

Linfocitos intraepiteliales en la enfermedad celíaca

P. Eiras Martínez^{a,d}, C. Camarero Salces^b, F. León Prieto^a, E. Roldán Santiago^a, A. Asensio Vegas^c, M. Baragaño González^b, L. Sánchez Muñoz^a, A. Bootello Gil^a y G. Roy Ariño^a

Servicios de ^aInmunología, ^bPediatría y ^cMedicina Preventiva. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

^dFacultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad San Pablo CEU. Boadilla. Madrid.

(An Esp Pediatr 2002; 56: 224-232)

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente a los componentes del gluten que cursa con una alteración de la mucosa del intestino delgado generalmente reversible al excluir el gluten de la dieta. La patogenia del proceso es inmunitaria y se sabe que, además de un estrechísimo ligamiento con ciertos alelos *HLA*, en esta enfermedad existen alteraciones constantes en los linfocitos intraepiteliales (i-LIE). El desarrollo de una técnica para su determinación por citometría de flujo (CMF) nos ha permitido profundizar en el conocimiento de estas alteraciones y utilizar su determinación en el diagnóstico clínico. Nuestra experiencia demuestra que esta prueba presenta una excelente sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la enfermedad celíaca y que su utilidad es especialmente relevante en las presentaciones atípicas de la enfermedad. En este trabajo se resumen los resultados obtenidos y se discuten algunas de las hipótesis que se han vertido acerca de la posible participación de los LIE en la patogenia de la enfermedad.

Palabras clave:

Enfermedad celíaca. Enfermedad celíaca latente. Linfocitos intraepiteliales TcR $\gamma\delta$. Linfocitos intraepiteliales NK-like.

INTRAEPIHELIAL LYMPHOCYTES IN CELIAC DISEASE

Coeliac disease (CD) is a permanent intolerance to gluten that provokes alterations in the mucosa of the small intestine. The disease can usually be controlled by excluding gluten from the diet. CD is immunologically-mediated, with a strong linkage to certain HLA alleles and a permanently altered intraepithelial lymphocytes (IEL) pattern. The development of a flow cytometric technique for the evaluation of IEL subsets has increased our understanding of these alterations and has prepared the ground for its clinical application. Our experience shows that this

procedure has excellent sensitivity and specificity in the diagnosis of CD and that it is particularly useful in the evaluation of atypical presentations of the disease. The present article reviews our experience in the diagnosis of CD and discusses some of the hypotheses that have been put forward on the possible role of IEL in its pathogenesis.

Key words:

Coeliac Disease. Latent coeliac disease. Intraepithelial lymphocytes TcR $\gamma\delta$. NK-like Intraepithelial lymphocytes.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca es una alteración en la mucosa del intestino delgado proximal asociada con una intolerancia permanente al gluten^{1,2} de causa inmunológica. La exclusión del gluten de la dieta permite normalmente alcanzar una remisión clínica e histológica completa³. Las presentaciones clásicas de la enfermedad celíaca, dominadas por una sintomatología florida de malabsorción y diarrea así como por la existencia de una grave afectación intestinal se acompañan, en la gran mayoría de los casos, de la presencia de unos excelentes marcadores séricos: los anticuerpos antiendomiso (AAE), los anticuerpos antigliadina (AAG) y, más recientemente, los anticuerpos antitransglutaminasa (AAT). Estos anticuerpos son de excepcional ayuda en la práctica clínica, aunque actualmente, y según los criterios de la ESPGHAN⁴, el diagnóstico definitivo precisa la demostración de la lesión intestinal. La generación de estos anticuerpos está condicionada al mantenimiento de la ingesta de gluten, de forma que al eliminar éste de la dieta, y coincidiendo con la recuperación de la normalidad histológica y clínica, estos marcadores se negativizan. Además de ellos, dos son los elementos más llamativos en lo que se refiere a la patogenia inmune de la enfermedad celíaca.

Trabajo financiado por el proyecto 00/0196 del Fondo de Investigaciones Sanitarias.

Correspondencia: Dra. G. Roy Ariño.

Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal.
Ctra. Colmenar Viejo, km 9,1. 28034 Madrid.
Correo electrónico: groy@hrc.insalud.es

Recibido en septiembre de 2001.

Aceptado para su publicación en septiembre de 2001.

Por una parte, es una de las enfermedades que tiene mayor asociación con los genes del complejo principal de histocompatibilidad humano (HLA), de tal forma que éstos se comportan realmente como marcadores de susceptibilidad génica a la enfermedad, ya que más del 95% de los pacientes portan el heterodímero *DQA1*0501/DQB1*0201*, serológicamente expresado HLA-DQ2, siendo además el resto HLA-DQ8⁵. Este fuerte ligamiento entre un antígeno del complejo principal de histocompatibilidad y la enfermedad explica en parte las grandes diferencias geográficas en la incidencia de la misma, dadas las también marcadas diferencias raciales en la frecuencia de expresión de DQ2 en la población general (tabla 1). Del mismo modo, esta asociación refuerza la patogenia inmune del proceso, ya que sugiere la participación de una presentación antigénica determinada en su patogenia⁶. Sin embargo, hay que destacar que el antígeno HLA-DQ2 es expresado por el 37,3% de la población caucásica, lo cual demuestra la existencia de otros factores patogénicos concurrentes, y por ello, la determinación clínica de dicho antígeno sólo aporta un alto valor predictivo negativo al diagnóstico de la enfermedad, de forma que la no posesión del mismo hace muy improbable el diagnóstico de enfermedad celíaca.

Otra característica reseñable desde el punto de vista inmunológico es que la enfermedad celíaca es, con seguridad, la enfermedad en la que está mejor documentada la existencia de alteraciones en las poblaciones de linfocitos intraepiteliales intestinales (i-LIE) de los pacientes, siendo además estas alteraciones constantes e independientes de la ingesta o no de gluten por parte del paciente. Estas alteraciones se concretan en un aumento del número total de i-LIE durante las fases activas de la enfermedad y, sobre todo, un importante incremento porcentual de i-LIE que portan el receptor TcR $\gamma\delta$ ⁸⁻¹². Aunque estas alteraciones se describieron por vez primera en 1989 (Spencer et al)¹³, la necesidad de técnicas laboriosas, subjetivas y difícilmente estandarizables para la práctica clínica habitual como la inmunohistoquímica, redujo en enorme medida la utilidad diagnóstica de este dato. Esta dificultad ha sido salvada en los últimos años mediante la técnica de análisis de los i-LIE mediante citometría de flujo (CMF). En este trabajo se revisa el valor diagnóstico de este análisis en la enfermedad celíaca, haciendo especial hincapié en su utilidad en las nuevas presentaciones de la enfermedad, en particular en la enfermedad celíaca latente/potencial.

NUEVAS PRESENTACIONES DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

El conocimiento del espectro clínico de la enfermedad celíaca ha evolucionado notablemente en los últimos años de forma que en la actualidad se sabe que, al lado de las formas clásicas de la enfermedad, caracterizadas por cursar con una clínica florida, en la que tienen cabida

TABLA 1. Diferencias raciales en la frecuencia (%) de HLA-DQ2⁷

Caucásicos	Negros	Japoneses	Chinos	Hispanos
37,3	22,7	1,2	15,5	24,3

también manifestaciones extraintestinales¹⁴, existen otras nuevas presentaciones de la enfermedad que se agrupan en las siguientes definiciones¹⁵:

Silente. Definida por la ausencia total o casi total de síntomas clínicos a pesar de existir una enteropatía demostrable anatomopatológicamente. Dadas sus características, el diagnóstico suele ser casual o fruto de estrategias de despistaje, bien familiar bien poblacional^{16,17}, así como en pacientes afectados por otros procesos con reconocida asociación a la enfermedad celíaca, como la diabetes tipo I, la dermatitis herpetiforme o el déficit aislado de inmunoglobulina A (IgA).

Latente. Se aplica a aquellos pacientes que, ingiriendo una dieta con gluten, tienen una mucosa intestinal que sería considerada como normal por la mayoría de los patólogos clínicos, pero que sin embargo, sí han tenido en el pasado¹⁸ o tendrán en el futuro¹⁹ una enteropatía asociada al gluten. En cuanto a sus características clínicas, estos pacientes pueden ser sintomáticos o asintomáticos. Es frecuente detectar AAG y AAE en el suero, aunque su presencia no es constante²⁰. Como es fácilmente comprensible dadas sus características se trata del subgrupo que entraña mayor dificultad diagnóstica.

Potencial. Su definición es esencialmente analítica, ya que se refiere a aquellos pacientes en los que nunca se ha demostrado atrofia vellositaria ni han referido clínica, pero en los que se encuentran alteraciones inmunológicas similares a las detectadas en los celíacos: AAE, AAG, alteraciones histológicas sutiles como incremento en la densidad de i-LIE, con aumento del porcentaje de éstos que portan TcR $\gamma\delta$, un patrón de anticuerpos en líquido intestinal similar al que exhiben los celíacos²¹⁻²³ o una provocación rectal con gluten positiva²⁴. El seguimiento clínico y serológico es la actitud terapéutica recomendable en ellos²⁵.

LINFOCITOS INTRAEPITELIALES INTESTINALES

Los i-LIE representan un compartimento inmunológico tan singular como funcionalmente desconocido. Sin embargo, existe el convencimiento entre la comunidad científica de que desempeñan funciones de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Esto es así por las siguientes características:

Abundancia. Los i-LIE se encuentran en el intestino delgado en una relación numérica aproximada de 1:10 con respecto a las células epiteliales circundantes. Si se

tiene en cuenta que la superficie absorbente intestinal se cifra en aproximadamente 300 m² es fácil comprender que, en conjunto, suponen un compartimento linfóide de gran importancia.

Situación. El intestino es el órgano que soporta una mayor carga antigénica del organismo, siendo estos linfocitos los primeros en tomar contacto con ella. Recordemos que, a diferencia de lo que pasaría si los distintos componentes de esta carga penetrasen en el organismo por vía hemática, la inmensa mayoría de estos antígenos, los de la dieta y la flora intestinal saprofita, no originan una respuesta en su contra, por parte del sistema inmunitario. Este fenómeno, denominado tolerancia oral, no por ser ya clásicamente conocido deja de ser desde el punto de vista inmunológico tan fascinante como enigmático en cuanto a sus mecanismos. Es posible que los i-LIE estén implicados en los mismos y se ha documentado la presencia de células con capacidad supresora entre ellas²⁶.

Ontogenia. Gran parte de los i-LIE son linfocitos T CD8+. Recientemente se ha descrito que algunos de estos i-LIE, al menos en ratón, no pasan por el timo²⁷. Dado que el timo es el lugar de maduración de los linfocitos T y en el que, a través del proceso de selección clonal tímica, se selecciona el repertorio de respuesta antigénica de éstos, este dato plantea la necesidad de que los i-LIE sufran una maduración extratímica. Es muy posible que esta maduración se lleve a cabo *in situ* en el propio intestino, y que el repertorio antigénico resultante, y por ello la capacidad de respuesta de los mismos, sea distinta a la de los linfocitos periféricos.

Complejidad fenotípica. Existen distintos tipos de i-LIE. Clásicamente se suele reconocer que los i-LIE son especialmente linfocitos T TcR $\alpha\beta$ CD8+ con pequeños porcentajes de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD4- CD8- y algo menos del 10% de linfocitos T TcR $\gamma\delta$. Además de ello, recientemente se ha identificado también un importante grupo de i-LIE con fenotipo sugerente de pertenencia a un linaje *natural-killer* (NK)^{28,29} (CD3- CD7+). Esta complejidad fenotípica puede estar relacionada con el desempeño de distintas funciones, ya que es necesario que el fenómeno de tolerancia oral anteriormente referido, se acompañe de una adecuada inmunidad protectora en contra de los microorganismos patógenos que puedan invadir el intestino. Por ello no resultaría extraño que hubiese diferentes tipos de i-LIE con funciones no sólo distintas, sino incluso contrapuestas.

Existe una alteración permanente en las poblaciones de i-LIE del intestino de los pacientes celíacos consistente en unas cifras anormalmente aumentadas de i-LIE TcR $\gamma\delta$ de forma que éstos, que como queda dicho representan en individuos sanos menos del 10% del total de los i-LIE, multiplican varias veces sus porcentajes normales. Nos referiremos especialmente a ellos en el punto siguiente.

LINFOCITOS INTRAEPITELIALES INTESTINALES TcR $\gamma\delta$

Si clasificamos a los linfocitos T en función del tipo de receptor clonotípico para el antígeno que posean, existen dos tipos claramente diferenciados:

Linfocitos T TcR $\alpha\beta$. Representan la inmensa mayoría de los linfocitos T periféricos, suponiendo más del 95% del total, subdividiéndose en los linfocitos cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+) comúnmente conocidos.

Linfocitos T TcR $\gamma\delta$. Como se infiere del punto anterior constituyen sólo una pequeña minoría de los linfocitos T periféricos. Esto motivó que durante mucho tiempo se hayan considerado por los inmunólogos tan sólo como un rudimento evolutivo, cuando no totalmente ignorados. El descubrimiento reciente de que tanto en las mucosas como en la epidermis están representados en mayores proporciones, así como de que en determinadas enfermedades, como la celíaca, su número se encuentra claramente aumentado, ha dirigido actualmente el interés de la comunidad científica sobre ellos.

Se trata de una población linfóide muy particular, ya que son varias las diferencias que les separan del resto de los linfocitos T. Las más destacables se refieren a su capacidad de reconocimiento antigénico, a las posibles funciones que desempeñan y a su probable implicación en fenómenos autoinmunitarios:

Capacidad de reconocimiento antigénico. Se sabe que en estas células es distinta a la del resto de los linfocitos, destacando su capacidad de reconocer ligandos no peptídicos³⁰, antígenos proteicos no procesados³¹ y superantígenos bacterianos. Otros de sus ligandos conocidos son las HSP, abreviatura anglosajona de proteínas de choque térmico³². Estas proteínas son expresadas por las células que han sido dañadas. Otra característica singular de los linfocitos $\gamma\delta$ es su capacidad para reconocer antígenos presentados en un contexto distinto al de las moléculas de histocompatibilidad clásicas. De esta forma, son capaces de reconocer antígenos expresados en el contexto de moléculas como el CD1d³³ o por moléculas MICA-MICB³⁴.

Características funcionales. Aunque distan mucho de estar aclaradas, son varias las funciones atribuidas a los i-LIE TcR $\gamma\delta$, en gran parte debido a las muchas propiedades que han demostrado tener: por una parte, algunos autores los consideran una primera línea de defensa contra gérmenes patógenos intestinales, lo que estaría de acuerdo con su demostrado poder citotóxico²⁷. Otros autores, por el contrario, consideran que su principal función es la de mantener la integridad del epitelio, eliminando los enterocitos dañados gracias a su capacidad de reconocimiento de las HSP³⁵. Una tercera función que se les ha atribuido es la de contribuir a la homeostasia del

epitelio suministrando a sus células factores tróficos, lo cual explicaría su capacidad de sintetizar y secretar el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF)³⁶.

Implicación en enfermedades autoinmunes. Uno de los motivos del creciente interés actual acerca de los linfocitos TcR $\gamma\delta$ es su posible implicación en la patogenia de varias enfermedades. Más concretamente, es reseñable que determinados estudios parecen indicar que los linfocitos $\gamma\delta$ pueden estar implicados en la génesis de diversas enfermedades autoinmunes³⁷, lo que también puede estar relacionado con su capacidad de reconocer las HSP que, en definitiva, son estructuras propias. De esta forma, aparte de la enfermedad celíaca, se les ha relacionado con muchas otras enfermedades autoinmunes entre las que se encuentran la esclerosis múltiple³⁸, la artritis reumatoide³⁹, las tiroiditis autoinmunes¹⁰ o las enfermedades hepáticas autoinmunes⁴⁰. Creemos que la presumible relación de los linfocitos TcR $\gamma\delta$ con un número cada vez más elevado de enfermedades autoinmunes refuerza una posible implicación patogénica de los mismos en la enfermedad celíaca.

VALOR DIAGNÓSTICO DE LA DETERMINACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LOS I-LIE EN LA ENFERMEDAD CELÍACA

La determinación inmunofenotípica por CMF de los i-LIE es una prueba rápida y económica que precisa, como único requisito previo, individualizar las células del epitelio. Ello se consigue fácilmente mediante incubación con agentes quelantes del calcio (ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]) y reductores ditiotreitól (DTT) que rompen las uniones intercelulares del epitelio intestinal sin afectar a la celularidad de la lámina propia (fig. 1). De esta forma se consigue que los i-LIE queden en suspensión y sean accesibles al estudio por CMF, la selección de los mismos por la expresión del antígeno panleucocitario CD45 permite su análisis selectivo impidiendo la contaminación por células epiteliales (fig. 2).

Tres son las alteraciones descritas en las poblaciones de i-LIE en la enfermedad celíaca:

1. Aumento del porcentaje total de i-LIE (en relación al total de células del epitelio) durante las fases activas de la enfermedad, que se corrige al excluir el gluten de la dieta (fig. 3).

2. Aumento constante, independientemente de la ingestión o no de gluten, del porcentaje de i-LIE TcR $\gamma\delta$ (fig. 4).

3. Disminución constante, también independiente de la ingestión de gluten, del porcentaje de i-LIE CD3⁻ CD7⁺ (NK-like)^{27,41} (fig. 5).

En la figura 6 pueden observarse unos histogramas bi-paramétricos de CMF en los que se comparan los i-LIE de enfermos celíacos con los de un individuo control.

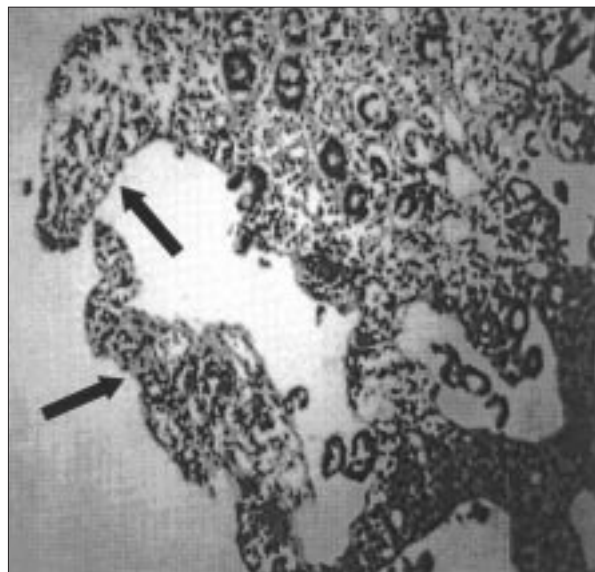


Figura 1. Desepitelización del intestino, corte histológico, teñido con hematoxilina-eosina de una biopsia intestinal tras el proceso de desepitelización. Obsérvese (flechas) cómo las vellosidades se han desepitelizado, conservándose, sin embargo, la celularidad de la lámina propia.

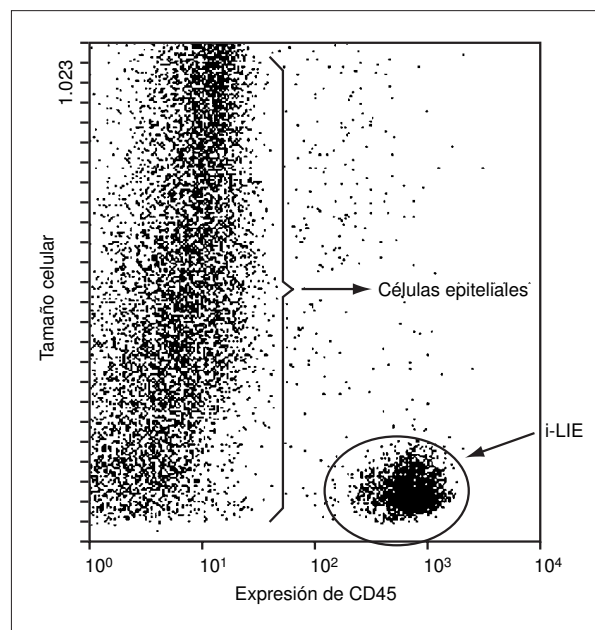


Figura 2. Desepitelización del intestino, aislamiento del comportamiento epitelial y selección de los i-LIE. La selección de los i-LIE se basa en la expresión del marcador panleucocitario CD45 conjuntamente con un bajo grado de dispersión de la luz a 90°.

Para calcular el valor diagnóstico del análisis conjunto de estas alteraciones que permite la determinación de las poblaciones de i-LIE por CMF, Camarero et al⁴¹ han desarro-

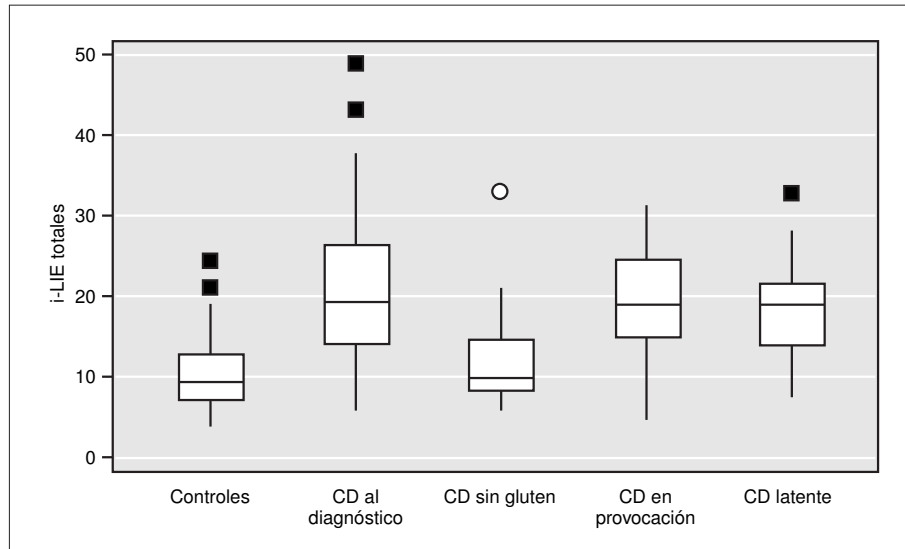


Figura 3. Medias, rangos e intercuartiles de los porcentajes de i-LIE totales, con respecto al total de células del epitelio en los distintos subgrupos diagnósticos: obsérvese como en los tres tipos de enfermos celíacos que ingieren gluten, enfermedad celíaca al diagnóstico, enfermedad celíaca en provocación y enfermedad celíaca latente, existe un marcado incremento en el porcentaje total de i-LIE con respecto a los controles ($p < 0,05$), que tiende a corregirse en aquellos pacientes a los que se les ha retirado el gluten de la dieta.

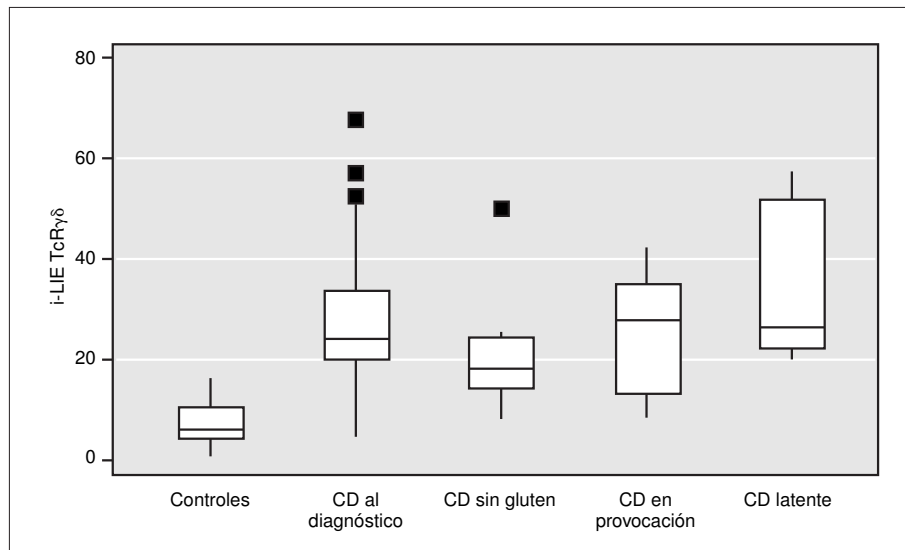


Figura 4. Medias, rangos e intercuartiles del porcentaje de i-LIE TcR $\gamma\delta$, con respecto al total de i-LIE, en los distintos subgrupos diagnósticos: obsérvese el significativo aumento de estos i-LIE en todos los subgrupos de enfermedad celíaca: al diagnóstico, en provocación, con dieta sin gluten y en los casos de enfermedad celíaca latente o potencial, con respecto a los controles ($p < 0,01$).

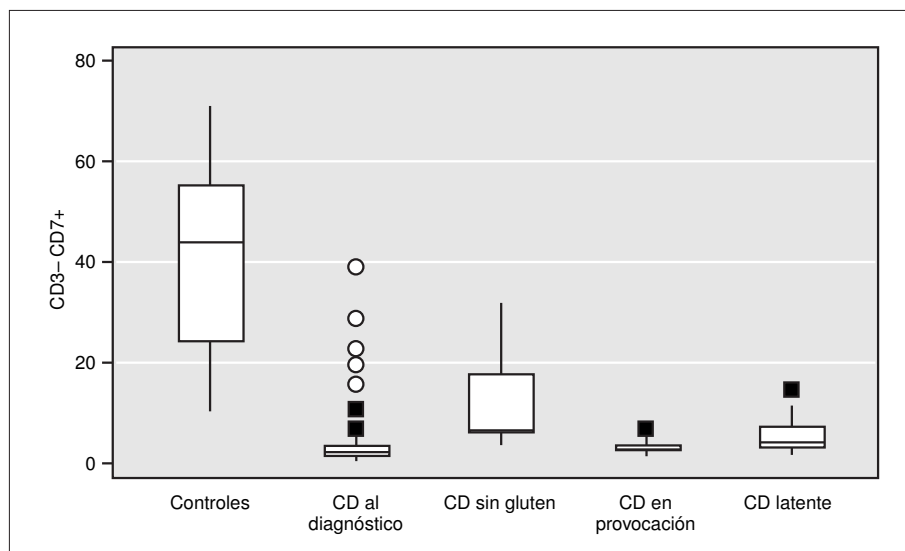


Figura 5. Medias, rangos e intercuartiles del porcentaje de i-LIE CD3-CD7+, con respecto al total de i-LIE, en los distintos subgrupos diagnósticos: obsérvese la marcada disminución de los mismos, con respecto a los controles en todos los subgrupos de enfermos celíacos, ya sea al diagnóstico, en provocación con gluten, con dieta sin gluten, así como en el subgrupo de enfermos con enfermedad celíaca latente/potencial ($p < 0,01$).

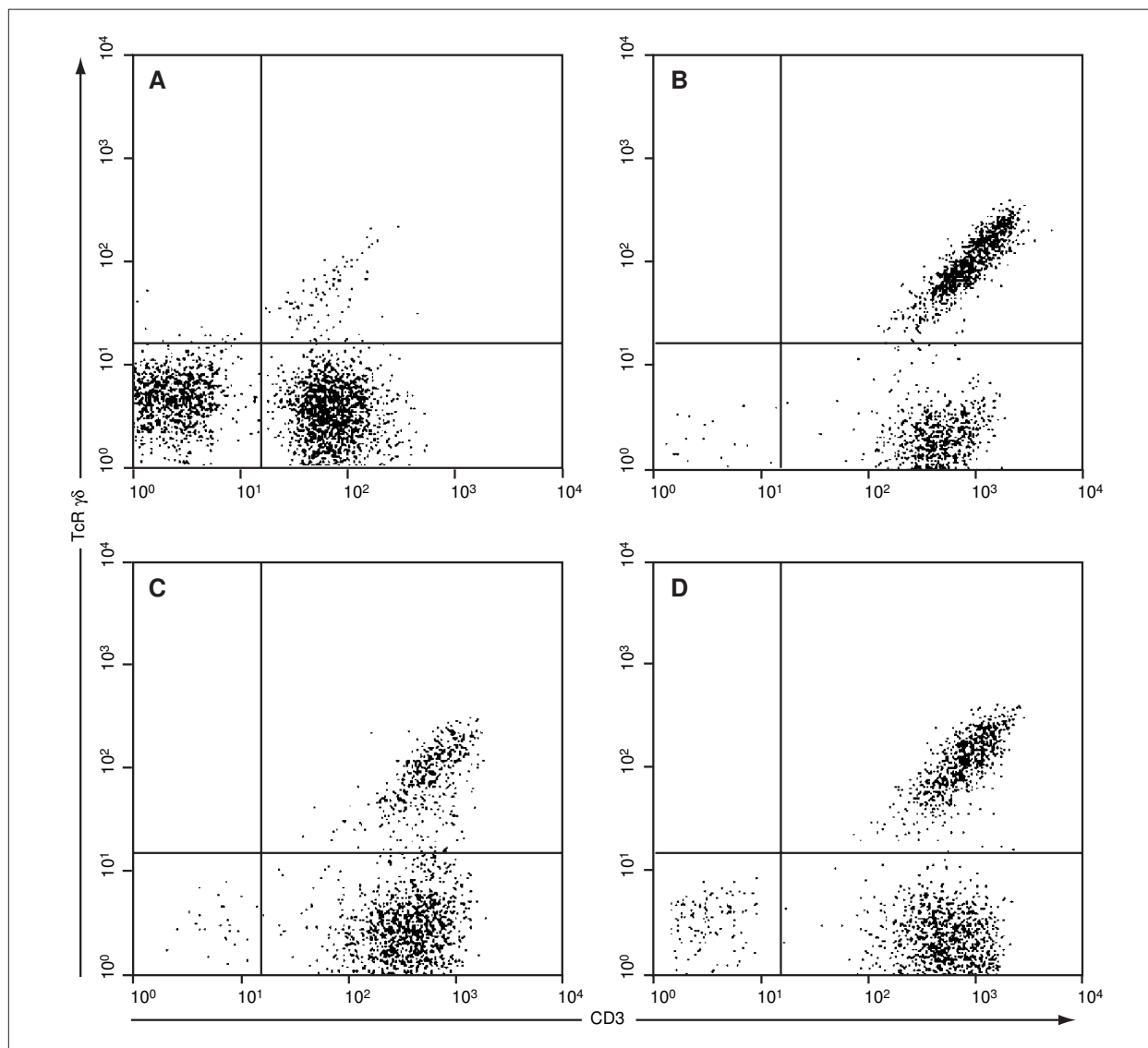


Figura 6. Distribución de las poblaciones de i-LIE en pacientes celíacos en distintas fases de la enfermedad. Histogramas biparamétricos representativos de las poblaciones i-LIE, seleccionados como se muestra en la figura 2. **A)** Individuo control; **B)** celíaca activa; **C)** celíaca latente; **D)** celíaca sin gluten. Obsérvese que en todas las fases de la enfermedad celíaca se produce un notable aumento de i-LIE TcR $\gamma\delta$, así como un acusado descenso de i-LIE CD3⁻CD7⁺.

llado, por un proceso de regresión logística, una fórmula que permite fácilmente calcular la posibilidad de ser celíaco partiendo de los valores de i-LIE:

$$\ln P/(1-P) = -1,19 - (0,13 \times \%CD3^-CD7^+) + (0,20 \times \%TcR\gamma\delta)$$

Donde P es la probabilidad de ser celíaco, siendo 0,5 el valor establecido como punto de corte. Con la utilización de este método se alcanzan una sensibilidad del 94,4% y una especificidad del 94,9%⁴¹.

Sin embargo, y a pesar de las excelentes sensibilidad y especificidad alcanzadas, para discutir el verdadero valor diagnóstico de esta prueba es necesario tener en cuenta

el hecho que la enfermedad celíaca es posiblemente la enfermedad que cuenta con mejores marcadores serológicos en sus presentaciones clásicas, de forma que los anticuerpos antiendomiso y más recientemente antitransglutaminasa, esta última cuando se emplea el nuevo antígeno recombinante humano⁴², muestran valores cercanos al 100% de especificidad y sensibilidad. Este hecho obviamente reduce la importancia clínica de todo nuevo parámetro añadido para su diagnóstico. Aun así, creemos que la determinación de las subpoblaciones de i-LIE puede realizar contribuciones relevantes al diagnóstico de la enfermedad celíaca en la práctica clínica que se concretan en los siguientes puntos:

1. Es una determinación que complementa al estudio anatomopatológico clásico aumentando su especificidad, puesto que la atrofia de vellosidades y la hiperplasia críptica son alteraciones características pero no específicas de enfermedad celíaca.

2. Las alteraciones de las subpoblaciones de i-LIE parecen ser extensivas a las formas latentes de la enfermedad, en las que tanto las alteraciones anatomopatológicas como los marcadores séricos son de aparición inconstante.

3. Es la única prueba que permanece alterada tras la exclusión del gluten de la dieta, por lo que su realización en las biopsias de control tras tratamiento puede ayudar a minimizar la necesidad de la indicación de pruebas de provocación con gluten que, actualmente, con frecuencia son necesarias para alcanzar el diagnóstico de confirmación definitivo^{43,44}.

4. Dado que el porcentaje total de i-LIE se normaliza tras el tratamiento, un número elevado de éstos en la biopsia de control tras tratamiento debe ponernos en guardia, y ayudar a detectar muy sensiblemente la existencia de transgresiones dietéticas.

La determinación de las poblaciones de i-LIE precisa de una única pieza de biopsia endoscópica, por lo que hay que destacar que no interfiere en modo alguno con el estudio anatomopatológico clásico, contribuyendo además a una mejor caracterización de las alteraciones inmunológicas que concurren en la enteropatía celíaca.

TEORÍAS ACERCA DE LAS IMPLICACIONES PATOGENICAS DE LOS I-LIE EN LA ENFERMEDAD CELÍACA

En la actualidad, tanto el papel fisiológico de los i-LIE como su implicación patogénica en la enfermedad celíaca permanecen sin resolver. En lo que se refiere a los i-LIE TcR $\gamma\delta$, su aumento permanente en el intestino de los enfermos celíacos sugiere su implicación en la génesis del proceso⁴⁵. Del mismo modo, experimentos realizados en modelos murinos de transferencia adoptiva indican que estas células tienen la capacidad de suprimir fenómenos de tolerancia oral a antígenos determinados⁴⁶, lo que podría estar en consonancia con un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad celíaca⁴⁷. Otros autores consideran que la enfermedad celíaca podría explicarse por un fenómeno de mimetismo molecular de forma que la unión del HLA-DQ2 con los péptidos de la gliadina podrían mimetizar a algún superantígeno de un microorganismo por ahora aún no identificado⁶, con lo cual sería fácil integrar a los linfocitos T TcR $\gamma\delta$ dada su conocida especial capacidad para el reconocimiento de superantígenos⁴⁸⁻⁵⁰.

Sin embargo, un punto de vista radicalmente opuesto es el expuesto recientemente por el Dr. Schuppan⁵¹: según su teoría, la expansión encontrada de i-LIE TcR $\gamma\delta$ obedecería a un papel protector de la mucosa intestinal ante el mantenimiento crónico de una respuesta inmuni-

taria inadecuada contra el gluten de la dieta, de forma que dichos i-LIE secretarían citocinas como la IL-4 que ayudarían a minimizar el daño producido a la mucosa desplazando la respuesta Th1 en favor de una respuesta Th2 menos lesiva. También en consonancia con este posible papel protector de los i-LIE TcR $\gamma\delta$ se encuentra la reconocida capacidad de éstos para secretar factores tróficos para el epitelio intestinal como el KGF³⁶.

Respecto al descenso de los i-LIE CD3⁺ CD7⁺ recientemente descrito en la enfermedad celíaca, es preciso, antes de formular cualquier hipótesis acerca de su participación en el proceso, profundizar en la caracterización funcional de esta población. Sin embargo, hay que señalar que dichos i-LIE guardan una estrechísima similitud fenotípica²⁹ con otra población *NK-like* que existe en útero y decidua humana (u-NK)⁵² y que se ha relacionado con la tolerancia materno-fetal^{53,54}, de forma que su ausencia imposibilita, en el modelo murino, los embarazos a término⁵⁵ y, además, parecen estar sustituidos por otros tipos celulares en mujeres con abortos múltiples⁵⁶, por lo que es deseable que ulteriores investigaciones profundicen en las características funcionales de esta población linfocitaria.

CONCLUSIONES

El análisis de las alteraciones de i-LIE es una prueba que cumple todos los requisitos de sensibilidad y especificidad para ser de utilidad en la práctica clínica en el diagnóstico de la enfermedad celíaca. Esta utilidad es más relevante en el caso de presentaciones atípicas de la enfermedad, como la latente, en la que los marcadores serológicos son de aparición inconstante, y en las biopsias de control tras tratamiento, en las que es la única prueba que permanece alterada. Por otra parte, la CMF es, por su sensibilidad, objetividad, rapidez y moderado coste el método de elección para su determinación.

En cuanto a una posible implicación en la patogenia de la enfermedad, el hecho del escaso conocimiento actual en cuanto a las funciones de los i-LIE en general y de los TcR $\gamma\delta$ en particular, hace que existan diversas teorías algunas de ellas incluso contrapuestas. Sin embargo, y con independencia de que alguna de ellas se ajuste a la realidad o de que todas ellas sean desbancadas por otras más acertadas, creemos que cualquier hipótesis patogénica futura acerca de la enfermedad celíaca debe justificar, además del estrecho ligamiento HLA/enfermedad, las alteraciones permanentes en las poblaciones de i-LIE que existen en estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dicke W. Coeliakie. [Tesis doctoral]. Universidad de Utrecht, 1950.
2. Walker-Smith JA, Murch S. Coeliac disease. En: Walker-Smith JA, Murch S, eds. Diseases of the small intestine in Childhood. Oxford: Isis Medical Media, 1999; 235-277.

3. Cooke WT, Holmes GKT. Coeliac Disease. Filadelfia: Churchill Livingstone, 1984.
4. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling 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: 909-911.
5. Spurkland A, Sollid LM, Polanco I, Vartdal F, Thorsby E. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. Hum Immunol 1992; 35: 188-192.
6. Barbeau WE, Novascome MA, Elgert KD. Is coeliac disease due to molecular mimicry between gliadin peptide-HLA class II molecule T cell interactions and those of some unidentified superantigen? Mol Immunol 1997; 34: 535-541.
7. The central database analysis committee. Allele frequencies, section 6.3 splits combined (five loci). The databook of the 11th International Histocompatibility Workshop 1991; 2: 807-814.
8. Holm K, Mäki M, Savilahti E, Lipsanen V, Laippala P, Koskimies S. Intraepithelial $\gamma\delta$ T cell- receptor Lymphocytes and genetic susceptibility to coeliac disease. Lancet 1992; 339: 1500-1503.
9. Korponay-Szabo IR, Kovacs JB, Lorincz M, Goracz G, Szabados K, Balogh M. Prospective significance of antiendomysium antibody positivity in subsequently verified celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997; 25: 56-63.
10. Kutlu T, Brousse N, Rambaud C, Le Deist F, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. Numbers of T cell Receptor $\alpha\beta$ + but not of TcR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. Gut 1993; 34: 208-214.
11. Savilahti E, Arata A, Verkasalo M. Increased numbers of gamma-delta bearing T cells in the epithelium of coeliac patients. Advances in mucosal immunology (ed. TT Macdonald et al) Kluwer, Dordrecht, 1997; 61.
12. Savilahti E, Arata A, Verkasalo M. Intestinal $\gamma\delta$ receptor bearing T lymphocytes in coeliac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant Increase in celiac disease. Pediatric Res 1990; 28: 579-581.
13. Spencer J, Isaacson PG, Diss TC, Macdonald TT. Expression of disulphide linked and non-disulphide linked form of the T cell receptor Gamma-Delta in human intestinal intraepithelial lymphocytes. Eur J Immunol 1989; 19: 1335-1341.
14. Ferguson A, Gillet H, Humphreys K, Kingstone K. Heterogeneity of celiac disease: Clinical, pathological, immunological and genetic. Ann N Y Acad Sci 1988; 859: 112-120.
15. Ferguson A, Arranz E, Mahory S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease: Active, silent, latent, potential. Gut 1993; 34: 150-151.
16. De Lecea A, Ribes-Koninckx C, Polanco I, Calvete JF. Serological screening (antigliadin and antiendomysium antibodies) for non-overt coeliac disease in children of short stature. Acta Paediatr 1996; (Suppl 412): 54-55.
17. Catassi C, Fabiani E, Rättsch IM. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. Acta Paediatr 1996; 85 (Suppl 412): 29-35.
18. Troncone R. Latent coeliac disease in Italy. The SIGEP Working Group on Latent Coeliac Disease. Italian Society for Paediatric Gastroenterology and Hepatology. Acta Paediatr 1995; 84: 1252-1257.
19. Mäki M, Holm K, Koskimies S, Visakorpi JK. Normal small bowel biopsy followed by coeliac disease. Arch Dis Child 1990; 65: 1137-1141.
20. Barbato M, Viola F, Miglietta MR. Value of AGA in latent coeliac disease. Nápoles: Eighth International Symposium on Coeliac disease, 1999; 207.
21. Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of coeliac disease: Association with gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential coeliac disease. Gut 1994; 35: 476-482.
22. Arranz E, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: Occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. Gastroenterology 1993; 104: 1263-1272.
23. Arranz E, Ferguson A. Jejunal fluid antibodies and mucosal gamma/delta IEL in latent and potential coeliac disease. Adv Exp Med Biol 1995; 371B: 1345-1348.
24. Troncone R, Greco L, Mayer M, Paparo F, Caputo N, Micillo M et al. Latent and potential coeliac disease. Acta Paediatr 1996; (Suppl 412): 10-14.
25. Collin P, Helin H, Mäki M, Hallstrom O, Karvonen AL. Follow-up of patients positive in reticulin and gliadin antibody tests with normal small-bowel biopsy findings. Scand J Gastroenterol 1993; 28: 595-598.
26. Hoang P, Dalton HR, Jewell DP. Human colonic intra-epithelial lymphocytes are suppressor cells. Clin Exp Immunol 1991; 85: 498-503.
27. Ishikawa H, Abeliovich A, Yamamoto S, Kaufman SH, Tonegawa S. Cytotoxic and Interferon- γ producing activities of $\gamma\delta$ T cells in the mouse intestinal epithelium are strain dependent. Proc Natl Acad Sci (USA) 1993; 90: 8204-8208.
28. Eiras P, Roldan E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3- CD7+ intraepithelial subset in human duodenal biopsies: Potential diagnostic value in coeliac disease. Cytometry 1998; 34: 95-102.
29. Eiras P, Leon F, Camarero C, Lombardia M, Roldan E, Bootello A et al. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. Scand J Immunol 2000; 52: 1-6.
30. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL et al. Nonpeptide ligands for human $\gamma\delta$ T cells. Proc Natl Acad Sci (USA) 1994; 91: 8175-8179.
31. Salerno A, Dieli F. Role of gamma-delta T lymphocytes in immune response in human and mice. Crit Rev Immunol 1998; 18: 327-357.
32. Multhoff G, Botzler C, Issels R. The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. Biol Chem 1998; 379: 295-300.
33. Sugita M, Jackman RM, Grant EP, Rosat JP, Behar SM, Peters PJ et al. CD1, a new paradigm for antigen presentation and T cell activation. Clin Immunol Immunopathol 1998; 87: 8-14.
34. Croh V. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. Science 1998; 279: 1737-1740.
35. Sakai T, Kimura K, Inagaki-Ohaka K, Kusugami DH, Lynch DH, Yoshikai Y. Fas-mediated cytotoxicity by intestinal intraepithelial lymphocytes during acute graft-versus-host disease in mice. Gastroenterology 1997; 113: 168-174.
36. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. Science 1994; 266: 1253-1255.
37. Haylay A, Geng L. $\gamma\delta$ T cell regulate autoimmunity. Curr Opin Immunol 1997; 9: 884-889.
38. Selmaj K, Brosnan CF, Raine CS. Colocalization of Lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci (USA) 1991; 88: 6452-6456.
39. Keystone E, Rittershaus C, Wood N, Snow K, Flatow J, Purvis J. Elevation of a $\gamma\delta$ T cell subset in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 1991; 84: 78-82.

40. Wen L, Peakman M, Mieli-Vergary G, Vergani D. Elevation of activated $\gamma\delta$ T cells in patients with autoimmune liver chronic disease. *Clin Exp Immunol* 1992; 89: 78-82.
41. Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H et al. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor $\gamma\delta$ subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr* 2000; 89: 285-290.
42. Leon F, Pena R, Camarero C, Sanchez L, Eiras P, Del Amo A et al. Limitations of anti-guinea pig liver transglutaminase IgA in the screening of Coeliac Disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 586-587.
43. Krasilnikoff PA. Diagnostic criteria: Two or three biopsies? En: Mäki M Collin P, Visakorpi JK, eds. *Proc 7th Int Symp on Coeliac Disease*, 1996; 181-184.
44. Polanco I. Continuing need for three biopsies in children. En: Mäki M Collin P, Visakorpi JK, eds. *Proc 7th Int Symp on Coeliac Disease*, 1996; 171-176.
45. Sciammas R, Tatsumi Y, Sperling AI, Arunan K, Bluestone JA. TcR Gamma-delta cells: Mysterious cells of the immune cells. *Immunol Res* 1994; 13: 268-279.
46. Fujihashi K, Taguchi T, Aicher WK, McGhee JR, Bluestone JA, Eldridge JH et al. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: $\gamma\delta$ T cells abrogate oral tolerance, While $\alpha\beta$ T cells provide B cell help. *J Exp Med* 1992; 175: 695-707.
47. Barbeau WE. Interactions between dietary proteins and the human system: Implications for oral tolerance and food-related diseases. *Adv Exp Med Biol* 1997; 415: 183-193.
48. Salerno A, Dieli F. Role of gamma-delta T lymphocytes in immune response in human and mice. *Crit Rev Immunol* 1998; 18: 327-357.
49. Morita CT, Li H, Lamphear JG, Rich RR, Fraser JD, Mariuzza RA et al. Superantigen recognition by gammadelta T cells: SEA recognition site for human Vgamma2 T cell receptors. *Immunity* 2001; 14: 331-344.
50. Ramesh N, Horner A, Ahern D, Geha RS. Bacterial superantigens induce the proliferation of resting gamma/delta receptor bearing T cells. *Immunol Invest* 1995; 24: 713-724.
51. Schuppan D. Current Concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 234-242.
52. Schallhammer L, Walcher W, Wintersteiger R, Dohr-G, Sedlmayr P. Phenotypic comparison of natural killer cells from peripheral blood and from early pregnancy decidua. *Early Pregnancy* 1997; 3: 15-22.
53. Clark DA, Vince G, Flanders KC, Hirte H, Starkey P. CD56+ lymphoid cells in human first trimester pregnancy decidua as a source of novel transforming growth factor-beta 2-related immunosuppressive factors. *Hum Reprod* 1994; 9: 2270-2277.
54. Chaouat G, Tranchot-Diallo J, Volumenie JL, Menu E, Gras G, Delage G et al. Immune suppression and Th1/Th2 balance in pregnancy revisited: A (very) personal tribute to Tom Wegmann. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 427-434.
55. Guimond MJ, Wang B, Croy BA. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. *J Exp Med* 1998; 187: 217-223.
56. Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N, Mori H. Role of decidual NK cells in patients with missed abortion: Differences between cases with normal and abnormal chromosome. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 449.