

32. Salud Humana

Evaluación de la eficiencia analítica de la determinación de alelos de susceptibilidad HLA como complemento en el diagnóstico de Enfermedad Celíaca

Ruera, Carolina Naymé; nayme.cr@gmail.com; Luciana Guzmán; Lorena Menéndez; Laura Orellano; Agustín Becker; María Cecilia Girard Bosch; Fernando Chirido.

Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

Resumen

En el presente trabajo se desea evaluar la eficiencia analítica de la determinación de alelos de susceptibilidad HLA en el diagnóstico de Enfermedad Celíaca en casos donde el protocolo convencional no permite establecer un diagnóstico definitivo.

Para ello se analizaron los resultados de la determinación de alelos de susceptibilidad HLA realizada en el período 2015-2017 en pacientes pediátricos. La detección de los alelos de susceptibilidad HLADQ2.5 (DQA1*05:01, DQB1*02:01), DQ2.2 (DQA1*02:01, DQB1*02:02), DQ8 (DQA1*03:01, DQB1*03:02) se realizó utilizando un sistema comercial (INNO-LIPA HLA DQA1/DQB1 MULTIPLEX, Innogenetics).

Los casos con incertidumbre diagnóstica fueron organizados en 5 grupos considerando la presentación clínica, serología y análisis histológico. La evaluación se realizó sobre 40 casos.

El resultado de alelos HLA fue determinante en el diagnóstico de 35 casos (87,5%).

El impacto de la determinación de HLA no fue homogéneo en los distintos grupos de pacientes. En el grupo de pacientes con serología positiva, pero histología normal, la determinación de HLA contribuyó a establecer el diagnóstico definitivo en el 100% al igual que en otros dos grupos (pacientes con serología negativa e histología compatible, y en aquellos que no se contó con biopsia intestinal). En los dos grupos restantes la eficiencia fue menor (>70%) pero igualmente significativa.

La evaluación de HLA tuvo un impacto positivo cuando al aplicarse en grupos definidos de casos que no pudieron ser diagnosticados siguiendo el protocolo convencional. A pesar de su elevado costo, esta estrategia permite un beneficio diagnóstico si se aplica un criterio de inclusión de pacientes para este estudio.

Palabras Claves: Enfermedad Celíaca, HLA, Diagnóstico

Introducción

La Enfermedad Celíaca (EC) es una patología multigénica de base inmune de muy alta prevalencia (estimada en 1 en 100 en población general) que se desencadena en individuos genéticamente susceptibles por la ingesta de un grupo de proteínas de trigo, cebada, centeno y avena (comúnmente denominada gluten). Se estima que está presente entre el 0,5 y el 3% de la población general, siendo más común en mujeres que en hombres (en una relación 2:1).

La prevalencia de EC en el mundo es variable, y se estima que esta variación es consecuencia de factores étnicos (composición genética), culturales (hábitos alimenticios) y ambientales (infecciones) (Abadie et al., 2011). En particular, en Argentina la prevalencia dentro de la población pediátrica fue estimada en un 1,26% (Mora et al., 2012) y en la población adulta en un 0,6% (Gomez et al., 2001).

En la EC se produce daño en la mucosa del intestino delgado, observándose sistemáticamente en los pacientes atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y un marcado infiltrado linfocitario, tanto a nivel de la *lamina propria* (LP) como en el compartimento intraepitelial. Estos efectos conducen a la pérdida de la funcionalidad del intestino delgado y a un síndrome de malabsorción (SMA)

asociado a diversos signos clínicos que variaran significativamente en los distintos pacientes y sobre todo según el momento de presentación de la enfermedad, puesto que la misma puede manifestarse en cualquier momento de la vida. En el contexto de nuestro estudio es de importancia destacar que la variabilidad de cuadros clínicos en su presentación contribuye a un elevado subdiagnóstico.

La sintomatología más frecuente incluye síntomas gastrointestinales asociados con la malabsorción como diarrea crónica, distensión abdominal y pérdida de peso; pero también incluye manifestaciones extraintestinales secundarias a la malabsorción como anemia crónica (por deficiencia de hierro) u osteoporosis (por deficiencia en la absorción de calcio). En algunos casos puede presentarse una manifestación cutánea llamada dermatitis herpetiforme, caracterizada por depósitos de IgA en la piel, pápulas y vesículas pruriginosas. Cabe destacar que en EC es remarcable la gran proporción de pacientes asintomáticos o pacientes que cursan con signos subclínicos (como cansancio o irritabilidad) (Ludvigsson et al., 2013; Husby y Murray, 2014).

Estas alteraciones intestinales registradas en los pacientes con EC en su mayoría revierten cuando se establece una estricta dieta libre de las proteínas tóxicas siendo,

en la actualidad, el único tratamiento efectivo.

La fisiopatología de la enfermedad se basa en una respuesta inmune exacerbada, frente a un grupo de péptidos de derivados del gluten a nivel del intestino delgado. Estos péptidos son procesados por células dendríticas y presentados en moléculas MHC de clase II, en particular, por los alelos HLA-DQ2 y DQ8. Estas células presentadoras, migran a los ganglios mesentéricos donde pueden activar linfocitos T CD4+ diferenciándolos preferencialmente a un perfil Th1. Las células diferenciadas migran a la *lamina propria* como efectores donde producen IFN γ citoquina crítica en el daño del intestino delgado, al reconocer los péptidos derivados de gluten presentados en las moléculas HLA-DQ2 o DQ8.

En este proceso participa la enzima transglutaminasa 2 (TG2), quien es capaz de deamidar selectivamente residuos del aminoácido glutamina a ácido glutámico. Este cambio genera un residuo con carga negativa que aumenta la afinidad de unión de los péptidos a las moléculas de HLA-DQ2 o DQ8. Desde el punto de vista funcional esto a su vez incrementa la capacidad de estimulación de los linfocitos T.

La EC es una enfermedad de base inmune con un importante componente genético. El mayor impacto radica en genes que codifican para moléculas del complejo HLA, en particular los alelos codificantes para las moléculas HLA-DQ2 o DQ8. El Antígeno Leucocitario Humano, comúnmente denominado con las siglas HLA es una gran región génica, cuyos genes son muy polimórficos, que codifica moléculas de MHC de clase I y II. Estas codifican para la expresión de una serie de moléculas presentes en la superficie celular. Prácticamente el 100% de la población celíaca expresa uno de estos alelos, lo que representa la asociación más fuerte encontrada para una patología de base inmune (Trynka et al., 2010; Howell, 2014).

Como se mencionó hasta el momento la Enfermedad Celíaca se trata de un desorden multigénico y su factor de susceptibilidad genética más importante está ubicado en el locus del HLA. Dentro de este complejo de genes, ciertas variantes de DQA1 y DQB1 están fuertemente asociadas a la misma, y se estima que un 90% de los pacientes presentan los alelos DQA1*05:01 y DQB1*02:01. Estos codifican para la cadena α y β , respectivamente, de la molécula HLA-DQ2, específicamente la variante DQ2.5. Esta variante codificada

en cis dentro del haplotipo DR3-DQ2 es la más común en pacientes celíacos, aunque también puede presentarse en trans codificada por dos haplotipos: DR5-DQ7 (conteniendo el alelo DQA1*05:05) y DR7-DQ2 (conteniendo el alelo DQB1*02:02). Las configuraciones cis o trans para esta molécula no tienen diferencias funcionales en cuanto a nivel de expresión ni capacidad de presentación. El restante 10% de los pacientes celíacos portan los alelos DQA1*03:01 y DQB1*03:02 codificantes de la molécula HLA-DQ8, dentro del haplotipo DR4-DQ8, o los alelos DQA1*02:01 y DQB1*02:02 codificantes de la molécula HLA-DQ2.2 dentro del haplotipo DR7-DQ2. Es importante resaltar que la susceptibilidad a la enfermedad depende del efecto dosis del heterodímero DQ2.5, siendo aquellos individuos homocigotas para el haplotipo DR3-DQ2 o los heterocigotas DR5-DQ7/DR7-DQ2 los que expresan los mayores niveles del heterodímero y por ende portan el mayor riesgo genético para EC (Sollid y Thorsby, 1993; Sollid, 2002; Abadie et al., 2011)

Existen distintos algoritmos diagnósticos que incluyen la observación clínica, estudios de serología y la evaluación histológica de piezas de intestino delgado. Usualmente, lo primero que ocurre es la sospecha clínica a raíz de la sintomatología que, si bien es poco

específica y muy variable, juega un rol importante en la inclusión del paciente en un protocolo diagnóstico. También pueden ser sometidos a métodos de diagnóstico aquellos individuos con familiares directos con EC o aquellos que padecen enfermedades asociadas.

Los ensayos serológicos consisten en la detección de anticuerpos de isotipo IgA anti-endomisio (EMA), anticuerpos anti-transglutaminasa 2 (TG2) (isotipo IgA o IgG), y de anticuerpos dirigidos contra péptidos de gliadinas deamidados (PGD) (isotipos IgA o IgG). Entre los ensayos serológicos, los más utilizados son la detección de IgA anti-TG2 y EMA; ambos con una alta especificidad y sensibilidad, especialmente al ser aplicados a una población preseleccionada (por sospecha clínica y/o por familiares en primer grado con la patología) (Husby y Murray, 2014; Ludvigsson et al., 2014)

Dado que la deficiencia de IgA ocurre con mayor frecuencia en pacientes con EC (1,3%) que en la población general (0,13-0,25%), existe cierto riesgo de arribar a resultados falsos negativos cuando se determinan anticuerpos de este isotipo. Por esto, es parte del protocolo diagnóstico el dosaje de IgA total previo a la elección del test serológico, y en caso de confirmarse una deficiencia proceder al dosaje de IgG anti-TG2 y, de ser posible, IgG anti-PGD.

El diagnóstico confirmatorio de EC requiere la evaluación histológica de la mucosa duodenal. Con este fin, se realiza una endoscopia alta y la toma de biopsias duodenales. Durante la endoscopia se analiza la presencia de diferentes signos sugestivos de EC: disminución en número y altura de los pliegues duodenales, su aspecto festoneado y patrón “en mosaico” o aspecto nodular de la mucosa; aunque la mayoría de estos signos solo se aprecian cuando la atrofia es de grado avanzado (Ianiro et al., 2013). La toma de biopsias comprende entre 4 o 6 especímenes y se realiza en bulbo y segunda porción duodenales. Esto se debe a que en ocasiones ocurre un tipo de lesión en parche donde no existe un compromiso homogéneo a lo largo del intestino. Para evitar un error diagnóstico es necesario entonces analizar varias piezas de diferente localización (Ludvigsson et al., 2013; Tonutti y Bizzaro, 2014).

La demostración histológica de atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y un aumento en el infiltrado de linfocitos intraepiteliales (LIEs) son claves para la confirmación del diagnóstico. En la práctica actual, la clasificación histológica globalmente más aplicada es la descrita por Marsh (Marsh, 1992) y modificada por Oberhuber (Oberhuber et al., 1999). Esta

clasificación tiene en cuenta el número de LIEs y la apreciación de criptas y vellosidades, y comprende lesiones histológicas de I a IV (Figura 3). En nuestro país, algunos patólogos utilizan otra clasificación basada en la morfometría de la mucosa, donde se establece la relación numérica entre altura de vellosidad y profundidad de cripta. En base a ese cociente se establecen los distintos grados de alteración histológica en estadios del I al IV (Drut y Rúa, 2001). Ambas clasificaciones se describen en la Tabla 2. En cualquiera de las dos, los grados más altos de lesión son confirmatorios de EC. Los grados intermedios como I o II requieren estudios complementarios y/o un seguimiento del paciente hasta llegar a un diagnóstico definitivo.

Hay que resaltar que la atrofia de vellosidades no es condición unívoca de EC. Ciertas infecciones bacterianas o por *Giardia lamblia* suelen generar características histopatológicas con cierto grado de atrofia, por lo cual es necesario tenerlo en cuenta para el diagnóstico diferencial.

El protocolo diagnóstico para EC aquí descrito es el más aceptado en la práctica clínica. Sin embargo, ocasionalmente aparecen inconsistencias entre los datos de serología y la evaluación histológica. En estos casos el

paciente ingresa en un protocolo de seguimiento y re-evaluación. En este contexto y para lograr un diagnóstico más eficiente, se ha propuesto incluir en el protocolo la búsqueda de los alelos del HLA de susceptibilidad. La tipificación de los alelos de susceptibilidad del HLA con fines diagnósticos tiene un fuerte impacto como criterio de exclusión de EC, puesto que el hallazgo del HLA-DQ2 o DQ8 no es determinante de la presencia de EC. En cambio, la ausencia de los alelos de susceptibilidad es un fuerte predictor negativo de la presencia de EC. Si bien esta es una información complementaria de utilidad, el alto costo de la determinación impide su uso en forma extendida.

Aquí es donde cobra real importancia nuestro estudio puesto que al lograr seleccionar grupos determinados a ingresar al protocolo diagnóstico disminuiría la cantidad de pacientes totales a someter a la determinación de alelos de susceptibilidad y así se lograría incrementar la eficacia diagnóstica en aquellos pacientes que presentan alguna dualidad al momento de su evaluación.

Objetivos

Evaluar la eficiencia analítica de la determinación de alelos de susceptibilidad HLA en el diagnóstico de Enfermedad Celíaca en casos donde el protocolo

convencional no permite establecer un diagnóstico definitivo.

Materiales y Métodos

El proyecto se ejecutó en forma coordinada con los Servicios de Gastroenterología del Hospital de Niños “Sor María Ludovica” y la Unidad de Biología Molecular del Hospital de Niños “Sor María Ludovica”.

Se analizaron 40 muestras de sangre periférica obtenidas de pacientes pediátricos de entre 1 y 16 años, en el curso del protocolo diagnóstico seguido desde el año 2015 hasta el 2017. Cabe destacar que protocolos de trabajo fueron aprobados por los Comité de Ética e Investigación de los respectivos hospitales siendo los pacientes o los familiares responsables quienes firman los consentimientos para la participación en dichos estudios.

Para establecer la eficacia analítica de la determinación de alelos de susceptibilidad HLA en casos donde el protocolo convencional para diagnóstico de EC no permite arribar a un diagnóstico claro se procedió a la creación de 5 grupos candidatos a ser incluidos en el protocolo (Ver tabla 1). Estos grupos fueron seleccionados por el equipo de gastroenterología del Hospital de Niños siendo esencialmente elegidos aquellos

casos que presentaron complicaciones al momento del diagnóstico convencional por

tener pruebas no concluyentes o resultados contradictorios.

Tabla 1: Criterios de inclusión por grupos

Grupo	Definición
Grupo 1	Pacientes con biopsia de intestino delgado con histología normal con panel de anticuerpos específicos positivos, en valores al menos 3 veces superiores a los valores de corte.
Grupo 2	Pacientes con biopsia de intestino delgado con histología normal, panel de anticuerpos específicos negativos o menores a 3 veces el valor de corte y clínica compatible.
Grupo 3	Pacientes con biopsia de intestino delgado con histología patológica y panel de anticuerpos específicos negativos.
Grupo 4	Pacientes con biopsia de intestino delgado con enteropatía intermedia, panel de anticuerpos específicos menores a 3 veces el valor de corte y clínica compatible.
Grupo 5	Pacientes con panel de anticuerpos específicos positivos, clínica compatible y que por alguna razón no se realizó la biopsia de intestino delgado llegando a la consulta con la dieta instalada.

La detección de los alelos de susceptibilidad de EC se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Hospital de Niños de La Plata. Para esto se utilizó un sistema comercial de la empresa Innogenetics. Este consiste en la amplificación de un región específica de locus de HLA de clase II DQ y luego la lectura de las bandas de hibridación en soporte sólido.

Las determinaciones para DQA1 y DQB1 se realizan por separado, ambas con una metodología similar. Se utilizó el kit comercial INNO-LIPA HLA DQA1/DQB1

MULTIPLEX para uso in vitro destinado a la amplificación del ácido nucleico de las regiones: exón 1 y exón 2+3 del locus de HLA-DQA1 y del exón 2+3 del locus de HLA-DQB1. La reacción fue llevada a cabo por medio de PCR (siglas en inglés de Reacción en Cadena de Polimerasa) en formato multiplex.

El fundamento del test se basa en una extracción previa de ADN de leucocitos de muestras de sangre periférica mediante columnas de extracción. Debe corroborarse que la concentración de dicho extracto sea de 0,02 a 1,5 µg/µL

para ser amplificado por PCR al ser introducido en una mezcla de reactivos conteniendo:

- Buffer con exceso de dNTPs
- Primers con biotina específicos para ampliar las regiones antes descritas
- ADN Polimerasa termoestables

La muestra y los reactivos se colocaron en la multiplex y se dio comienzo a la reacción. En primer lugar se deben configurar la cantidad de ciclos, y la temperatura de cada uno.

Frente al calor, las dos cadenas de ADN se desnaturalizan y exponen la secuencia blanco frente a los primers.

Luego, disminuye la temperatura un cierto rango, y esto permite la unión de los primers a las secuencias de las regiones complementarias que flanquean la secuencia blanco.

A otra temperatura específica, la polimerasa utiliza el exceso de dNTPs para extender los primers unidos a lo largo de la cadena molde.

De esta manera, dos copias exactas biotiniladas de la secuencia blanco se producen en un ciclo. Luego de varios ciclos, el número de copias biotiniladas aumenta exponencialmente.

Es de suma importancia que además de las muestras, se amplifique un control negativo (sin ADN) y un control positivo.

Una vez que la reacción haya terminado, deben visualizarse los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% sembrando 10 μ L del producto por calle. Es necesario asegurarse que los controles hayan sido correctos para poder aceptar la corrida.

Para el caso de DQA1 se deben ver dos amplicones uno de 265 pb correspondientes al exón 1 y otro de 1065 pb correspondientes al exón 2+3. Para el caso de DQB1 se producen dos amplicones uno de 261 pb correspondiente al exón 2 y otro de 250 pares de bases correspondientes al exón 3. Su migración en el gel de agarosa es similar y aparecen juntos como una simple banda gruesa, con un borde en 250 y otro en 261 pb.

El test se fundamenta en el método de hibridación reversa.

El ADN biotinilado, previamente amplificado, es químicamente desnaturalizado con EDTA, y las cadenas separadas se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicos, inmovilizados en tiras de membrana. Luego se realiza un lavado riguroso para remover todo el ADN no unido, y se agrega estreptavidina conjugada con Fosfatasa Alcalina uniéndose al híbrido biotinilado.

Se incuba con una solución de un sustrato cromógeno, resultando en un precipitado

violeta/marrón. El desarrollo de este color, se interpreta como positivo para dicha sonda.

La reacción se frena con un lavado, y se almacena la tira con el patrón marcado para interpretar los resultados.

Resultados

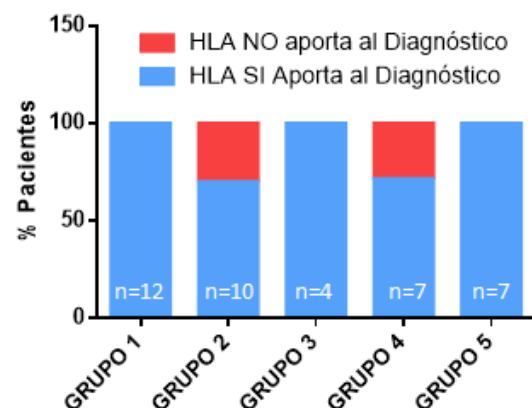
Para evaluar los casos con incertidumbre diagnóstica, elaboramos Criterios de Inclusión (ver sección de Métodos) en grupos considerando la presentación clínica, serología y el análisis histológico. La evaluación se realizó sobre 40 casos.

En la Figura 1 puede observarse que el impacto de la determinación de HLA al momento de ayudar a establecer el diagnóstico definitivo de los pacientes con duda diagnóstica no fue homogéneo en los grupos planteados. En el Grupo 1 (serología positiva, pero histología normal) la determinación de HLA contribuyó a establecer el diagnóstico definitivo en 12 casos (100%). Este grupo a su vez resultó ser el más numeroso y concuerda con la conocida EC potencial que se define como aquella que se presenta en pacientes portadores de alelos de susceptibilidad del HLA, serología positiva para EC y mucosa duodenal normal (Ludvigsson et al., 2013; Tonutti y Bizzaro, 2014). De igual forma que en el Grupo 1 en los Grupos 3 y 5 (pacientes con serología negativa e histología compatible,

y aquellos con los que no se contó con la biopsia intestinal) la determinación HLA contribuyó a establecer el diagnóstico en el 100% de los casos evaluados, siendo 4 y 7 pacientes, respectivamente.

En los Grupos 2 y 4 la determinación HLA contribuyó a un diagnóstico definitivo en un porcentaje menor. En el caso del Grupo 2 conformado por 10 pacientes quienes presentaban clínica compatible pero serología e histología normal se logró arribar a un diagnóstico definitivo en 7 pacientes (70%) permaneciendo en 3 la duda diagnóstica a pesar de contar con la información complementaria brindada por el HLA. El grupo 4 tuvo un comportamiento similar, éste contaba con 7 pacientes de los cuales en 5 (71,4%) se logró arribar a un diagnóstico definitivo permaneciendo 2 pacientes con incertidumbre diagnóstica.

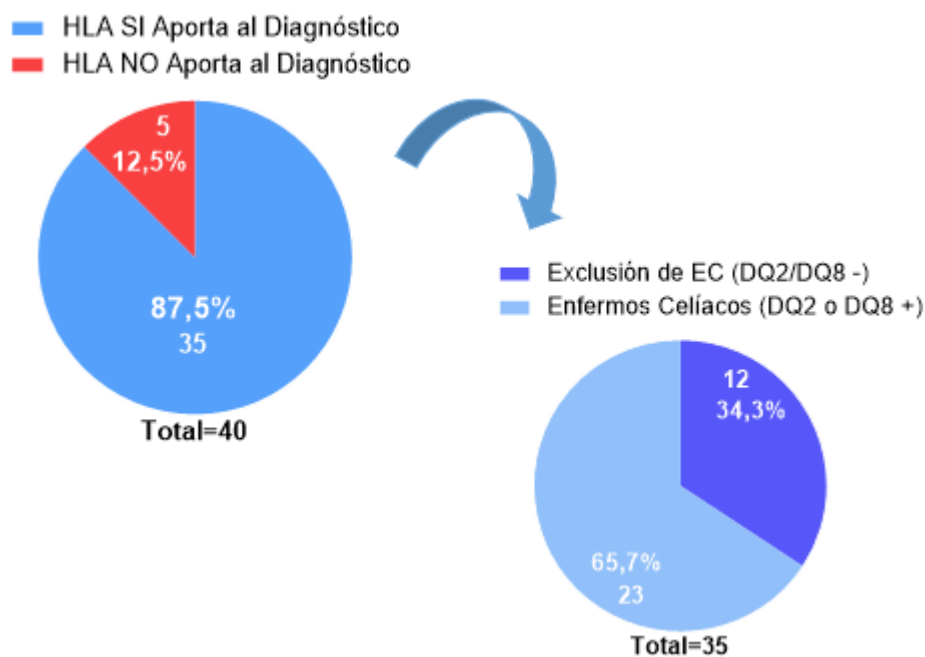
Figura 1: Distribución por grupos y aporte del HLA al diagnóstico definitivo



Como puede observarse en la Figura 2 el resultado de alelos HLA fue determinante al momento de establecer el diagnóstico definitivo de 35 casos (87,5%) aportando esta información adicional dada por el HLA al diagnóstico tanto al ser compatible

con EC, 23 casos (65,7%) que presentaban alguno de los alelos de susceptibilidad asociados con la enfermedad como al no serlo, 12 casos (34,3%) quienes resultaron ser DQ2/DQ8 negativos.

Figura 2: Aporte del HLA al protocolo diagnóstico de Enfermedad Celíaca.



Para completar el análisis decidimos evaluar la frecuencia de aparición de los distintos alelos de susceptibilidad HLA en la población estudiada dentro del desarrollo de nuestro protocolo planteado, se consideraron los 35 pacientes en los cuales logramos establecer un diagnóstico definitivo y los 5 en los que permaneció la duda diagnóstica a pesar de contar con la información del HLA.

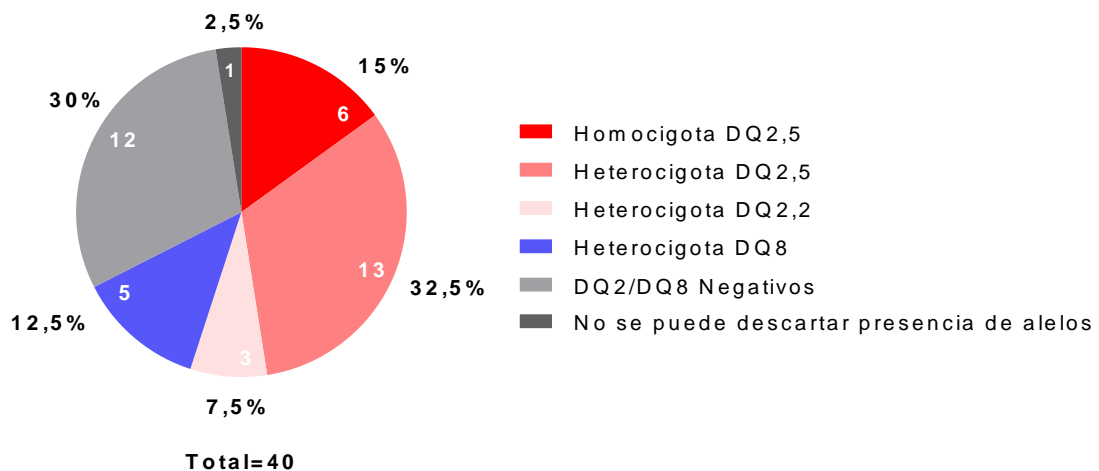
Se le asignó entonces a cada paciente, una variante alélica de susceptibilidad donde se especificó qué genotipo presentaba para las cadenas DQA1 y DQB1.

Como puede observarse en la Figura 3 la cual muestra el resultado de los 40 pacientes analizados sin considerar la división por grupos podemos observar que el resultado obtenido es muy similar a lo ya

publicado anteriormente sobre el comportamiento de estos alelos en nuestro país. En nuestro análisis podemos observar que el alelo DQ2,5 (DQ2.5= DQA1*0501; DQB1*0201) se presentó en el 45,5% de los casos, el DQ2,2 (DQA1*0201; DQB1*0202) en el 7,5% y el DQ8 (DQA1*0301; DQB1*0302) en el 12,5% mientras que 30% de la población no presentó ninguno de estos alelos. Hay que tener en cuenta que aquí se están evaluando tanto los pacientes diagnosticados como enfermos

celíacos como en los que se excluyó la enfermedad y aquellos que permanecieron con duda diagnóstica. Si se tuviesen en cuenta solo los pacientes que resultaron diagnosticados con Enfermedad Celíaca (23) los porcentajes resultaron ser para el alelo DQ2,5 (DQ2.5= DQA1*0501; DQB1*0201) 78,2% (18 casos), para el DQ2,2 (DQA1*0201; DQB1*0202) 8,7 % (2 casos) y para el DQ8 (DQA1*0301; DQB1*0302) 17,4% (4 casos).

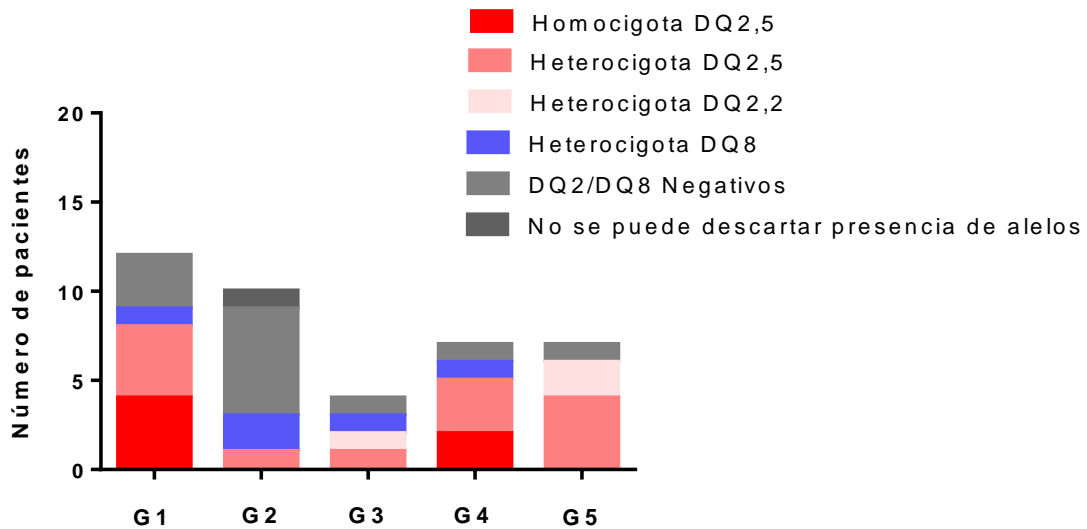
Figura 3: Frecuencia de aparición de alelos de susceptibilidad HLA en la población estudiada.



También se realizó la evaluación de la frecuencia de presentación de los distintos alelos de susceptibilidad HLA divididos por grupos encontrándose una distribución mostrada en la Figura

4. Podemos observar que la presentación de los mismos es bastante heterogénea en todos los grupos.

Figura 4: Frecuencia de presentación de los distintos alelos de susceptibilidad HLA divididos por grupos



Conclusiones

En casos que no pueden ser diagnosticados siguiendo el protocolo convencional, la evaluación de HLA tuvo un impacto positivo cuando se aplica a pacientes en grupos definidos. Siendo en algunos grupos planteados de mayor ayuda que en otros pero siempre resultando favorable. En aquellos grupos donde su contribución fue menor debería buscarse aumentar el número de casos en estudio o replantearse dicho criterio de inclusión. A pesar de su elevado costo, esta estrategia permite un beneficio diagnóstico si se aplica siguiendo un criterio de inclusión de pacientes para este estudio. Esta estrategia permite a su vez, aumentar la eficiencia diagnóstica y reducir el subdiagnóstico. Habiendo confirmado la utilidad diagnóstica, en

especial en ciertos grupos de pacientes, se espera extender este protocolo diagnóstico a otras Instituciones Públicas de Salud.

En cuanto al estudio de la frecuencia de aparición de alelos de susceptibilidad HLA pudimos concluir que nuestra población de interés tiene un comportamiento similar a lo reportado con predominio de presentación del alelo DQ2,5.

Bibliografía

Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., Jabri, B., 2011. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 493–525. doi:10.1146/annurev-immunol-040210-092915

Drut, R., Rúa, E.C., 2001. The histopathology of pediatric celiac disease: order must prevail out of chaos. *Int. J. Surg. Pathol.* 9, 261–264.

Gomez, J.C., Selvaggio, G.S., Viola, M., Pizarro, B., la Motta, G., de Barrio, S., Castelletto, R., Echeverría, R., Sugai, E., Vazquez, H., Mauriño, E., Bai, J.C., 2001. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 2700–2704. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.04124.x

Husby, S., Murray, J.A., 2014. Diagnosing celiac disease and the potential for serological markers. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 655–663. doi:10.1038/nrgastro.2014.162

Ianiro, G., Gasbarrini, A., Cammarota, G., 2013. Endoscopic tools for the diagnosis and evaluation of celiac disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 8562–8570. doi:10.3748/wjg.v19.i46.8562

Ludvigsson, J.F., Leffler, D.A., Bai, J.C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C.P., Leonard, J.N., Lundin, K.E.A., Murray, J.A., Sanders, D.S., Walker, M.M., Zingone, F., Ciacci, C., 2013. The Oslo

definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 62, 43–52. doi:10.1136/gutjnl-2011-301346

Marsh, M.N., 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102, 330–354.

Mora, M., Litwin, N., Toca, M. del C., Azcona, M.I., Solís Neffa, R., Battiston, F., Solaegui, M., Ortiz, G., Wagener, M., Olivera, J., Marchisone, S., Oropeza, G., Bastianelli, C., González, A., Rezzónico, G., 2012. Prevalence of celiac disease: multicentric trial among pediatric population from five urban districts in Argentina. *Arch. Argent. Pediatría* 110, 490–496. doi:10.1590/S0325-00752012000600006

Murray, J.A., Rubio-Tapia, A., Van Dyke, C.T., Brogan, D.L., Knipschild, M.A., Lahr, B., Rumalla, A., Zinsmeister, A.R., Gostout, C.J., 2008. Mucosal atrophy in celiac disease: extent of involvement, correlation with clinical presentation, and response to treatment. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 6, 186–193; quiz 125. doi:10.1016/j.cgh.2007.10.012

Oberhuber, G., Granditsch, G., Vogelsang, H., 1999. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1185–1194.

Sollid, L.M., 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 647–655. doi:10.1038/nri885

Tonutti, E., Bizzaro, N., 2014. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmun. Rev.*, Diagnostic criteria in Autoimmune diseases 9th International Congress on Autoimmunity 13, 472–476. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.043

Trynka, G., Wijmenga, C., van Heel, D.A., 2010. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol. Med.* 16, 537–550. doi:10.1016/j.molmed.2010.09.003