

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE POSTGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a
lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”**

Trabajo de tesis para optar por el título de Magíster en Ciencias Biomédicas

Autora: Bioq. Silvia Cristina Ferreira Maniero

Directora de tesis: Dra. Patricia Elena Langjahr Penayo, M.Sc., Ph.D.

Co-directora de tesis: Dra. Vivian Giménez Bareiro, M.Sc.

San Lorenzo - Paraguay

2017

Catalogado por: Biblioteca del IICS

Ferreira Maniero, Silvia Cristina

Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca / Silvia Cristina

Ferreira Maniero; Dir de tesis Patricia Elena Langjahr Penayo

Co-dir de tesis Vivian Giménez Bareiro. -- San Lorenzo : UNA.

Dirección General de Postgrado. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 2017.

xi, 98 : il ; 28 cm.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) -- IICS, 2017

1. Enfermedad Celíaca. 2. Translocación Bacteriana.
3. Receptores de Lipopolisacáridos. 4. Dieta Sin Gluten. I. Título

CDD (ed. 18ª) 616.34

**ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CD14 SOLUBLE Y PROTEÍNA DE
UNIÓN A LIPOPOLISACÁRIDO EN LA ENFERMEDAD CELÍACA**

SILVIA CRISTINA FERREIRA MANIERO

Aprobado en fecha 31 de octubre de 2017.

Tribunal examinador:

Dra. Gabriela Ávila, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de
Asunción, Paraguay.

Dra. Ana Ayala, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

Dra. Cynthia Díaz, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

Dra. Patricia Langjahr, M.Sc., Ph.D.

Directora de Tesis

Dra. Vivian Giménez, M.Sc.

Co-directora de tesis

AGRADECIMIENTOS

A Dios y María por bendecirme y darme la fortaleza para alcanzar este anhelado objetivo.

A mi directora de tesis, la Dra. Patricia Langjahr, por sus valiosas orientaciones que contribuyeron enormemente a mi formación, por la motivación, paciencia y confianza depositada en mí durante la elaboración de la tesis.

A mi co-directora de tesis, la Dra. Vivian Giménez, por su valiosa colaboración y sugerencias brindadas en el desarrollo del trabajo de tesis.

A la jefa del Departamento de Inmunología IICS-UNA, Dra. María Mercedes Carpinelli, por darme la posibilidad de trabajar en el laboratorio a su cargo, por su apoyo y excelente predisposición, y a todos los miembros del laboratorio por la ayuda brindada en todo momento.

A la directora de la Fundación Paraguaya de Celíacos (FUPACEL), Dra. María Elena Chamorro, a la Dra. Idalina Dalles y a la Lic. Mirena Torcida, por la gran ayuda otorgada en el reclutamiento de los pacientes.

A la Cátedra de Gastroenterología y Endoscopia del Hospital de Clínicas, en especial al Dr. Jesús Ortiz y al Dr. Sebastián Díaz, por la colaboración en el reclutamiento de pacientes.

A todas las personas que participaron o colaboraron en el reclutamiento de pacientes y controles, en especial a mi tutora Patricia Langjahr, co-tutora Vivian Giménez, a Aníbal Espínola y Christa Burgos por su importante colaboración.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización de esta maestría.

A la encargada del laboratorio de Inmunidad Innata, del Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de

Chile, Dra. Marcela Hermoso y su equipo de trabajo, por darme la oportunidad de realizar una pasantía en el laboratorio a su cargo durante la maestría y por las valiosas sugerencias brindadas.

A mis compañeros de maestría, por el apoyo y gratos momentos compartidos y por acompañarme en los momentos difíciles.

A mis amigos de la vida, por el aliento y apoyo, por el consuelo recibido en los momentos difíciles que me ayudaron enormemente a lograr esta meta. Gracias de corazón.

A mi querida Familia. A mis padres, Luciano[†] y María Cristina, por ser mi ejemplo de esfuerzo y perseverancia, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en el cumplimiento de esta meta. A mis hermanas Natalia y Mariana, por el acompañamiento y aliento de siempre. A mis sobrinos, Meli, Santi y Paulita, por compartir conmigo hermosos momentos en estos años. A mis cuñados, Guille y Sergio, por la ayuda y el apoyo brindado.

Dedico especialmente esta tesis a mi papá, a quien agradezco su enorme generosidad y apoyo hasta el último día de su vida. Gracias por darme fortaleza para seguir adelante en medio de tanta tristeza por tu reciente partida.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
TÍTULO.....	1
RESUMEN	2
SUMMARY.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Enfermedad celíaca	5
1.1.1. Patogénesis de la EC	6
1.1.1.1. Inmunopatogénesis de la EC	9
1.1.2. Presentación clínica de la EC	11
1.1.3. Tratamiento de la EC.....	12
1.1.4. Diagnóstico de la EC	13
1.1.4.1. Serología.....	13
1.1.4.2. Evaluación histológica	14
1.1.4.3. Estudio genético	16
1.1.5. Seguimiento de la EC	16
1.2. Moléculas asociadas a daño intestinal en pacientes con EC	18
1.2.1. Traslocación microbiana	19
1.3. Proteína de unión a LPS (LBP) y CD14 soluble (sCD14): proteínas accesorias del receptor TLR4	20
1.4. LBP y sCD14 como marcadores de exposición a endotoxina (LPS)	24
1.5. LBP y sCD14 y su relación con patologías	25

2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo general	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Diseño del estudio	31
3.2. Pacientes y controles	31
3.2.1. Criterios de selección	31
3.2.2. Reclutamiento.....	32
3.3. Toma de muestra y separación de sueros	33
3.4. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-tTG2	33
3.5. Cuantificación de sCD14.....	34
3.6. Cuantificación de LBP	34
3.7. Asuntos éticos.....	35
3.8. Análisis de datos.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes e individuos controles participantes del estudio	38
4.2. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin y con DLG .	39
4.2.1. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos según duración de la DLG.....	41
4.2.2. Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 y la duración de la DLG en pacientes celíacos	42

4.3. Niveles séricos de sCD14 en pacientes celíacos sin y con DLG e individuos aparentemente sanos.....	43
4.3.1. Niveles séricos de sCD14 en pacientes celíacos según duración de la DLG	46
4.3.2. Correlación entre los niveles séricos de sCD14 y los de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos	47
4.3.3. Correlación entre los niveles séricos de sCD14 y la duración de la DLG en pacientes celíacos.....	49
4.4. Niveles séricos de LBP en pacientes celíacos sin y con DLG e individuos aparentemente sanos.....	49
4.4.1. Correlación entre los niveles séricos de LBP y los de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos	53
4.4.2. Correlación entre los niveles séricos de LBP y la duración de la DLG en pacientes celíacos.....	54
5. DISCUSIÓN.....	56
5.1. Características de la población	57
5.2. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos	58
5.3. CD14 soluble (sCD14) en pacientes celíacos.....	59
5.4. Proteína de unión a LPS (LBP) en pacientes celíacos.....	63
5.5. Consideraciones finales	64
5.6. Proyecciones.....	64
6. CONCLUSIONES.....	66
7. BIBLIOGRAFÍA	68
8. ANEXOS	93

8.1. Anexo 1	94
8.2. Anexo 2	95
8.3. Anexo 3	96
8.4. Anexo 4	97
8.5. Anexo 5	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogénesis de la Enfermedad Celíaca.....	6
Figura 2. Curva estándar representativa del ensayo de ELISA de anticuerpos IgA anti-tTG2 (Ajuste 4-PL)	40
Figura 3. IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos	41
Figura 4. Niveles de IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos según duración de la DLG.....	42
Figura 5. Correlación de IgA anti-tTG2 y duración de la DLG en pacientes celíacos.....	43
Figura 6. Curva estándar representativa del ensayo de ELISA de sCD14 (Ajuste 4-PL).....	44
Figura 7. sCD14 en pacientes celíacos e individuos controles.....	45
Figura 8. sCD14 en pacientes celíacos según los niveles de IgA anti-tTG2.....	46
Figura 9. Niveles de sCD14 en pacientes celíacos según duración de la DLG.....	47
Figura 10. Correlación de sCD14 e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG.....	48
Figura 11. Correlación de sCD14 e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos con DLG	48
Figura 12. Correlación de sCD14 y duración de la DLG en pacientes celíacos	49
Figura 13. Curva estándar representativa del ensayo de ELISA de LBP (Ajuste 4-PL).....	50
Figura 14. LBP en pacientes celíacos e individuos controles	51
Figura 15. Niveles de LBP en pacientes celíacos según los niveles de IgA anti-tTG2.....	52
Figura 16. Correlación de LBP e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG	53
Figura 17. Correlación de LBP e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos con DLG	54
Figura 18. Correlación de LBP y duración de la DLG en pacientes celíacos	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C:	Grado Celsius
µg:	Microgramo
4-PL:	Regresión logística de 4 parámetros
AGA:	Anticuerpos anti-gliadina
ATIs:	Inhibidores amilasa-tripsina
BPI:	Proteína bactericida que incrementa la permeabilidad
BSA:	Albúmina de suero bovina
cCK-18:	Fragmento de citoqueratina 18 unido a caspasa
CONACYT:	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CPA:	Células presentadoras de antígeno
CXCL10:	Quimioquina 10 con motivo CXC
d.C.:	Después de Cristo
DAMPs:	Patrones moleculares asociados a daño celular
DE:	Desviación estándar
DGP:	Péptidos de gliadina desaminados
DLG:	Dieta libre de gluten
E:	Glutamato
EATL:	Enteropatía asociada a linfoma de células T
EC:	Enfermedad celíaca
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EMA:	Anticuerpos anti-endomisio
EndoCAb:	Anticuerpos contra el núcleo de endotoxina

ESPGHAN:	Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición
FABPs:	Proteínas de unión a ácidos grasos
FUPACEL:	Fundación Paraguaya de Celíacos
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
h:	Hora
HLA:	Antígeno leucocitario humano
HMGB1:	Proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1
HMW:	Alto peso molecular
HRP:	Peroxidasa de rábano picante
HSP60:	Proteína de choque térmico 60
IBD:	Enfermedad inflamatoria intestinal
IELs:	Linfocitos intraepiteliales
I-FABP:	Proteína intestinal de unión a ácidos grasos
IFN-β:	Interferón beta
IgA:	Inmunoglobulina A
IICS:	Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud
IL:	Interleucina
IL-1R:	Receptor de interleucina-1
kDa:	Kilodalton
L:	Litro
LAL:	Lisado de amebocitos del Limulus
LBP:	Proteína de unión a lipopolisacárido
LMW:	Bajo peso molecular

LPS:	Lipopolisacárido
LRR:	Repeticiones ricas en leucina
mCD14:	CD14 de membrana
MD-2:	Factor de diferenciación mieloide-2
mg:	Miligramo
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad
min:	Minuto
mL:	Mililitro
MyD88:	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
ng:	Nanogramo
NK:	Natural killer
nm:	Nanómetro
OMS:	Organización Mundial de la Salud
P:	Prolina
PAMPs:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	Buffer fosfato salino
PCR:	Proteína C reactiva
ppm:	Partes por millón
PRRs:	Receptores de reconocimiento de patrón
Q:	Glutamina
r:	Coefficiente de correlación de Spearman
RE:	Retículo endoplásmico
Reg-3α:	Proteína 3-alfa derivada de islote regenerador

rpm:	Revoluciones por minuto
RSV:	Virus sincitial respiratorio
RUO:	Research Use Only
sCD14:	CD14 soluble
TCR:	Receptor de linfocitos T
Th:	Linfocitos T colaboradores
TIR:	Dominio de homología Toll/IL-1R
TLR:	Receptor tipo Toll
TRIF:	Adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN- β
tTG2:	Transglutaminasa tisular 2
U:	Unidades
UNA:	Universidad Nacional de Asunción
USA:	Estados Unidos de América
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
α-GST:	α - glutatión S-transferasa

“Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”

"Study of soluble CD14 and lipopolysaccharide binding protein proteins in celiac disease"

RESUMEN

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía autoinmune del intestino delgado debida al consumo de gluten en personas genéticamente susceptibles. La alteración de la permeabilidad intestinal puede conducir a la traslocación bacteriana, de la luz intestinal a la circulación, y posterior endotoxemia (por la presencia de lipopolisacárido (LPS) bacteriano) y activación de la respuesta inmune sistémica. Las proteínas CD14 soluble (sCD14) y proteína de unión a LPS (LBP), que reconocen LPS y lo presentan a receptores del sistema inmune innato, se postulan como marcadores de endotoxemia y daño intestinal en algunas patologías, diferentes a la EC. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar sCD14 y LBP en la EC. En este estudio observacional descriptivo con componente analítico, transversal, se incluyeron pacientes celíacos adultos, sin dieta libre de gluten (DLG) (no tratados) (n=20) y con DLG (n=40) y controles aparentemente sanos (n=45). Se determinaron por ELISA los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular 2 (tTG2), sCD14 y LBP. sCD14 se encontró elevada en suero de pacientes con EC activa respecto a pacientes celíacos con DLG ($p=0,0168$) y controles ($p=0,0421$). No se observó diferencia significativa entre los niveles séricos de LBP de celíacos no tratados, celíacos con DLG y controles. Los datos obtenidos sirven de base para estudios futuros sobre moléculas relacionadas a daño intestinal y contribuyen a un mayor conocimiento de moléculas de la respuesta inmune innata en la EC.

Palabras clave: Enfermedad Celíaca, Translocación Bacteriana, Receptores de Lipopolisacáridos, Dieta Sin Gluten.

SUMMARY

Celiac disease (CD) is an autoimmune enteropathy of the small intestine due to the consumption of gluten in genetically susceptible persons. Alteration of intestinal permeability can lead to bacterial translocation, from intestinal lumen to circulation, and subsequent endotoxemia (due to the presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS)) and activation of the systemic immune response. The soluble CD14 (sCD14) and LPS-binding protein (LBP) proteins, which recognize LPS and present it to receptors of the innate immune system, are postulated as markers of endotoxemia and intestinal damage in some pathologies, other than CD. The main objective of this study was to study sCD14 and LBP in CD. Adult celiac patients with no gluten-free diet (GFD) (n=20) and GFD (n=40) and apparently healthy controls (n=45) were included in this observational, descriptive, cross-sectional study with analytical component. Serum levels of IgA anti-tissue transglutaminase 2 (tTG2), sCD14 and LBP were determined by ELISA. sCD14 was found to be elevated in serum of patients with active CD compared to celiac patients with GFD ($p=0.0168$) and controls ($p=0.0421$). No significant difference was observed between the serum LBP levels of untreated celiacs, celiacs with GFD and controls. The data obtained serve as the basis for future studies on molecules related to intestinal damage and contribute to a better understanding of molecules of the innate immune response in CD.

Key words: Celiac Disease, Bacterial Translocation, Lipopolysaccharide Receptors, Diet, Gluten-Free.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía autoinmune del intestino delgado provocada por el consumo de gluten de la dieta en personas con susceptibilidad genética (1).

El gluten es la fracción proteica insoluble en agua presente en cereales como el trigo, cebada, centeno, avena y otros granos relacionados, compuesta de prolaminas y glutelinas (1,2).

La EC (del griego “koiliakos”, abdominal) fue descrita por primera vez en el siglo II d.C., por el médico griego Aretaeus de Cappadocia, como un síndrome de malabsorción con diarrea crónica (3). En 1887, Samuel Gee hizo la primera descripción clínica de lo que ahora se conoce como EC, mientras que el pediatra Dicke fue el primero en vincular la EC con el consumo de trigo en las décadas de 1930 y 1940 (4).

La prevalencia de la EC varía aproximadamente de 0,5% a 1% en población norteamericana y europea (5–9), así como en las poblaciones de Australia (10), Nueva Zelanda (11), el norte de África y Oriente Medio (9,12,13), el sur de Asia (14), Argentina (15) y Brasil (16). Es 1,5 a 2 veces más alta en mujeres que en hombres (17), como en la mayoría de los desórdenes autoinmunes. En un estudio realizado en nuestro país con registros de la Fundación Paraguaya de Celíacos (FUPACEL), entre los años 2006 y 2011 se registraron 5 a 10 casos nuevos de EC al mes (18). Datos sobre la prevalencia de la enfermedad en población paraguaya no existen.

El aumento de la frecuencia de la EC observado en muchos países en desarrollo puede deberse a la occidentalización de la dieta, cambios en la producción y preparación del trigo y una mayor concienciación de la enfermedad (19).

El riesgo de desarrollar EC se incrementa entre las personas que tienen un familiar de primer grado afectado y en pacientes con otras enfermedades autoinmunes tales como la diabetes tipo 1 (3 a 16%), la tiroiditis de Hashimoto (5%), la enfermedad hepática autoinmune, el síndrome de Sjögren, la esclerosis múltiple, así como la nefropatía por IgA, el síndrome de Down (5%), el síndrome de Turner (3%) y la deficiencia de IgA (9%) (19).

1.1.1. Patogénesis de la EC

La patogénesis de la EC involucra una serie de factores como el consumo de gluten y otros factores ambientales, así como un fuerte componente genético (**Figura 1**) (20).

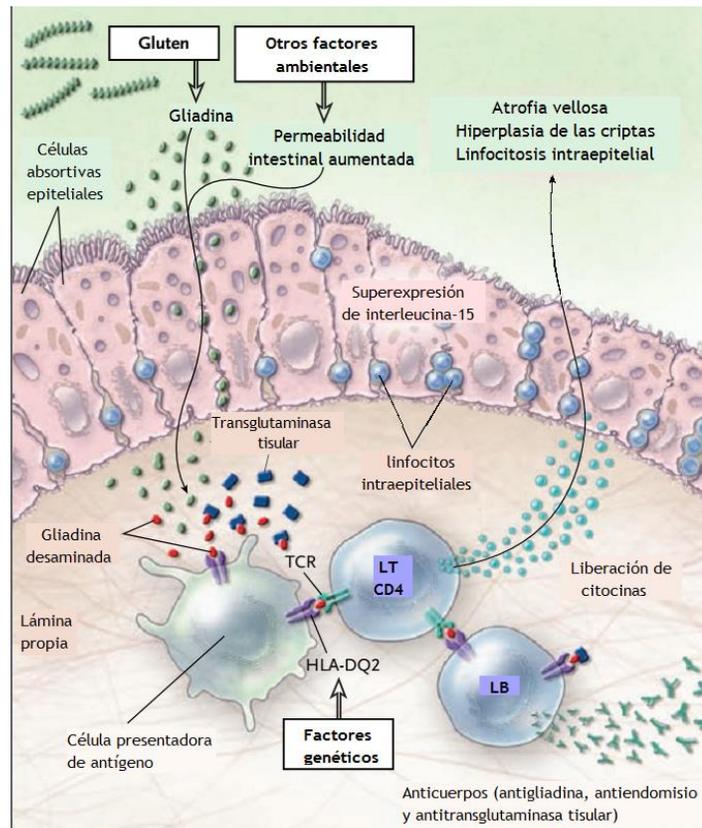


Figura 1. Patogénesis de la Enfermedad Celíaca. Interacción del gluten con factores inmunes y genéticos en la Enfermedad Celíaca (Modificado de Green *et al.*, 2007) (20).

El gluten presente en el trigo es un conjunto de proteínas compuesto por gliadinas y gluteninas (21). Prolaminas similares a la gliadina también están presentes en el centeno (secalinas), la cebada (hordeínas) y la avena (aveninas) (22). Péptidos derivados de las prolaminas presentes en el trigo, la cebada y el centeno son capaces de desencadenar la EC, a diferencia de los presentes en la avena, que han mostrado ser no inmunogénicos en la mayoría de los individuos con EC (1,23).

Las gliadinas, hordeínas, secalinas y gluteninas son péptidos ricos en prolinas y glutaminas que son débilmente digeridos en el tracto gastrointestinal humano debido a su resistencia a la degradación por endopeptidasas lumbales y del borde en cepillo, que carecen de actividad prolil endopeptidasa (20,23).

Las gliadinas se subdividen en α -, γ -, and ω -gliadinas, mientras que las gluteninas se clasifican en gluteninas de bajo peso molecular (LMW) y de alto peso molecular (HMW). Los péptidos derivados del gluten que estimulan más fuertemente a los linfocitos T de pacientes con EC son los derivados de α - y ω - gliadina (4 residuos de prolina), y en menor medida los de γ -gliadina (2-3 residuos de prolina) y las gluteninas LMW (1-2 residuos de prolina) (24).

En un contexto de permeabilidad de la mucosa intestinal aumentada, como el que se presenta en la EC, fragmentos de gliadina no digeridos pueden alcanzar la lámina propia del intestino mediante mecanismos de transporte a través de la barrera epitelial de la mucosa, tales como transporte transcelular y paracelular (2).

Los principales factores genéticos que contribuyen a la susceptibilidad de la EC son los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) o antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, HLA-DQ2 y HLA-DQ8, moléculas presentes en las células presentadoras de antígeno (CPA) involucradas en la presentación de antígenos a los linfocitos T (23).

Más del 90% de los pacientes con EC posee una o dos copias de HLA-DQ2.5 (DQA1*0501/DQB1*0201). Un porcentaje menor de pacientes expresa los haplotipos HLA-DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302) y HLA-DQ2.2 (DQA1*0202/DQB1*0201), de menor riesgo (25).

Los haplotipos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 son necesarios pero no suficientes para el desarrollo de la EC, ya que el HLA-DQ2 está presente en 30% de la población caucásica (26), mientras que sólo 1% desarrolla EC, demostrando la participación de otros factores genéticos o ambientales (2).

Tanto HLA-DQ2.5 y HLA-DQ8 presentan en su estructura bolsillos con carga positiva que unen preferentemente péptidos con carga negativa, como los derivados del gluten. Las proteínas inmunogénicas del gluten poseen un alto contenido de glutamina (Q) y prolina (P). Dado que los péptidos ricos en prolina son resistentes a la proteólisis por enzimas digestivas, estos permanecen en el lumen intestinal y eventualmente, frente a una alteración de la permeabilidad intestinal, pueden entrar en contacto con las células inmunes intestinales. Péptidos que contienen motivos ricos en glutamina (Q)-prolina (P) son excelentes sustratos para la enzima transglutaminasa tisular 2 (tTG2) presente en el intestino, la cual puede desaminar residuos de glutamina (Q) neutros, dentro de las secuencias Q-X-P, en residuos de glutamato (E) de carga negativa. Los residuos de prolina introducen restricciones estructurales que permiten la unión de péptidos sólo a moléculas HLA-DQ2/8 expresadas en células presentadoras de antígeno, las cuales pueden activar a linfocitos T CD4⁺ específicos del gluten (25).

HLA-DQ2.5 cubre un amplio repertorio de péptidos de gluten inmunogénicos y más resistentes a la degradación por enzimas gastrointestinales, a diferencia de HLA-DQ8 y HLA-DQ2.2, lo que explicaría la fuerte asociación de EC con la presencia de HLA-DQ2.5 (24).

Los haplotipos de HLA asociados a la EC representan 36-40% del riesgo genético en la enfermedad (22). Se han identificado al menos 39 genes no HLA que predisponen a la enfermedad, implicados en respuestas inflamatorias e inmunitarias principalmente (19). Además, existe un alto grado de concordancia de la EC entre gemelos monocigóticos y la prevalencia entre familiares de primer grado es del 10 a 15% (27).

Aún faltan estudios genéticos acerca de la frecuencia de los HLA predisponentes en la población paraguaya. En países vecinos se ha encontrado la predominancia del HLA DQ2.5 (28).

1.1.1.1. Inmunopatogénesis de la EC

En la EC está involucrada tanto la respuesta inmune innata como adaptativa. Los péptidos de gliadina pueden activar directamente a receptores de reconocimiento de patrón, como los receptores tipo Toll (TLR), específicamente el TLR2 y TLR4 (29). Además, los inhibidores amilasa-tripsina (ATIs), que son proteínas diferentes al gluten encontradas en trigo, centeno y cebada, activan el sistema inmune innato en pacientes con EC (30).

En condiciones fisiológicas normales, el sistema inmune intestinal mantiene la tolerancia oral a los antígenos proteicos solubles en un ambiente de ácido retinoico y TGF- β , que inducen propiedades tolerogénicas en las células dendríticas. Estas células dendríticas, a su vez inducen el desarrollo de linfocitos T reguladores FOXP3⁺, los cuales secretan citocinas anti-inflamatorias tales como TGF- β , IL-10 e IL-4 y suprimen a linfocitos T efectores (23,31). Sin embargo, en la EC, las células dendríticas intestinales son estimuladas por altos niveles de

citocinas pro-inflamatorias como IL-15, IFN- α e IL-21, y pueden promover la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ específicos para el gluten (31). Otro factor importante que contribuye a la tolerancia inmune es la mantención de la permeabilidad intestinal.

La enzima tTG2 presenta un papel fisiológico en la reparación tisular catalizando el entrecruzamiento de proteínas presentes en las células (23,31) y es enzimáticamente inactiva a nivel intracelular. Al transportarse extracelularmente, en presencia de calcio, adquiere una conformación abierta reducida y activa enzimáticamente, lo cual se favorece en condiciones reductoras como en la inflamación (23).

En la lámina propia los péptidos de gliadina son desaminados por la enzima tTG2, que convierte ciertos residuos de glutamina sin carga, en ácido glutámico de carga negativa, aumentando su afinidad de unión a las moléculas HLA de clase II DQ2 y/o DQ8 presentes en la superficie de CPA, tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (32).

Los péptidos de gliadina son presentados a los linfocitos T CD4⁺ induciendo su activación y proliferación, producen citocinas pro-inflamatorias Th1 y Th17 como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-26 y promueven la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos anti-gliadina (AGA) y anti-tTG2 (33,34). Las citocinas pro-inflamatorias llevan a la producción de metaloproteasas y factor de crecimiento de queratinocitos por células estromales, con la posterior inducción de hiperplasia de las criptas (33). Concomitantemente, se producen altas cantidades de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β como un mecanismo para contrarrestar la activación inmune anormal en la mucosa intestinal durante la EC activa (35).

Las células Th CD4⁺ específicas contra el gluten no pueden producir por sí solas el daño tisular y la atrofia de las vellosidades en la EC. Por el contrario, los linfocitos

intraepiteliales (IELs) activados por IL-15, median la destrucción de células intraepiteliales y la atrofia de las vellosidades (31). Los IELs están compuestos de células CD8⁺ TCR αβ⁺ principalmente, TCR γδ⁺ y algunas de tipo natural killer (NK) (23). En individuos sanos tienen la función de proteger la barrera intestinal, sin embargo, en la EC, su activación crónica contribuye al daño epitelial (25).

La activación de los IELs CD8+TCR αβ+ en la EC se produce por la IL-15 (24,25,31), una citocina pro-inflamatoria producida por células epiteliales y dendríticas de la lámina propia expuestas a péptidos de gliadina tóxicos (32).

1.1.2. Presentación clínica de la EC

La EC es reconocida actualmente como una enfermedad sistémica que puede afectar a personas de cualquier edad, raza y grupo étnico (19).

Las manifestaciones clínicas de la EC pueden ser clásicas (signos y síntomas de malabsorción) o no clásicas y sintomáticas (con síntomas gastrointestinales y/o extraintestinales) o asintomáticas (36).

La presentación clásica de la EC es más común en niños pequeños y consiste principalmente en síntomas gastrointestinales que se relacionan con malabsorción e incluyen diarrea crónica, dolor abdominal, distensión abdominal, falta de crecimiento, pérdida de peso y en algunos casos estreñimiento (36).

Los síntomas extraintestinales secundarios a la malabsorción incluyen la anemia por deficiencia de hierro y osteoporosis resultante de la disminución de la absorción de calcio. Otras manifestaciones extraintestinales pueden ser artritis, neuropatía periférica, hepatitis, pancreatitis y anormalidades del sistema reproductor femenino (27). Manifestaciones poco comunes de la EC son la dermatitis herpetiforme, una erupción ampollosa con depósitos de

IgA, la ataxia del gluten y la crisis celíaca observada en niños y caracterizada por diarrea severa, hipoproteinemia y desequilibrios metabólicos y electrolíticos (19).

Entre las deficiencias nutricionales presentes en los pacientes con EC, además del hierro y calcio, se encuentran la vitamina D, la vitamina B12, la vitamina B6 y el zinc (36).

Cabe resaltar que una proporción de pacientes con EC no presenta síntomas (27).

Las complicaciones asociadas con la EC no tratada incluyen el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes, el adenocarcinoma del intestino delgado, la enteropatía asociada a linfoma de células T (EATL) y los trastornos linfoproliferativos extraintestinales, como los linfomas no Hodgkin de células T y B (32).

La EC refractaria al tratamiento afecta al 5% de las personas con EC y se caracteriza por síntomas clínicos de malabsorción persistentes o recurrentes junto con cambios histológicos a pesar de seguir una dieta libre de gluten (DLG) estricta (37,38).

1.1.3. Tratamiento de la EC

El único tratamiento para la EC es una DLG estricta durante toda la vida, por lo que todos los productos de trigo, centeno, cebada y avena contaminada con gluten deben evitarse (36). De esta manera se interrumpe la respuesta inmune intestinal provocada por el gluten permitiendo la recuperación de la mucosa intestinal (25).

Los pacientes recién diagnosticados deben ser asesorados por un nutricionista para evitar el gluten, así como para tener una ingesta adecuada de nutrientes y fibra en su dieta (4).

El grado de susceptibilidad de los pacientes con EC a la contaminación del gluten es variable (4). La cantidad más baja de gluten diaria que puede causar daño a la mucosa intestinal de pacientes con EC es de 10 a 50 mg por día (19).

La comisión del Codex Alimentarius de la OMS estipuló una contaminación máxima de gluten de 20 ppm en los alimentos etiquetados sin gluten, siendo este contenido de gluten seguro para los pacientes con EC (4).

La DLG permite la resolución de los síntomas y la reparación del daño intestinal y mejora los parámetros nutricionales, incluyendo aumento en el peso corporal, índice de masa corporal y mineralización ósea. Además, la adherencia a la DLG disminuye el riesgo de complicaciones como el cáncer y la mortalidad (39).

Con la instauración de una DLG las características serológicas se normalizan en 3 a 12 meses (40), mientras que la recuperación del daño intestinal se produce normalmente dentro de 6 a 24 meses de iniciada la dieta (19). La EC refractaria se presenta en aproximadamente un 5% de los pacientes, y ocurre cuando persisten los cambios histológicos y síntomas a pesar de seguir una DLG (37,38).

1.1.4. Diagnóstico de la EC

El diagnóstico de la EC se realiza a través de la evaluación clínica, serología e histología en pacientes que presentan una dieta conteniendo gluten (4).

1.1.4.1. Serología

Las pruebas serológicas se utilizan como el primer paso para identificar a los pacientes con sospecha de EC (36). Estas incluyen medición de anticuerpos IgA e IgG anti-tTG2, anticuerpos IgA anti-endomisio (EMA) y anticuerpos IgA e IgG anti-péptidos de gliadina desaminados (DGP) (4).

La medición de anticuerpos IgA anti-tTG2 es la prueba inicial de elección, ya que es altamente sensible y específica para el diagnóstico de EC (32). Un aumento de la

concentración de anticuerpos IgA anti-tTG2 en el momento del diagnóstico se asocia con grados más severos de atrofia de las vellosidades intestinales (41–43). En este sentido, se reportó una correlación entre los títulos de anticuerpos anti-tTG2 y los grados de daño duodenal en pacientes con EC activa (44–46).

Los anticuerpos anti-EMA se dirigen a estructuras reticulínicas del músculo liso gastrointestinal y tienen una especificidad cercana al 100% para el diagnóstico de EC (36).

La medición de los niveles séricos de anticuerpos anti-gliadina (AGA) actualmente no se recomienda debido a su baja sensibilidad y especificidad, excepto cuando existe una alta prevalencia de la enfermedad. En su lugar, los anticuerpos IgA e IgG anti-DGP son más precisos para la detección de EC y son especialmente útiles para la detección de EC en niños menores de 2 años donde se recomienda su uso en combinación con IgA anti-tTG2 (39).

La deficiencia selectiva de IgA ocurre más frecuentemente en pacientes con EC (2%) que en la población general (0,2%), lo cual puede llevar a resultados falsos negativos cuando se realizan los tests serológicos usuales basados en IgA, como anti-tTG2 y anti-EMA (4). Por lo tanto, se sugiere medir IgA total al inicio de las pruebas y si existe deficiencia de los niveles de IgA se recomienda la determinación de anticuerpos IgG anti-tTG2 y/o anti-DGP (39).

Se recomienda el cribado selectivo para EC de sujetos sintomáticos y aquellos con mayor riesgo como los familiares de sujetos con EC y personas con diabetes tipo 1 o síndrome de Down (32).

1.1.4.2. Evaluación histológica

La evaluación histológica de la mucosa intestinal es el estándar de oro para el diagnóstico de EC en adultos y no puede ser reemplazada por la serología (4). Sin embargo, las directrices de la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y

Nutrición (ESPGHAN) sugieren que la biopsia del intestino delgado puede no ser necesaria para el diagnóstico de EC en niños sintomáticos, con un alto título de anticuerpos anti-tTG2 (mayor a 10 veces el límite superior del rango normal), con anticuerpos EMA positivos en una muestra de sangre tomada por separado y con presencia de los genotipos predisponentes HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 (47).

Las muestras de biopsias se obtienen mediante una endoscopia superior. Debido a que la inflamación duodenal puede ser irregular, se recomienda tomar varias muestras, al menos cuatro de la segunda o tercera parte del duodeno y una o dos del bulbo duodenal (27).

Existen varias clasificaciones de los cambios histológicos asociados con la EC siendo la más conocida la clasificación de Marsh, según la cual la mucosa intestinal normal se clasifica como Marsh 0, la linfocitosis intraepitelial (> 25 linfocitos intraepiteliales por 100 enterocitos) como Marsh 1, la linfocitosis intraepitelial e hiperplasia de las criptas como Marsh 2, la linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades como Marsh 3. La clasificación de Marsh fue modificada por Oberhuber que subdividió la lesión 3 en 3a-3c, según la atrofia sea parcial (3a), subtotal (3b) o total (3c). Existe una clasificación simplificada más reciente desarrollada por Corazza (39).

El diagnóstico de EC se establece fácilmente en quienes realizando una dieta conteniendo gluten, presentan una serología positiva y una biopsia duodenal con una histología caracterizada por un aumento de la linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades (4).

La prevalencia de EC seronegativa es del 6-22% de todos los casos diagnosticados (48-51). Por lo tanto, cuando existe una fuerte sospecha de EC, la biopsia intestinal debe realizarse incluso si las pruebas serológicas son negativas (4). Adicionalmente, en la histología

pueden encontrarse pacientes con EC con hallazgos inespecíficos. Esta falta de concordancia entre la serología e histología lleva a que muchos casos queden sin diagnóstico, demostrando la necesidad de desarrollar pruebas de diagnóstico adicionales.

1.1.4.3. Estudio genético

Las pruebas genéticas para determinar la presencia de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 pueden ser útiles en personas con factores de riesgo de desarrollar EC, como por ejemplo, en los familiares de pacientes con EC y en pacientes con casos dudosos. Estas pruebas tienen un alto valor predictivo negativo, por lo que es poco probable el desarrollo de EC en quienes tengan resultados negativos (19).

1.1.5. Seguimiento de la EC

Una vez que los pacientes con EC inician una DLG es importante evaluar la recuperación de la mucosa intestinal, para prevenir las complicaciones asociadas con el daño inflamatorio intestinal persistente. Realizar una evaluación histológica del intestino mediante endoscopia y biopsia resulta dificultoso debido a la naturaleza invasiva del procedimiento y al costo sanitario considerable (52).

Adicionalmente se utilizan estrategias indirectas para evaluar la adherencia a la DLG como entrevistas a los pacientes sobre los hábitos alimenticios y mejoría de los síntomas, así como la medición periódica de los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 y/o anti-DGP, los cuales disminuyen de forma continua al retirar el gluten de la dieta (52,53).

La medición de anticuerpos refleja con precisión el daño intestinal durante el diagnóstico de la EC (44–46). Sin embargo, en el seguimiento de la DLG, los niveles de anticuerpos son pobres indicadores de la recuperación de la mucosa intestinal (52,54–57). Si

bien algunos estudios encontraron una correlación entre los niveles de anticuerpos, especialmente IgG anti-DGP, y el grado de daño intestinal en el seguimiento de los pacientes con EC (58,59), la eficacia de estas pruebas es generalmente menor que en pacientes no tratados y deberían realizarse más estudios que confirmen estos hallazgos.

Las pruebas serológicas de anticuerpos reflejan más bien la actividad de la respuesta inmune relacionada a la EC que el daño intestinal; la fiabilidad de estas pruebas para el monitoreo de la respuesta histológica durante el tratamiento de la EC aún es cuestionable (57,60).

Los niveles de anti-tTG2 se mantienen más altos pero dentro de los límites normales en aquellos pacientes recuperados incompletamente después de un año, lo que indica que la desaparición de anticuerpos ocurre antes que la recuperación de la mucosa (61). Además, la seropositividad persistente de anti-tTG2 es independiente de la recuperación completa de la mucosa intestinal (52).

La EC no cursa con elevación de marcadores inflamatorios sanguíneos como la velocidad de eritrosedimentación, la proteína C reactiva o proteína amiloide A sérica (62), por lo que es necesaria la búsqueda de otras moléculas circulantes que puedan reflejar el grado de inflamación intestinal (62–64).

Debido a esto, es necesaria la identificación de marcadores medibles en forma no invasiva y sensibles para evaluar la recuperación de la mucosa intestinal en respuesta a una DLG.

Se estudiaron los perfiles de expresión de citocinas en el suero de pacientes con EC activa y pacientes con EC con DLG y se encontraron diferencias entre ambos grupos de pacientes, lo cual podría servir como una prueba útil para evaluar la respuesta al tratamiento

(65–67). Además, debido a que hasta ahora el análisis histológico y de citometría de flujo es necesario para distinguir entre formas complicadas (EC refractaria tipo II y EATL) y no complicadas de EC y EC refractaria tipo I, se estudiaron ciertos parámetros séricos inmunológicos y bioquímicos, incluyendo la medición de ciertas citocinas, que podrían servir como pruebas no invasivas útiles para tal fin (68).

1.2. Moléculas asociadas a daño intestinal en pacientes con EC

Se han estudiado diferentes moléculas y su relación con el estado de la mucosa intestinal, una vez instalada la DLG, en pacientes con EC.

Niveles séricos de transtiretina (69), CD163 soluble (62) y quimiocina inflamatoria CXCL10 (70) se encontraron aumentados significativamente en pacientes celíacos con enfermedad activa (sin DLG) y dichos niveles volvieron a valores basales durante la DLG.

Se propuso a Reg-3 α como un biomarcador de daño de las células epiteliales intestinales en diversas enteropatías, incluida la EC (71).

La apoptosis excesiva de enterocitos es uno de los mecanismos responsables de la atrofia vellositaria (72–74) y disminuye con la adherencia a una DLG (72). Se encontraron niveles incrementados del marcador de apoptosis conocido como el fragmento de citoqueratina 18 unido a caspasa (cCK-18) en pacientes con EC en relación a controles sanos (75).

Niveles plasmáticos del aminoácido citrulina producido por los enterocitos del intestino delgado (76), niveles plasmáticos y urinarios de las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) presentes en enterocitos maduros del intestino grueso y delgado (77–79), y niveles circulantes de la enzima α -glutatión S-transferasa (α -GST) presente en las células

intestinales, hepáticas y renales (80,81) y su relación con la integridad de las células epiteliales intestinales han sido descritos.

La proteína de unión a ácidos grasos intestinal (I-FABP) ha sido propuesta como marcador de daño intestinal en EC. Los niveles séricos de I-FABP se encontraron aumentados en pacientes con EC no tratados en comparación con controles no celíacos y disminuyeron significativamente durante la DLG (63,64,82,83).

Sin embargo, aún es necesario el estudio de estas moléculas en un número mayor de muestras y la validación de procedimientos para determinar su utilidad como marcadores de daño intestinal en pacientes con EC.

1.2.1. Traslocación microbiana

El daño y alteración de la permeabilidad intestinal puede conducir a la traslocación microbiana, que consiste en el paso de bacterias y otros microorganismos de la luz intestinal a la circulación sistémica, produciendo como consecuencia endotoxemia o presencia de endotoxina o lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas en la sangre (84).

La traslocación microbiana ha sido relacionada con activación de la respuesta inmune en forma sistémica. Las bacterias que llegan a la circulación como resultado de la traslocación bacteriana, son reconocidas por receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) del sistema inmune y desencadenan su activación e inflamación. La activación sistémica de la respuesta inmune trae como consecuencia diversos procesos inflamatorios (84).

El fenómeno de activación inmune sistémica como consecuencia de la traslocación microbiana se observa en varias patologías, tales como infección por VIH (85), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (86,87), hígado graso (88), entre otras.

La traslocación bacteriana puede ser evaluada a través del ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL), que mide los niveles circulantes de LPS. Este ensayo presenta varias limitaciones técnicas lo que hace difícil su implementación en estudios a gran escala (89).

Adicionalmente, han sido evaluados como marcadores de traslocación microbiana anticuerpos contra el núcleo de endotoxina o LPS (EndoCAb) (90) y la medición de los niveles plasmáticos de D-lactato, producto de fermentación producido por bacterias presentes en el tracto humano gastrointestinal (91,92).

Alternativamente, la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP-LPS binding protein-) y CD14 soluble (sCD14), proteínas que participan en el reconocimiento del LPS, han sido postuladas como marcadores de endotoxemia y daño intestinal en algunas patologías (93–96).

1.3. Proteína de unión a LPS (LBP) y CD14 soluble (sCD14): proteínas accesorias del receptor TLR4

La proteína LBP y la proteína CD14 participan en el reconocimiento del LPS de bacterias gram negativas, colaborando con el receptor TLR4 (97,98).

Los TLRs constituyen los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de la inmunidad innata más representativos. Son codificados por la línea germinal y están presentes principalmente en macrófagos y células dendríticas, reconocen patrones estructurales comunes de los microorganismos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs) (97,99).

Los TLRs son proteínas transmembrana de tipo I compuestas por un dominio extracelular conteniendo repeticiones ricas en leucina que median el reconocimiento de PAMPs y DAMPs, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de homología a la

familia del receptor de interleucina-1 (IL-1R), denominado dominio de homología Toll/IL-1R (TIR), involucrado en la transducción de la señal (97,99,100).

Diversos PAMPs actúan como ligandos para TLRs entre los que se incluyen lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos derivados de microorganismos tales como bacterias, virus, parásitos y hongos (97). Entre los DAMPs detectados por los TLRs se incluyen moléculas liberadas de las células dañadas, apoptóticas o fibróticas durante la inflamación (101).

La unión de ligandos a los TLRs conduce a la activación de factores de transcripción y la posterior producción y secreción de citocinas y otras moléculas pro-inflamatorias (99).

Los TLRs se dividen en dos subgrupos en función de su localización celular y ligandos. Un grupo comprende a aquellos expresados en la superficie celular que reconocen componentes de membrana microbianos como lípidos, lipoproteínas y proteínas e incluye a TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, y el otro grupo se compone de aquellos que se expresan en vesículas intracelulares como el retículo endoplásmico (RE), endosomas, lisosomas y endolisosomas donde reconocen a ácidos nucleicos microbianos e incluye a TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 (97).

Además de expresarse en células inmunes tales como macrófagos, monocitos y células dendríticas, los TLRs se expresan en células epiteliales, endoteliales, neurales y gliales, y por lo tanto, tienen un rol importante en la inflamación específica de tejidos (101).

El TLR4 fue el primero de los TLRs en ser descrito. Participa en la respuesta inmune innata contra microorganismos tales como bacterias gram negativas y positivas, micobacterias, espiroquetas, levaduras y virus tales como el virus sincitial respiratorio (RSV) y el virus de tumor mamario (101). El TLR4 reconoce el LPS, glicolípidos componente de la membrana

externa de las bacterias gram negativas, que puede desencadenar shock séptico (97,102). Además, reconoce DAMPs o alarminas, como las proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1), el ácido hialurónico, la proteína de choque térmico 60 (HSP60) y Mrp8 (103).

Específicamente, el TLR4 reconoce en forma de homodímero al grupo lipídico altamente conservado del LPS, asociado con la molécula accesoria factor de diferenciación mieloide-2 (MD-2) (103,104).

El complejo TLR4-MD2 reconoce LPS y recluta distintas moléculas adaptadoras dando inicio a la transducción de señales. El TLR4 activa tanto las vías de señalización dependientes de MyD88 y TRIF (97).

El LPS está compuesto de una región hidrofóbica, el lípido A, unida a una cadena larga de carbohidrato. Lípido A es la región reconocida por el sistema inmune innato. Está compuesta de una cadena principal de glucosamina fosforilada y lleva cuatro a siete cadenas de acilo unidas. Posee diversidad estructural entre distintas especies bacterianas, ya que puede variar el número y longitud de las cadenas acilo y los residuos fosfato terminales pueden ser modificados por otros grupos químicos. La zona de carbohidratos se compone de una región central o núcleo conservado entre diferentes especies bacterianas, que contiene residuos de carbohidratos inusuales como heptosa y KDO, y de una región O específica compuesta de copias repetidas de unidades de carbohidratos. La sola presencia del lípido A es suficiente para activar la respuesta inmunitaria innata, sin embargo, la respuesta inmune adaptativa depende de la región O (99,102).

Las proteínas LBP y sCD14 realizan la monomerización de LPS antes de presentarlo al complejo TLR4-MD-2, facilitando así la detección (99).

LBP es una glicoproteína de fase aguda de 60 kDa presente en el plasma; se sintetiza principalmente en los hepatocitos y se libera al torrente sanguíneo. También es producida por el epitelio intestinal, respiratorio y gingival (105). Pertenece a la familia LBP o de transferencia de lípidos, a la que además pertenecen la proteína bactericida que incrementa la permeabilidad (BPI), la proteína de transferencia de éster de colesterol, la proteína de transferencia de fosfolípido, entre otras (99).

La LBP se une a agregados de LPS a través del NH₂- terminal de carga positiva y los transfiere al CD14, reconociendo a ésta a través del COOH- terminal, de esta manera estimulando la respuesta inmune innata (99,105).

El CD14 es una glicoproteína que puede estar unida a la membrana (mCD14) de células mielomonocíticas por un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) o en forma soluble (sCD14) en fluidos biológicos (106–109).

CD14 divide los agregados de LPS en monómeros y los presenta al complejo TLR4-MD-2 presente en la superficie celular (99,102).

La proteína CD14 pertenece a la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR), y tiene la estructura curvada de solenoide, con un bolsillo hidrofóbico en el lado NH₂-terminal. Dado que su bolsillo de unión a LPS es muy pequeño, sólo une monómeros de LPS. Puede unirse tanto a la región de lípido A, como a la región de carbohidratos del LPS (99,110).

mCD14 presenta un tamaño de 55 kDa (111), mientras sCD14 varía de 43 a 53 kDa según el grado de glicosilación y dependiendo si se sintetizó sin el anclaje o se eliminó del anclaje por actividad enzimática o proteólisis como resultado de la activación de monocitos

(106–109). sCD14 es también producida por los hepatocitos (112–116) y puede ser considerada una proteína de fase aguda de tipo 2 inducida por IL-6 (117).

Además de su rol en la señalización por LPS, sCD14 es un factor regulatorio que interactúa directamente con células T y B y podría tener un rol modulador de las respuestas inmunes celulares y humorales en enfermedades inflamatorias (118,119).

CD14 también puede reconocer y unir otros productos bacterianos como peptidoglicano, ácido lipoteicoico, lipoarabinomanano y lipoproteínas, así como inducir la fagocitosis de células apoptóticas (99,110).

De igual modo, la producción de sCD14 puede ser inducida por otros ligandos de TLR, diferentes a LPS, como flagelina y CpG oligodesoxinucléotidos así como por citocinas inflamatorias tales como IL-6 e IL-1 β (120).

1.4. LBP y sCD14 como marcadores de exposición a endotoxina (LPS)

sCD14 y LBP pueden reflejar la exposición de LPS a largo plazo, ya que la vida media de ambas proteínas oscila entre 24 a 48 hs, a diferencia del LPS que tiene una vida media de 1-3 h (121).

Se ha reportado que en el suero de sujetos sanos, la concentración de LBP se encuentra entre 5 a 15 $\mu\text{g/mL}$ y puede aumentar hasta 50 $\mu\text{g/mL}$ o más durante la respuesta inflamatoria de fase aguda (122); la concentración sérica de sCD14 en sujetos sanos varía entre 1,5 a 5 mg/L (123).

Cuando LPS se encuentra en altas concentraciones, LBP puede atenuar sus efectos estimulantes por varios mecanismos, por ejemplo, transfiriendo LPS a lipoproteínas de alta o baja densidad en el suero (124) o competir con mCD14 por el LPS (125).

Las funciones de sCD14 son competir con mCD14 por la unión a LPS a fin de neutralizar las respuestas inducidas por la endotoxina (126–129) o permitir el reconocimiento de LPS de células que no expresan mCD14, como las células endoteliales, epiteliales y de músculo liso, y mediar la activación celular (130,131). sCD14 también puede transferir LPS unido a las células a lipoproteínas plasmáticas (132).

1.5. LBP y sCD14 y su relación con patologías

Niveles séricos aumentados de LBP y sCD14 han sido encontrados en diferentes patologías. Los pacientes con IBD presentan niveles séricos aumentados de endotoxina, LBP y sCD14, que se correlaciona con la actividad de la enfermedad y se normalizan después del tratamiento (95). LBP y sCD14 han sido propuestos como marcadores de la actividad de la enfermedad de Crohn mostrando una precisión similar a la proteína C reactiva (PCR), usada para tal fin (93).

Los niveles séricos de LBP se encontraron elevados en pacientes adultos con sepsis causada por infecciones bacterianas y fúngicas (133,134), VIH (85), cirrosis (135) y enfermedad arterial coronaria (136,137). Existe una asociación entre los niveles séricos de LBP y el espesor de la íntima media de la carótida, un marcador de aterosclerosis ampliamente utilizado (138).

Adicionalmente, mayores concentraciones séricas de LBP también se asociaron con la obesidad y el síndrome metabólico (139–141) y la diabetes tipo 2 (140,141), en concordancia con la exposición microbiana en estas anomalías a consecuencia de alteraciones en la microbiota intestinal y la permeabilidad intestinal (142–145).

Por otro lado, bajos niveles de LBP fueron encontrados en la enfermedad de Parkinson (146,147), la tuberculosis extra-pulmonar (148), la filariasis activa (149) y la diabetes tipo 1 (150).

Los niveles séricos de sCD14 se encontraron elevados en pacientes con infecciones bacterianas (151–153) y virales (154–156), así como en pacientes con quemaduras y traumatismos (157).

Niveles plasmáticos aumentados de sCD14 se observaron en pacientes infectados por hepatitis B y C (158), VIH (85) y tuberculosis activa en relación a tuberculosis latente (159–162), donde se correlacionaron con los niveles de PCR (160).

Niveles séricos elevados de sCD14 están asociados con diversas enfermedades autoinmunes. Se encontraron niveles elevados en lupus y se correlacionó con la actividad de la enfermedad (163,164). Además, se reportaron niveles séricos elevados de sCD14 en artritis reumatoide (165), síndrome de Kawasaki (166) y esclerosis múltiple donde aumentaron durante el tratamiento con IFN- β (167).

Los niveles de sCD14 aumentaron también en el suero de pacientes con diabetes tipo 2 (168) y se relacionaron con la resistencia a la insulina (169), aterosclerosis e infarto agudo de miocardio (170).

En resumen, las proteínas LBP y sCD14 presentan niveles alterados en diferentes patologías inflamatorias y son marcadores de daño intestinal y traslocación microbiana (exposición a LPS). Debido a esto y a que no existen datos sobre las proteínas LBP y sCD14 en la EC, el objetivo de este estudio es generar conocimiento sobre estas proteínas en la patología. Este estudio permitirá aumentar el conocimiento existente sobre moléculas de la respuesta inmune innata en la EC. Adicionalmente, servirá como base para estudios futuros

que evalúen el posible uso de estas proteínas inflamatorias, fácilmente medibles en suero, como marcadores de inflamación y daño a nivel intestinal o seguimiento de tratamiento en la EC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Estudiar a las proteínas CD14 soluble (sCD14) y proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) en la enfermedad celíaca (EC).

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Evaluar los niveles séricos de sCD14 en pacientes celíacos no tratados y con dieta libre de gluten e individuos aparentemente sanos, y compararlos entre sí.
- 2.2.2. Evaluar los niveles séricos de LBP en pacientes celíacos no tratados y con dieta libre de gluten e individuos aparentemente sanos, y compararlos entre sí.
- 2.2.3. Evaluar el efecto de la duración de la dieta sobre los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular 2 (tTG2) en pacientes celíacos.
- 2.2.4. Correlacionar los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular 2 (tTG2) en pacientes celíacos no tratados y con dieta libre de gluten con los niveles séricos de sCD14 y LBP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

El presente trabajo consistió en un estudio observacional descriptivo con componente analítico, de corte transversal, con muestreo no probabilístico de casos consecutivos. Este trabajo servirá para generar datos de base para futuros estudios, ya que al iniciar el mismo, no se contaba con ningún antecedente sobre estas moléculas en la EC. Esta tesis se enmarca dentro del Proyecto “Estudio de las moléculas inflamatorias CD14 soluble (sCD14) y proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) en enfermedad celíaca”, 14-INV-171 del Programa PROCENCIA del CONACYT. Tanto el proyecto marco como el proyecto de tesis fueron aprobados por el Comité Científico y de Ética del IICS-UNA, código N° P06/2014.

3.2. Pacientes y controles

3.2.1 Criterios de selección

Se incluyeron pacientes con los siguientes criterios de inclusión: i) adultos (con 18 años cumplidos), de ambos sexos; ii) pacientes con diagnóstico reciente de EC por un gastroenterólogo, siguiendo criterios clínicos, serológicos e histológicos, que no se encuentren con DLG (no tratados); iii) pacientes con diagnóstico de EC realizado por un gastroenterólogo siguiendo criterios clínicos, serológicos e histológicos, que estén con DLG (tratados), con un mínimo de 6 meses de haber comenzado la dieta y que reciban asesoramiento nutricional regularmente en la FUPACEL sobre alimentos certificados libres de gluten. Además, se incluyeron controles con características demográficas (edad y sexo) similares a las de los pacientes celíacos sin y con DLG. Los criterios de inclusión para controles fueron: adultos (con 18 años cumplidos), de ambos sexos, libres de EC y con una dieta normal incluyendo gluten.

Se excluyeron a pacientes celíacos que refirieron tener: i) otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias, tales como: tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, lupus, diabetes tipo 1, colagenopatía, psoriasis, colitis ulcerosa, enfermedad hepática crónica, diabetes tipo 2; ii) infección o fiebre desde 7 días antes de la toma de muestra; iii) cáncer o embarazo. Se excluyeron del grupo control a sujetos que refirieron tener: i) enfermedades autoinmunes o inflamatorias, tales como: tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, lupus, diabetes tipo 1, colagenopatía, psoriasis, colitis ulcerosa, enfermedad hepática crónica, diabetes tipo 2; ii) infección o fiebre desde 7 días antes de la toma de muestra; iii) cáncer o embarazo; y a sujetos con resultados positivos (≥ 10 U/ml) de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular, medidos durante el desarrollo de la tesis.

3.2.2. Reclutamiento

Los pacientes con EC se reclutaron gracias al apoyo de la FUPACEL, entidad que aglutina a pacientes celíacos y familiares de estos, y de gastroenterólogos colaboradores del proyecto, durante el periodo 2015-2017. Los controles se reclutaron durante el periodo de estudio.

Se procedió a la toma de muestra en aquellos pacientes y controles que accedieron a participar de manera voluntaria, previa explicación verbal del estudio y su participación en el mismo, se les entregó una hoja informativa (**Anexo 1** para pacientes celíacos y **Anexo 2** para individuos aparentemente sanos), se aclararon las dudas de los mismos y se procedió a la firma de consentimiento informado (**Anexo 3**). Tanto a los pacientes celíacos y controles se les realizó un cuestionario (**Anexo 4** y **5**, respectivamente), a fin de recoger información sobre los criterios de selección.

3.3. Toma de muestra y separación de sueros

Se tomó una muestra de sangre (5-10 mL) a cada participante mediante punción venosa y la muestra se colectó en tubos secos. Para separar el suero, se incubó la muestra 15 min a 37°C, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, se separó el suero y se conservó a – 20 °C hasta el momento del análisis.

3.4. Cuantificación de anticuerpos IgA anti-tTG2

Los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 se determinaron utilizando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) en pacientes celíacos (AESKULISA, Wendelsheim, Alemania) y controles (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Mainz, Alemania), según las instrucciones del fabricante.

Las muestras fueron diluidas empleando el factor de dilución 1:101 recomendado por el fabricante. Aquellas muestras con absorbancias fuera del rango de la curva estándar fueron diluidas de 10 a 60 veces.

Brevemente, se incubaron por duplicado los controles positivos y negativos, estándares y muestras diluidas durante 30 minutos en placas sensibilizadas con transglutaminasa recombinante humana, se lavó, se agregó el anticuerpo de detección, se incubó durante 15 o 30 minutos según la marca del kit, se lavó, se añadió el sustrato, se incubó por 15 o 30 minutos según la marca del kit, se añadió la solución de paro y se incubó por 5 minutos. Se midió la absorbancia a 450-620 nm. Se creó la curva estándar utilizando un ajuste 4-PL y las concentraciones fueron calculadas utilizando el programa www.myassays.com.

Los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 se clasificaron en positivos (> 18 U/mL), indeterminados (12-18 U/mL) y negativos (< 12 U/mL), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.5. Cuantificación de sCD14

Los niveles séricos de sCD14 se determinaron utilizando el ensayo de ELISA (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), según las instrucciones del fabricante. El límite de detección del ensayo fue 125 pg/mL.

Se realizó previamente la estandarización de la dilución de suero óptima a ser utilizada para la detección de sCD14, ya que el kit empleado corresponde al tipo de RUO (Research Use Only). Para este fin se midió la absorbancia de sCD14 en dos muestras de suero a diferentes diluciones (1:200, 1:300, 1:400, 1:600). Se escogió la dilución 1:400, en la cual la absorbancia de ambas muestras se situó en la región lineal media de la curva estándar.

Brevemente, se incubaron por duplicado los estándares y muestras diluidas durante 3 h en placas sensibilizadas con anticuerpo de captura, se lavó, se agregó el anticuerpo de detección, se incubó durante 1 h, se lavó, se añadió el sustrato, se incubó por 30 minutos y se añadió la solución de paro. Se midió la absorbancia a 450-570 nm. Se creó la curva estándar utilizando un ajuste 4-PL y las concentraciones fueron calculadas utilizando el programa www.myassays.com.

3.6. Cuantificación de LBP

Los niveles séricos de LBP se determinaron utilizando el ensayo de ELISA (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), según las instrucciones del fabricante.

Se realizó previamente la estandarización de la dilución de suero óptima a ser utilizada para la detección de LBP, ya que el kit empleado corresponde al tipo de RUO. Para este fin se midió la absorbancia de LBP en dos muestras de suero a diferentes diluciones seriadas (1:100 a 1:12800). Se escogió la dilución 1:1600, en la cual la absorbancia de ambas muestras se situó en la región lineal media de la curva estándar.

Brevemente, se sensibilizaron las placas con anticuerpo de captura durante toda la noche a 4°C, se lavó, se bloquearon los pocillos con solución de albúmina de suero bovina (BSA) en PBS durante 1 h, se lavó, se incubaron por duplicado los estándares y muestras diluidas durante 2 h en las placas sensibilizadas con anticuerpos de captura, se lavó, se agregó el anticuerpo de detección, se incubó durante 2 h, se lavó, se añadió la solución de estreptavidina-HRP, se incubó por 20 minutos. Posteriormente se añadió el sustrato, se incubó por 20 minutos y se añadió la solución de paro. Se midió la absorbancia a 450-570 nm. Se creó la curva estándar utilizando un ajuste 4-PL y las concentraciones fueron calculadas utilizando el programa www.myassays.com.

3.7. Asuntos éticos

Tanto el proyecto marco como el proyecto de tesis fueron aprobados por el Comité Científico y de Ética del IICS-UNA, código N° P06/2014 y el trabajo se realizó teniendo en cuenta los principios éticos de la investigación clínica: respeto a la persona humana, justicia, beneficencia.

Los participantes recibieron una carta informativa del estudio (**Anexo 1** para pacientes celíacos y **Anexo 2** para individuos aparentemente sanos), accedieron a participar voluntariamente y firmaron un consentimiento informado (**Anexo 3**).

Se mantuvo la confidencialidad y el anonimato de los participantes, ya que las muestras y datos colectados fueron codificados y sólo los investigadores responsables contaron con acceso a la base de datos.

Tanto los pacientes como individuos del grupo control se beneficiaron obteniendo un resultado gratuito de anticuerpos IgA anti-tTG2, una de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la EC y para el seguimiento de los pacientes celíacos una vez que inician la dieta libre de gluten.

3.8. Análisis de datos

Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 6.01. Para establecer la distribución de las variables se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los valores de variables continuas de anticuerpos IgA anti-tTG2, sCD14 y LBP se expresaron como mediana y rangos intercuartílicos (IC_{25-75%}). Para establecer si hay diferencias de variables entre 2 grupos se aplicó la prueba U de Mann-Whitney de dos colas y para el cálculo de correlaciones entre pares de variables continuas se utilizó la prueba de Spearman. En todos los análisis se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes e individuos controles participantes del estudio

El presente estudio incluyó a 60 pacientes con EC, con diagnóstico por criterios clínicos, serológicos e histológicos. De ellos, 20 eran pacientes con diagnóstico reciente, sin DLG (no tratados) y 40 eran pacientes con DLG (tratados), con un mínimo de 6 meses de duración de la dieta al momento de la toma de muestra. Los pacientes con DLG se clasificaron según la duración de la dieta haya sido de 0,5 a 1 año (n=6) o mayor a 1 año de duración (n=34) y según los niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 sean negativos (n=25), indeterminados (n=4) o positivos (n=11).

Además, se incluyeron 45 controles, libres de EC, aparentemente sanos, con una dieta normal incluyendo gluten.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes celíacos y controles se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los sujetos de estudio

	Control	EC sin DLG	EC con DLG
Número de participantes	45	20	40
Edad promedio, años ± DE	34,9 ± 12,2	37,0 ± 12,3	34,8 ± 13,1
Sexo, n (%)			
F	34 (75,6)	15 (75,0)	32 (80)
M	11 (24,4)	5 (25,0)	8 (20)
Duración de DLG, n (%)			
0,5 - 1 año	-	-	6 (15)
> 1 año	-	-	34 (85)
Anticuerpos IgA anti-tTG2 (U/mL), n (%)			
< 12 (Negativo)	45 (100)	0	25 (62,5)
12-18 (Indeterminado)	0	0	4 (10,0)
> 18 (Positivo)	0	20 (100)	11 (27,5)

EC, enfermedad celíaca. DLG, dieta libre de gluten. DE, desviación estándar

Edad mínima/máxima: de controles 18/63, de pacientes celíacos sin DLG 19/65 años y de pacientes celíacos con DLG 19/67 años.

Promedio de duración de la DLG: 5,8 años.

Entre los pacientes con DLG de 0,5 a 1 año de duración, 50% (3/6) presentó niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 negativos, 16,7% (1/6) niveles indeterminados y 33,3% (2/6) niveles positivos; entre aquellos con DLG mayor a 1 año, 64,7% (22/34) presentó niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 negativos, 8,8% (3/34) niveles indeterminados y 26,5% (9/34) niveles positivos.

4.2. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin y con DLG

El anticuerpo anti-tTG2 es el marcador serológico más utilizado para el diagnóstico de la EC en personas adultas. No existen datos sobre los niveles de anticuerpos anti-tTG2 en pacientes paraguayos.

En la **Figura 2** se muestra una curva estándar representativa correspondiente al ensayo de ELISA para cuantificar los niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2.

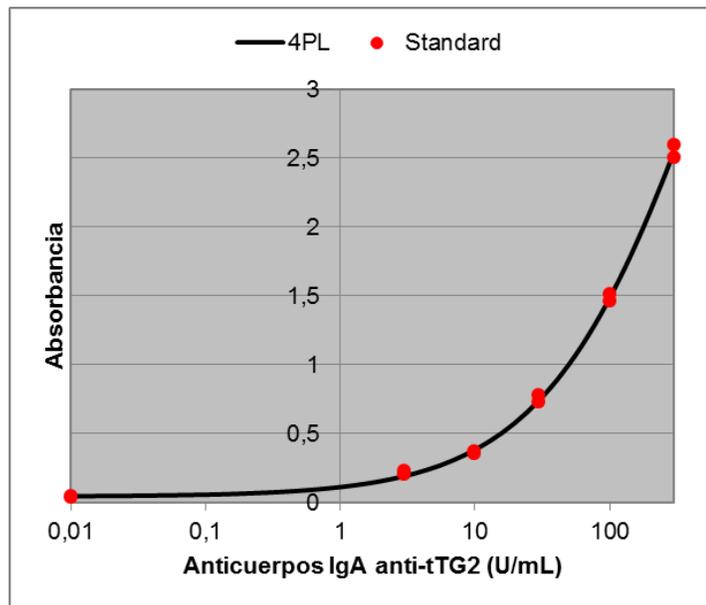


Figura 2. Curva estándar representativa del ensayo de ELISA de anticuerpos IgA anti-tTG2 (Ajuste 4-PL). Se representan los puntos de datos del estándar (puntos rojos) sobre ejes semi-log con los valores de absorbancia medidos vs. las concentraciones especificadas. (En el eje X logarítmico se representan las concentraciones y en el eje Y lineal se muestran las mediciones).

Las medianas ($IC_{25-75\%}$) de los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin y con DLG fueron 3986 (381,9-6606) U/mL y 7,469 (3,272-19,46) U/mL, respectivamente, observándose aumentados en el grupo de pacientes con EC activa (sin DLG) ($p < 0,0001$) (**Figura 3**).

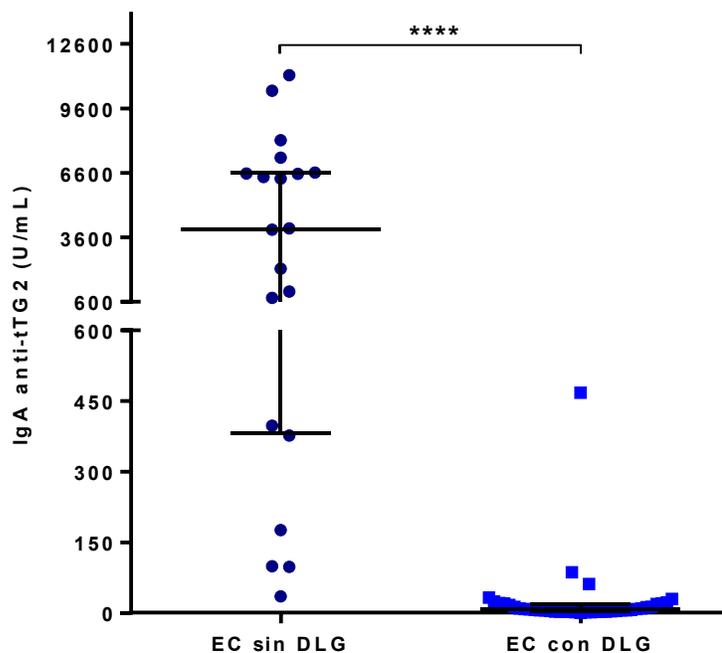


Figura 3. IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG (n=20) y pacientes celíacos con DLG (n=40). Cada punto representa valores individuales. Las líneas horizontales representan la mediana y los rangos intercuartílicos (IC_{25-75%}). Prueba U de Mann-Whitney. ****p<0,0001.

4.2.1. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos según duración de la DLG

Los niveles de anticuerpo anti-tTG2 disminuyen con la DLG (171), por lo que se analizaron los niveles del auto-anticuerpo según la duración de la DLG. Se observaron niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 significativamente elevados en pacientes celíacos sin DLG en comparación con los niveles en pacientes celíacos con DLG de 0,5 a 1 año (p=0,0003), como mayor a 1 año de duración (p<0,0001). No se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 de pacientes con DLG de 0,5 a 1 año de duración en comparación con los que presentaban DLG mayor a 1 año (**Figura 4**).

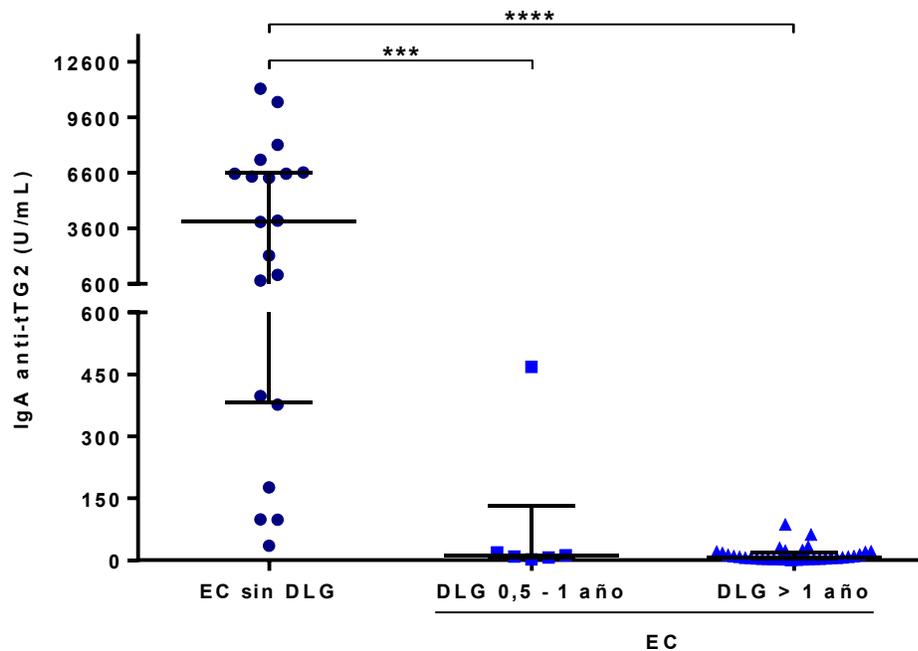


Figura 4. Niveles de IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos según duración de la DLG. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG (n=20), pacientes celíacos con DLG 0,5 - 1 año (n=6) y pacientes celíacos con DLG > 1 año (n=34). Cada punto representa valores individuales. Las líneas horizontales representan la mediana y los rangos intercuartílicos (IC_{25-75%}). Prueba U de Mann-Whitney. ***p=0,0003; ****p<0,0001.

4.2.2. Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 y la duración de la DLG en pacientes celíacos

A su vez, se realizó un análisis de correlación entre los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos y la duración de la DLG. Al aumentar el tiempo de la DLG disminuyeron los niveles de anticuerpos ($r=-0,3221$; $p=0,0427$) (**Figura 5**).

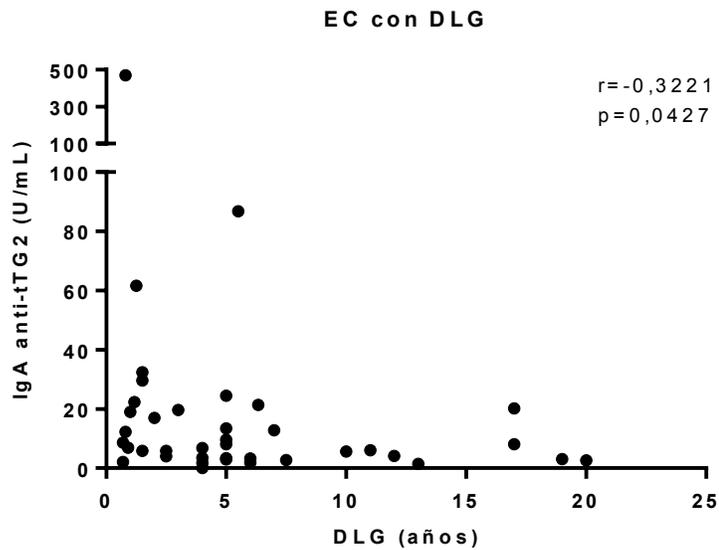


Figura 5. Correlación de IgA anti-tTG2 y duración de la DLG en pacientes celíacos. Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 y la duración de la DLG en pacientes celíacos (n=40). Cada punto representa valores individuales. Prueba de correlación de Spearman. $r = -0,3221$; $p = 0,0427$.

4.3. Niveles séricos de sCD14 en pacientes celíacos sin y con DLG e individuos aparentemente sanos

En la **Figura 6** se muestra una curva estándar representativa correspondiente al ensayo de ELISA para cuantificar sCD14.

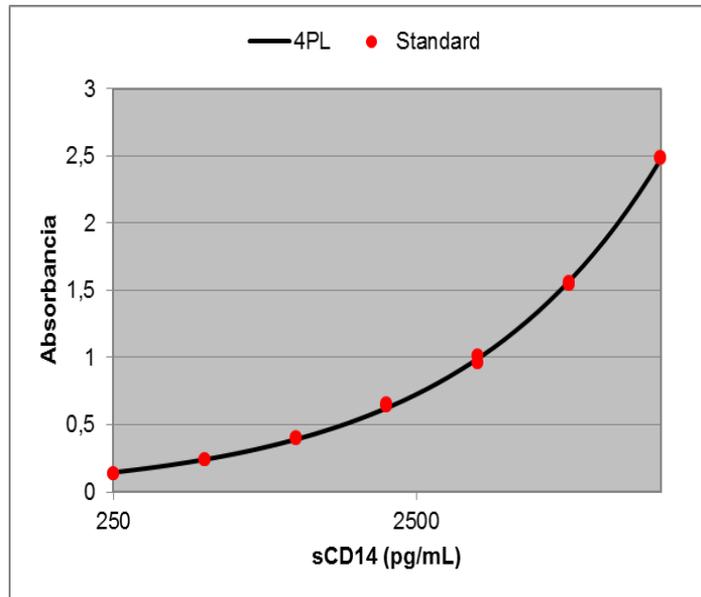


Figura 6. Curva estándar representativa del ensayo de ELISA de sCD14 (Ajuste 4-PL). Se representan los puntos de datos del estándar (puntos rojos) sobre ejes semi-log con los valores de absorbancia medidos vs. las concentraciones especificadas. (En el eje X logarítmico se representan las concentraciones y en el eje Y lineal se muestran las mediciones).

Se determinaron los niveles séricos de sCD14 en las muestras de pacientes celíacos y controles. Las medianas ($IC_{25-75\%}$) de los niveles séricos de sCD14 detectados en el grupo control, en pacientes celíacos sin DLG y en pacientes celíacos con DLG fueron 1573 (1329-1754) ng/mL, 1776 (1489-1902) ng/mL y 1490 (1308-1695) ng/mL, respectivamente (**Figura 7**).

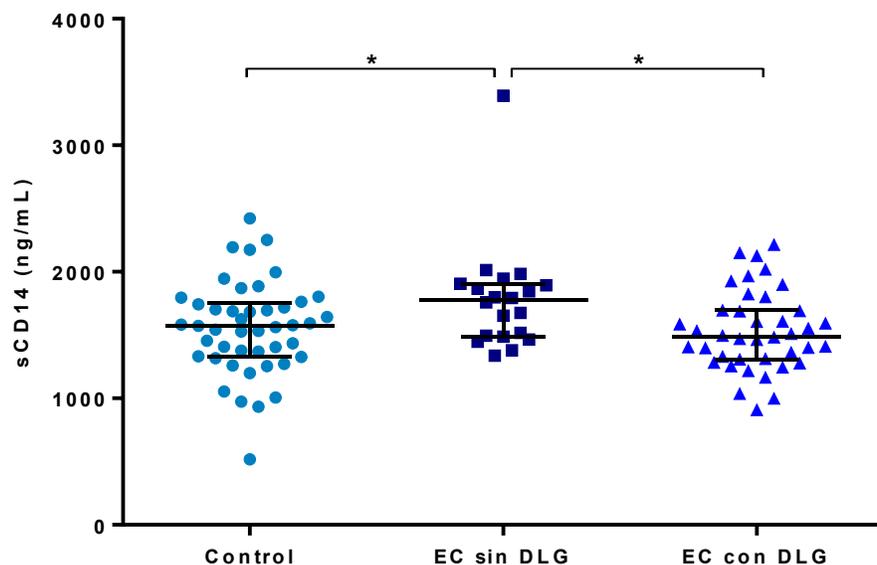


Figura 7. sCD14 en pacientes celíacos e individuos controles. Niveles séricos de sCD14 en controles (n=45), pacientes celíacos sin DLG (n=20) y pacientes celíacos con DLG (n=40). Cada punto representa valores individuales. Las líneas horizontales representan la mediana y los rangos intercuartílicos (IC_{25-75%}). Prueba U de Mann-Whitney. *p=0,0421 entre EC sin DLG y grupo control; *p=0,0168 entre EC sin DLG y EC con DLG.

Se observaron niveles séricos de sCD14 elevados en pacientes celíacos sin DLG respecto al grupo control (p=0,0421). Además, se compararon los niveles séricos de sCD14 de pacientes sin DLG con los de pacientes con DLG. Los pacientes celíacos sin DLG presentaron niveles de sCD14 superiores a los pacientes celíacos con DLG (p=0,0168) (**Figura 7**).

Se compararon los niveles séricos de sCD14 de pacientes celíacos sin DLG y pacientes celíacos con DLG con niveles positivos, indeterminados o negativos para IgA anti-tTG2. Se observó diferencia significativa entre los niveles séricos de sCD14 de pacientes celíacos sin DLG y pacientes celíacos con DLG que presentaron niveles negativos de anticuerpos IgA anti-tTG2 (p=0,0253) (**Figura 8**).

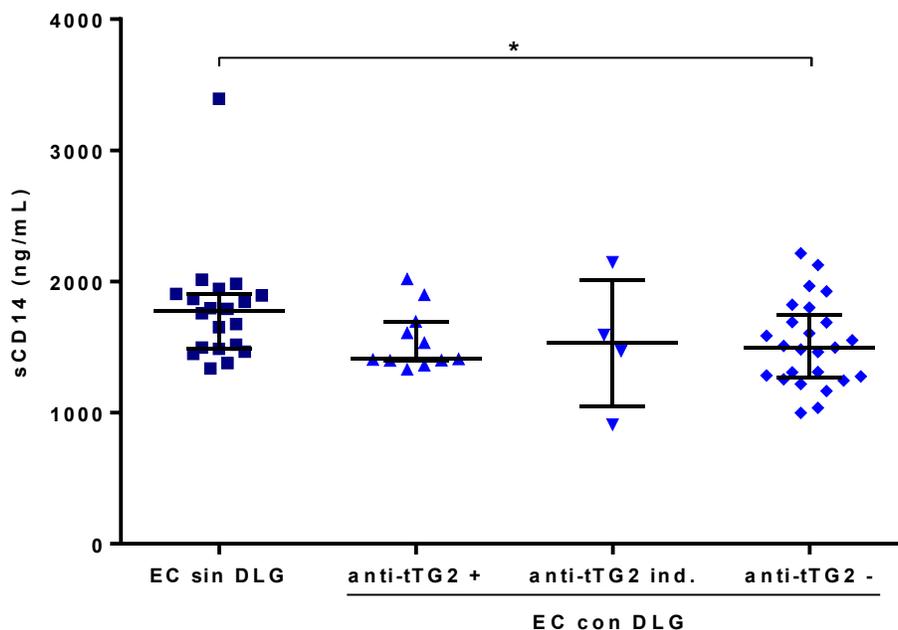


Figura 8. sCD14 en pacientes celíacos según los niveles de IgA anti-tTG2. Niveles séricos de sCD14 en pacientes celíacos sin DLG (n=20), pacientes celíacos con DLG/IgA anti-tTG2 positivo (+), n=11; pacientes celíacos con DLG/IgA anti-tTG2 indeterminado (ind.), n=4 y pacientes celíacos con DLG/IgA anti-tTG2 negativo (-), n=25. Cada punto representa valores individuales. Las líneas horizontales representan la mediana y los rangos intercuartílicos (IC_{25-75%}). Prueba U de Mann-Whitney. *p=0,0253.

A su vez, se analizaron los niveles séricos de sCD14 según el sexo de los pacientes con EC e individuos aparentemente sanos. No se encontró diferencia significativa entre pacientes ni controles del sexo femenino y masculino (datos no mostrados).

4.3.1. Niveles séricos de sCD14 en pacientes celíacos según duración de la DLG

Se analizó el efecto de la duración de la DLG sobre los niveles séricos de sCD14, separando a los pacientes con DLG en dos grupos, ya sea con DLG de 0,5 a 1 año o mayor a 1 año de duración. Se observó diferencia entre los niveles séricos de sCD14 de pacientes

celíacos sin DLG y pacientes celíacos con DLG de 0,5 a 1 año ($p=0,0436$), y entre los niveles séricos de sCD14 de pacientes celíacos sin DLG y pacientes celíacos con DLG > 1 año ($p=0,0333$).

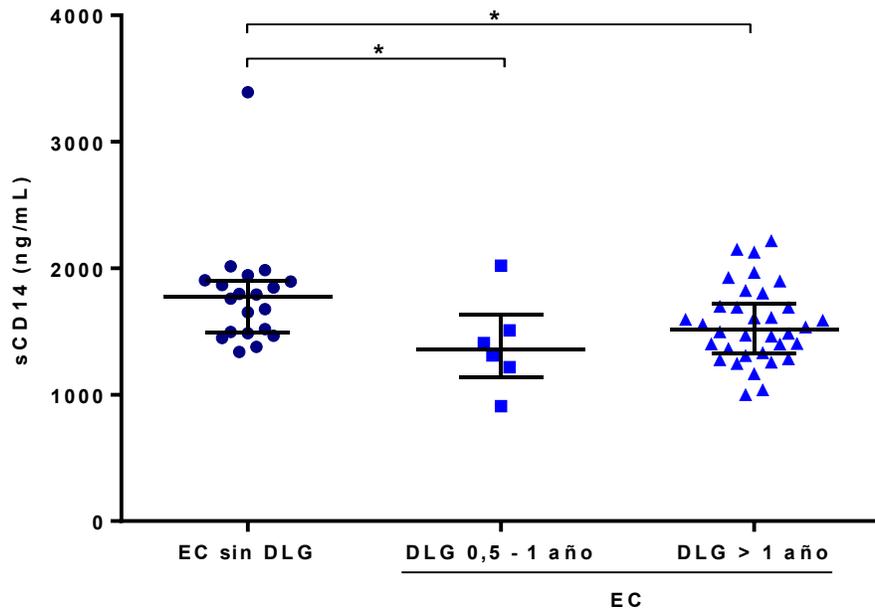


Figura 9. Niveles de sCD14 en pacientes celíacos según duración de la DLG. Niveles séricos de sCD14 en pacientes celíacos sin DLG ($n=20$), pacientes celíacos con DLG 0,5 - 1 año ($n=6$) y pacientes celíacos con DLG > 1 año ($n=34$). Cada punto representa valores individuales. Las líneas horizontales representan la mediana y los rangos intercuartílicos ($IC_{25-75\%}$). Prueba U de Mann-Whitney. $*p=0,0436$ entre EC sin DLG y EC con DLG 0,5 - 1 año; $*p=0,0333$ entre EC sin DLG y EC con DLG > 1 año.

4.3.2. Correlación entre los niveles séricos de sCD14 y los de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos

No se observó correlación significativa entre los niveles séricos de sCD14 y los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2, de pacientes celíacos sin DLG ($r=0,2797$; $p=0,2323$) (Figura 10) ni con DLG ($r=0,09925$; $p=0,5423$) (Figura 11).

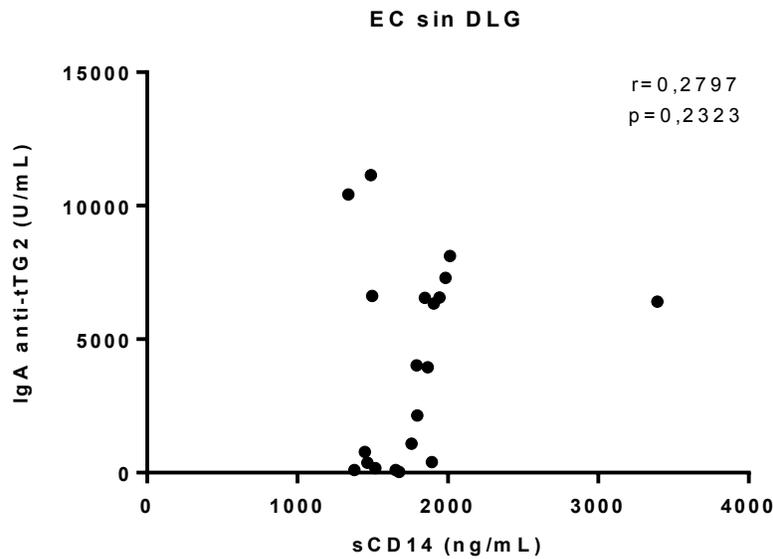


Figura 10. Correlación de sCD14 e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG. Correlación entre los niveles séricos de sCD14 y anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG (n=20). Cada punto representa valores individuales. Prueba de correlación de Spearman. $r=0,2797$; $p=0,2323$.

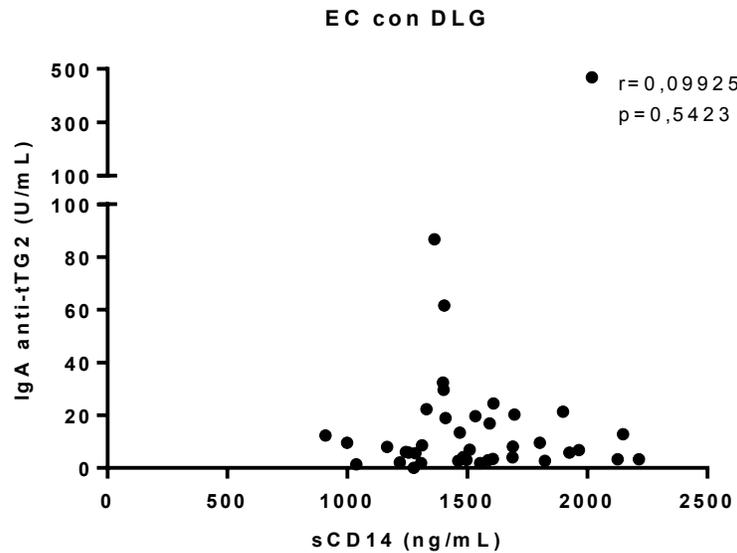


Figura 11. Correlación de sCD14 e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos con DLG. Correlación entre los niveles séricos de sCD14 y anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos con DLG (n=40). Cada punto representa valores individuales. Prueba de correlación de Spearman. $r=0,09925$; $p=0,5423$.

4.3.3. Correlación entre los niveles séricos de sCD14 y la duración de la DLG en pacientes celíacos

No se observó correlación significativa entre los niveles séricos de sCD14 de pacientes celíacos con DLG y la duración de la dieta ($r=-0,2239$; $p=0,1649$) (**Figura 12**).

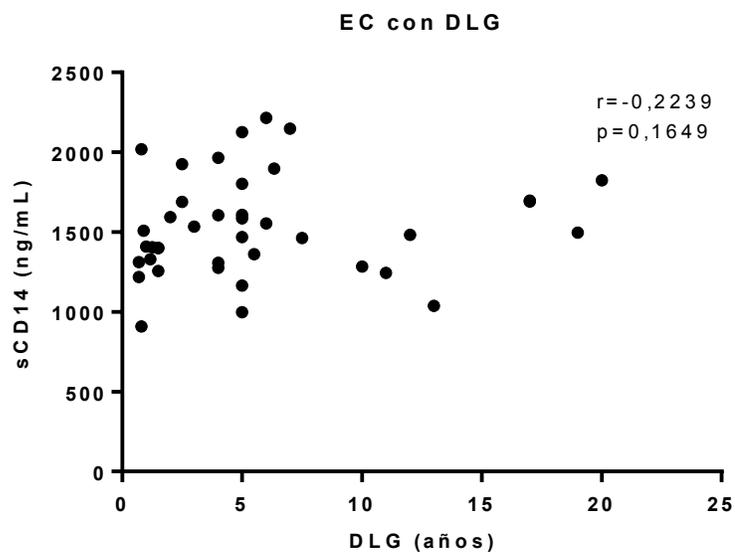


Figura 12. Correlación de sCD14 y duración de la DLG en pacientes celíacos. Correlación entre los niveles séricos de sCD14 y la duración de la DLG en pacientes celíacos ($n=40$). Cada punto representa valores individuales. Prueba de correlación de Spearman. $r=-0,2239$; $p=0,1649$.

4.4. Niveles séricos de LBP en pacientes celíacos sin y con DLG e individuos aparentemente sanos

En la **Figura 13** se muestra una curva estándar representativa correspondiente al ensayo de ELISA para cuantificar LBP.

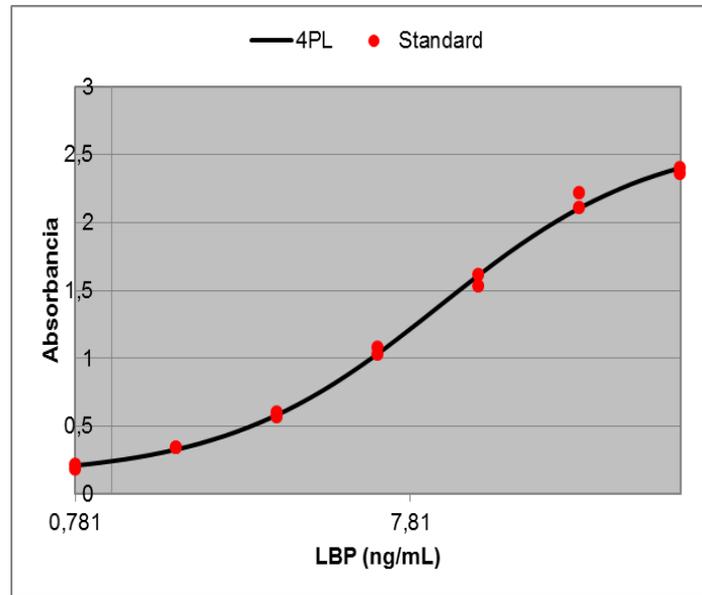


Figura 13. Curva estándar representativa del ensayo de ELISA de LBP (Ajuste 4-PL). Se representan los puntos de datos del estándar (puntos rojos) sobre ejes semi-log con los valores de absorbancia medidos vs. las concentraciones especificadas. (En el eje X logarítmico se representan las concentraciones y en el eje Y lineal se muestran las mediciones).

Se determinaron los niveles séricos de LBP en las muestras de suero de pacientes y controles. Las medianas ($IC_{25-75\%}$) de los niveles séricos de LBP detectados en el grupo control, en pacientes celíacos sin DLG y en pacientes celíacos con DLG fueron 8,320 (7,377-10,93) $\mu\text{g/mL}$, 7,864 (7,053-17,03) $\mu\text{g/mL}$ y 10,45 (7,374-14,55) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Figura 14**).

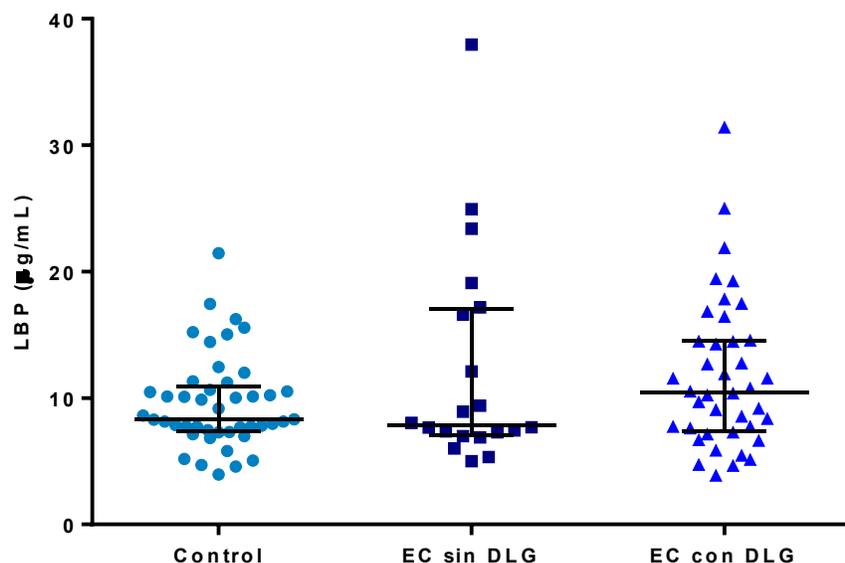


Figura 14. LBP en pacientes celíacos e individuos controles. Niveles séricos de LBP en controles (n=45), pacientes celíacos sin DLG (n=20) y pacientes celíacos con DLG (n=40). Cada punto representa valores individuales. Las líneas horizontales representan la mediana y los rangos intercuartílicos (IC_{25-75%}). Prueba U de Mann-Whitney.

No se observó diferencia significativa entre los niveles de LBP de pacientes celíacos (sin o con DLG) y el grupo control. Además, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los niveles de LBP de pacientes celíacos sin DLG con los de pacientes con DLG (**Figura 14**).

A fin de evaluar si hay diferencias en los niveles de LBP entre los grupos de pacientes celíacos sin DLG y los pacientes celíacos con DLG positivos, indeterminados o negativos para IgA anti-tTG2, se compararon los niveles séricos de LBP en estos grupos. No se observó diferencia significativa de los niveles séricos de LBP entre los pacientes celíacos sin DLG y los pacientes celíacos con DLG positivos, indeterminados o negativos para IgA anti-tTG2 (**Figura 15**).

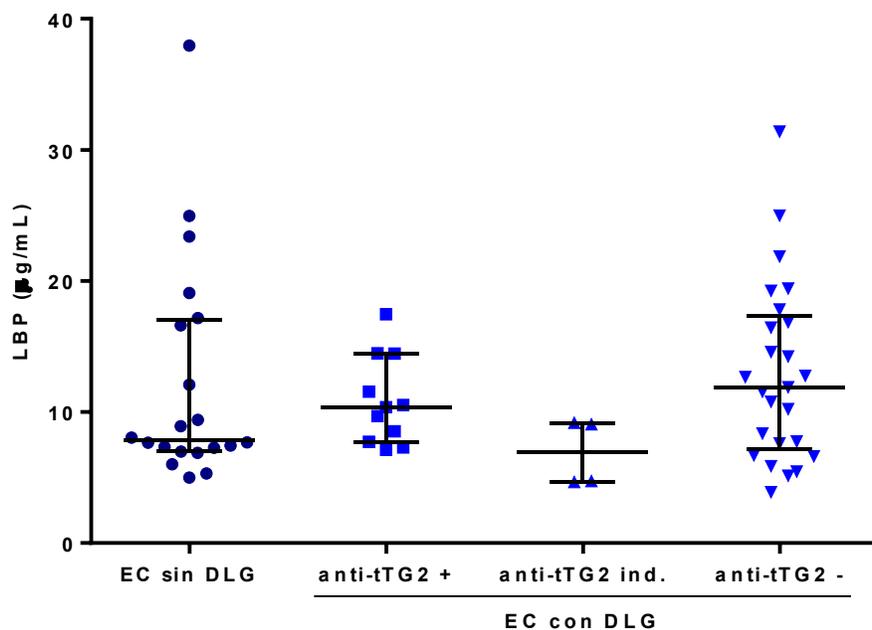


Figura 15. Niveles de LBP en pacientes celíacos según los niveles de IgA anti-tTG2. Niveles séricos de LBP en pacientes celíacos sin DLG (n=20), pacientes celíacos con DLG/IgA anti-tTG2 positivo (+), n=11, pacientes celíacos con DLG/IgA anti-tTG2 indeterminado (ind.), n=4 y pacientes celíacos con DLG/IgA anti-tTG2 negativo (-), n=25. Cada punto representa valores individuales. Las líneas horizontales representan la mediana y los rangos intercuartílicos (IC_{25-75%}). Prueba U de Mann-Whitney.

Además, se analizaron los niveles séricos de LBP según sexo de pacientes con EC e individuos aparentemente sanos. En pacientes sin DLG, se encontró diferencia significativa entre pacientes del sexo femenino y masculino (p=0,0193). Sin embargo, en pacientes con DLG y controles, no se encontró diferencia significativa según el sexo (datos no mostrados).

4.4.1. Correlación entre los niveles séricos de LBP y los de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos

No se observó correlación significativa entre los niveles séricos de LBP y los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 de pacientes celíacos sin DLG ($r=0,1143$; $p=0,6314$) (Figura 16) ni con DLG ($r=-0,04578$; $p=0,7791$) (Figura 17).

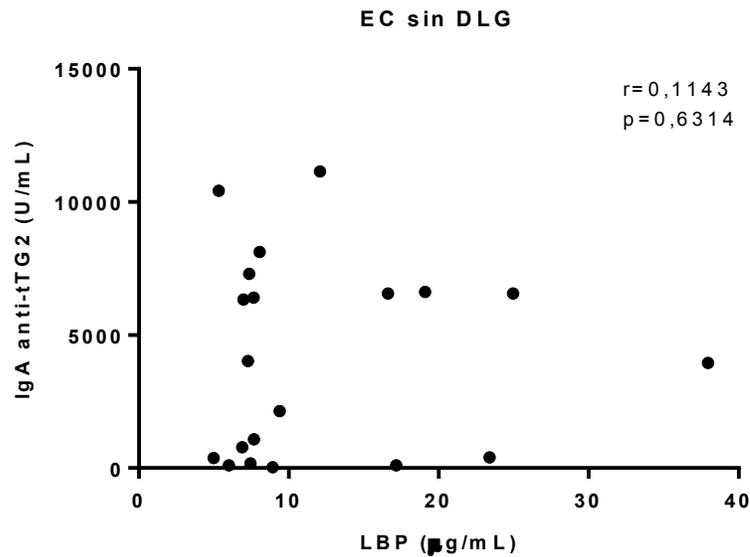


Figura 16. Correlación de LBP e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG. Correlación entre los niveles séricos de LBP y anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos sin DLG ($n=20$). Cada punto representa valores individuales. Prueba de correlación de Spearman. $r=0,1143$; $p=0,6314$.

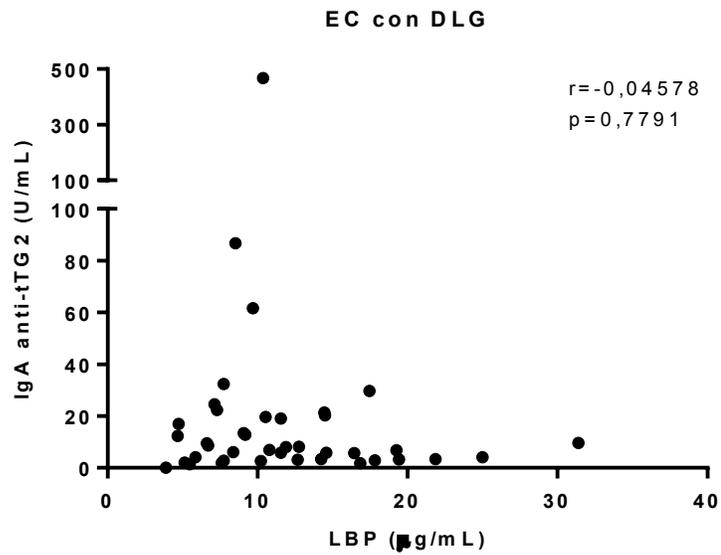


Figura 17. Correlación de LBP e IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos con DLG. Correlación entre los niveles séricos de LBP y anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos con DLG (n=40). Cada punto representa valores individuales. Prueba de correlación de Spearman. $r=-0,04578$; $p=0,7791$.

4.4.2. Correlación entre los niveles séricos de LBP y la duración de la DLG en pacientes celíacos

No se observó correlación significativa entre los niveles séricos de LBP de pacientes celíacos con DLG y la duración de la dieta ($r=0,1372$; $p=0,3987$) (**Figura 18**).

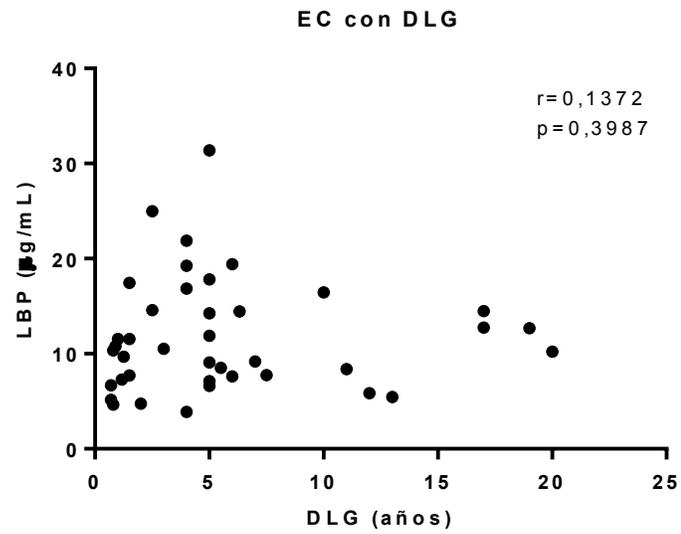


Figura 18. Correlación de LBP y duración de la DLG en pacientes celíacos. Correlación entre los niveles séricos de LBP y la duración de la DLG en pacientes celíacos (n=40). Cada punto representa valores individuales. Prueba de correlación de Spearman. $r=0,1372$; $p=0,3987$.

5. DISCUSIÓN

La enfermedad celíaca es una enteropatía autoinmune donde la respuesta inmune adaptativa participa de manera importante, sin embargo también se observa participación de la respuesta inmune innata.

Las proteínas sCD14 y LBP participan en la respuesta inmune innata y han sido postuladas como marcadores de daño intestinal en varias enfermedades, tales como colitis ulcerosa (95), enfermedad de Crohn (93,95), diabetes tipo 1 (150), Parkinson (146,147), obesidad y síndrome metabólico (139–141), diabetes tipo 2 (140,141,168), cirrosis (135), infección por VIH (85), entre otras.

Al inicio de este trabajo no se encontraba información respecto a estas moléculas en la EC, por lo que se planteó el objetivo de evaluar los niveles séricos de sCD14 y LBP en pacientes con EC activa (sin DLG) y pacientes en tratamiento (con DLG), y generar información sobre estas proteínas relacionadas con la inflamación y el daño intestinal.

5.1. Características de la población

Se estudiaron las muestras de 40 pacientes celíacos con DLG y 20 pacientes celíacos sin DLG (EC activa), que no presentaban ninguna otra enfermedad autoinmune. Este tamaño de muestra no es muy amplio, sin embargo es similar al de otros trabajos en el área de la EC (63,66,68).

Se debe considerar que la prevalencia de la EC es aproximadamente 1% y que se incluyeron en este estudio sólo pacientes adultos con diagnóstico de EC (no se incluyeron niños ni adolescentes). Además, los pacientes reclutados no presentaban otras enfermedades autoinmunes, inflamatorias o infecciosas con el fin que los resultados obtenidos de los niveles séricos de las proteínas inflamatorias sean lo más representativos posibles del estado de las

mismas en la EC. Esto dificultó ampliar el tamaño de muestra, considerando que los pacientes con EC tienen un riesgo incrementado de presentar otras enfermedades autoinmunes (19).

Respecto a la edad de los pacientes incluidos es resaltante que 20% de los pacientes recientemente diagnosticados tenían edades comprendidas entre 50 y 65 años. Esto concuerda con la tendencia creciente del aumento de la incidencia de la EC entre personas de edad avanzada. En la actualidad se considera que puede diagnosticarse a cualquier edad (172) y en medida casi igual en niños y adultos (173).

La proporción mayoritaria de pacientes con EC fue del sexo femenino. Esto podría deberse a que más mujeres que hombres padecen esta enfermedad, como en otros trastornos autoinmunes, siendo en la EC la proporción entre mujeres y hombres 2:1 (17).

5.2. Niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes celíacos

Este es el primer estudio que reporta los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 en pacientes paraguayos con EC. Los pacientes con EC no tratados presentaron mayores niveles de estos anticuerpos que aquellos que realizaban una DLG, en concordancia con estudios realizados en otras poblaciones (48,171,174,175).

Todos los pacientes con EC activa (dieta conteniendo gluten), presentaron niveles positivos de anticuerpos IgA anti-tTG2, a diferencia de otros estudios donde 87% de los pacientes fueron positivos (48,176). Sin embargo, esta diferencia puede deberse al tamaño de la población.

Se observaron niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 significativamente menores en pacientes con DLG de 6 meses a 1 año de duración de la dieta en comparación a pacientes sin DLG, similar a lo observado en otro estudio (177). Los pacientes con DLG de nuestra

población presentaron niveles negativos de anticuerpos en porcentaje menor a otros estudios con un promedio de duración de 1 año de la DLG (55,171).

La persistencia de serología positiva un año después del inicio de la DLG es altamente indicativa de contaminación con gluten en la dieta (178). Sin embargo, no hay un consenso sobre la relación entre los niveles de IgA anti-tTG2 y la adherencia a la DLG. Algunos estudios muestran que los niveles de este auto-anticuerpo se correlacionan con el grado de cumplimiento dietario y funcionan bien para evaluar adherencia a la DLG (42,174,179). Por el contrario, otros muestran que la serología falla en detectar transgresiones dietarias (56,60,180). En este estudio, el cumplimiento dietario se evaluó mediante un cuestionario y todos los pacientes incluidos manifestaron estar en conocimiento de los alimentos certificados libres de gluten por la FUPACEL y cumplir con la dieta. Los pacientes de este estudio con DLG mayor a 1 año con niveles positivos e indeterminados de auto-anticuerpo podrían haber ingerido gluten de forma inadvertida, por ejemplo como contaminación cruzada o presentado niveles persistentes de IgA anti-tTG2 independiente al cumplimiento de la DLG.

Se estudió además la correlación entre los niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 y la duración de la DLG, observándose que los niveles de anticuerpos disminuyen significativamente a medida que aumentan los años de dieta. Este resultado concuerda con lo reportado por Bürgin-Wolff y col. (181).

5.3. CD14 soluble (sCD14) en pacientes celíacos

sCD14 es una molécula de la respuesta inmune innata, y, en colaboración con LBP, presenta LPS al complejo TLR4/MD2 en monocitos/macrófagos y como consecuencia se activan distintas vías de señalización que llevan a la activación de la expresión de genes pro-inflamatorios, entre ellos de citocinas (97).

Al inicio de este trabajo de tesis, no se encontraba información sobre las moléculas sCD14 y LBP en la EC. Durante el desarrollo del mismo se realizaron dos reportes (75,182).

En este estudio se encontraron niveles séricos elevados de sCD14 en pacientes con EC activa en comparación a los niveles en pacientes celíacos con DLG y controles aparentemente sanos. A su vez, no se observó diferencia significativa entre los niveles de sCD14 de pacientes con DLG y controles, similar a lo reportado por (75). Por otro lado, se reportó que pacientes italianos con EC activa no presentan niveles aumentados de sCD14 en comparación a un grupo control (182), argumentando la existencia de un mecanismo efectivo de neutralización de productos microbianos que podrían atravesar la lámina propia, ya sea por anticuerpos IgA o células fagocíticas. La diferencia con lo encontrado en este estudio, podría deberse a que se estudia a una población diferente o que este mecanismo propuesto de defensa del sistema inmune podría ser inadecuado en la mayoría de los pacientes con EC activa de nuestra población.

El incremento de los niveles de sCD14 en pacientes con EC activa podría deberse a la activación de la respuesta inmune sistémica como consecuencia de un aumento de la permeabilidad intestinal y posterior traslocación de bacterias de la luz intestinal a la circulación sanguínea. Esta traslocación microbiana puede conducir a un estado de inflamación sistémica promoviendo el desarrollo de patologías (183,184). En individuos infectados con VIH se observó que la traslocación microbiana aumenta la activación inmune sistémica en respuesta a antígenos bacterianos y se asocia a déficits cognitivos (185). La presencia de LPS de bacterias gram negativas en la circulación induce la secreción de sCD14 por monocitos y macrófagos, así como de LBP por células hepáticas principalmente (84).

Además, sCD14 puede ser secretada directamente por los hepatocitos (112–116) y podría considerarse una proteína de fase aguda (117).

La liberación de sCD14 de células mononucleares también puede ser inducida por otros ligandos del TLR, así como por citocinas inflamatorias tales como IL-6 e IL-1 β (120).

El hallazgo de niveles similares de sCD14 entre pacientes con DLG e individuos aparentemente sanos podría explicarse por el hecho de que una vez iniciada la DLG la inflamación intestinal disminuye gradualmente y se produce la recuperación de la mucosa intestinal (19). Como consecuencia, disminuiría la permeabilidad del intestino y la traslocación de productos bacterianos, disminuyendo así la producción de las moléculas indicadoras de traslocación bacteriana, como sCD14.

Se evaluó si existe diferencia entre los niveles de sCD14 de pacientes celíacos sin DLG y los pacientes celíacos con DLG con niveles positivos, indeterminados o negativos de anticuerpos IgA anti-tTG2. Se encontró diferencia entre pacientes celíacos sin DLG y aquellos con niveles negativos de anticuerpos IgA anti-tTG2. Si bien los niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 son pobres indicadores de la recuperación de la mucosa intestinal (52,55–57), es probable que aquellos pacientes con niveles negativos de autoanticuerpos cumplan mejor con la DLG y por consiguiente presenten menor grado de inflamación a nivel intestinal y baja permeabilidad intestinal. Sin embargo, la seroconversión no implica necesariamente la recuperación del intestino (55,56).

Al analizar el efecto de la duración de la DLG, en vista de que varios pacientes con DLG mayor a 1 año presentaron niveles positivos de anticuerpos, probablemente el cumplimiento dietario de estos pacientes no fue óptimo, lo cual pudo haber repercutido en el

grado de daño intestinal y por ende en la traslocación de productos bacterianos y los niveles de sCD14.

También se estudió la correlación de los niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2 y los niveles de sCD14 en pacientes sin y con DLG, debido a que hasta la fecha la medición de IgA anti-tTG2 se utiliza para el seguimiento de los pacientes (4). No se observó correlación entre ambas moléculas en estos pacientes, lo cual sugiere que evalúan componentes diferentes del proceso inflamatorio.

Correlacionar los niveles de sCD14 con el estado de la mucosa intestinal (linfocitos intraepiteliales, grado de atrofia) de los pacientes es relevante a fin de determinar su potencial utilidad como marcador serológico de daño intestinal. Si bien se contaba con los estudios de anatomía patológica de biopsia de varios de los pacientes con EC activa incluidos en este estudio, se presentó la limitante que las biopsias fueron evaluadas por diferentes patólogos con distintos criterios y clasificaciones histológicas. Para relacionar los niveles de sCD14 con el estado de la mucosa intestinal surge la necesidad que los análisis histológicos sean informados con un sistema normalizado como la clasificación Marsh, el cual se encuentra poco implementado en el país.

En base a los resultados obtenidos, los niveles de sCD14 podrían estar relacionados con la actividad de la EC. Esta información sirve de base para realizar estudios posteriores, ya que debería confirmarse en una cohorte mayor de pacientes con EC activa.

5.4. Proteína de unión a LPS (LBP) en pacientes celíacos

LBP es una proteína de fase aguda, que participa en la respuesta inmune innata, transfiriendo el LPS al complejo TLR4/MD-2 (97). A pesar de ser una proteína de fase aguda, los niveles séricos de LBP no estuvieron elevados significativamente en los pacientes con EC. Sin embargo, este resultado es similar a lo observado con otras proteínas de fase aguda en la EC, como la proteína C reactiva y la proteína amiloide A sérica, que tampoco se encuentran elevadas (62).

No se observó diferencia significativa de los niveles séricos de LBP entre pacientes con EC activa y el grupo control, en concordancia con lo reportado recientemente por Uhde y col. (182).

Existe una disparidad en el comportamiento de LBP en la inflamación crónica inducida por LPS (150). Esto podría deberse al comportamiento dual de LBP frente a la exposición al LPS, donde concentraciones bajas de LBP estimulan la activación inducida por LPS de las células mononucleares y un aumento de la concentración de LBP neutraliza el LPS durante la exposición aguda e inhibe la activación celular a fin de atenuar sus efectos (186).

En nuestro estudio, una exposición crónica moderada al LPS explicaría por qué los niveles de LBP no se encuentran aumentados en la mayoría de los pacientes con EC activa. Este hecho podría confirmarse a través de la medición en suero de los niveles de LPS.

Al evaluar si existe diferencia entre los niveles de LBP de pacientes celíacos sin DLG y los pacientes celíacos con DLG no se encontró diferencia significativa, sugiriendo que los niveles de LBP en la EC no se relacionan con la actividad de la enfermedad.

5.5. Consideraciones finales

Este es el primer estudio sobre los niveles de anticuerpos anti-tTG2 en pacientes celíacos de la población paraguaya y uno de los primeros que evalúa el estado de las moléculas sCD14 y LBP en la EC.

Este trabajo sugiere que los pacientes con EC activa presentan niveles de sCD14 aumentados con respecto a pacientes con EC no activa o controles aparentemente sanos.

Los niveles de anticuerpos IgA anti-tTG2, medidos normalmente para evaluar la respuesta al tratamiento durante el seguimiento de la DLG en la EC, no se correlacionan con la recuperación de la mucosa intestinal (52,55–57). Se han estudiado potenciales marcadores de daño intestinal medibles de forma no invasiva, principalmente en suero, que permitan evaluar el estado de la mucosa intestinal (62–64,69–71,75,82,83). Sin embargo, aún faltan procedimientos validados que permitan la implementación de los mismos. Por lo tanto, se presenta la necesidad de nuevos marcadores de daño intestinal de la EC que puedan ser evaluados de manera no invasiva.

Los datos obtenidos sobre los niveles de sCD14 y LBP en este estudio contribuyen como base para estudios futuros que evalúen el posible uso de estas proteínas inflamatorias, como marcadores de inflamación y daño a nivel intestinal. Adicionalmente, estos datos permiten aumentar el conocimiento existente sobre la EC y moléculas de la respuesta inmune innata.

5.6. Proyecciones

Una de las fortalezas de este estudio es que los sueros de los individuos reclutados fueron preservados por congelamiento permitiendo la creación de una seroteca de pacientes

celiacos sin y con DLG, que no presentan otra enfermedad autoinmune. A partir de esto podrán realizarse estudios adicionales para ampliar los conocimientos referentes a la EC.

Como proyección de este estudio, se considera correlacionar los niveles de sCD14 con niveles de citocinas inflamatorias, así como también realizar la medición de la molécula sCD14 a nivel intestinal, sitio donde ocurre la inflamación en la EC, a fin de comparar con los hallazgos encontrados en la periferia.

6. CONCLUSIONES

- Pacientes con EC activa presentan niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 elevados respecto a los niveles de pacientes celíacos con DLG. Este es el primer reporte de los niveles de IgA anti-tTG2 en pacientes paraguayos. Se observó una correlación significativa inversa entre los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2 y la duración de la DLG.
- La molécula sCD14 se encontró elevada en el suero de pacientes con EC activa respecto a los pacientes con DLG e individuos aparentemente sanos. Además, no se observó diferencia entre los niveles séricos de sCD14 de pacientes con DLG e individuos aparentemente sanos.
- No se observó correlación entre los niveles séricos de sCD14 con los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2. Tampoco se observó correlación entre los niveles séricos de sCD14 y la duración de la DLG.
- No se observó diferencia significativa entre los niveles séricos de LBP de pacientes celíacos no tratados, pacientes celíacos con DLG e individuos aparentemente sanos.
- No se observó correlación entre los niveles séricos de LBP con los niveles séricos de anticuerpos IgA anti-tTG2. Tampoco se observó correlación entre los niveles séricos de LBP y la duración de la DLG.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013;62(1):43–52.
2. Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*. 2012;18(42):6036–59.
3. Trigoni E, Tsirogianni A, Pipi E, Mantzaris G, Papasteriades C. Celiac disease in adult patients: specific autoantibodies in the diagnosis, monitoring, and screening. *Autoimmune Dis*. 2014;2014:623514.
4. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ, et al. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut*. 2014;63:1210–28.
5. West J, Logan RFA, Hill PG, Lloyd A, Lewis S, Hubbard R, et al. Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut*. 2003;52(7):960–5.
6. Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med*. 2003;348(25):2517–24.
7. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*. 2003;163(3):286–92.
8. Katz KD, Rashtak S, Lahr BD, Melton LJ 3rd, Krause PK, Maggi K, et al. Screening for celiac disease in a North American population: sequential serology and gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(7):1333–9.
9. Tatar G, Elsurer R, Simsek H, Balaban YH, Hascelik G, Ozcebe OI, et al. Screening of

tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors for celiac disease screening in the turkish population. *Dig Dis Sci.* 2004;49(9):1479–84.

10. Hovell CJ, Collett JA, Vautier G, Cheng AJ, Sutanto E, Mallon DF, et al. High prevalence of coeliac disease in a population-based study from Western Australia: a case for screening? *Med J Aust.* 2001;175(5):247–50.
11. Cook HB, Burt MJ, Collett JA, Whitehead MR, Frampton CM, Chapman BA. Adult coeliac disease: prevalence and clinical significance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(9):1032–6.
12. Alarida K, Harown J, Ahmaida A, Marinelli L, Venturini C, Kodermaz G, et al. Coeliac disease in Libyan children: a screening study based on the rapid determination of anti-transglutaminase antibodies. *Dig Liver Dis.* 2011;43(9):688–91.
13. Shahbazkhani B, Malekzadeh R, Sotoudeh M, Moghadam K, Farhadi M, Ansari R, et al. High prevalence of coeliac disease in apparently healthy Iranian blood donors. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15(5):475–8.
14. Sood A, Midha V, Sood N, Malhotra V. Adult celiac disease in northern India. *Indian J Gastroenterol.* 2003;22(4):124–6.
15. Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, La Motta G, De Barrio S, et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: Screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(9):2700–4.
16. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJP, Carvalho FO, Bordin JO, et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19(1):43–9.

17. Murray JA, Van Dyke C, Plevak MF, Dierkhising RA, Zinsmeister AR, Melton LJ. Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2003;1(1):19–27.
18. Real Delor RE, Arza G, Chamorro ME, Dalles I, Ibarra Douglas A. Coeliac disease in Paraguay. *Rev Nac*. 2011;3(2):7–15.
19. Fasano A, Catassi C. Celiac Disease. *N Engl J Med*. 2012;367(25):2419–26.
20. Green PHR, Cellier C. Celiac Disease. *N Engl J Med*. 2007;357:1731–43.
21. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10:13.
22. Kneepkens CMF, Von Blomberg BME. Clinical practice: Coeliac disease. *Eur J Pediatr*. 2012;171(7):1011–21.
23. Kupfer SS, Jabri B. Pathophysiology of Celiac Disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2012;22(4):639–60.
24. Koning F. Celiac disease: Quantity matters. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):541–9.
25. Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Celiac Disease: An Immunological Jigsaw. *Immunity*. 2012;36(6):907–19.
26. Sollid L, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*. 1989;169:345–50.
27. Husby S, Murray JA. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(11):655–63.
28. Herrera M, Theiler G, Augustovski F, Chertkoff L, Fainboim L, DeRosa S, et al.

- Molecular characterization of HLA class II genes in celiac disease patients of Latin American caucasian origin. *Tissue Antigens*. 1994;43(2):83–7.
29. Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, et al. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45(2):187–93.
 30. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2012;209(13):2395–408.
 31. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(12):858–70.
 32. Green PHR, Lebwohl B, Greywoode R. Celiac disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1099–106.
 33. Pagliari D, Urgesi R, Frosali S, Riccioni ME, Newton EE, Landolfi R, et al. The Interaction among Microbiota, Immunity, and Genetic and Dietary Factors Is the Condicio Sine Qua Non Celiac Disease Can Develop. *J Immunol Res*. 2015;2015:123653.
 34. Sziksz E, Pap D, Veres G, Fekete A, Tulassay T, Vannay Á. Involvement of heat shock proteins in gluten-sensitive enteropathy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(21):6495–503.
 35. Mazzarella G. Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(24):7349–56.
 36. Kelly C, Bai J, Edwin L, Leffler D. Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1175–86.
 37. Malamut G, Cellier C. Refractory celiac disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*.

- 2014;8(3):323–8.
38. Rubio-Tapia A, Murray JA. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut*. 2010;59(4):547–57.
 39. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. American College of Gastroenterology Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656–77.
 40. Schuppan D, Zimmer KP. The diagnosis and treatment of celiac disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(49):835–46.
 41. Kurppa K, Räsänen T, Collin P, Iltanen S, Huhtala H, Ashorn M, et al. Endomysial antibodies predict celiac disease irrespective of the titers or clinical presentation. *World J Gastroenterol*. 2012;18(20):2511–6.
 42. Fabiani E, Catassi C. The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of coeliac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(6):659–65.
 43. Donaldson MR, Book LS, Leiferman KM, Zone JJ, Neuhausen SL. Strongly Positive Tissue Transglutaminase Antibodies are Associated With Marsh 3 Histopathology in Adult and Pediatric Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42(3):256–60.
 44. Rahmati A, Shakeri R, Sohrabi M, Alipour A, Boghratian A, Setareh M, et al. Correlation of tissue transglutaminase antibody with duodenal histologic marsh grading. *Middle East J Dig Dis*. 2014;6(3):131–6.
 45. Donaldson MR, Firth SD, Wimpee H, Leiferman KM, Zone JJ, Horsley W, et al. Correlation of Duodenal Histology With Tissue Transglutaminase and Endomysial

- Antibody Levels in Pediatric Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5(5):567–73.
46. Dahlbom I, Korponay Szabó IR, Kovács JB, Szalai Z, Mäki M, Hansson T. Prediction of clinical and mucosal severity of coeliac disease and dermatitis herpetiformis by quantification of IgA/IgG serum antibodies to tissue transglutaminase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;50(2):140–6.
 47. Husby S, Koletzko S, Korponay Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(1):136–60.
 48. Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA. Comparative Usefulness of Deamidated Gliadin Antibodies in the Diagnosis of Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(4):426–32.
 49. Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, Korponay Szabó I, Sommer R, Schreier E, et al. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17(1):85–91.
 50. Hopper AD, Cross SS, Hurlstone DP, McAlindon ME, Lobo AJ, Hadjivassiliou M, et al. Pre-endoscopy serological testing for coeliac disease: evaluation of a clinical decision tool. *BMJ.* 2007;334(7596):729.
 51. Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. Reliance on serum endomysial antibody testing underestimates the true prevalence of coeliac disease by one fifth. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:181–3.
 52. Sharkey LM, Corbett G, Currie E, Lee J, Sweeney N, Woodward JM. Optimising

- delivery of care in coeliac disease - comparison of the benefits of repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38(10):1278–91.
53. Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines on Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47(2):121–6.
 54. Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. Disappearance of endomysial antibodies in treated celiac disease does not indicate histological recovery. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(3):712–4.
 55. Lanzini A, Lanzarotto F, Villanacci V, Mora A, Bertolazzi S, Turini D, et al. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29(12):1299–308.
 56. Kaukinen K, Sulkanen S, Mäki M, Collin P. IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002;14(3):311–5.
 57. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM. Lack of usefulness of anti-transglutaminase antibodies in assessing histologic recovery after gluten-free diet in celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2003;37(5):387–91.
 58. De Chaisemartin L, Meatchi T, Malamut G, Fernani-Oukil F, Hosking F, Rault D, et al. Application of deamidated gliadin antibodies in the follow-up of treated celiac disease. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136745.
 59. Volta U, Granito A, Fiorini E, Parisi C, Piscaglia M, Pappas G, et al. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci.* 2008;53(6):1582–8.

60. Vahedi K, Mascart F, Mary JY, Laberrenne JE, Bouhnik Y, Morin MC, et al. Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(5):1079–87.
61. Pekki H, Kurppa K, Mäki M, Huhtala H, Sievänen H, Laurila K, et al. Predictors and Significance of Incomplete Mucosal Recovery in Celiac Disease After 1 Year on a Gluten-Free Diet. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(7):1078–85.
62. Daly A, Walsh C, Feighery C, O’Shea U, Jackson J, Whelan A. Serum levels of soluble CD163 correlate with the inflammatory process in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24(3):553–9.
63. Bottasso Arias NM, García M, Bondar C, Guzman L, Redondo A, Chopita N, et al. Expression pattern of fatty acid binding proteins in celiac disease enteropathy. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:738563.
64. Adriaanse MP, Tack GJ, Passos VL, Damoiseaux JG, Schreurs MW, van Wijck K, et al. Serum I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(4):482–90.
65. Björck S, Lindehammer SR, Fex M, Agardh D. Serum cytokine pattern in young children with screening detected coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2015;179(2):230–5.
66. Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, Konikkara J, Naiyer AJ, Lee AR, et al. Serum cytokine elevations in celiac disease: Association with disease presentation. *Hum Immunol*. 2010;71(1):50–7.
67. Romaldini CC, Barbieri D, Okay TS, Raiz R, Cançado ELR. Serum soluble interleukin-

- 2 receptor, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha levels in children with celiac disease: response to treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;35(4):513–7.
68. Tack GJ, van Wanrooij RLJ, von Blomberg BME, Amini H, Coupe VMH, Bonnet P, et al. Serum parameters in the spectrum of coeliac disease: beyond standard antibody testing - a cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:159.
69. McMillan SA, Dickey W, Douglas JP, Hughes DF. Transthyretin values correlate with mucosal recovery in patients with coeliac disease taking a gluten free diet. *J Clin Pathol.* 2001;54(10):783–6.
70. Bondar C, Araya RE, Guzman L, Rua EC, Chopita N, Chirido FG. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PLoS One.* 2014;9(2):e89068.
71. Marafini I, Di Sabatino A, Zorzi F, Monteleone I, Sedda S, Cupi ML, et al. Serum regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of mucosal enteropathies. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(8):974–81.
72. Moss S, Attia L, Scholes J, Walters J, Holt P. Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut.* 1996;39(6):811–7.
73. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R, Muzi P, D'Alò S, Ventura T, et al. Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(4):494–503.
74. Diosdado B, van Oort E, Wijmenga C. “Coelionomics”: towards understanding the molecular pathology of coeliac disease. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(7):685–95.
75. Hoffmanová I, Sánchez D, Hábová V, Anděl M, Tučková L, Tlaskalová Hogenová H. Serological markers of enterocyte damage and apoptosis in patients with celiac disease,

- autoimmune diabetes mellitus and diabetes mellitus type 2. *Physiol Res*. 2014;64(4):537–46.
76. Crenn P, Vahedi K, Lavergne Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1210–9.
77. Relja B, Szermutzky M, Henrich D, Maier M, de Haan JJ, Lubbers T, et al. Intestinal-FABP and liver-FABP: Novel markers for severe abdominal injury. *Acad Emerg Med*. 2010;17(7):729–35.
78. Thuijls G, Derikx JPM, van Wijck K, Zimmermann LJI, Degraeuwe PL, Mulder TL, et al. Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis. *Ann Surg*. 2010;251(6):1174–80.
79. Reisinger KW, Derikx JP, Thuijls G, van der Zee DC, Brouwers HA, van Bijnen AA, et al. Noninvasive measurement of intestinal epithelial damage at time of refeeding can predict clinical outcome after necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*. 2013;73(2):209–13.
80. Sundberg AGM, Nilsson R, Appelkvist EL, Dallner G. Immunohistochemical Localization of α and ϕ Class Glutathione Transferases in Normal Human Tissues. *Pharmacol Toxicol*. 1993;72(4–5):321–31.
81. McMonagle MP, Halpenny M, McCarthy A, Mortell A, Manning F, Kilty C, et al. Alpha glutathione S-transferase: a potential marker of ischemia-reperfusion injury of the intestine after cardiac surgery? *J Pediatr Surg*. 2006;41(9):1526–31.
82. Vreugdenhil AC, Wolters VM, Adriaanse MP, Van den Neucker AM, van Bijnen AA, Houwen R, et al. Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46(12):1435–41.

83. Derikx JPM, Vreugdenhil ACE, Van den Neucker AM, Grootjans J, van Bijnen AA, Damoiseaux JGMC, et al. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(8):727–33.
84. Brenchley JM, Douek DC. Microbial Translocation Across the GI Tract. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:149–73.
85. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12(12):1365–71.
86. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn’s disease and their relatives: A possible etiologic factor. *Ann Intern Med.* 1986;105(6):883–5.
87. Gardiner KR, Halliday MI, Barclay GR, Milne L, Brown D, Stephens S, et al. Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1995;36(6):897–901.
88. Abu-Shanab A, Quigley EM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(12):691–701.
89. Hurley JC. Endotoxemia: Methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(2):268–92.
90. Braun JP, Buhner S, Kastrup M, Dietz E, Langer K, Dohmen PM, et al. Barrier function of the gut and multiple organ dysfunction after cardiac surgery. *J Int Med Res.* 2007;35(1):72–83.
91. Sun XQ, Fu XB, Zhang R, Lu Y, Deng Q, Jiang XG, et al. Relationship between

- plasma D(-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World J Gastroenterol.* 2001;7(4):555–8.
92. Assadian A, Assadian O, Senekowitsch C, Rotter R, Bahrami S, Fürst W, et al. Plasma D-Lactate as a Potential Early Marker for Colon Ischaemia After Open Aortic Reconstruction. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;31(5):470–4.
93. Lakatos PL, Kiss LS, Palatka K, Altorjay I, Antal-Szalmas P, Palyu E, et al. Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(3):767–77.
94. Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, Ignatz-Hoover J, et al. Circulating CD4+ and CD8+ T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology.* 2013;140(1):87–97.
95. Pastor Rojo Ó, López San Román A, Albéniz Arbizu E, de la Hera Martínez A, Ripoll Sevillano E, Albillos Martínez A. Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(3):269–77.
96. Severance EG, Gressitt KL, Stallings CR, Origoni AE, Khushalani S, Leweke FM, et al. Discordant patterns of bacterial translocation markers and implications for innate immune imbalances in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2013;148(0):130–7.
97. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373–84.
98. Akashi-Takamura S, Miyake K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(4):420–5.

99. Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013;45(12):e66.
100. Savva A, Roger T. Targeting Toll-like receptors: Promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol*. 2013;4:387.
101. Murad S. Toll-like receptor 4 in inflammation and angiogenesis: A double-edged sword. *Front Immunol*. 2014;5:313.
102. Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence*. 2014;5(1):213–8.
103. Buchholz BM, Bauer AJ. Membrane TLR signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22(3):232–45.
104. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191–5.
105. Ding PH, Jin LJ. The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity: A revisit and its relevance to oral/periodontal health. *J Periodontal Res*. 2014;49(1):1–9.
106. Bazil V, Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol*. 1991;147(5):1567–74.
107. Durieux J, Vita N, Popescu O, Guette F, Calzada Wack J, Munker R, et al. The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: Characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol*. 1994;24(9):2006–12.
108. Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M, Hess S, Krüger C, Stelter F, et al. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from

- human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol.* 1995;25(2):604–10.
109. Stelter F, Pfister M, Bernheiden M, Jack RS, Bufler P, Engelmann H, et al. The myeloid differentiation antigen CD14 is N- and O-glycosylated. Contribution of N-linked glycosylation to different soluble CD14 isoforms. *Eur J Biochem.* 1996;236(2):457–64.
 110. Zaroni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:32.
 111. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990;249(4975):1431–3.
 112. Matsuura K, Ishida T, Setoguchi M, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S. Upregulation of mouse CD14 expression in Kupffer cells by lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1994;179:1671–6.
 113. Fearn C, Kravchenko V V, Ulevitch RJ, Loskutoff DJ. Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1995;181:857–66.
 114. Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Liu K, Geller DA, et al. Expression of CD14 by hepatocytes: Upregulation by cytokines during endotoxemia. *Infect Immun.* 1998;66(11):5089–98.
 115. Su GL, Dorko K, Strom SC, Nüssler AK, Wang SC. CD14 expression and production by human hepatocytes. *J Hepatol.* 1999;31(3):435–42.
 116. Pan Z, Zhou L, Hetherington CJ, Zhang DE. Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(46):36430–5.

117. Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol.* 2004;172(7):4470–9.
118. Arias MA, Rey Nores JE, Vita N, Stelter F, Borysiewicz LK, Ferrara P, et al. Cutting edge: human B cell function is regulated by interaction with soluble CD14: opposite effects on IgG1 and IgE production. *J Immunol.* 2000;164:3480–6.
119. Rey Nores JE, Bensussan A, Vita N, Stelter F, Arias MA, Jones M, et al. Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function. *Eur J Immunol.* 1999;29(1):265–76.
120. Shive CL, Jiang W, Anthony DD, Lederman MM. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS.* 2015;29(10):1263–5.
121. Lequier LL, Nikaidoh H, Leonard SR, Bokovoy JL, White ML, Scannon PJ, et al. Preoperative and postoperative endotoxemia in children with congenital heart disease. *Chest.* 2000;117:1706–12.
122. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood.* 2001;98(13):3800–8.
123. Grunwald U, Krüger C, Westermann J, Lukowsky A, Ehlers M, Schütt C. An enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of solubilized CD14 in biological fluids. *J Immunol Methods.* 1992;155(2):225–32.
124. Wurfel BMM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein Is Carried on Lipoproteins and Acts as a Cofactor in the Neutralization of LPS. *J Exp Med.* 1994;180(3):1025–35.

125. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res.* 2005;11(4):225–9.
126. Schütt C, Schilling T, Krüger C. sCD14 prevents endotoxin inducible oxidative burst response of human monocytes. *Allerg Immunol.* 1991;37(3–4):159–64.
127. Schutt C, Schilling T, Grunwald U, Schönfeld W, Krüger C. Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. *Res Immunol.* 1992;143(1):71–8.
128. Haziot A, Rong GW, Bazil V, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble CD14 inhibits LPS-induced tumor necrosis factor-alpha production by cells in whole blood. *J Immunol.* 1994;152(12):5868–76.
129. Haziot A, Rong GW, Lin XY, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *J Immunol.* 1995;154(12):6529–32.
130. Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(7):2744–8.
131. Haziot A, Rong GW, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble {CD14} mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1993;151(3):1500–7.
132. Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O’Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest.* 2001;108(3):485–93.
133. Gaïni S, Koldkjaer OG, Pedersen C, Pedersen SS. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections

- and sepsis: a prospective study. *Crit Care*. 2006;10(2):R53.
134. Blairon L, Wittebole X, Laterre PF. Lipopolysaccharide-binding protein serum levels in patients with severe sepsis due to gram-positive and fungal infections. *J Infect Dis*. 2003;187(2):287–91.
 135. Albillos A, de la Hera A, González M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology*. 2003;37(1):208–17.
 136. Lepper PM, Schumann C, Triantafilou K, Rasche FM, Schuster T, Frank H, et al. Association of Lipopolysaccharide-Binding Protein and Coronary Artery Disease in Men. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(1):25–31.
 137. Lepper PM, Kleber ME, Grammer TB, Hoffmann K, Dietz S, Winkelmann BR, et al. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) is associated with total and cardiovascular mortality in individuals with or without stable coronary artery disease - results from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC). *Atherosclerosis*. 2011;219(1):291–7.
 138. Serrano M, Moreno-Navarrete JM, Puig J, Moreno M, Guerra E, Ortega F, et al. Serum lipopolysaccharide-binding protein as a marker of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;230(2):223–7.
 139. Gonzalez-Quintela A, Alonso M, Campos J, Vizcaino L, Loidi L, Gude F. Determinants of Serum Concentrations of Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) in the Adult Population: The Role of Obesity. *PLoS One*. 2013;8(1):e54600.
 140. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serino M, Luche E, Waget A, Pardo G, et al. Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related

- insulin resistance. *Int J Obes*. 2012;36(11):1442–9.
141. Sun L, Yu Z, Ye X, Zou S, Li H, Yu D, et al. A Marker of Endotoxemia Is Associated With Obesity and Related Metabolic. *Diabetes Care*. 2010;33(9):1925–32.
 142. Frazier TH, Dibaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enter Nutr*. 2011;35(5 Suppl):14S–20S.
 143. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher f M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(3):E740-7.
 144. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761–72.
 145. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470–81.
 146. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson’s disease. *PLoS One*. 2011;6(12):e28032.
 147. Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, et al. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson’s disease. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142164.
 148. Kumar NP, Anuradha R, Andrade BB, Suresh N, Ganesh R, Shankar J, et al.

- Circulating biomarkers of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in children. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(5):704–11.
149. Anuradha R, George PJ, Kumar NP, Fay MP, Kumaraswami V, Nutman TB, et al. Circulating microbial products and acute phase proteins as markers of pathogenesis in lymphatic filarial disease. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002749.
150. Aravindhavan V, Mohan V, Arunkumar N, Sandhya S, Babu S. Chronic endotoxemia in subjects with type-1 diabetes is seen much before the onset of microvascular complications. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137618.
151. Nockher WA, Wick M, Pfister HW. Cerebrospinal fluid levels of soluble CD14 in inflammatory and non-inflammatory diseases of the CNS: Upregulation during bacterial infections and viral meningitis. *J Neuroimmunol.* 1999;101(2):161–9.
152. Glück T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res.* 2001;6(8):351–8.
153. Lin B, Noring R, Steere AC, Klempner MS, Hu LT. Soluble CD14 levels in the serum, synovial fluid, and cerebrospinal fluid of patients with various stages of Lyme disease. *J Infect Dis.* 2000;181(3):1185–8.
154. Jirillo E, Amati L, Caradonna L, Greco B, Cozzolongo R, Cuppone R, et al. Soluble (s) CD14 and plasmatic lipopolysaccharides (LPS) in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon (IFN)-alpha. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1998;20(1):1–14.
155. Mammaev S, Lukina E, Lugovskaia S, Levina A, Shul'pekova I, Pochtar' M, et al. [Cytokine production in patients with chronic viral hepatitis C during treatment with

- interferon-alpha]. *Klin Lab Diagn.* 2001;8:45–8.
156. Nockher WA, Bergmann L, Scherberich JE. Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 1994;98(3):369–74.
 157. Kruger C, Schütt C, Obertacke U, Joka T, Müller F, Knöller J, et al. Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol.* 1991;85(2):297–301.
 158. Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology.* 2011;141(4):1220–30.
 159. Zambuzi FA, Cardoso-Silva PM, Espindola MS, Soares LS, Galvao-Lima LJ, Brauer VS, et al. Identification of promising plasma immune biomarkers to differentiate active pulmonary tuberculosis. *Cytokine.* 2016;88:99–107.
 160. Feruglio SL, Trøseid M, Damås JK, Kvale D, Dyrhol-Riise AM. Soluble Markers of the Toll-Like Receptor 4 Pathway Differentiate between Active and Latent Tuberculosis and Are Associated with Treatment Responses. *PLoS One.* 2013;8(7):e69896.
 161. Lawn SD, Labeta MO, Arias M, Acheampong JW, Griffin GE. Elevated serum concentrations of soluble CD14 in HIV- and HIV+ patients with tuberculosis in Africa: Prolonged elevation during anti-tuberculosis treatment. *Clin Exp Immunol.* 2000;120(3):483–7.
 162. Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJ, Buurman WA, van Deutekom H, Speelman P, et al. Serum concentrations of lipopolysaccharide activity-modulating proteins during tuberculosis. *J Infect Dis.* 1998;178(6):1839–42.

163. Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dörner T. Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2000;9(8):614–21.
164. Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 1994;96(1):15–9.
165. Yu S, Nakashima N, Xu BH, Matsuda T, Izumihara A, Sunahara N, et al. Pathological significance of elevated soluble CD14 production in rheumatoid arthritis: In the presence of soluble CD14, lipopolysaccharides at low concentrations activate RA synovial fibroblasts. *Rheumatol Int*. 1998;17(6):237–43.
166. Takeshita S, Nakatani K, Tsujimoto H, Kawamura Y, Kawase H, Sekine I. Increased levels of circulating soluble CD14 in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(2):376–81.
167. Brettschneider J, Ecker D, Bitsch A, Bahner D, Bogumil T, Dressel A, et al. The macrophage activity marker sCD14 is increased in patients with multiple sclerosis and upregulated by interferon beta-1b. *J Neuroimmunol*. 2002;133(1–2):193–7.
168. Mo H, Liu S, Zhou Z, Tang W, Yan X, Huang G, et al. [Change of serum soluble CD14 level in newly diagnosed Type 2 diabetes and its significance]. *J Cent South Univ (Med Sci)*. 2010;35(7):699–705.
169. Fernández-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, López-Bermejo A, Ricart W. CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1780–4.
170. Amar J, Ruidavets JB, Bal Dit Sollier C, Bongard V, Boccalon H, Chamontin B, et al.

- Soluble CD14 and aortic stiffness in a population-based study. *J Hypertens.* 2003;21(10):1869–77.
171. Midhagen G, Åberg AK, Olcén P, Järnerot G, Valdimarsson T, Dahlbom I, et al. Antibody levels in adult patients with coeliac disease during gluten-free diet: A rapid initial decrease of clinical importance. *J Intern Med.* 2004;256(6):519–24.
172. Rashtak S, Murray JA. Celiac Disease in the Elderly. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009;38(3):433–46.
173. Reilly NR, Green PHR. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Semin Immunopathol.* 2012;34(4):473–8.
174. Bazzigaluppi E, Roggero P, Parma B, Brambillasca MF, Meroni F, Mora S, et al. Antibodies to recombinant human tissue-transglutaminase in coeliac disease: Diagnostic effectiveness and decline pattern after gluten-free diet. *Dig Liver Dis.* 2006;38(2):98–102.
175. Lichtwark IT, Newnham ED, Robinson SR, Shepherd SJ, Hosking P, Gibson PR, et al. Cognitive impairment in coeliac disease improves on a gluten- free diet and correlates with histological and serological indices of disease severity. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(2):160–70.
176. Weitz V JC, Montalva D R, Alarcón O T, Contreras M L. Determinación de anticuerpos anti-transglutaminasa en el diagnóstico de enfermedad celíaca. *Rev Med Chil.* 2003;131(1):31–6.
177. Nachman F, Sugai E, Vázquez H, González A, Andrenacci P, Niveloni S, et al. Serological tests for celiac disease as indicators of long-term compliance with the gluten-free diet. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(6):473–80.

178. Abdulkarim AS, Burgart LJ, See J, Murray JA. Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systematic approach. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(8):2016–21.
179. Dipper CR, Maitra S, Thomas R, Lamb CA, McLean-Tooke APC, Ward R, et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies in the follow-up of adult coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(3):236–44.
180. Leffler DA, Edwards George JB, Dennis M, Cook EF, Schuppan D, Kelly CP. A prospective comparative study of five measures of gluten-free diet adherence in adults with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(9):1227–35.
181. Bürgin-Wolff A, Dahlbom I, Hadziselimovic F, Petersson CJ. Antibodies against human tissue transglutaminase and endomysium in diagnosing and monitoring coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(6):685–91.
182. Uhde M, Ajamian M, Caio G, De Giorgio R, Indart A, Green PH, et al. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut*. 2016;0:1–8.
183. Pal GD, Shaikh M, Forsyth CB, Ouyang B, Keshavarzian A, Shannon KM. Abnormal lipopolysaccharide binding protein as marker of gastrointestinal inflammation in Parkinson disease. *Front Neurosci*. 2015;9:306.
184. Kelesidis T, Kendall MA, Yang OO, Hodis HN, Currier JS. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: Association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2012;206(10):1558–67.
185. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(9):655–66.
186. Gutschmann T, Müller M, Carroll SF, Mackenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual Role of

Lipopolysaccharide (LPS) - Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells. *Infect Immun.* 2001;69(11):6942–50.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1

HOJA INFORMATIVA

Título del proyecto: “Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”

Propósito: Este trabajo busca describir si las proteínas inflamatorias proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) y CD14 soluble (sCD14) están relacionadas con la enfermedad celíaca.

Antecedentes: La enfermedad celíaca cursa con inflamación en el intestino si se consume gluten, el cual está presente en todos los alimentos que incluyan en su preparación harinas derivadas de trigo y otros cereales. Las proteínas LBP y sCD14 que están presentes en la sangre y en el intestino, pueden favorecer la inflamación en varias enfermedades.

Procedimientos: Se tomará una muestra de sangre de una vena del brazo (5-10 mL) y se medirán los niveles de LBP, sCD14 y anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular. En caso de tener la posibilidad técnica se medirán además otras proteínas de la inflamación relacionadas con la enfermedad celíaca: las citocinas inflamatorias y proteínas de fase aguda.

Beneficios: Si Ud. opta por participar en el estudio se le dará el resultado gratuito de la prueba de IgA anti-transglutaminasa tisular (prueba de control de la enfermedad celíaca) en un plazo de 10-20 días. La medición de las proteínas LBP, sCD14, citocinas y proteínas de fase aguda se realizará con fines de investigación y no afectan el curso ni el tratamiento de la enfermedad celíaca; si Ud. lo solicita se le entregará los resultados de estas pruebas.

Además, su participación ayudará a generar mayor conocimiento sobre la inflamación en la enfermedad celíaca.

Riesgos: No existen riesgos y la molestia es mínima para la toma de muestra de sangre venosa.

Confidencialidad: La identidad de cada participante será confidencial y su nombre no aparecerá en ningún reporte de este estudio. Todos los datos y resultados del estudio serán confidenciales y no serán dados a conocer a ninguna otra persona que no sean los investigadores de este proyecto. Toda la información se procesará en forma de códigos y será almacenada en una computadora con acceso restringido a investigadores de este estudio.

Alternativas: Ud. puede optar por no participar en este estudio en cualquier momento sin que esto afecte el proceso rutinario de su atención en la comunidad.

Si decide participar: Su muestra será almacenada durante 5 años en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, sólo para la realización de estudios referentes a la enfermedad celíaca. En caso de que éstas sean usadas en futuras investigaciones, se solicitará nuevamente autorización, si no es posible obtenerla directamente de los pacientes, debe ser del Comité de ética.

A quien contactar: Para cualquier duda o problema relacionado con el estudio, Ud. puede contactar al Dpto. de Inmunología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, teléfono (0981)342399, con la BC. Silvia Ferreira, la Dra. Patricia Langjahr o la Dra. Vivian Giménez, de lunes a viernes, de 7:30 a 13 hs.

8.2. Anexo 2

HOJA INFORMATIVA

Grupo control

Título del proyecto: “Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”

Propósito: Este trabajo busca describir si las proteínas inflamatorias proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) y CD14 soluble (sCD14) están relacionadas con la enfermedad celíaca.

Antecedentes: La enfermedad celíaca cursa con inflamación en el intestino si se consume gluten, el cual está presente en todos los alimentos que incluyan en su preparación harinas derivadas de trigo y otros cereales. Las proteínas LBP y sCD14 que están presentes en la sangre y en el intestino, pueden favorecer la inflamación en varias enfermedades.

Para que este estudio sea útil, es necesario comparar los resultados de los pacientes celíacos con los obtenidos con un grupo de personas que no tengan este tipo de enfermedad.

Procedimientos: Se tomará una muestra de sangre de una vena del brazo (5-10 mL) y se medirán los niveles de LBP, sCD14 y anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular. En caso de tener la posibilidad técnica se medirán además otras proteínas de la inflamación relacionadas con la enfermedad celíaca: las citocinas inflamatorias y proteínas de fase aguda.

Beneficios: Si Ud. opta por participar en el estudio se le dará el resultado gratuito de la prueba de IgA anti-transglutaminasa tisular (prueba de control de la enfermedad celíaca). Este será entregado en un plazo de 10-20 días. La medición de las proteínas LBP, sCD14, citocinas y proteínas de fase aguda se realizará con fines de investigación y no afectan el curso ni el tratamiento de la enfermedad celíaca; si Ud. lo solicita se le entregará los resultados de estas pruebas.

Además, su participación ayudará a generar mayor conocimiento sobre la inflamación en la enfermedad celíaca.

Riesgos: No existen riesgos y la molestia es mínima para la toma de muestra de sangre venosa.

Confidencialidad: La identidad de cada participante será confidencial y su nombre no aparecerá en ningún reporte de este estudio. Todos los datos y resultados del estudio serán confidenciales y no serán dados a conocer a ninguna otra persona que no sean los investigadores de este proyecto. Toda la información se procesará en forma de códigos y será almacenada en una computadora con acceso restringido a investigadores de este estudio.

Alternativas: Ud. puede optar por no participar en este estudio en cualquier momento sin que esto afecte el proceso rutinario de su atención en la comunidad.

Si decide participar: Su muestra será almacenada durante 5 años en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, sólo para la realización de estudios referentes a la enfermedad celíaca. En caso de que éstas sean usadas en futuras investigaciones, se solicitará nuevamente su autorización, si no es posible obtenerla directamente, debe ser del Comité de ética.

A quien contactar: Para cualquier duda o problema relacionado con el estudio, Ud. puede contactar al Dpto. de Inmunología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, teléfono (0981)342399, con la BC. Silvia Ferreira, la Dra. Patricia Langjahr o la Dra. Vivian Giménez, de lunes a viernes, de 7:30 a 13 hs.

8.3. Anexo 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: “Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”

Yo(Nombres/s y Apellidos/s)

He leído la hoja de información que me ha entregado y he podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el procedimiento, sus beneficios y riesgos.

Comprendo que mi muestra será almacenada y mis datos personales serán resguardados.

He respondido un cuestionario.

He hablado con.....(Nombre del investigador)

CI N°

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones

Doy libremente mi conformidad para participar en la investigación: SI NO

Fecha...../...../.....Firma del participante.....CI N°

Datos de contacto del participante para nuevo consentimiento

.....
.....
.....

8.4. Anexo 4

CUESTIONARIO

Título del proyecto: “Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”

IMPORTANTE: Toda la información contenida en este cuestionario es estrictamente confidencial y su uso es exclusivo para el propósito de este proyecto.

Preguntas sobre los criterios de inclusión:

• **Edad:**

• **¿Fue diagnosticado con Enfermedad Celíaca por su médico?:**

1=___Sí

2=___No

Si respondió “Sí”, responda las siguientes preguntas:

• **¿Sigue una dieta libre de gluten?**

1=___Sí*

2=___No

*Especifique duración de la dieta: 1=___Menos de 6 meses 2=___Más de 6 meses

*¿Está en conocimiento de los alimentos certificados libres de gluten?: 1=___Sí 2=___No

*¿Cumple estrictamente con la dieta?: 1=___Sí 2=___No

Preguntas sobre los criterios de exclusión:

• **¿Presenta enfermedad autoinmune o inflamatoria crónica como Artritis reumatoide, Lupus, Enfermedad de Crohn u otras, diferente a la enfermedad celíaca?**

1=___Sí (Especifique enfermedad(es): _____)

2=___No

• **¿Presenta enfermedad crónica del hígado?**

1=___Sí

2=___No

• **¿Presenta o presentó infección o fiebre en los últimos 7 días?**

1=___Sí

2=___No

Datos del paciente

Nombres y apellidos: _____

Sexo: 1=___Femenino 2=___Masculino

Teléfono de contacto: _____

Código: _____

Resultados

Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular:

LBP:

sCD14:

8.5. Anexo 5

CUESTIONARIO

Grupo control

Título del proyecto: “Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”

IMPORTANTE: Toda la información contenida en este cuestionario es estrictamente confidencial y su uso es exclusivo para el propósito de este proyecto.

Preguntas sobre los criterios de inclusión:

- Edad:

Preguntas sobre los criterios de exclusión:

- ¿Presenta alguna enfermedad inflamatoria o autoinmune, tales como enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, lupus?

1= ___ Sí (Especifique enfermedad(es): _____)

2= ___ No

- ¿Presenta o presentó infección o fiebre en los últimos 7 días?

1= ___ Sí

2= ___ No

Datos del paciente

Nombres y apellidos: _____

Sexo: 1= ___ Femenino 2= ___ Masculino

Teléfono de contacto: _____

Código: _____

Resultados

Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular:

LBP:

sCD14: