

DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA: ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDOS DE SINTESIS DE GLIADINA Y ANTI-TRANSGLUTAMINASA DE TEJIDO

MARIA V. PIAGGIO^{1,2}, ANA M. DEMONTE¹, GUILLERMO SIHUFE¹, SILVIA GARCILAZO¹,
MARIA C. ESPER¹, MARTA WAGENER², MABEL ALEANZI¹

¹ Cátedra de Bioquímica Básica, INTEBIO, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe; ² Servicio de Gastroenterología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Santa Fe

Resumen Los marcadores serológicos comúnmente utilizados en el diagnóstico de la enfermedad celíaca son los anticuerpos antigliadina (AG) y antiendomiso (AE). Recientemente (1997) se identificó a la transglutaminasa de tejido (tTG) como el principal autoantígeno de los anticuerpos AE. El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de tests de ELISA desarrollados en base a la utilización de estructuras moleculares definidas como antígenos de captura para los anticuerpos AG y AE. Como antígenos inmovilizados para los anticuerpos AG se ensayaron tres péptidos de síntesis correspondientes a la región amino terminal de la alfa gliadina y para los AE, la transglutaminasa de hígado de cobayo. Se examinaron un total de 80 sueros correspondientes a: pacientes celíacos, no tratados y tratados, controles enfermos no celíacos y controles sanos. Rango de edad: 7 meses a 14 años. Se obtuvo una sensibilidad del 97% y una especificidad 86% para la IgG determinada utilizando como antígeno uno de los tres péptidos de síntesis (correspondiente a los residuos 31-55 de la alfa gliadina). Este péptido aparece como un antígeno altamente sensible y más específico que la gliadina. El mejor resultado, con un 100% de especificidad y sensibilidad, se obtuvo en la determinación de la IgA anti-tTG, lo que destaca la relevancia de estos anticuerpos como marcadores serológicos de la enfermedad celíaca.

Abstract *Serological diagnosis of celiac disease: anti-gliadin peptide antibodies and tissue anti-transglutaminase.* Serological markers currently used for the diagnosis of celiac disease are anti-gliadin (AG) and anti-endomysium (AE) antibodies. Recently tissue transglutaminase (tTG) was identified as the specific autoantigen for endomysial antibodies. The aim of this work was to determine sensitivity and specificity of ELISA tests developed by using defined molecular structures as capture antigen for AG and AE antibodies. Three synthetic peptides, from the amino terminal region of alpha gliadin, were used as immobilized antigens for AG, and the transglutaminase from guinea pig liver for AE. A total of 80 sera from celiac patients, non celiac disease controls and healthy controls were examined. Age range was 7 months to 14 years. A sensitivity of 97% and a specificity of 86% was obtained for IgG determined by using as antigen one of the three synthetic peptides (corresponding to residues 31-55 of alpha gliadin). Therefore, this peptide appears as a highly sensitive antigen and more specific than gliadin. The best result, showing 100% of sensitivity and specificity, was obtained for IgA anti-tTG, thus pointing out the relevance of these antibodies as serological markers for celiac disease.

Key words: celiac disease, diagnosis, antibodies, gliadin synthetic peptides, transglutaminase

La enfermedad celíaca es una enteropatía que se desencadena en individuos genéticamente susceptibles, por la ingestión de prolaminas (proteínas etanol solubles) de trigo, cebada, centeno y avena.

El diagnóstico confirmatorio de la enfermedad se basa en la biopsia del intestino delgado^{1,2}. Los ensayos serológicos, que se utilizan conjuntamente para su diagnóstico y seguimiento, son la determinación de anticuerpos de clase IgG e IgA antigliadina (AG) e IgA antiendomiso (AE).

Los anticuerpos antigliadina se determinan corrientemente por ensayos de ELISA con equipos de diagnóstico comerciales o de preparación propia utilizándose en todos los casos como antígeno de captura la fracción total de gliadinas (prolaminas de trigo).

Existen distintos datos publicados de sensibilidad y especificidad de los anticuerpos AG^{3,4,5,6}. Para la IgG AG el rango de sensibilidad oscila entre 73 y 100%, con un valor promedio del 95%, y el rango de especificidad es de 50-100%, con un promedio del 70%. Para la IgA AG, el rango de sensibilidad es 61-100% con un promedio del 88% y el de la especificidad es de 83 al 100% con un promedio del 92%.

Los datos publicados^{4,7,5} sobre anticuerpos AE de clase IgA, coinciden en asignarles una elevada especificidad.

Recibido: 12-II-1999

Aceptado: 11-VIII-1999

Dirección postal: Dra. Mabel Aleanzi, Facultad de Bioquímica, Universidad Nacional del Litoral, Paraje El Pozo, CC 242, 3000 Santa Fe, Argentina

Fax: (54-0342)457-5218

E-mail: maleanzi@fbc.unl.edu.ar

cidad, cercana al 100% y una sensibilidad mayor al 90%. Estos anticuerpos han sido tradicionalmente determinados por ensayo inmunohistoquímico, sobre cortes de esófago de mono o más recientemente de cordón umbilical humano. La naturaleza de la o las moléculas responsables de esta respuesta y su función en la patología eran desconocidas. En 1997, Dieterich et al.⁸ lograron identificar a la transglutaminasa (tTG) de tejido como el autoantígeno blanco principal de estos anticuerpos. En ese mismo trabajo, utilizando tTG de cobayo como antígeno de captura, determinaron por test de ELISA, una total correlación entre los resultados de los anticuerpos AE y los antitransglutaminasa.

Es de gran interés encontrar marcadores serológicos altamente sensibles y específicos que puedan utilizarse como prueba diagnóstica de referencia. Con este fin se estudió la respuesta a tres péptidos de síntesis de la región amino terminal de la alfa gliadina para su utilización como antígenos de captura más específicos en la determinación de los anticuerpos AG. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos anti-tTG, utilizando como antígeno la tTG de cobayo.

Las determinaciones de anticuerpos se efectuaron por test de ELISA, sobre un panel de sueros de 80 niños en diferentes situaciones clínicas.

Materiales y métodos

Péptidos de síntesis

Selección de las secuencias. Se ensayaron tres péptidos denominados G-1, G-2 y G-3 cuyas secuencias se superponen parcialmente con los residuos 1-55 de la región amino terminal de la alfa gliadina

G-1 (1-19)	VRVPVQLQPQNPSQQQPQ
G-2 (11-30)	QNPSQQQPQEQLVPLVQQQF
G-3 (31-55)	LGQQQFPFPQYPQPFPSPQPY

Los criterios para su selección fueron: a) La toxicidad demostrada de péptidos aislados de gliadina o sintetizados correspondientes a esta región de la alfa gliadina⁹; b) Su elevado contenido en glutaminas y prolina conjuntamente con la presencia de los motivos estructurales QQQP y PSQQ, cuya posición se subraya en el texto¹⁰; c) Su probable antigenicidad, en base a estudios estructurales experimentales y de modelado, los que predicen un elevado contenido de giros beta en la secuencia¹¹; d) la baja probabilidad de homología con otras proteínas no tóxicas¹².

Síntesis: los péptidos seleccionados fueron sintetizados por Peptidogenic (USA). La pureza de los mismos analizada por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) fue mayor del 95%.

Panel de sueros

Se constituyó en base a los siguientes grupos de pacientes: 1) Celíacos no tratados: N = 30. 2) Celíacos en tratamiento: N

= 10. De estos pacientes, cuatro cumplen una estricta dieta libre de gluten y seis se sospecha, por observación clínica, que cometen transgresiones. 3) pacientes no celíacos con patologías relacionadas (desnutrición primaria con enteropatía ambiental, diarrea crónica inespecífica, parasitosis, intolerancia a la leche de vaca): N = 15. 4) controles sanos: N = 25. Rango de edad: 7 meses a 14 años, valor promedio 2.5 años. Sexo: celíacos 60% F y 40% M. Otros grupos: 50% F/M.

Los sueros se conservaron a -20 °C, y se descongelaron dos o tres veces para su procesamiento.

Criterios de diagnóstico

El diagnóstico de confirmación de la enfermedad se basó en: 1. Evaluación clínica. 2. Exámenes de laboratorio: de rutina, para evaluar función de absorción-excreción y anticuerpos IgG e IgA AG. 3. Biopsia positiva: enteropatía grado III o IV siguiendo los criterios de Marsh¹⁰ y las pautas del Comité de Gastroenterología de la SAP². 4. Evolución favorable con dieta libre de gluten.

Tests de ELISA

Determinación de anticuerpos AG frente a fracción completa y frente a péptidos de gliadina. Las placas fueron incubadas dos horas a 37 °C y una noche a 4 °C con 100 µl de la solución del antígeno correspondiente (gliadina o péptido) en carbonato/bicarbonato 0.1 M pH 9.5. Los sueros fueron diluidos 1/100 en solución de PBS-Tween-albúmina bovina. Los respectivos conjugados (anti-inmunoglobulina G, γ-específico o anti-IgA, α-específico, conjugados a peroxidasa) se diluyeron en la misma solución que los sueros. Como sustratos se utilizaron TMB (tetrametilbencidina) y agua oxigenada. La reacción de color se detuvo con ácido sulfúrico 2 N y las absorbancias se leyeron a 450 nm.

Determinación de anticuerpos A-tTG. Se siguió el protocolo de Dieterich et al.⁸ utilizando como antígeno transglutaminasa de cobayo (Sigma). Las placas fueron incubadas con 100 µl de una solución que contenía 1 µg de transglutaminasa en PBS (buffer de fosfato salino, pH 7.4), durante 2 horas a 37 °C. Los sitios residuales fueron bloqueados con una solución de PBS-albúmina bovina al 1%, a 4°C durante toda la noche.

Los sueros fueron diluidos 1/100 en solución de PBS-Tween-albúmina, e incubados una hora a 37°C. Los lavados entre cada etapa se realizaron con PBS-Tween al 0.1%. Para el revelado el conjugado anti-IgA humana, específico de cadena α marcado con peroxidasa se dejó reaccionar durante una hora. La reacción de color se desarrolló según lo descrito anteriormente para los anticuerpos AG.

Cálculo de sensibilidad y especificidad

El valor del cut-off para cada determinación se calculó en base al promedio de las absorbancias de los sueros de individuos sanos, más dos desviaciones estándar:

$$\text{cut-off} = x + 2 \text{sd}$$

La sensibilidad o índice de detectabilidad positivo (ID+) y la especificidad o índice de detectabilidad negativo (ID-) se calcularon de acuerdo a:

$$\text{Sensibilidad} = V.P. / (V.P. + F.N.); \text{Especificidad} = V.N. / (V.N. + F.P.)$$

Donde V = verdadero; F = Falso; P = positivo y N = negativo.

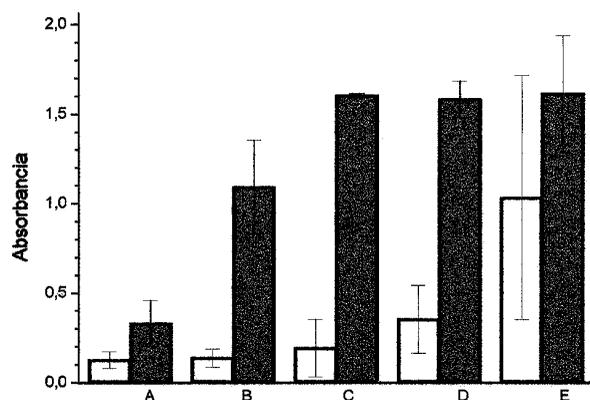


Fig. 1.— Anticuerpos anti-gliadina (AG). Absorbancias promedio de los anticuerpos AG determinadas con la fracción completa de gliadina, correspondientes a los distintos grupos de pacientes: A) individuos sanos; B) controles no celiacos; C) celiacos en tratamiento sin transgresiones; d) celiacos en tratamiento con transgresiones; E) celiacos no tratados. Anticuerpos: IgA (blanco) e IgG (gris)

TABLA 1.— Proporción de pacientes de los distintos grupos que resultaron positivos a los distintos marcadores (Positivos/total de grupo)

Grupo de paciente	Ac-AG		Ac anti-peptido 3		Ac anti-tTG
	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Celiacos sin DLG	28/30	30/30	21/30	29/30	30/30
Celiacos con DLG (sin transgresiones)	2/4	4/4	2/4	4/4	0/4
Celiacos con DLG (con transgresiones)	5/6	6/6	1/6	6/6	6/6
No celiacos con patologías relacionadas	0/15	15/15	0/15	4/15	0/15
Controles sanos	2/30	13/30	0/30	4/30	0/30

TABLA 2.— Sensibilidad y especificidad de los ensayos de determinación de anticuerpos frente a los distintos antígenos

	IgA		IgG	
	E(%)	S(%)	E(%)	S(%)
Ac. antigliadina (AG)	93	93	62	100
Ac. antipeptido G-3	100	72	86	97
Ac. antitransglutaminasa	100	100		

Resultados

Los anticuerpos antigliadina de clase IgG, determinados utilizando la fracción total de gliadina, se encontraron

elevados en todos los grupos de pacientes. Aun en los controles sanos, si bien el valor promedio fue bajo, trece individuos dieron valores por encima del valor de corte (Fig. 1, Tabla 1). Aunque presentan 100% de sensibilidad, su especificidad es baja (Tabla 2).

No ocurrió lo mismo con los de clase IgA, cuyo valor promedio de absorbancia fue significativamente elevado ($p < 0.01$), sólo en pacientes celiacos sin dieta libre, con relación a los otros grupos. No obstante para ese grupo, la dispersión de los valores de absorbancia fue alta como se observa en la Fig. 1. De estos pacientes, dos resultaron negativos, y cuatro de los positivos presentaron valores próximos al nivel de corte. Los pacientes celiacos con dieta libre de gluten (DLG) mostraron valores promedio menores a los no tratados, siendo superiores al valor de corte en dos de los cuatro pacientes que por la evaluación clínica cumplían la dieta. De este modo se observa que la IgA-AG, de elevada especificidad, resulta menos sensible que la IgG-AG (Tabla 1 y 2).

A partir del estudio de la respuesta individual de sueros de pacientes celiacos no tratados frente a cada uno de los péptidos de síntesis (resultados no mostrados), se calcularon los valores promedios de las absorbancias a una dilución 1/100 de los sueros. En la Fig. 2, se muestran estas absorbancias promedio con sus desviaciones. Se observa que, al igual que para la fracción total gliadina, la respuesta de la IgA es menor que la de la IgG para los tres péptidos. La reactividad del péptido G-3 es elevada, siendo menor la del péptido G-1 y casi nula la del péptido G-2. En base a este resultado, se determinaron las respuestas de los sueros de los distintos grupos de pacientes sólo frente al péptido G-3. En la Fig. 3 se observa que la absorbancia promedio correspondiente a la IgG se encuentra significativamente elevada ($p < 0.01$) en los pacientes celiacos con relación a los controles no

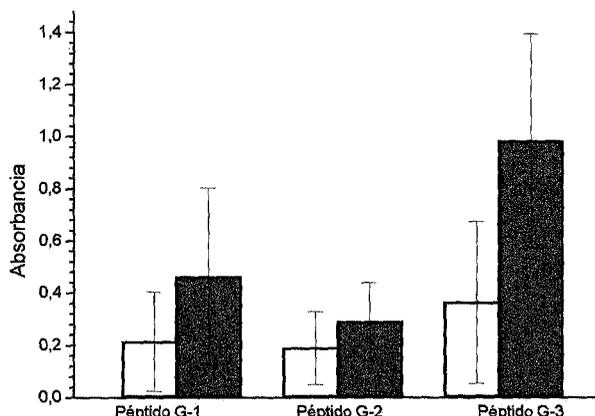


Fig. 2.— Reactividad de sueros de pacientes celiacos frente a los tres péptidos. Absorbancias promedio de los anticuerpos de clase IgA (blanco) e IgG (gris) de sueros de pacientes celiacos sin tratamiento frente a los péptidos de síntesis G-1, G-2 y G-3.

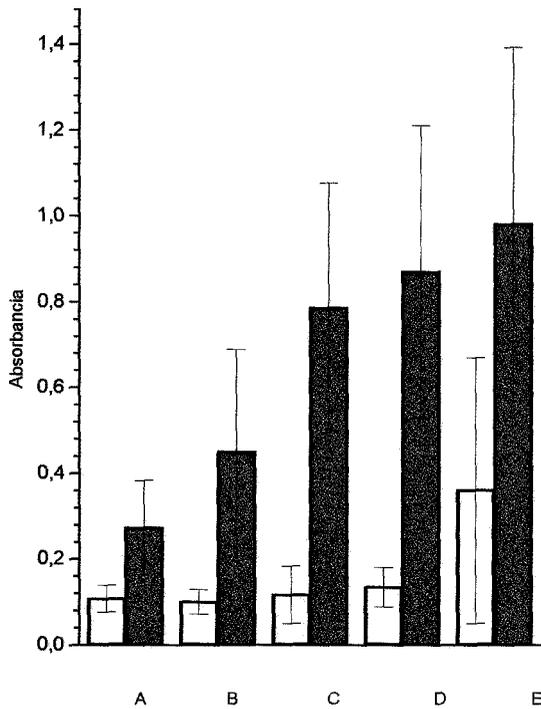


Fig. 3.— Anticuerpos anti-péptido G-3. Absorbancias promedio de los anticuerpos IgA (blanco) e IgG (gris) anti-péptido G-3 correspondientes a los distintos grupos de pacientes: A) individuos sanos; B) controles no celíacos; C) celíacos en tratamiento sin transgresiones; D) celíacos en tratamiento con transgresiones; E) celíacos no tratados.

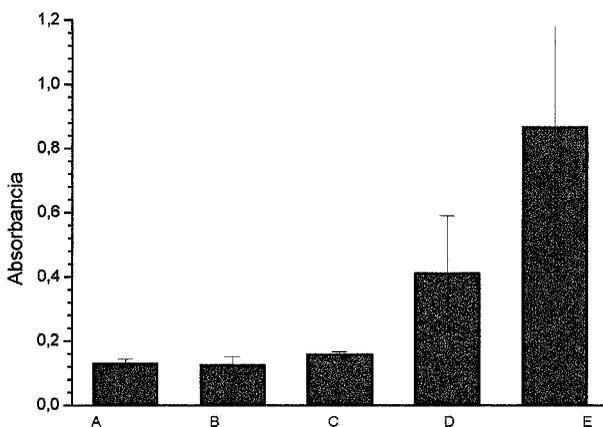


Fig. 4.— Anticuerpos anti-transglutaminasa (AtTG). Absorbancias promedio de los anticuerpos de clase IgA anti-transglutaminasa correspondientes a los distintos grupos de pacientes: A) individuos sanos; B) controles no celíacos; C) celíacos en tratamiento sin transgresiones; D) celíacos en tratamiento con transgresiones; E) celíacos no tratados.

celíacos e individuos sanos, obteniéndose una sensibilidad del 97% con una especificidad del 86% para estos anticuerpos.

El valor promedio de absorbancia de la IgA antitransglutaminasa se encontró significativamente elevado (p

< 0.01) sólo en los pacientes celíacos no tratados (Fig. 4, Tabla 1 y 2). Todos los pacientes celíacos sin tratamiento fueron positivos para este antígeno, encontrándose sólo tres que presentaron valores de absorbancias bajos, cercanos al valor de corte. Aquellos celíacos que estando bajo DLG, por la evaluación clínica se sospechaba que cometían transgresiones, dieron valores positivos, aunque inferiores en promedio a los de los que se encontraban bajo dieta normal. Se obtuvo un 100% de especificidad y sensibilidad para estos anticuerpos.

Las biopsias de intestino delgado de los pacientes celíacos realizadas bajo dieta normal, resultaron de grado IV en 25 de los treinta pacientes siendo de grado III, III-IV en los cinco restantes. De estos cinco pacientes, tres fueron los que presentaron valores de absorbancia bajos para la IgA AG y dos de ellos también fueron los menos reactivos a la transglutaminasa.

Discusión

De los resultados aquí obtenidos y teniendo en cuenta los datos previamente publicados^{3,6}, se puede concluir que los anticuerpos IgG-AG determinados utilizando la fracción completa de gliadina como antígeno son muy sensibles pero presentan baja especificidad y por lo tanto son marcadores válidos en pruebas de tamizado. La especificidad de la IgA-AG es elevada, pero presenta menor sensibilidad que la IgG. La utilización de la IgA-AG como único parámetro para el diagnóstico y seguimiento no permitiría detectar pacientes con déficit de esta clase de inmunoglobulina. Además, los valores de absorbancia de estos anticuerpos, si bien están por encima del cut-off en el 93% de los pacientes celíacos, en un gran número su valor es relativamente bajo, lo cual en estos casos da un rango estrecho para su utilización como parámetro de evolución favorable.

Los tres péptidos ensayados poseen motivos estructurales presuntamente tóxicos (PSQQ y/o QQQP), y se solapan parcial o totalmente con secuencias de la región amino terminal de la alfa gliadina, cuya toxicidad fue demostrada *in vitro*⁹: la región 1-30 (que comprende los péptidos G-1 y G-2) y la 31-55 (que comprende al péptido G-3). La única secuencia identificada hasta el presente como tóxica en base a estudios *in vivo*¹³, se superpone parcialmente con el péptido G-3. No obstante la respuesta de los anticuerpos frente a los péptidos fue sólo sensible para el péptido G-3. Este resultado estaría indicando una falta de correlación entre las características de toxicidad y antigenicidad de las secuencias.

La IgG anti-péptido G-3 mostró resultados de alta sensibilidad, cercana a la de los IgG-AG pero con una especificidad un 24% mayor que la de estos anticuerpos IgG-AG. La identificación de otras secuencias antigénicas y específicas permitiría, a partir de su utilización conjun-

ta como antígenos de captura la generación de tests con igual sensibilidad pero mayor especificidad que los que utilizan la fracción completa de gliadinas.

Los anticuerpos anti-tTG dieron el máximo de sensibilidad y especificidad. En este trabajo, en base a los resultados obtenidos por Dieterich et al. en su publicación, sólo se determinaron los de clase IgA debido a su mayor especificidad. Por otro lado, se observa una sensible disminución de los mismos en aquellos pacientes celíacos que cumplen la DLG. Se puede concluir que la determinación de IgA anti-tTG por ELISA, utilizando transglutaminasa de cobayo como antígeno, por su elevada sensibilidad, especificidad, practicidad y reproducibilidad es un ensayo que puede reemplazar a la determinación inmunohistoquímica de los anticuerpos antiendomiso. Los resultados obtenidos en este trabajo, el 100% para ambos índices de detectabilidad, positivo y negativo, coinciden con los obtenidos en el trabajo publicado en el que se identificó a la enzima como el principal autoantígeno⁸. No obstante debemos ser cautelosos en la interpretación de los mismos tomándolos como parámetros muestrales, no poblacionales.

Agradecimientos: Los autores agradecen el aporte económico de la Universidad Nacional del Litoral realizado a través del subsidio al proyecto CAI+D. 12/B047.

Bibliografía

1. Walker-Smith JA, Guadalini S, Schmitz J, Schmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease: Report of Working Group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-11.
2. Comité de Gastroenterología de la Sociedad Argentina de Pediatría. Criterios diagnósticos de la Enfermedad Celíaca. *Arch Arg Pediatr* 1991; 89: 296.
3. Maki M. The humoral immune system in coeliac disease. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 1995; 9: 231-49.
4. Cataldo F, Ventura A, Lazzari R, Balli F, Nassimbeni G, Marino V. Antiendomiso antibodies and coeliac disease: solved and unsolved questions. *Acta Paediatr* 1995; 84: 1125-31.
5. Volta U, Molinaro N, de Franceschi L, Fratangelo D, Bianchi FB. IgA anti-endomiso antibodies on human umbilical cord tissue for coeliac disease screening. Save both money and monkeys *Digestive Disease Science* 1995; 40: 1902-5.
6. Berger R, Schmidt G. Evaluation of six anti-gliadin antibody assays. *J Immun Meth* 1996; 191: 77-86.
7. Vázquez H, Sugai E, Pedreira S, et al. Screening for asymptomatic coeliac sprue in families. *J Clin Gastroenterol* 1995; 21: 130-3.
8. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nature Medicine* 1997; 3: 797-801.
9. Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr* 1996; 412 (Suppl) 3-9.
10. Marsh NM. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). *Gastroenterology* 1992; 102: 330-54.
11. Tatham AS, Marsh MN, Wieser H, Shewry PR. Conformational studies of peptides corresponding to the coeliac - activating regions of wheat α -gliadin. *Biochem J* 1990; 270: 313-8.
12. Devery JM, Bender V, Penttila I, Skeritt JH. Identification of reactive synthetic gliadin peptides specific for coeliac disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 95: 356-62.
13. Sturgess R, Day P, Ellis HJ, et al. Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet* 1994; 343: 758-61.

Las imágenes no son marginales o decorativas: la iconografía ofrece preciosas intuiciones sobre modos de pensamiento que las meras palabras a menudo enmascaran e ignoran, precisamente porque confeccionamos nuestros discursos con gran cuidado pero en cambio revelamos inconscientemente nuestros secretos en aquellas "meras" ilustraciones.

Stephen Jay Gould

Crónica de tres imágenes, en Ocho cerditos. Reflexiones sobre historia natural. Barcelona: Crítica 1994, p 409

Traducción castellana de Oriol Canals de: *Eight little piggies. Reflections in natural history. New York: W.W. Norton, 1993.*