., Murray, J.A., Rubio-Tapia, A., Green, P.H., Ludvigsson, J.F. (2013). Mucosal healing and mortality in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.*, *37(3)*, 332-339.

Lebwohl, B., Granath, F., Ekblom, A., Smedby, K.E., Murray, J.A., Neugut, A.I., Green, P.H., Ludvigsson, J.F. (2013a). Mucosal healing and risk for lymphoproliferative malignancy in celiac disease: a populationbased cohort study. *Ann Intern Med.*, 159(3), 169-175.

Lebwohl, B., Green, P.H.R., Murray, J.A., Ludvigsson, J.F. (2013b). Season of birth in a nationwide cohort of coeliac disease patients. *Arch. Dis. Child.*, 98(1), 48.

Lebwohl, B., Luchsinger, J.A., Freedberg, D.E., Green, P.H.R., Ludvigsson, J.F. (2016). Risk of dementia in patients with celiac disease: a population-based cohort study. *J. Alzheimers. Dis.*, 49(1), 179-185.

Lebwohl, B., Sanders, D.S., Green, P.H.R. (2018). Coeliac disease. *Lancet*, 6(391), 70-81.

Lee, K.H., Wucherpfennig, K.W., Wiley, D.C. (2001a). Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat. Immunol.*, 2(9), 501-507.

Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H., Hwang, D. (2001b). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.*, 276, 16683-16689.

Leffler, D., Schuppan, D., Pallav, K., Najarian, R., Goldsmith, J.D., Hansen, J., Kabbani, T., Dennis, M., Kelly, C.P. (2013). Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut*, 62(7), 996-1004.

Leffler, D.A., Dennis, M., Hyett, B., Kelly, E., Schuppan, D., Kelly, C.P. (2007). Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 5(4),445-450.

Leffler, D.A., Schuppan, D. (2010). Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol.*, 105, 2520-2524.

Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Bioch. Biophys.*, 1366, 53-67.

Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R, Formiggini, G., Genova, M.L., Giuliano, G., Pich, M.M., Paolucci, U., Castelli, G.P., Ventura, B. (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959,199-213.

Leon, A.J., Garrote, J.A.,Blanco-Quiros, A.,Calvo, C.,Fernández-Salazar, L., Del Villar, A., Barrera, A., Arranz, E.(2006). Interleukin 18 maintains a long- standing inflammation in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol.*, 146(3), 479-485.

Lerner, B.A., Phan Vo, L.T., Yates, S., Rundle, A.G., Green, P.H.R., Lebwohl, B. (2019). Detection of Gluten in Gluten-Free Labeled Restaurant Food. *American Journal of Gastroenterology*. doi: 10.14309.

Lewis, P., Pallis, C. (1974). Neurological complications of coeliac disease and tropical sprue. In:

Lewis P, Pallis C, editors. The neurology of gastrointestinal disease. London: Saunders.

Lindsay, D.G., Astley, S.B. (2002), European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Mol. Aspects Med.*, 23 (1-3), 1-38.

Lio, D., Bonanno, C.T., D'Anna, C., De Luca, S., Gervasi, F., Cavataio, F., Iacono, F., Salerno, A. (1998). Gluten stimulation induces an *in vitro* expansion of peripheral blood T gamma delta cells from HLA-DQ2-positive subjects of families of patients with celiac disease. *Exp Clin Immunogenet.*, 15, 46-55.

Lionetti, E., Catassi, C. (2011). New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int. Rev. Immunol.*, 30(4), 219-231.

Littarru, G.P., Battino, M. (1994). Natural antioxidants and sports medicine. *Int. J. Sports. Cardiol.*, 2, 127-130.

Littarru, G.P., Battino, M. (1994). Natural antioxidants and sports medicine. *Int. J. Sports. Cardiol.*, 2, 127-130.

Liu, E., Lee, H.S., Agardh, D. (2014). Risk of celiac disease according to HLA haplotype and country. *N Engl J Med.*, 371, 1074.

Lloyd, B., Robson, E., Smith, I. & Clayton, B.E. (1989). Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activity. *Arch. Dis. Child.*, 64(3), 352- 356.

Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.

Lombardo, G., Marabini, L., Doneda, L., Lombardo, V., Scricciolo, A., Elli, L., Della Valle, V., Muratori, S., Roncoroni, L. (2019). DNA damage in human skin fibroblasts from patients with dermatitis herpetiformis. *Eur J Dermatol.* doi:10.1684.

Londei, M., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Quarantino, S., Maiuri, L. (2005). Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol. Immunol.*, 42(8), 913-918.

Lorand, L., Graham, R.M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140-156.

Luciani, A., Vilella, V.R., Vasaturo, A., Giardino, I., Pettoello-Mantovani, M., Guido, S., Cexus, O.N., Peake, N., Londei, M., Quaratino, S., Maiuri, L. (2009). Lysosomal accumulation of gliadin p31–43 peptide induces oxidative stress and Tissue Transglutaminase mediated PPAR downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut.*, 59(3), 311-319.

Ludvigsson, J.F., Bai, J.C., Biagi, F., Card, T.R., Ciacci, C., Ciclitita, P.J., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Holdoway, A., van Heel, D.A., Kaukinen, K., Leffler, D.A., Leonard, J.N., Lundin, K.E.A., McGough, N., Davidson, M., Murray, J.A., Swift, G.L., Walker, M.M., Zingone, F., Sanders, D.S. (2014). Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut.*, 63, 1210-1228.

Ludvigsson, J.F., Leffler, D.A., Bai, J.C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, J.A., Leonard, J.N., Lundin, K.E.A., Murray, J.A., Sanders, D.S., Walker, M.M., Zingone, F., Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.*, 62(1), 43-52.

Lundin, K.E., Scott, H., Fausa, O., Thorsby, E., Sollid, L.M. (1994). T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4 DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum. Immunol.*, 41(4), 285-291.

Lundin, K.E., Scott, H., Hansen, T., Paulsen, G., Halstensen, T.S., Fausa, O., Thorsby, E., Sollid, L.M. (1993). Gliadin-specific, HLA-DQ(α 1*0501 β 1*0201) restricted T cells

isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J. Exp. Med.*, 178(1), 187-196.

MacCulloch, K., Rashid, M. (2014). Factors affecting adherence to a gluten-free diet in children with celiac disease. *Paediatr Child Health.*, 19(6), 305-309.

MacDonald, T.T., Spencer, J. (1988). Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J Exp Med.*, 167, 1341-1349.

Maiuri, L., Ciacci, C., Auricchio, S. Brown, V., Quarantino, S., Londei, M. (2000). Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterol.*, 119, 996-1006.

Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quarantino, S., Londei, M. (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.*, 362(9377), 30-37.

Maiuri, L., Troncone, R., Mayer, M., Coletta, S., Picarelli, A., de Vincenzi, M., Pavone, V., Auricchio, S. (1996). In vitro activities of A-gliadin related synthetic peptides: Damaging affect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune

response in the treated coeliac mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.*, 31, 247-253.

Makharia, G.K. (2014). Current and Emerging Therapy for Celiac Disease. *Front. Med., (Lausanne) 1*, 6.

Makharia, G.K., Mulder, C.J., Goh, K.L., Ahuja, V., Bai, J.C., Catassi, C., Green, P.H., Gupta, S.D., Lundin, K.E., Ramakrishna, B.S., Rawat, R., Sharma, H., Sood, A., Watanabe, C., Gibson, P.R. (2014). Issues associated with the emergence of coeliac disease in the Asia-Pacific region: a working party report of the World Gastroenterology Organization and the Asian Pacific Association of Gastroenterology. *J Gastroenterol Hepatol.*, 29(4), 666-677.

Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila, K., Dahlbom, I., Hansson, T., Höpfl, P., Knip, M. (2003). Prevalence of Celiac Disease among Children in Finland. *N. Engl. J. Med.*, 348(25), 2517-2524.

Mäki, M., Collin, P. (1997). Coeliac disease. *Lancet.*, 349, 1755-1759.

Malamut, G., Afchain, P., Verkarre, V., Lecomte, T., Amiot, A., Damotte, D., Bouhnik, Y., Colombel, J.F., Delchier J.C., Allez, M., Cosnes, J., Lavergne-Slove, A., Merese, B., Trinquart, L., Macintyre, E., Radford-Weiss, I., Hermine, O., Brousse, N., Cerf-Bensussan, N., Cellier, C. (2009). Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II. *Gastroenterol.*, 136(1), 81-90.

Malamut, G., Cellier, C. (2014). Refractory celiac disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*, 8(3),323-328.

Malamut, G., Cellier, C. (2015). Complications of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 29, 451-458.

Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannere, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J.J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E.A., Brousse, N., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Meresse, B. (2010). IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.*, 120(6), 2131-2143.

Malus, C.D., Weber, P.C., Leaf, A. Bonventre, J.V. (1999). Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increase susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species. Evidence for enhanced activation of phospholipase A2 in mitochondria enriched with n-3 fatty acids. *Proc. Nutr. Acad. Sci. USA*, 87, 8845-8849.

Manavalan, J.S., Hernández, L., Girish Shah, J., Konikkara, J., Haiyer, A.J., Lee, A.R., Ciaccio, E., Minaya, M.T., Green, P.H., Bhagat G. (2010). Serum cytokine elevations in celiac disease: Association with disease presentation. *Human Immunology* 71(1), 50-57.

Mårild, K., Ye, W., Lebowl, B., Green, P.H.R., Blaser, M.J., Card, T., Ludvigsson, J.F. (2013). Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: a nationwide case-

control study. *BMC Gastroenterol.*, 13(1), 109.

Mariné, M., Farre, C., Alsina, M., Vilar, P., Cortijo, M., Salas, A., Fernández-Bañares, F., Rosinach, M., Santaolalla, R., Loras, C., Marquès, T., Cusí, V., Hernández, M.I., Carrasco, A., Ribes, J., Viver, J.M., Esteve, M. (2011). The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, 33(4),477-486.

Marnett, L.J. (2000).Oxyradicals and DNA damage.*Carcinogenesis* 21,361-370.

Marsh, M.N. (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiological approach to the spectrum of gluten sensitivity. *Gastroenterol.*, 102, 330-354.

Marx, G., Chevion, M. (1986).Site-specific modification of albumin by free radicals.Reaction with copper (II) and ascorbate.*Biochem. J.*, 234,236-297.

Marzari, R., Sblattero, D., Florian, F., Tongiorgi, E., Not, T., Tommasini, A., Ventura, A., Bradbury, A. (2001).Molecular Dissection of the Tissue Transglutaminase Autoantibody Response in Celiac Disease.*J. Immunol.*, 166(6),4170-4176.

Måtensson, J., Jain, A., Meister, A. (1990). Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 87, 1715-1719.

Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Dugave, C., Namane, A., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M.(2003). Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease.*Gastroenterol.*, 125(3),696-707.

Matysiak-Budnik, T., Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Menard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., van Niel, G., Bouhnik, Y., Lamarque, D., Chaussade, S., Malamut, G., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Monteiro, R.C., Heyman, M. (2008). Secretory IgA mediates retro- transcytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.*, 205(1),143-154.

Mautalen, C., González, D., Mazure, R., Vázquez, H., Lorenzetti, M.P., Maurino, E., Niveloni, S., Pedreira, S., Smecuol, E., Boerr, L.A., Bai, J.C. (1997). Effect of treatment on bone mass, mineral metabolism, and body composition in untreated celiac disease patients.*Am. J. Gastroenterol.*, 92(2),313-318.

Mauviel A. (1993). Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem.*, 53,288-295.

Mayor-Oxilia, R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev.Inst. Med. Trop*, 5(2), 23-29.

Mazzone, L., Reale, L., Spina, M., Guarnera, M., Lionetti, E., Martorana, S., Mazzone, D. (2011). Compliant gluten-free children with celiac disease: an evaluation of psychological distress. *BMC Pediatrics*, 11, 46.

McCord, J.M. (1989). Free radical and heart disease. En: Nutritional impact of food processing. Eds. Somogy, J.C., Müller, H.R. Bibli. Nutr. Dieta Basel, Karger, Switzerland, 43, 327-337.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1968). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.

McDole J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry R.D., Miller M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 483, 345-349.

McKenzie, R.L., Rea, H.M., Thomson, C.D., Robinson, M.F. (1978). Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand infants and children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31(8), 1413-1418.

McKeon, A., Lennon, V.A., Pittock, S.J., Kryzer, T.J., Murray, J. (2014). The neurologic significance of celiac disease biomarkers. *Neurology*, 83(20), 1789-1796.

McNicholl, B., Egan-Mitchell, B., Stevens, F., Keane, R., Baker, S., McCarthy, C.F., Fottrell, P.F. (1976), Mucosal recovery in treated childhood celiac disease (gluten-sensitive enteropathy). *J Pediatr.*, 89,418-424.

Medical Advisory Secretariat. (2011). Clinical utility of serologic testing for celiac disease in asymptomatic patients: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*, 11(3),1-63.

Medrano, L.M., Dema, B., López-Larios, A., Maluenda, C., Bodas, A., López-Palacios, N., Figueredo, M.A., Fernández-Arquero, M., Núñez, C. (2012). HLA and celiac disease susceptibility: new genetic factors bring open questions about the HLA influence and gene-dosage effects. *PLoS One.*, 7(10), e48403.

Meini, A., Pillan, N.M., Villanacci, V., Monafó, V., Ugazio, A.G., Plebani, A.(1996). Prevalence and diagnosis of celiac disease in IgA-deficient children. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 77, 333-336.

Melov, S. (2002). Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 959, 330-340.

Mention, J.J., Ben Ahmed, M., Begue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J.F., Cugnenc, P.H., Ruemmele, F.M., McIntyre, E., Brousse, N., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N. (2003). Interleukin 15: A key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterol.*, 125(3), 730-745.

Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E., Winchester, R.J., Braud, V., Lanier, L.L., Geraghty, D.E., Green, P.H., Guandalini, S., Jabri, B. (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med.*, 203(5),1343-1355.

Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., Green, P.H., Jabri, B. (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine- activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 21(3), 357-366.

Meresse, B., Malamut, G., Cerf-Bensussan, N. (2012). Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity* 36,907-919.

Meresse, B., Ripoche, J., Heyman, M., Cerf-Bensussan, N. (2009). Celiac disease: From oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol.*, 2(1), 8-23.

Miller, A.F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.*, 586,585-595.

Mitea, C., Havenaar, R., Drijfhout, J.W., Edens, L., Dekking, L., Koning, F. (2008). Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model:

implications for coeliac disease. *Gut*, 57(1), 25-32.

Miyadera, H., Kano, K., Miyoshi, H., Ishii, N., Hekimi, S., Kita, K. (2002). Quinones in long-lived clk-1 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.*, 512(1-3), 33-37.

Miyadera, H., Kano, K., Miyoshi, H., Ishii, N., Hekimi, S., Kita, K. (2002). Quinones in long-lived clk-1 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.*, 512(1-3), 33-37.

Molberg, O., Kett, K., Scott, H., Thorsby, E., Sollid, L.M., Lundin, K.E. (1997). Gliadin specific HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand. J. Immunol.*, 46(3), 103-109.

Molberg, O., Mcadam, S.N., Körner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Norén, O., Roepstorff, P., Lundin, K.E.A., Sjöström H., Sollid, L.M. (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat. Med.*, 4(6), 713-717.

Moller, P. (2006). The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98(4), 336-345.

Molteni, N., Bardella, M.T., Bianchi, P.A. (1990). Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue. *J. Clin. Gastroenterol.*, 12(1), 37-39.

Monguzzi, E., Marabini, L., Elli, L., Vaira, V., Ferrero, S., Ferretti, F., Branchi, F., Gaudio, G., Scricciolo, A., Lombardo, V., Doneda, L., Roncoroni, L. (2019). Gliadin effect on the oxidative balance and DNA damage: An in-vitro, ex-vivo study. *Dig Liver Dis.* 51(1), 47-54.

Monteleone, G., Pender, S.L., Alstead, E., Hauer, A.C., Lionetti, P., McKenzie, C., MacDonald, T.T. (2001). Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut.*, 48(3),425-429.

Monteleone, I., Monteleone, G., Del Vecchio Blanco, G., Vavassori, P., Cucchiara, S., MacDonald, T.T., Pallone, F. (2004). Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in coeliac disease mucosa. *Gut.*, 53,1090-1095.

Mooney, P.D., Kurien, M., Evans, K.E., Chalkiadakis, I., Hale, M.F., Kannan, M.Z., Courtize, V., Johnston, A.J., Irvine, A.J., Hadjivassiliou, M., Sanders, D.S. (2014). Point-of-care testing for celiac disease has a low sensitivity in endoscopy. *Gastrointest Endosc.*, 80,456-462.

Moscoso, F., Quera, R. (2015). Enfermedad celiaca: revisión. *Rev Med Clin Condes.* 26(5), 613-627.

Moser, B., Wolf, M., Walz, A. (2004). Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.*, 25,75-84.

Moss, S.F., Attia, L., Scholes, J.V., Walters, J.R., Holt, P.R. (1996). Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut* 39, 811-817.

Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.*, 3(4),331-341.

Muggli, R. (1993). Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. En: Free radicals and antioxidants in nutrition". Coringiu, F., Banm. S., Dessi, M.A. Eds. The Richelieu Press. Londres, 189-194.

Mukherjee, R., Kelly, C.P., Schuppan, D. (2012). Nondietary therapies for celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.*, 22(4),811-831.

Mulder, C.J., van Weyenberg, S.J., Jacobs, M.A. (2010). Celiac disease is not yet mainstream in endoscopy. *Endoscopy.*, 42(3), 218-219.

Mulder, C.J., Wierdsma, N.J., Berkenpas, M., Jacobs, M.A.J.M., Bouma, G. (2015). Preventing complications in celiac disease: our experience with managing adult celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 29, 459-468.

Multhaup, G., Rupper, T. (1997). Reactive oxygen species and Alzheimer disease. *Biochem. Pharmacol.*, 54(5),533-559.

Murray, J.A., Rubio-Tapia, A. (2012). Diarrhoea due to small bowel diseases. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 26, 581-600.

Myléus, A., Hernell, O., Gothefors, L., Hammarström, M.L., Persson, L.Å., Stenlund, H., Ivarsson, A. (2012). Early infections are associated with increased risk for celiac disease: an incident case-referent study. *BMC Pediatr.*, 12(1), 194.

Nachman, F., Mauriño, E., Vázquez, H., Sfoggia, C., González, A., González, V., Plancer del Campo, M., Smecuol, E., Niveloni, S., Sugai, E., Mazure, R., Cabanne, A., Bai, J.C. (2009). Quality of life in celiac disease patients: Prospective analysis on the importance of clinical severity at diagnosis and the impact of treatment. *Dig Liver Dis.*, 41, 15-25.

Nardecchia, S., Auricchio, R., Discepolo, V., Troncone, R. (2019). Coeliac disease in children: clinical features and mechanisms. *Frontiers in Pediatrics*. doi: 10.3389.

Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.

Navalón-Ramón, E., Juan-García, Y., Pizón-Rivadeneira, A. (2016). Prevalencia y características de la enfermedad celiaca en la fachada mediterránea peninsular. *Semergen*, 42(8), 514-522.

Nenna, R., Pontone, S., Mennini, M., Petrarca, L., Mastrogiorgio, G., Bonamico, M. (2012). Duodenal bulb for diagnosing adult celiac disease: much more than an optimal biopsy site. *Gastrointest Endosc.*, 76, 1081-1082.

Neri, S. Gardini, A., Facchini, A., Olivieri, F., Franceschi, C., Ravaglia, G., Mariani, E. (2005). Mismatch repair system and aging: microsatellite instability in peripheral blood cells from differently aged participants. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 60(3), 285-292.

NICE. (2015). Coeliac disease: recognition, assessment and management. National Institute for Health and Care Excellence (NICE); p. 145.

Nieto, N. (1993). Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memorias de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia, 1993.

Niki, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44, 227-253.

Nilsen, E.M., Gjertsen, H.A., Jensen, K., Brandtzaeg, P., Lundin, K.E. (1996). Gluten activation of peripheral blood T cells induces a *Th0*-like cytokine pattern in both coeliac patients and controls. *Clin Exp Immunol.*, 103, 295-303.

Nilsen, E.M., Jahnsen, F.L., Lundin, K.E., Johansen, F.E., Fausa, O., Sollid, L.M., Jahnsen, J., Scott, H., Brandtzaeg, P.(1998). Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterol.*, 115, 551-563.

Nilsen, E.M., Lundin, K.E.A., Krajei, P., Scott, H., Sollid, L.M., Brandtzaeg, P. (1995). Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut.*, 37(6),766-776.

Nojima, Y., Ito, K., Ono, H., Nakazato, T., Bono, H., Yokoyama, T., Sato, R., Suetsugu, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Satoh, J., Tabunoki, H., Fugo, H. (2015) Superoxide Dismutases, SOD1 and SOD2, Play a Distinct Role in the Fat Body during Pupation in Silkworm *Bombyx mori*. *PLoS ONE* 10(2), e0116007.

Norström, F., Lindholm, L., Sandström, O., Nordyke, K., Ivarsson, A. (2011). Delay to celiac disease diagnosis and its implications for health- related quality of life. *BMC Gastroenterol.*, 11, 118.

Nurminkaya, M.V., Belkin, A.M.(2012). Cellular functions of tissue transglutaminase.*Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 294,1-97.

Nygaard, O., Vollset, S.E., Refsum, H., Brattström, L., Ueland, P.M. (1999).Total homocysteine and cardiovascular disease.*J Intern Med*, 246, 425–41.

Oberhuber, G. (2000). Histopathology of celiac disease. *Biomed. Pharmacother.*, 54, 368-372.

Oberhuber, G., Granditsch, G., Vogelsang, H. (1999). The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 11, 1185-1194.

Odetti, P., Valentini, S., Aragno, I., Garibaldi, S., Pronzato, M.A., Rolandi, E., Barreca, T. (1998). Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. *Free Radic Res.*, 29, 17-24.

Ohba, M., Shibamura, M., Kuroki, T., Nose, K. (1994). Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor- β 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol.* 126, 1079-88.

Olaussen, R.W., Johansen, F.E., Lundin, K.E., Jahnsen, J., Brandtzaeg, P., Farstad, I.N. (2002). Interferon-gamma-secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scand J Immunol.*, 56(6), 652-664.

Olinski, R., Gackowski, D., Rozalski, R., Foksinski, M., Bialkowski, K. (2003). Oxidative DNA damage in a cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res.* 531, 177-190.

Olive, P.L. (1989). Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in chinese hamster V79 spheroids. *Radiat. Res.*, 117(1), 79-92.

Olmos, M., Antelo, M., Vazquez, H., Smecuol, E., Mauriño, E., Bai, J.C. (2008). Systematic review and meta- analysis of observational studies on the prevalence of fractures in coeliac disease. *Dig. Liver Dis.*, 40(1), 46-53.

Östling, O., Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 123(1), 291-298.

Ozcetin, M., Katar, M., Yilmaz, R., Karaaslan, E., Ozugurlu, F. (2011). Free Oxygen Radicals Associated with Growth in Coeliac Disease. *Health MED*, 5, 1007-1012.

Özgör, B., Selimoğlu, M.A. (2010). Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand. J. Gastroenterol.*, 45(4), 395-402.

Pabst, O., Mowat, A.M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.*, 5, 232-239.

Pagliari, D., Cianci, R., Frosali, S., Landolfi, R., Cammarota, G., Newton, E.E., Pandolfi, F. (2013). The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: A bridge between innate and adaptive immune response. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(5), 455-466.

Palamada, J. & Kehrer, J. 1992. "Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes", in *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293, pp. 103-109.

Pallav, K., Kabbani, T., Tariq, S., Vanga, R., Kelly, C.P., Leffler, D.A. (2014). Clinical utility of celiac disease-associated HLA testing. *Dig Dis Sci.*, 59,2199-2206.

Panichi, V., Maggiore, U., Taccola, D., , Migliori, M., Rizza, G.M., Consani, C., Bertini, A., Sposini, S., Perez-Garcia, R., Rindi, P., Palla, R., Tetta, C. (2004). Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.*, 19,1154-60.

Paparo, F., Petrone, E., Tosco, A., Maglio, M., Borrelli, M., Salvati, V.M., Miele, E., Greco, L., Auricchio, S., Troncone, R. (2005). Clinical HLA, and small bowel immunohistochemical features of children with positive serum antiendomysium antibodies and architecturally normal small intestinal mucosa. *Am. J. Gastroenterol.*, 100(10), 2294-2298.

Park SH, Stenvinkel P, Lindholm B. (2012). Cardiovascular biomarkers in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.*, 22,120-127.

Partanen, J., Milner, C., Campbell, R.D., Mäki, M., Lipsanen, V., Koskimies, S. (1993). HLA-linked heat-shock protein 70 (HSP70-2) gene polymorphism and celiac disease.

Tissue Antigens., 41(1),15-19.

Passananti, V., Santonicola, A., Bucci, C., Andreozzi, P., Ranaudo, A., Di Giacomo, D.V., Ciacci, C. (2012). Bone mass in women with celiac disease: role of exercise and gluten-free diet. *Dig. Liver Dis.*, 44(5), 379-383.

Peddie, C.M., Wolf, C.R., McLellan, LI., Collins, A.R., Bowen, D.T. (1997). Oxidative DNA damage in CD34+ myelodysplastic cells is associated with intracellular redox changes and elevated plasma tumour necrosis factor- α concentration. *Br J Haematol*, 99,625-631.

Penedo-Pita, M.,Peteiro-Cartelle, J. (1991). Increasedserumlevelsofinterleukin-2and soluble interleukin-2 receptor in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 12,56-60.

Pennazio, M., Spada, C., Eliakim, R., Keuchel, M., May, A., Mulder, C., Rondonotti, E., Adler, S.N., Albert, J., Baltes, P., Barbaro, F., Cellier, C., Charton, J.P., Delvaux, M., Despott, E.J., Domagk, D., Klein, A., McAlindon, M., Rosa, B., Rowse, G., Sanders, D.S., Saurin, J.C., Sindhu, R., Dumonceau, J.M., Hassan, C., Gralnek, I.M. (2015). Small-bowel capsule endoscopy and device-assisted enteroscopy for diagnosis and treatment of small-bowel disorders: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy.*, 47(4),352-386.

Peters, N., Tighe, D. (2017). Iron deficiency anaemia in a coeliac: a cause for concern? *BMJ Case Rep.* doi: 10.1136.

Peters, S.L., Biesiekierski, J.R., Yelland, G.W., Muir, J.G., Gibson, P.R. (2014). Randomised clinical trial: gluten may cause depression in subjects with non-coeliac gluten sensitivity – an exploratory clinical study. *Aliment Pharmacol Ther.*, 39(10), 1104-1112.

Piatek-Guziewicz, A., Ptak-Belowska, A., Przybylska-Felus, M., Pasko, P., Zagrodzki, P., Brzozowski, T., Mach, T., Zwolinska-Wcislo, M. (2017) .Intestinal parameters of oxidative imbalance in celiac adults with extraintestinal manifestations. *World J Gastroenterol.*, 23(44),7849-7862.

Pickett, J.P., Pendergrass, R.E., Bradford, W.D., Elchlepp, J.G. (1970). Localization of xanthine oxidase in rat duodenum; fixation of sections instead of blocks. *Stain. Technol.*, 45(1), 35-36.

Piper, J.L., Gray, G.M., Khosla, C. (2004). Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.*, 311(1), 213-219.

Ploski, R., Ek, J., Thorsby, E., Sollid, L.M. (1993). On the HLA-DQ(α 1*0501 β 1*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens*, 41, 173-177.

Plugis, N.M., Khosla, C. (2015). Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 29, 503-521.

Polanco Allué I, coordinadora. Diagnóstico precoz de la enfermedad celiaca. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2008.

Polanco Allué, I. (2008). (ed). Libro blanco de la enfermedad celiaca. Madrid: ICM.

Polanco I., Ribes C. (1991). Enfermedad Celiaca. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP. 37-46.

Przemioslo, R.T., Kontakou, M., Nobili, V., Ciclitira, P.J.(1994). Raised pro-inflammatory cytokines interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in coeliac disease mucosa detected by immunohistochemistry. *Gut*, 35,1398-1403.

Radi, R., Bush, M., Freeman, B.A. (1993). The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys*, 300(1),409-415.

Ráki, M., Fallang, L.E., Brottveit, M., Bergseng, E., Quarsten, H., Lundin, K.E., Sollid, L.M. (2007). Tetramer visualization of gut-homing gluten-specific T cells in the peripheral blood of celiac disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(8), 2831-2836.

Rao, M., Guo, D., Perianayagam, M.C., Tighiouart, H., Jaber, B.L., Pereira, B.J., Balakrishnan, V.S. (2005). Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.*, 45, 324-333.

Rao, R.K., Baker, R.D., Baker, S.S., Gupta, A., Holycross, M. (1997). Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol.*, 273(4), 812-823.

Rashid, M., Cranney, A., Zarkadas, M., Graham, I. D., Switzer, C., Case, S., Butzner, J.D. (2005). Celiac disease: evaluation of the diagnosis and dietary compliance in Canadian children. *Pediatrics*, 116(6), 754-759.

Remmen, H.V., Richardson, A. (2001). Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp. Gerontol.*, 36, 957-968.

Ren, M., Guo, Q., Guo, L., Lenz, M., Qian, F., Koenen, R.R., Xu, H., Schilling, A.B., Weber, C., Ye, R.D., Dinner, A.R., Tang, W. (2010). Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *The EMBO Journal*, 29(23), 3952-3966.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.*, 2(4), 361-367.

Ribeiro M., Nunes-Miranda, J.D., Branlard, G., Carrillo J.M., Rodriguez-Quijano, M.,Igrejas, G. (2013). One hundred years of grain omics: identifying the gltens that feed the world, *J. Proteome Res.* 12, 4702-4716.

Ribes Koninckx C. La dieta sin gluten. En: Polanco Allué I, coordinadora. Libro blanco de la enfermedad celiaca. Madrid: Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid; 2008.

Riedle, B., Kerjaschki, D. (1997). Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am. J. Pathol*, 151(1), 215- 231.

Riestra, S., Fernández, G., Rodrigo, L., García, S., Ocio, G. (2000). Prevalence of celiac disease in general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol.*, 35,398-402.

Rivabene R, Mancini E, De Vincenzi M. (1999). In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease. *Biochim Biophys Acta.*, 1453(1), 152-160.

Roberfroid, M., Buc-Calderon, P. (1995).Free radical and oxidation phenomen in a biological system.Marce Dekker Inc., New York, USA.

Roma, E., Roubani, A., Kolia, E., Panayiotou, J., Zellos, A., Syriopoulou, V.P. (2010). Dietary compliance and life style of children with coeliac disease. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 23(2), 176-182.

Roshan, B., Leffler, D.A., Jamma, S., Dennis, M., Sheth, S., Falchuk, K., Najarian, R., Goldsmith, J., Tariq, S., Schuppan, D., Kelly, C.P. (2011). The incidence and clinical spectrum of refractory celiac disease in a north american referral center. *Am J Gastroenterol.*, 106(5),923-928.

Rostami, K., Mulder, C.J., Werre, J.M., van Beukelen, F.R., Kerch- haert, J., Crusius, J.B., Peña, A.S., Willekens, F.L., Meijer, J.W. (1999). High prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors suggests a high prevalence of undiagnosed celiac disease in the Dutch population. *Scand J Gastroenterol.*, 34, 276-279.

Rostom, A., Dube, C., Cranney, A., Saloojee, N., Sy, R., Garritty,C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., McNeil, J., Moher, D., Mack, D., Patel, D. (2004). Celiac disease. *Evid Rep Technol Assess.*, 104,1-6.

Rostom, A., Dube, C., Cranney, A. Saloojee, N., Sy, R., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., MacNeil, J., Mack, D., Patel, D., Moher, D. (2005). The diagnostic accuracy of serological tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterol.*, 128, 38-46.

Rostom, A., Murray, J.A., Kagnoff, M.F. (2006). American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterol.*, 131,1981-2002.

Rubio-Tapia, A., Hill, I.D., Kelly, C.P., Calderwood, A.H., Murray, J.A. (2013). American College of Gastroenterology Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Am J Gastroenterol*, 108(5), 656-677.

Rubio-Tapia, A., Kelly, D.G., Lahr, B.D., Dogan, A., Wu, T.T., Murray, J.A.(2009a). Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience. *Gastroenterol.*, 136(1),99-107. quiz 352-335.

Rubio-Tapia, A., Kyle, R.A., Kaplan, E.L., Johnson, D.R., Page, W., Erdtmann, F., Brantner, T.L., Kim, W.R., Phelps, T.K., Lahr, B.D., Zinsmeister, A.R., Melton, L.J., Murray, J.A. (2009b). Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*,137(1), 88-93.

Rubio-Tapia, A., Van Dyke, C.T., Lahr, B.D., Zinsmeister, A.R., El-Youssef, M., Moore, S.B., Bowman, M., Burgart, L.J., Melton, L.J. 3rd, Murray, J.A. (2008). Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 6, 983-987.

Saadi, R., Malamut, G., Rahmi, G., Samaha, E., Cellier, C. (2014). Persistence of villous atrophy and iron deficiency anemia is frequently observed in adult patients with

celiac disease after at least one year of gluten free diet. Abstract Book UEGW Vienne.

Sainsbury, A., Sanders, D.S., Ford, A.C. (2013). Prevalence of Irritable Bowel Syndrome–type Symptoms in Patients With Celiac Disease: A Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2013 Apr;11(4), 359-365.e1.

Sakly, W., Sriha, B., Ghedira, I., Bienvenu, F., Ayadi, A., Sfar, M.T., Fabien, N. (2005) Localization of tissue transglutaminase and N (ϵ)-(γ)-glutamyl lysine in duodenal mucosa during the development of mucosal atrophy in coeliac disease. *Virchows Arch.* 446,613-618.

Salardi, S., Volta, U., Zucchini, S., Fiorini, E., Maltoni, G., Vaira, B., Cicognani, A. (2008). Prevalence of celiac disease in children with type 1 diabetes mellitus increased in the mid-1990s: an 18-year longitudinal study based on anti-endomysial antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 46,612-614.

Salmi, T.T., Collin, P., Järvinen, O., Haimila, K., Partanen, J., Laurila, K., Korponay-Szabo, I.R., Huhtala, H., Reunala, T., Mäki, M., Kaukinen, K. (2006). Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 24(3), 541-552.

Salvati, V.M., Bajaj-Elliott, M., Poulsom, R., Mazzarella, G., Lundin, K.E., Nilsen, E.M., Troncone, R., MacDonald, T.T. (2001). Keratinocyte growth factor and coeliac disease. *Gut.*, 49(2),176-181.

Santarlaschi V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F., Annunziato, F. (2013). IL-1 and T helper immune responses. *Front. Immunol.* 4, 182.

Sapone, A., de Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M.G., Tripathi, A., Cucca, F., Lampis, R., Kryszak, D., Carteni, M., Generoso, M., Iafusco, D., Prisco, F., Laghi, F., Riegler, G., Carratu, R., Counts, D., Fasano, A. (2006). Zonulin up-regulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes.*, 55, 1443-1449.

Saran, M., Michael, C. Bors, W. (1988). Reaction of NO with O₂ implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radic. Res. Com.*, 83;1705-1715.
En Cheeseman, K.H. Slater, T. "Free Radicals in Medicine". *British Council Bulletin*, 1993; 49(3):485.

Sarnesto, A., Linder, N., Raivio, K.O. (1996). Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab. Invest.*, 74(1); 48-56.

Sategna-Guidetti, C., Grosso, S.B., Grosso, S., Mengozzi, G., Aimo, G., Zaccaria, T., Di Stefano, M., Isaia, G.C. (2000). The effects of 1- year gluten withdrawal on bone mass, bone metabolism and nutritional status in newly- diagnosed adult coeliac disease patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 14(1), 35-43.

Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., Fiers, W. (1992). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions : Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biochem*, 267, 5317-5323.

Schumann, M., Richter, J.F., Wedell, I., Moos, V., Zimmermann-Kordmann, M., Schneider, T., Daum, S., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.D. (2008). Mechanisms of epithelial translocation of the α 2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*, 57, 747-754.

Schumann, M., Siegmund, B., Schulzke, J.D., Fromm, M. (2017). Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 3(2), 150-162.

Schuppan, D. (2000). Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterol.*, 119,234-242.

Schuppan, D., Zimmer, K.P. (2013). The diagnosis and treatment of celiac disease. *Dtsch Arztebl Int.*, 110,835-846.

Setty, M., Hormaza, L., Guandalini, S. (2008). Celiac Disease: Risk Assessment, Diagnosis, and Monitoring. *Mol. Diagn. Ther.*, 12(5),289-298.

Shah, S., Akbari, M., Vanga, R., Kelly, C.P., Hansen, J., Theethira, T., Tariq, S., Dennis, M., Leffler, D.A. (2014). Patient Perception of Treatment Burden Is High in Celiac

Disease Compared With Other Common Conditions. *Am J Gastroenterol.*, 109(9), 1304-1311.

Shan, L., Marti, T., Sollid, L.M., Gray, G.M., Khosla, C. (2004). Comparative biochemical analysis of three bacterial prolylendopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J*, 383, 311-318.

Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M., Khosla, C. (2002). Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. *Science*, 297(5590), 2275-2279.

Shan, L., Qiao S.W., Arentz-Hansen, H., Molberg, O., Gray, G.M., Sollid, L.M., Khosla, C. (2005). Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J. Proteome. Res.*, 4, 1732-1741.

Shewry, P.R., Halford, N.G. (2003). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in the grain utilization. *J Exp Bot.*, 53, 947-958.

Shiner, M., Ballard, J. (1972). Antigen-antibody reactions in jejunal mucosa in childhood coeliac disease after gluten challenge. *Lancet* 1(7762), 1202-1205.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843-845.

Siddiqui, A., Desai, N.G., Sharma, S.B., Aslam, M., Sinha, U.K., Madhu, S.V. (2019). Association of oxidative stress and inflammatory markers with chronic stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* doi: 10.1002.

Singh, J., Whelan, K. (2011). Limited availability and higher cost of gluten-free foods. *J Hum Nutr Diet.* 24(5),479-486.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175(1), 184-191.

Sjodin, B., Hellsten, A., Westing, Y., Apple, F.S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sport Med.*, 10, 236-254.

Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6), 959-962.

Snodgrass, S. (1992). Vitamin neurotoxicity. *Mol. Neurobiol.*, 6, 41-73.

Snyder J, Butzner JD, DeFelice AR, Fasano A, Guandalini S, Liu E, Newton, K.P. (2016). Evidence-Informed Expert Recommendations for the Management of Celiac Disease in Children. *Pediatrics.*, 138(3), e20153147.

Sollid, L.M. (2002). Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.*, 2(9),647-655.

Sollid, L.M., Lie, B.A. (2005). Celiac Disease Genetics: Current Concepts and Practical Applications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 3(9),843-851.

Sollid, L.M., Molberg, O., McAdam, S., Lundin, K.E. (1997). Autoantibodies in coeliac disease: Tissue transglutaminase—guilt by association? *Gut.*, 41(6),851-852.

Sollid, LM. (2000). Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol.*, 18, 53-81.

Soni, S., Badawy, S.Z.A. (2010). Celiac disease and its effect on human reproduction: a review. *J. Reprod. Med.*, 55(1–2),3-8.

Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K., Simone N. L., Cook J. A., Krishna M. C., Mitchell JB. (2007). The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic. Biol. Med.*, 42,1632-1650.

Spencer M, Lenhart A, Baker J, Dickens J, Weissman A, Read AJ, Saini, S., Saini, S.D. (2017). Primary care physicians are under-testing for celiac disease in patients with iron deficiency anemia: Results of a national survey. *PLoS One.*, 12(9), e0184754.

Ståhlberg, M.R., Hietanen, E., Mäki, M. (1988). Mucosal biotransformation rates in the small intestine of children. *Gut*, 29(8),1058-1063.

Stamnaes, J., Sollid, L.M. (2015). Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen. *Seminars in Immunology*, 27, 343-352.

Stazi, A.V., Trinti, B. (2010). Selenium status and over-expression of interleukin-15 in celiac disease and autoimmune thyroid diseases. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 46(4),389-399.

Steenholt, J.V., Nielsen, C., Baudewijn, L., Staal, A., Rasmussen, K.S., Sabir, H.J., Barington, T., Husby, S., Toft-Hansen, H. (2017). The composition of T cell subtypes in duodenal biopsies are altered in coeliac disease patients. *PLOS One*, 12, 1-17.

Stojiljković, V., Kasapović, J., Pejić, S., Gavrilović, L., Radlović, N., Saičić Z.S., Pajović, S.B. (2012a). Antioxidant Status of the Celiac Mucosa: Implications for Disease Pathogenesis. (pp.17-36). In: Celiac Disease – From Pathophysiology to Advanced Therapies .eter Kruzliak and Govind Bhagat Editors. Intech: Croatia.

Stojiljković, V., Pejic, S., Kasapović, J., Gavrilović, L., Stojiljković, S., Nicolić, D., Pajović, S.B. (2012b). Glutathione redox cycle in small intestinal mucosa and peripheral blood of pediatric celiac disease patients. *An Acad Bras Cienc* 84 (1), 175-184.

Stojiljković, V., Todorović, A., Pejić, S., Kasapović, J., Saičić, Z.S., Radlović, N., Pajović, S.B. (2009). Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. *Clinical Biochemistry*, 42, 1431-1437.

Stojiljkovic, V., Todorovic, A., Pejic, S., Kasapović, J., Saicić, Z.S., Radlović, N., Pajović, S.B. (2009). Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa in children with celiac disease. *Clin Biochem*, 42, 1430-1437.

Stojiljkovic, V., Todorovic, A., Radlovic, N., Pejic, S., Mladenovic, M., Kasapovic, J., Pajovic, S. (2007). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation in peripheral blood of children affected by coeliac disease. *Ann Clin Biochem.*, 44, 537-543.

Sulkanen, S., Halttunen, T., Laurila, K., Kolho, K.L., Korponay-Szabo, I.R., Sarnesto, A., Savilahti, E., Collin, P., Mäki, M. (1998). Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*, 115(6), 1322-1328.

Sur, L.M., Dascăl, L., Sur, G., Sur, D.G., Floca, E., Aldea, C., Lupan, I., Samasca, G. (2019). Diagnosis of gluten-related disorders: A new and challenging public health problem. *Autoimmun Rev.* doi:10.1016.

Suzuki, T., Hara, H. (2011). Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J. Nutr. Biochem.*, 22, 401-408.

Szaflarska-Popławska, A., Siomek, A., Czerwionka-Szaflarska, M., Gackowski, D., Różalski, R., Guz, J., Szpila, A., Zarakowska, E., Oliński, R. (2010). Oxidatively Damaged DNA/Oxidative Stress in Children with Celiac Disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(8), 1960-1965.

Szajewska, H., Shamir, R., Mearin, L., Ribes-Koninckx, C., Catassi, C., Domellof, M., Fewtrell, M.S., Husby, S., Papadopoulou, A., Vandenplas, Y., Castillejo, G., Kolacek, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.R., Lionetti, E., Polanco, I., Troncone, R. (2016). Gluten introduction and the risk of coeliac disease: A position paper by the european society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 62(3), 507-513.

Tack, G.J., Verbeek, W.H., Schreurs, M.W., Mulder, C.J. (2010). The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 7(4), 204-213.

Tanpowpong, P., Obuch, J.C., Jiang, H., McCarty, C.E., Katz, A.J., Leffler, D.A., Kelly, C.P., Weir, D.C., Leichtner, A.M., Camargo, C.A. (2013). Multicenter study on season of birth and celiac disease: evidence for a new theoretical model of pathogenesis. *J. Pediatr.*, 162(3), 501-504.

Tarabzouni, S., AlKhairallah, T. (2017). Isolated Neurological Manifestation in Silent Celiac Disease. *J. Mov. Disord.*, *10(2)*, 105-107.

Tartaglia, L.A., Goeddel, D.V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol. Today.*, *13(5)*, 151-153. Rothe, J., Gehr, G., Loetscher, H., Lesslauer, W. (1992). Tumor necrosis factor receptors- structure and function. *Immunol. Res.* *11(2)*, 81-90.

Templar, T., Kon, S.P., Milligan, T.P., Newman, D.J., Raftery, M.J. (1999). Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol Dial Transplant*, *14*, 946-951.

Tersigni, C., Castellani, R., de Waure, C., Fattorossi, A., De Spirito, M., Gasbarrini, A., Scambia, G., Di Simone, N. (2014). Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Hum. Reprod. Update.*, *20(4)*, 582-593.

Thomas, H.J., Ahmad, T., Rajaguru, C., Barnardo, M., Warren, B.F., Jewell, D.P. (2009). Contribution of histological, serological, and genetic factors to the clinical heterogeneity of adult-onset coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.*, *44*, 1076-1083.

Thomason, K., West, J., Logan, R.F.A., Coupland, C., Holmes, G.K.T. (2003). Fracture experience of patients with coeliac disease: a population based survey. *Gut.*, *52(4)*,

518-522.

Thompson, T., Dennis, M., Higgins, L.A., Lee, A.R., Sharrett, M.K. (2005). Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? *J. Hum. Nutr. Diet.*, 18(3), 163-169.

Thornalley, P.J., Vasak, M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 827(1), 36-44.

Tosco, A., Maglio, M., Paparo, F., Rapacciuolo, L., Sannino, A., Miele, E., Barone, M.V., Auricchio, R., Troncone, R. (2008). Immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody deposits in the small intestinal mucosa of children with no villous atrophy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 47(3), 293-298.

Tracey KJ. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420, 853-859.

Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. (2005). Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol.*, 16 Suppl 1, 83-88.

Troncone, R., Auricchio, S. (2007). Rotavirus and Celiac Disease: Clues to the Pathogenesis and Perspectives on Prevention. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 44(5),

527-528.

Trynka, G., Hunt, K.A., Bockett, N.A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S.F., Bardella, M.T., Bhaw-Rosun, L., Castillejo, G., de la Concha, E.G., de Almeida, R.C., Dias, K.R., van Diemen, C.C., Dubois, P.C., Duerr, R.H., Edkins, S., Franke, L., Fransen, K., Gutierrez, J., Heap, G.A., Hrdlickova, B., Hunt, S., Plaza Izurieta, L., Izzo, V., Joosten, L.A., Langford, C., Mazzilli, M.C., Mein, C.A., Midah, V., Mitrovic, M., Mora, B., Morelli, M., Nutland, S., Núñez, C., Onengut-Gumuscu, S., Pearce, K., Platteel, M., Polanco, I., Potter, S., Ribes-Koninckx, C., Ricaño-Ponce, I., Rich, S.S., Rybak, A., Santiago, J.L., Senapati, S., Sood, A., Szajewska, H., Troncone, R., Varadé, J., Wallace, C., Wolters, V.M., Zhernakova, A.; Spanish Consortium on the Genetics of Coeliac Disease (CEGEC); PreventCD Study Group; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), Thelma BK, Cukrowska B, Urcelay E, Bilbao JR, Mearin ML, Barisani D, Barrett JC, Plagnol V, Deloukas P, Wijmenga C, van Heel DA. (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet.*, 43(12), 1193-1201.

Tuire, I., Marja-Leena, L., Teea, S., Katri, H., Jukka, P., Päivi, S., Heini, H., Markku, M., Pekka, C., Katri, K. (2012). Persistent duodenal intraepithelial lymphocytosis despite a long-term strict gluten-free diet in celiac disease. *Am J Gastroenterol.*, 107, 1563-1569.

Union Europea. Reglamento de Ejecución (UE) N° 828/2014 de la Comisión de 30 de julio de 2014 relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos.

Ursini, F., Bindoli, A. (1987). The risk of selenium peroxidases in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipid*, 44, 255-276.

Vader W, Kooy Y, Van Veelen P, De Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Peña, S., Mearin, L., Drijfhout, J.W., Koning, F. (2002). The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterol.*, 122, 1729-1737.

Vahedi, K., Mascart, F., Mary, J.Y., Laberence, J.E., Bouhnik, Y., Morin, M.C., Ocmant, A., Velly, C., Colombel, J.F., Matuchansky, C. (2003). Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease. *Am J Gastroenterol.*, 98(5), 1079-1087.

Valdimarsson, T., Löfman, O., Toss, G., Ström, M. (1996). Reversal of osteopenia with diet in adult coeliac disease. *Gut.*, 38(3), 322-327.

Valerie, K., Povirk, L. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, 22(37), 5792-5812.

Van Berge-Henegouwen, G.P., Mulder, C.J. (1993). Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut.*, 34(11), 1473-1475.

Van Bergen, J., Mulder, C.J., Mearin, M.L., Koning, F. (2015). Local Communication Among Mucosal Immune Cells in Patients With Celiac Disease. *Gastroenterology*, 148, 1187-1194.

Van de Wal, Y., Kooy, Y., Van Veelen, P., Pena, S., Mearin, L., Papadopoulos, G., Koning, F. (1998). Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol.*, 161(4), 1585-1588.

Van de Wal, Y., Kooy, Y.M., Drijfhout, J.W., Amons, R., Koning, F. (1996). Peptide binding characteristics of the coeliac disease-associated DQ(α 1*0501 β 1*0201) molecule. *Immunogenetics*, 44(4), 246-253.

Van de Wal, Y., Kooy, Y.M., Drijfhout, J.W., Amons, R., Papadopoulos, G.K., Koning, F. (1997). Unique peptide binding characteristics of the disease-associated DQ(α 1*0501, β 1*0201) vs the non-disease-associated DQ(α 1*0201 β 1*0202) molecule. *Immunogenetics*, 46(6), 484-492.

Van der Berg, J.J., Op Den Kamp, J.A., Lubin, B.H., Kuypers, F.A. (1993). Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: a monolayer study. *Biochemistry*, 32, 4962-4967.

Van Heel, D.A., West, J. (2006). Recent advances in coeliac disease. *Gut*, 55, 1037-1046.

Van Heel, D.A., Franke, L., Hunt, K.A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., Wapenaar, M.C., Barnardo, M.C., Bethel, G., Holmes, G.K., Feighery, C., Jewell, D., Kelleher, D., Kumar, P., Travis, S., Walters, J.R., Sanders, D.S., Howdle, P., Swift, J., Playford, R.J., McLaren, W.M., Mearin, M.L., Mulder, C.J., McManus, R., McGinnis, R., Cardon, L.R., Deloukas, P., Wijmenga, C. (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet.*, 39(7),827-829.

Van Kalleveen, M.W., de Meiji, T., Plötz, F.B. (2019). Coelias disease in children: a changing clinical spectrum. *Ned Tijdschr Geneesk.*,19, 163.

Vartdal, F., Johansen, B.H., Friede, T., Thorpe, C.J., Stevanović, S., Eriksen, J.E., Sletten, K., Thorsby, E., Rammensee, H.G., Sollid, L.M. (1996).The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ ($\alpha 1^* 0501 \beta 1^* 0201$) molecule. *Eur. J. Immunol.*, 26(11), 2764-2772.

Vazquez, H., Mazure, R., Gonzalez, D., Flores, D., Pedreira, S., Niveloni, S., Smecuol, E., Mauriño, E., Bai, J.C. (2000). Risk of fractures in celiac disease patients: a cross-

sectional, case-control study. *Am. J. Gastroenterol.*, 95(1),183-189.

Vici, G., Belli, L., Biondi, M., Polzonetti, V. (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin. Nutr.*, 35(6), 1236-1241.

Villanacci, V., Not, T., Sblattero, D., Gaiotto, T., Chirido, F., Galletti, A., Bassotti, G. (2009).Mucosal tissue transglutaminase expression in celiac disease. *J. Cell Mol. Med.*, 13(2),334-340.

Vincentini, O., Quaranta, M.G., Viora, M., Agostoni, C., Silano, M. (2011). Docosahexaenoic acid modulates in vitro the inflammation of celiac disease in intestinal epithelial cells via the inhibition of cPLA2. *Clin. Nutr.*, 30, 541-546.

Viña, J., Sastre, J., Anton, V., Rivelles, M., Bruseghini, L., Esteras, A., Asensi, M. (1993).Role of antioxidants in aging prevention.*J. Clin. Nutr:Gastroent.*, 8,30-33.

Wagner, G., Zeiler, M., Grylli, V., Berger, G., Huber, W., Woeber, C., Rhind, C., Karwautz, A. (2016). Coeliac disease in adolescence: Coping strategies and personality factors affecting compliance with gluten-free diet. *Appetite*, 101, 55-61.

Wahab, P.J., Meijer, J.W., Mulder, C.J. (2002). Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol.*, 118(3),459-463.

Wahab, P.J., Peters, W.H., Roelofs, H.M., Jansen, J.B. (2001). Glutathione S-transferases in small intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92(3),279-284.

Wald, D.S., Morris, J.K., Law, M., Wald, J.N. (2006). Folic acid homocysteine and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ*, 333, 1114-1117.

Waldmann, T.A., Tagaya, Y. (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annual Review of Immunology*, 17, 19-49.

Wapenaar, M.C., van Belzen, M.J., Fransen, J.H., Sarasqueta, A.F., Houwen, R.H., Meijer, J.W., Mulder, C.J., Wijmenga, C. (2004). The interferon gamma gene in celiac disease: augmented expression correlates with tissue damage but no evidence for genetic susceptibility. *J Autoimmun.*, 23, 183-190.

West, J., Logan, R.F., Card, T.R., Smith, C., Hubbard, R. (2003). Fracture risk in people with coeliac disease: a population-based cohort study. *Gastroenterol.*, 125, 429-436.

Wierdsma, N.J., Bokhorst-de van der Schueren, M.A.E., Berkenpas, M., Mulder, C.J.J., van Bodegraven, A.A. (2013). Vitamin and Mineral Deficiencies Are Highly Prevalent in Newly Diagnosed Celiac Disease Patients. *Nutrients.*, 5, 3975-3992.

Wierdsma, N.J., van Bokhorst-de van der Schueren, M.A., Berkenpas, M., Mulder, C.J., van Bodegraven, A.A. (2013). Vitamin and mineral deficiencies are highly prevalent in newly diagnosed celiac disease patients. *Nutrients.*, 5(10),3975-3992.

Wilcox C. S., Pearlman A. (2008). Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides.*Pharm. Rev.*, 60,418-469.

Williams, M.J., Sutherland, D.H., Clark, C.G. (1963). Lymphomsarcoma of the small intestine with a malabsorption syndrome and pneumatosis intestinalis. Report of a case with peroral jejunal biopsy. *Gastroenterol.*, 45,550-557.

Wiseman, H., Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, 313,17-29.

Wolff, S.P., Dean, R.T. (1986). Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzyme hydrolysis.*Biochem. J.*, 234, 399-403.

Woodward, J. (2015). Coeliac Disease. *Medicine*, 43(4), 234-238.

Yla-Herttuala, S., Rissanen, T.T., Vajanto, I., Hartikainen, J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol.*, 49(10), 1015-1026.

Yüce, A., Demir, H., Temizel, I.N., Koçak, N. (2004). Serum carnitine and selenium levels in children with celiac disease. *Indian J. Gastroenterol.*, 23(3),87-88.

Zapata-Gonzalez, F., Rueda, F., Petriz, J., Domingo, P., Villarroya, F., Diaz-Delfin, J., de Madariaga, M.A., Domingo, J.C. (2008). Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR(gamma):RXR heterodimers: Comparison with other polyunsaturated fatty acids. *J. Leukoc. Biol.*, 84, 1172-1182.

Zemskov, E.A., Mikhailenko, I., Hsia, R.C., Zaritskaya, L., Belkin, A.M. (2011). Unconventional secretion of tissue transglutaminase involves phospholipid-dependent delivery into recycling endosomes. *PLoS ONE*, 6(4), e19414.

Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S.E., Oh, S., Kovanen, P.E., Hinrichs, C.S., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Brady, J.N., Restifo, N.P., Berzofsky, J.A., Leonard, W.J. (2005). Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.*, 201(1), 139-148.

Zimmer, K.P., Fischer, I., Mothes, T., Weissen-Plenz, G., Schmitz, M., Wieser, H., Büning, J., Lerch, M.M., Ciclitira, P.C., Weber, P., Naim, H.Y. (2010). Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut*, 59, 300-310.

