



Universidad
Zaragoza

Trabajo de fin de grado

Papel de la anatomía patológica en el diagnóstico de la enfermedad celíaca en el adulto

Autor

Ignacio García Sola

Directores

Javier Ortego Fernández de Retana

Guillermo Muñoz González

Carlo Bruno Marta

ÍNDICE

| | |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | Pág.5 |
| 1.1 La biopsia en la EC..... | Pág.8 |
| 2. OBJETIVOS..... | Pág.15 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | Pág.15 |
| 3.1 Análisis estadístico..... | Pág.19 |
| 4. RESULTADOS..... | Pág.20 |
| 4.1 Estudio de contraste de hipótesis..... | Pág.24 |
| 4.2 Variabilidad inter-observador..... | Pág.25 |
| 5. DISCUSIÓN..... | Pág.25 |
| 5.1 Limitaciones del estudio..... | Pág.31 |
| 6. CONCLUSIÓN | Pág.32 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | Pág.34 |
| ANEXO 1..... | Pág.36 |

SUMMARY

Introduction: Coeliac disease is an under-diagnosed pathology. Serologic and genetic tests give crucial information but in most cases, it must be accompanied by a pathological investigation. However, histological findings are not pathognomonic and evaluation criteria vary depending on the environment and the pathologist who performs the examination.

Objective: Describe the biopsy specimen characteristics of the patients with suspected coeliac disease received in the Pathology Department of the “Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa” (Zaragoza), studying the factors that affect their evaluation.

Materials and Methods: A cross-sectional descriptive study was performed. Clinical and histological features of 40 duodenal biopsies received in Pathology Department for the study and diagnosis of coeliac disease were evaluated. Patients entered into the study come from the coeliac disease and digestive endoscopy hospital units. A second evaluation of the samples was conducted by an outside evaluator in order to carry out an interobserver variability study.

Results: Only 17.5% of the samples accomplish all the diagnostic criteria for coeliac disease. Among those which did not meet criteria, the most prevalent lesion was Marsh 1 type (30%). Up to 69.7% of the evaluated fragments did not fulfill criteria for good orientation. A significant association between the presence of H.Pylori and Marsh 1 lesion was found. No differences were found between the intraepithelial lymphocytes counting per 100 enterocytes and intraepithelial lymphocytes counting per 20 enterocytes located at the villous tip. The interobserver variability study showed a moderate degree of concordance in the evaluation of degree of lymphocytosis and the villous atrophy.

Conclusion: The poor quality of the samples and the lack of uniformity in their assessment, reduce the reliability of the pathological study in our environment, so it is necessary to establish a uniform criteria in the sample extraction and orientation process and a diagnostic protocol to improve the quality of the pathological evaluation

Key Words: Coeliac Disease, Lymphocytosis, Atrophy

RESUMEN

Introducción: La enfermedad celíaca (EC) es una patología infra-diagnosticada. Las pruebas serológicas y genéticas aportan una información fundamental que en la mayoría de los casos, debe apoyarse en un estudio anátomo-patológico. Sin embargo, las lesiones histológicas encontradas no son patognomónicas y los criterios utilizados para su evaluación varían en función del entorno y del patólogo que realiza el examen.

Objetivo: Describir las características de las muestras biópsicas de pacientes con sospecha de enfermedad celíaca, recibidas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, estudiando los factores que influyen en su evaluación.

Material y métodos: Se realizó un estudio descriptivo transversal donde se evaluaron las características clínicas e histológicas de las biopsias de duodeno de 40 pacientes recibidas en el Departamento de Anatomía Patológica para el estudio y diagnóstico de enfermedad celíaca procedentes de las Unidades de Enfermedad Celíaca y de Endoscopias Digestivas del Servicio de Digestivo de dicho hospital. Una segunda evaluación de las muestras fue realizada por un evaluador ajeno al servicio con el objetivo de llevar a cabo un estudio de variabilidad inter-observador.

Resultados: Sólo el 17,5% de las muestras cumplieron todos los criterios diagnósticos de enfermedad celíaca. Entre los que no cumplían criterios, la lesión más prevalente fue la de tipo Marsh 1 (30%). Hasta un 69,7% de los fragmentos evaluados no cumplían criterios de buena orientación. Se encontraron una asociación significativa entre la presencia de *H. Pylori* y la lesión Marsh 1. No se encontraron diferencias en la evaluación de la linfocitosis intraepitelial por 100 enterocitos o por 20 enterocitos situados en la punta de las vellosidades. El estudio de variabilidad inter-observador mostró grados de concordancia moderada al evaluar el grado de linfocitosis y de atrofia vellositaria.

Conclusión: La mala calidad de las muestras y la falta de uniformidad en su evaluación, disminuyen la fiabilidad del estudio anátomo-patológico en nuestro entorno, por lo que es necesario implantar unos criterios uniformes en el proceso de extracción y orientación de la muestra y un protocolo diagnóstico que mejore la calidad de la evaluación.

Palabras clave: Enfermedad celíaca, Linfocitosis, Atrofia.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca es un trastorno crónico, de base inmunológica que afecta a individuos genéticamente predispuestos y que es producido por el consumo de determinados alimentos que contienen gluten, un complejo proteico que se puede encontrar en ciertos cereales como el trigo, la cebada o el centeno¹. En dichos individuos, la ingestión de gluten, produce una reacción inflamatoria que desencadena un daño en la mucosa intestinal, dando lugar a un síndrome malabsortivo, responsable de gran parte de las manifestaciones clínicas de la enfermedad².

Esta reacción inflamatoria se produce, por el paso a la lámina propia del intestino delgado de ciertos componentes peptídicos del gluten. En la lámina propia, estos compuestos, son de-aminados por la enzima transglutaminasa, lo que aumenta su afinidad por el HLA de clase DQ2 y/o DQ8 con el que interaccionan. Todo ello, desencadena la activación de los linfocitos TH1 que segregan citoquinas y otras sustancias que serán las causantes de daño sobre la mucosa intestinal².

Desde el punto de vista epidemiológico, la celiaquía, es una enfermedad muy común, que se estima que padece un 1% de la población mundial y que afecta tanto a Occidente, como a países en vías de desarrollo como China, India o el Norte de África³.

La prevalencia es 1.5-2 veces más alta en mujeres, afectando en un porcentaje más alto a aquellas personas con algún factor de riesgo, entre las que se encuentran: ser familiar de primer grado (10-15%) o presentar algún tipo de patología autoinmune, como diabetes mellitus tipo 1 (3-16%) o la tiroiditis de Hashimoto (5%) entre otras. Asimismo, se ha visto una mayor prevalencia en aquellos pacientes que presentan Síndrome de Down (5%), Síndrome de Turner (3%) o deficiencia de IgA (9%)⁴.

En las últimas décadas, la prevalencia, ha experimentado un gran incremento, en parte debido a una mejora en los métodos de diagnóstico, principalmente la serología, y en otra parte, a un aumento real de la incidencia, siendo particularmente notorio, el aumento que ha tenido la prevalencia de la

enfermedad en personas adultas. En relación a ello, ciertos estudios muestran unas cifras de prevalencia en adultos, que alcanzan hasta un 2,45% frente a un 1% en niños⁵, demostrando por tanto, la posible influencia de factores ambientales aún desconocidos en el desarrollo de la enfermedad⁶.

Por otra parte, cabe destacar el hecho, de que pese a la mejoría de los métodos diagnósticos, la mayoría de los estudios epidemiológicos citan que solamente un 21% de los casos de celiaquía son correctamente diagnosticados por lo que el infra-diagnóstico, es un problema evidente⁶. Una de las características que indudablemente contribuyen al infra-diagnóstico de la enfermedad, es su gran variabilidad clínica³⁻⁴.

Es bien conocido desde hace tiempo, que la celiaquía causa un síndrome malabsortivo caracterizado por diarrea, distensión abdominal y fallo de medro en los niños. Sin embargo, en los últimos tiempos, se ha detectado un gran número de pacientes celíacos, cuyas manifestaciones clínicas se encuentran alejadas de esa forma de presentación más clásica, siendo en su mayoría adultos. De hecho, menos del 50% de los adultos presenta diarrea como síntoma principal, manifestando una clínica, denominada atípica, entre la que se puede observar fatiga, anemia ferropénica y osteoporosis además de otras manifestaciones más raras, entre las que destacan; la dermatitis herpetiforme, la ataxia cerebelosa, la infertilidad y el linfoma no Hodgkin de célula T, presentándose estas últimas, en pacientes consumidores de gluten tras una larga evolución³⁻⁴.

Los avances en el diagnóstico han permitido el reconocimiento de otras formas de presentación entre las que podemos distinguir:

- **La enfermedad celiaca potencial:** Presente en individuos asintomáticos con una mucosa intestinal normal pero con serología positiva, lo que implicaría un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad⁷.
- **La enfermedad celiaca asintomática o subclínica:** Pacientes que no refieren síntomas pero que si presentan serologías positivas y alteraciones en la mucosa⁷.

- **La enfermedad celiaca refractaria:** Pacientes celiacos cuya clínica y alteraciones anatómo-patológicas persisten tras 12 meses siguiendo una dieta libre de gluten de forma estricta. En muchos de los casos, esta última variante desencadenaría en muchos de los casos, la malignización de la enfermedad en forma de linfoma no Hodgkin de células T⁷.

Por ello, el diagnóstico de la enfermedad es un reto y para afrontarlo se requieren, a parte de los datos clínicos, otras pruebas diagnósticas entre las que destacan; la serología, las pruebas genéticas y el estudio anatómo-patológico de la mucosa intestinal¹⁻⁴.

La serología juega un papel fundamental en el diagnóstico de la enfermedad, siendo la primera prueba a llevar a cabo, en aquellos pacientes en los que se sospecha clínicamente la patología y en familiares de primer grado de un individuo afecto. Para esta determinación, se utilizan distintos tests serológicos, entre los que se encuentran⁴:

- **Ac IgA antitransglutaminasa:** Presentan una alta sensibilidad (73.9-100%) con una especificidad cercana al 90% por lo que se utilizan como primer test serológico en la mayoría de los pacientes⁴.
- **Ac IgA antiendomisio:** Tienen una sensibilidad inferior a los Ac anti transglutaminasa (82.6-100%) pero su especificidad, es cercana al 100% por lo que se utilizan conjuntamente con los primeros para confirmar el diagnóstico⁴.
- **Ac IgG anti-péptidos de gliadina deaminados (DGP):** Presentan una sensibilidad y una especificidad cercanas al 90% y se utilizan al ser IgG en pacientes en los que se sospeche un déficit de IgA⁴.
- **Ac IgA antigliadina:** Actualmente sólo se utilizan en niños menores de 2 años al ser los primeros anticuerpos que se manifiestan a esas edades¹.
- **Ac IgG antitransglutaminasa:** A diferencia de los IgA, su sensibilidad y su especificidad es muy variable por lo que sólo se utilizan, al igual que los IgG DGP, en aquellos pacientes en los que se sospeche déficit de IgA¹.

Aparte de los test serológicos, el test genético consistente en la determinación del HLA DQ2/DQ8 es de gran utilidad por su alto valor predictivo negativo, cercano al 100%, pudiendo servir de ayuda en aquellos casos dudosos o como complemento al resto de pruebas⁷. Todas estas determinaciones, han permitido mejorar ostensiblemente el diagnóstico de la enfermedad.

Sin embargo estos tests, presentan una sensibilidad y especificidad variable en función del fabricante y no están exentos de falsos positivos y negativos, lo que añadido a la presencia de formas de enfermedad celiaca seronegativas, dificultan el diagnóstico².

Por ello, el estudio anátomo-patológico sigue siendo crucial para confirmar las sospechas diagnósticas en la población adulta y constituye el “gold standard” del diagnóstico de la enfermedad⁸⁻⁹.

1.1 La biopsia en la EC

La mayor parte de la reacción inmune presente en la EC tiene lugar en la parte proximal del intestino delgado, por lo que lógicamente, las biopsias tomadas en esa zona, presentarán cambios histológicos más evidentes y serán más adecuadas para el estudio¹⁰. Existe cierta controversia respecto a la mejor localización donde deben tomarse las biopsias, ya que mientras muchos autores consideran que el bulbo duodenal no es un buen sitio para obtener las biopsias por su exposición más íntima al contenido gástrico y su contenido glandular y linfoide, otros autores, consideran que el bulbo duodenal debe de ser el sitio de elección, al ser el lugar donde el contacto con el gluten es más precoz. En la práctica, parece razonable que al menos 1 biopsia de las 4-6 que se recomiendan, sea tomada de la zona bulbar y el resto de la segunda porción duodenal⁸.

La mucosa duodenal normal se caracteriza por presentar unas vellosidades de aspecto digitiforme, cuya altura en relación a la de las criptas adyacentes, debe tener una relación 3:1 o superior a favor de la vellosidad y los enterocitos que revisten, deben tener una altura de entre 29-34 µm con una diferenciación clara de su borde en cepillo¹. El número de linfocitos intraepiteliales, es variable en función de las personas pero los trabajos de Hayat et al, consideran que la

mayoría de los sujetos, presentaba menos de 20 linfocitos por 100 enterocitos y concluyeron, que un número de 25-29 linfocitos por 100 enterocitos constituiría el límite normal¹¹. Respecto a su forma de distribución a lo largo de la vellosidad, es importante recalcar que en la mayoría de las personas sigue un patrón decreciente, encontrándose por tanto, una densidad de linfocitos intraepiteliales mayor, en la base de la vellosidad que en la punta¹².

Las criptas de la mucosa intestinal, tienen una función regeneradora del epitelio vellositario, gracias a las mitosis de sus células epiteliales replicantes. En la lámina propia, hay principalmente células leucocitarias entre las que destacan las células plasmáticas y los linfocitos aunque en condiciones normales, también se pueden encontrar eosinófilos, histiocitos y mastocitos. Sin embargo, no hay neutrófilos, que solo estarían presentes en ciertas situaciones como la duodenitis activa relacionada con la infección por *H.pylori*¹.

La histopatología de la enfermedad celíaca se caracteriza por 4 cambios fundamentales de la mucosa duodenal¹:

- Linfocitosis intraepitelial
- Perdida de altura enterocitaria
- Hiperplasia criptal
- Atrofia vellositaria

La linfocitosis intraepitelial, definida como el aumento anormal del número de linfocitos intraepiteliales, constituiría la base del diagnóstico anatómopatológico de la enfermedad celíaca¹⁻¹⁰. El número de linfocitos necesario para hablar de un incremento anormal, es un tema controvertido. Según Hayat et al, sería un número igual o superior o igual a 30 linfocitos por cada 100 enterocitos¹¹ pero otros autores, citan límites más bajos de hasta 25 linfocitos por cada 100 enterocitos o incluso menos⁶. Por otra parte, ciertos estudios, recomiendan el conteo linfocitario solo de las puntas de las vellosidades al ser considerado un método más rápido y fiable. En este caso, la presencia de 5 o más linfocitos por 20 enterocitos en 5 vellosidades distintas sería un hallazgo fuera de lo normal¹⁰. La pérdida del patrón de distribución decreciente es otro hallazgo histológico que puede ayudar al diagnóstico de la enfermedad.

El estudio de Goldstein et al, otorga una alta sensibilidad diagnóstica a este hecho por lo que debe ser tenido también en cuenta a la hora de evaluar la muestra¹². (**Figuras 1-2**)

Los enterocitos, pueden sufrir cambios como la pérdida de altura, la vacuolización intracitoplasmática y la pérdida del borde en cepillo, pero estos hallazgos, son poco específicos ¹.

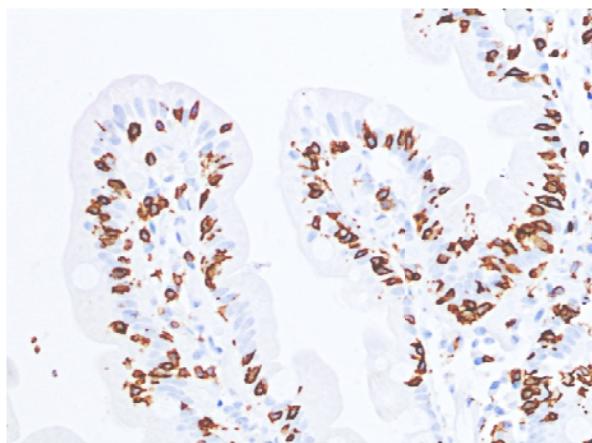


Fig. 1

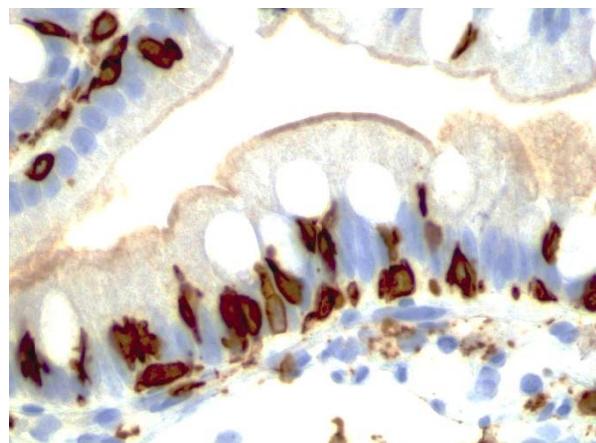


Fig. 2

Figura 1: Vellosidades duodenales con ligera atrofia, en las que se aprecia un número anormalmente elevado de linfocitos intraepiteliales marcados con inmunohistoquímica para CD3.

Figura 2: Detalle de los muy numerosos linfocitos intraepiteliales marcados CD3 +.

Imágenes cedidas por amabilidad del Dr. Ortego. Servicio de Anatomía Patológica del HCU Lozano Blesa (Zaragoza)

La hiperplasia criatal, surge con el objetivo de regenerar el epitelio perdido a causa de la agresión inmune. Así, las criptas, aumentan su longitud total, la de la zona germinal o replicativa y su actividad mitótica en la EC¹⁰, por lo que muchos autores consideran la existencia de más de 1 mitosis por cripta como un buen criterio de hiperplasia¹². Cuando la agresión es continuada, llega un momento, que este mecanismo acaba siendo insuficiente, dando lugar a la atrofia vellositaria¹⁰.

La atrofia vellositaria es uno de los hallazgos más característicos de la enfermedad. Para su valoración, se utiliza la relación vellosidad/cripta al ser uno de los métodos más objetivo para graduar la atrofia. (**Figura 3**)

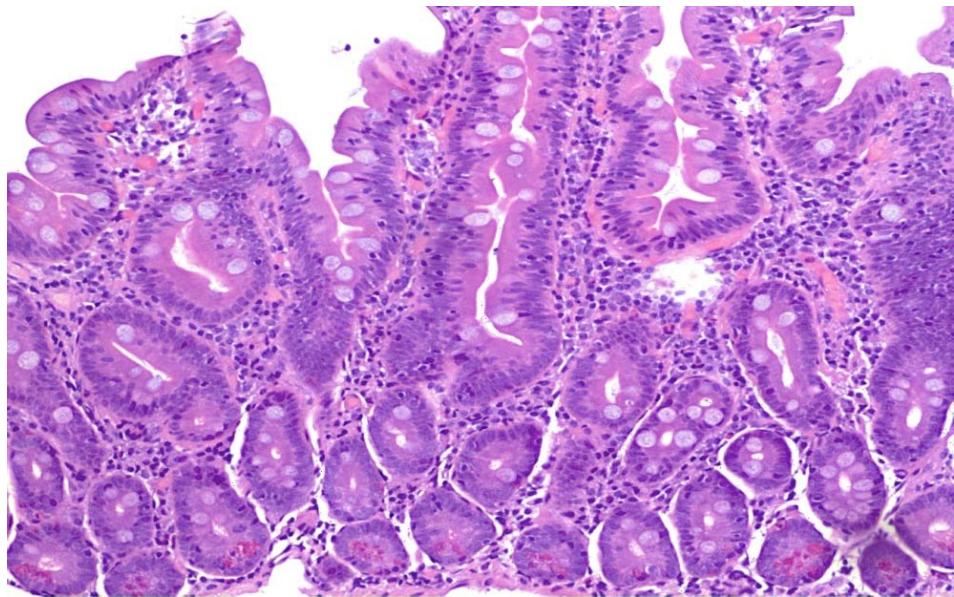


Fig. 3

Figura 3: Detalle de la mucosa duodenal de un paciente celíaco en la que se aprecian vellosidades atróficas con una marcada linfocitosis intraepitelial.

Imagen cedida por amabilidad del Dr. Ortego. Servicio de anatomía patológica del HCU Lozano Blesa (Zaragoza)

Así, se hablaría de atrofia leve cuando la relación sea menor a 3/1 o 2/1, atrofia moderada cuando la relación es 1/1 y atrofia grave ante la ausencia de vellosidades¹³. Sin embargo otros autores, como Drut, valoran la atrofia en grado 1 cuando la relación es 2,5-2, grado 2 cuando la relación se sitúa entre 1-2, grado 3 entre 1-0,5 y grado 4, menor a 0,5 por lo que al igual que la contabilización linfocitaria, este tema también es controvertido¹⁴.

A lo largo de las últimas décadas y basándose en estos hallazgos, se han elaborado a lo largo de las últimas décadas, una serie de clasificaciones que permiten graduar la gravedad de la EC. Actualmente, se usan preferentemente 2, la clasificación de Marsh-Oberhuber y la de Corazza y Villanacci¹²⁻¹⁵.

La clasificación de Marsh-Oberhuber de 1999, es una modificación de la propuesta por Marsh en 1992, y divide el daño de la mucosa intestinal producido en la EC en 5 grupos (tipos 0-4)⁸.

- **Tipo 0 (Mucosa normal):** VelloSIDADES de aspecto normal, sin atrofia con menos de 30 linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos. (**Figura 4a**)
- **Tipo 1 (Lesión infiltrativa):** VelloSIDADES de aspecto normal, sin atrofia con más de 30 linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos. (**Figura 4b**)
- **Tipo 2 (Lesión infiltrativa-hiperplásica):** VelloSIDADES de aspecto normal, sin atrofia pero acompañadas de hiperplasia criptal (más de una mitosis por cripta) y más de 30 linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos.
- **Tipo 3 (Lesión destructiva):** Caracterizada por marcada disminución de la altura enterocitaria, pérdida del borde en cepillo y vacuolización citoplasmática, y que a su vez se divide en tres subgrupos⁸:
 - **Tipo 3a:** Atrofia vellositaria leve (relación V/C 2:1) e incremento del número de linfocitos intraepiteliales (más de 30 por 100 enterocitos)⁸
 - **Tipo 3b:** Atrofia vellositaria moderada (relación V/C 1:1) e incremento del número de linfocitos intraepiteliales (más de 30 por 100 enterocitos)⁸ (**Figura 4c**)
 - **Tipo 3c:** Atrofia vellositaria grave (mucosa plana) e incremento del número de linfocitos intraepiteliales (más de 30 por 100 enterocitos)⁸ (**Figura 4d**)
- **Tipo 4 (Mucosa atrófica):** Patrón de afectación muy raro caracterizado por una mucosa plana, sin velloSIDADES y pocas o ninguna cripta con un número de linfocitos intraepiteliales cercano a la normalidad⁸.

Esta clasificación, es utilizada hoy en día por multitud de patólogos para evaluar el daño de la mucosa duodenal en la EC. Sin embargo, es importante destacar que los cambios sufridos por la mucosa duodenal (sobre todo en fases iniciales), distan mucho de ser patognomónicos de EC. De hecho las lesiones de tipo Marsh 1, pueden verse en multitud de patologías entre las que destacan; la infección por H.Pylori y la toma de AINES, por lo que la interpretación de dichos cambios, debe ser interpretada con cautela en función del contexto clínico.

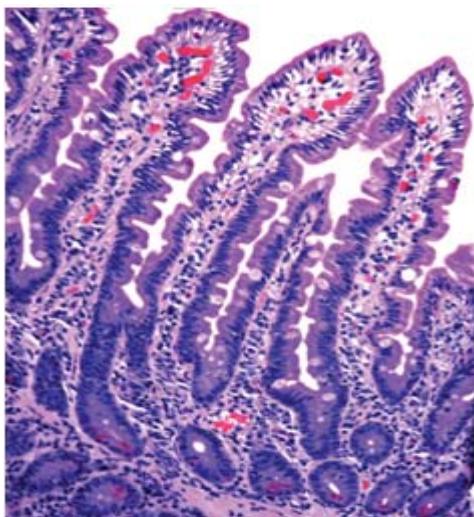


Fig. 4a

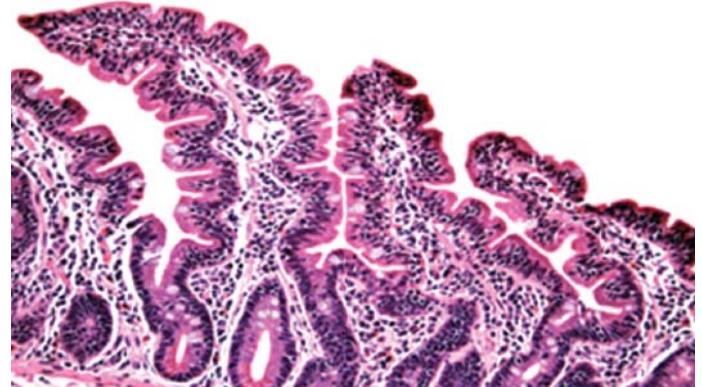


Fig. 4b

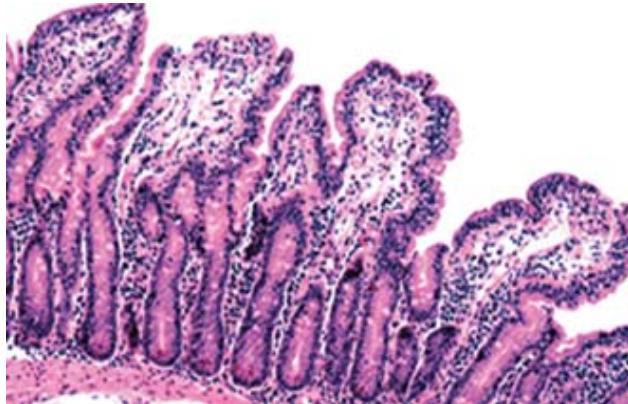


Fig. 4c

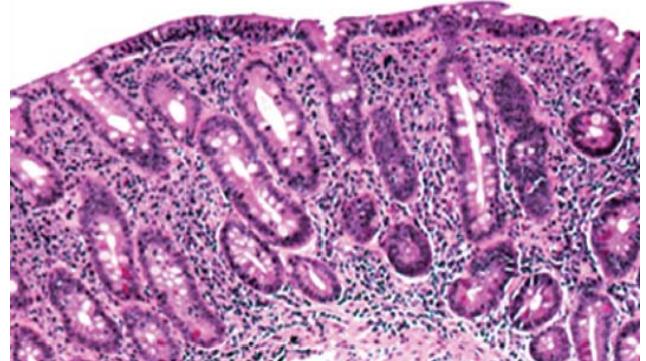


Fig. 4d

Figura 4a: Mucosa duodenal normal. (Marsh 0) Tinción hematoxilina-eosina

Figura 4b: Mucosa con marcada linfocitosis intraepitelial acompañada de una arquitectura criptal y vellositaria normal. (Marsh 1) Tinción hematoxilina-eosina

Figura 4c: Mucosa con marcada linfocitosis intraepitelial acompañada de signos de hiperplasia criptal y atrofia moderada. (Marsh 3b) Tinción hematoxilina-eosina

Figura 4d: Mucosa con marcada linfocitosis intraepitelial acompañada de signos de hiperplasia criptal y atrofia grave. (Marsh 3c) Tinción hematoxilina-eosina

Imágenes tomadas de: Bao F, Green P, Bhagat G. An Update on Celiac Disease Histopathology and the Road Ahead. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2012; 136(7): 735-745.

Además, en la práctica, la aplicación de esta clasificación, ha evidenciado ciertos problemas derivados de su uso como por ejemplo; la dificultad a la hora de diferenciar los tipos 1 y 2 de Marsh o el alto grado de variabilidad interobservador existente sobre todo entre los tipos 3a y 3b.

Por este motivo, Corazza y Villanacci ha propuesto una nueva clasificación que divide el daño sobre la mucosa duodenal en 2 categorías; A y B dividida esta última a su vez, en 2 subgrupos⁸:

- **Grado A (no atrófica):** Criptas y vellosidades sin alteraciones pero con un número de linfocitos intraepiteliales superior a 25⁸
- **Grado B1 (atrófica):** Relación vellosidad-cripta por debajo de 3:1 y linfocitos intraepiteliales aumentados en un número superior a 25⁸
- **Grado B2 (atrófica y plana):** Sin vellosidades con un número de linfocitos intraepiteliales superior a 25⁸

Esta nueva clasificación, resulta un método más simple de clasificar el daño de la mucosa duodenal y presenta un grado menor de variabilidad interobservador que la clasificación de Marsh-Oberhuber como demuestra el único estudio que compara ambas clasificaciones que otorga, valores kappa más altos a la clasificación de Corazza y Villanaci (0,55 vs 0,35)¹⁶. Sin embargo, otros estudios realizados para determinar el grado de variabilidad interobservador de la clasificación de Marsh-Oberhuber, dan valores kappa más altos que este último estudio a dicha clasificación (kappa = 0,486). A pesar de esta variabilidad, este mismo estudio concluye que al tener en cuenta el conjunto de hallazgos serológicos, histológicos y la respuesta a la dieta sin gluten, la mayoría de observadores coincidieron en el diagnóstico (kappa =0.850) por lo que la evaluación de los datos clínicos, serológicos, histológicos y la respuesta a la dieta libre de gluten es imprescindible para llegar a un diagnóstico correcto¹⁷.

En base a estos datos, se deduce que el diagnóstico de la EC es un asunto complejo. El estudio anatómo-patológico de la mucosa duodenal de los pacientes, es clave en la mayoría de los casos, pero la fiabilidad de su evaluación, depende de muchos factores, entre los que se encuentran la calidad de la muestra recibida y la experiencia del patólogo que la recibe.

Además, existe cierta controversia, en relación a los métodos utilizados para la evaluación de las muestras y la forma en la que se realiza dicha evaluación, la cual varía ostensiblemente en función del lugar y el patólogo que las realiza.

2. OBJETIVOS

Por lo tanto, este trabajo pretende:

- Describir las características de las biopsias sospechosas de enfermedad celiaca, recibidas en el Departamento de Anatomía Patológica del HCU Lozano Blesa en un periodo de tiempo determinado.
- Establecer la relación existente entre, el resultado del conteo linfocitario por 100 enterocitos y el conteo linfocitario por 20 enterocitos situados en la punta vellositaria así como la relación entre la lesión Marsh 1 y la presencia de H.Pylori.
- Valorar la variabilidad inter-observador existente, tras la revisión de las muestras seleccionadas en el estudio.
- Proponer posibles hipótesis que puedan explicar la causa de los resultados obtenidos.
- En base a los resultados del estudio y a la revisión bibliográfica del tema elaborar un documento de recogida protocolizada de datos que permita una mejor evaluación anatómo-patológica en el futuro

3. MATERIAL Y METODOS

Para alcanzar estos objetivos, se realizó un estudio descriptivo transversal a partir de una muestra representativa con el ánimo de describir las características de dicha muestra e intentar establecer las relaciones propuestas en los objetivos del trabajo.

Para ello, se seleccionaron las biopsias recibidas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, durante 4 meses, del 18 de Junio al 18 de Octubre del 2014 correspondientes a pacientes con sospecha clínica de EC, con el propósito de estudiar la presencia o no de EC.

Para la obtención de estos datos, se utilizó el programa de gestión de Anatomía Patológica *PathWin* mediante el cual, se buscaron los informes anatómo-patológicos realizados durante el periodo de tiempo antes referido, utilizando como criterios de búsqueda, la palabra clave “Marsh” y la localización de la biopsia endoscópica, que fue intestino delgado.

Los criterios de inclusión en nuestro estudio fueron:

- Paciente con informes anatómo-patológicos por sospecha de enfermedad celiaca validados.
- Mayor de edad
- Historia clínica disponible en la base de datos del “Sistema Aragonés de Salud”

Se excluyeron los pacientes en los que no se continuó el estudio de EC con otras pruebas diagnósticas.

La muestra seleccionada tuvo un tamaño total de 40 pacientes en total. Se recogieron datos de índole socio-demográfica y clínica para lo que se accedió a la historia clínica de cada paciente y se comprobó el resultado de las distintas pruebas disponibles. En relación a la información de la historia clínica predominante, se seleccionó el dato clínico al que el paciente daba más relevancia, obteniéndose las siguientes variables:

✓ **Variables sociodemográficas**

- **Edad:** (Variable cuantitativa discreta)
- **Sexo:** (Variable cualitativa nominal dicotómica)

✓ **Variables clínicas**

- **Clínica predominante.** (Variable cualitativa nominal no dicotómica)
- **Serología:** Basada en la determinación de Ac IgA antitransglutaminasa, Ac IgA antiendomisio y Ac Ig G anti-péptidos de gliadina deaminados (DGP). En función del resultado, se clasificó cada tipo de prueba

serológica en positiva, negativa o no realizada. (Variable cualitativa nominal no dicotómica).

- **Tipaje HLA:** Se clasificó como positivo, si estaba presente el HLA DQ2, DQ8 o ambos, negativo si no estaba presente ninguno y/o no realizado. (Variable cualitativa nominal no dicotómica).
- **Estudio de H.Pylori:** Se clasificó como positivo, negativo o no realizado. (Variable cualitativa nominal no dicotómica).

La información de las biopsias de los pacientes introducidos en el estudio, se obtuvo a partir de los informes anatómo-patológicos realizados por los patólogos del servicio. Así, a partir de estos documentos, se pudieron obtener los siguientes datos:

- **Número de fragmentos recibidos por caso** (Variable cuantitativa discreta)
- **Número de linfocitos intra-epiteliales por 100 enterocitos:** Si el número de linfocitos intra-epiteliales por 100 enterocitos vellositarios era igual o mayor a 30×100 se consideraba positivo para linfocitosis y si era inferior, negativo. (Variable cualitativa nominal dicotómica)
- **Grado de atrofia:** Se clasificó en normal, leve, moderada o grave. (Variable cualitativa ordinal)
- **Grado de lesión según la clasificación de Marsh-Oberhuber:** Dividido en 0, 1, 2, 3a, 3b y 3c. (Variable cualitativa ordinal)

Por último, se volvieron evaluar las biopsias por un observador distinto a los patólogos responsables de dichos informes, con el objetivo de obtener una información más completa y actualizada según la revisión bibliográfica realizada de las características anatómo-patológicas de dichas muestras. Esta nueva evaluación se llevó a cabo siguiendo una serie de criterios que dieron lugar a los siguientes datos:

- **Orientación:** Se evaluó la orientación en función de los criterios de Drut.R¹⁸ que determinan que un fragmento está bien orientado cuando es posible reconocer 3 criptas y 3 vellosidades en toda su longitud. Si se cumplían dichos criterios, se consideraba que el fragmento estaba

bien orientado y si no los cumplían, se consideraba que estaba mal orientado. (variable cualitativa nominal dicotómica)

- **Número de linfocitos intraepiteliales por 100 enterocitos vellositarios:** El conteo linfocitario se realizó gracias al uso de un marcador inmunohistoquímico CD3 que, al teñir los linfocitos CD3+, resalta su presencia del resto de estructuras y facilita su contabilización. La cuantificación se realizó de forma directa debido a la imposibilidad de utilizar técnicas más modernas, precisas y cómodas, como los métodos de cuantificación automática y las técnicas basadas en la captura de imágenes por microscopio de scanner digital. En relación a la presencia de linfocitosis intraepitelial, se consideraron como positivos todos los valores iguales o superiores a 30 x 100 linfocitos intraepiteliales, y como negativos todos los valores inferiores a dicho valor. (variable cualitativa nominal dicotómica)
- **Número de linfocitos intraepiteliales por 20 enterocitos situados en la punta de la vellosidad:** El conteo se ha hecho con el mismo método descrito anteriormente pero esta vez, contando solamente los linfocitos intra-epiteliales presentes en la punta vellositaria. La región de la punta vellositaria se delimitó utilizando como referencia el enterocito del ápex. A partir de este punto, se contaron los 10 enterocitos a su derecha y los 10 enterocitos a su izquierda. Con este enfoque, solo se tuvo en cuenta como positivo si el valor obtenido era igual o superior a 5 linfocitos intraepiteliales por 20 enterocitos en 5 vellosidades distintas (resultado positivo) o como negativo si era inferior. (variable cualitativa nominal dicotómica)
- **Grado de atrofia vellositaria:** Para determinar el grado de atrofia se calculó la relación cripta-vellosidad, midiendo la altura vellositaria y la altura criptal y estableciendo su cociente. Así, una relación proporcional vellosidad/cripta de 3:1 o superior se consideró normal, una relación 2:1 se consideró atrofia leve, una relación 1:1 se consideró atrofia moderada y la visualización de una mucosa sin vellosidades, se consideró como atrofia grave. (Variable cualitativa ordinal)

- **Escala Marsh:** En base a los datos obtenidos en lo referente a la linfocitosis, la hiperplasia y el grado de atrofia se clasificaron a las muestras según la escala de Marsh-Oberhuber en 1, 2, 3a, 3b y 3c. (variable cualitativa ordinal)

Nota: Para la realización de los estudios de contraste de hipótesis y de variabilidad inter-observador, las categorías de la escala de Marsh se agruparon en grados 1,2 y 3 así como el grado de atrofia, en normal, leve y moderado/grave con el objetivo de facilitar el estudio estadístico

3.1 Análisis estadístico

El análisis descriptivo, aporta para las variables cualitativas, las frecuencias relativas y absolutas y para las variables cuantitativas, la media y la desviación estándar (DE).

Para los estudios de contraste de hipótesis, se aplicó el test de Chi-Cuadrado, indicado para mostrar la relación entre variables cualitativas independientes como son:

- La lesión de tipo Marsh 1 y la infección por H.pylori
- El contaje linfocitario por 100 enterocitos vellositarios y el contaje por 20 enterocitos situados en la punta

Para el estudio de variabilidad inter-observador se realizó la determinación del índice kappa de Cohen que relaciona el acuerdo que exhiben los observadores, más allá del debido al azar en variables cualitativas.

Las variables estudiadas fueron:

- El contaje linfocitario por 100 enterocitos vellositarios
- El grado de atrofia
- El tipo de lesión según la escala de Marsh-Oberhuber

Para toda la investigación se estableció el nivel de significación estadística para un p valor menor a 0,05 y se utilizó el programa estadístico SPSS v22.0 (licencia Universidad de Zaragoza).

4. RESULTADOS

Se incluyeron 40 pacientes cuya media de edad era de 43 años (DE: 18.107) con un rango de edades situado entre 18 y 77 años. De ellos 10 (25%) eran varones y 30 (75%) mujeres.

Las **características clínicas** más referidas en nuestra muestra fueron la diarrea y la dispepsia, con 12 individuos respectivamente (30%) mientras que la anemia ferropénica, fue el tercer hallazgo más frecuente, presentándose en 7 individuos (17,5%). La epigastralgia estuvo presente en 3 individuos (7,5%), el déficit de vitamina B12 y el dolor abdominal bajo en 2 individuos (5%) y la alteración del ritmo intestinal y la pirosis, en 1 individuo (2,5%) respectivamente. (**Gráfico 1**)

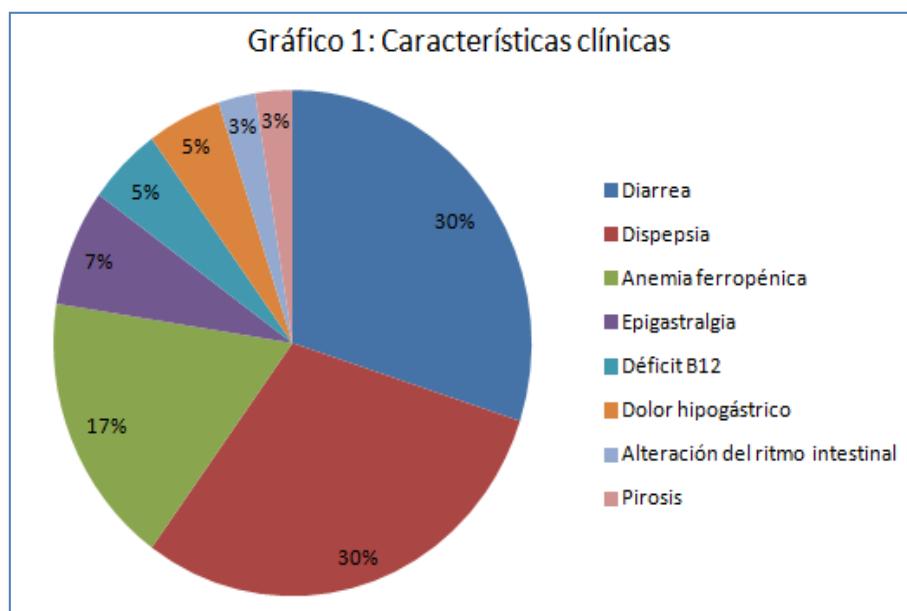


Gráfico 1: Distribución de las características clínicas principales de la muestra
Fuente: Elaboración propia

Sólo 4 individuos (10%) de la muestra fueron positivos para las 3 **pruebas serológicas** evaluadas, mientras que otros 4 individuos (10%) presentaron únicamente un resultado positivo en el anticuerpo de clase IgG anti-péptidos de gliadina deaminados (DGP). Por lo tanto, el resto de la muestra, conformada por 32 individuos (80%) presentó un resultado negativo o no se les fue realizada alguna de las pruebas serológicas establecidas.

Respecto al **tipaje HLA**, 31 individuos (77,5%) presentaron un resultado positivo, más concretamente, 23 (57,5%) fueron DQ2 positivos, 6 (15%) fueron DQ8 positivos y 2 (5%) fueron DQ2/DQ8 positivos. Del total de la muestra, 5 individuos (12,5%) presentaron un resultado negativo y a 4 (10%) no se les realizó la prueba

A 34 individuos de la muestra se les solicitó en algún momento una prueba para determinar **la presencia de H.Pylori**, resultando positiva en 5 individuos (12,5%) y negativa en 29 (72,5%).

La mayoría de las muestras histológicas evaluadas en nuestro trabajo (87,5%) presentaron **4 fragmentos** o más, de mucosa duodenal, mientras que solo un 12,5% presentó menos. En todos los casos, al menos 1 fragmento procedía del bulbo duodenal.

La revisión de los informes anátomo-patológicos relativos a dichas muestras, reflejó que 32 muestras (80%), tenían un número de **linfocitos intraepiteliales** por 100 enterocitos vellositarios igual o superior al 30%.

De este grupo, 14 (35%) no presentaron signos de **atrofia**, por 18 (45%) que se asociaron a algún grado de atrofia vellositaria. Así, en 14 muestras (35%) se encontraron signos de atrofia leve, en 3 (7,5%) de atrofia moderada y en 1 muestra (2,5%) de atrofia grave. Por tanto, la mayoría de los informes revisados reflejaron grados de lesión de grado 3a de la escala de Marsh-Oberhuber. La lesión grado 1 fue la segunda más frecuente, seguida de las lesiones de grados 3b, 2 y 3c. (Grado 1: 30%, Grado 2: 5%, Grado 3a: 35%, Grado 3b: 7,5% y Grado 3c: 2,5%)

En las 8 muestras restantes (20%) no se encontraron signos de linfocitosis por lo que se clasificaron como grado 0 de Marsh (**Gráfico 2**).

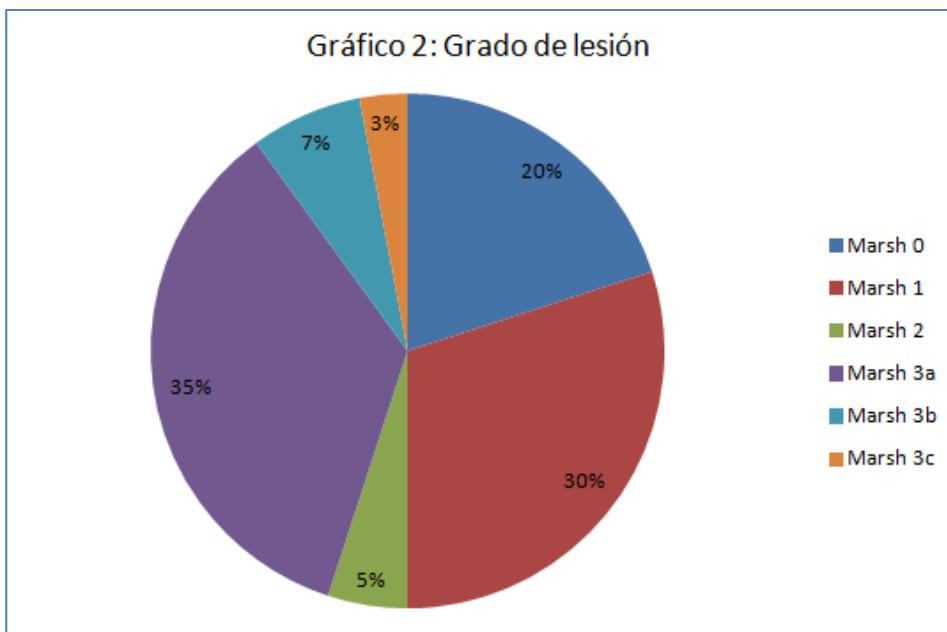


Gráfico 2: Distribución de los grados de lesión según la escala de Marsh encontrados en los pacientes de la muestra

Fuente: Elaboración propia

Del total de la muestra, sólo 7 (17,5%) de los pacientes estudiados cumplieron criterios clínicos, serológicos, genéticos y anatómo-patológicos de enfermedad celiaca. De estos, la mayor parte presentaba como clínica diarrea y dispepsia, objetivándose lesiones de tipo 3 en la escala de Marsh, en la totalidad de ellos (Marsh 3a: 3 individuos; Marsh 3b: 3 individuos; Marsh 3c: 1 individuo). **(Gráfico 3)**

En aquellos que no cumplían criterios serológicos o bien no cumplían criterios genéticos, el tipo de lesión más frecuente fue la de tipo 1 que la presentaron 12 individuos (30%) seguida de la lesión de tipo 3a que la presentaron 11 individuos (27,5%) y la lesión de tipo 2, que la presentaron 2 individuos (5%). Los 8 individuos restantes (20%) no presentaron ningún tipo de lesión en el estudio anatómo-patológico. **(Gráfico 4)**

Gráfico 3: Pacientes con pruebas serológicas y genéticas positivas

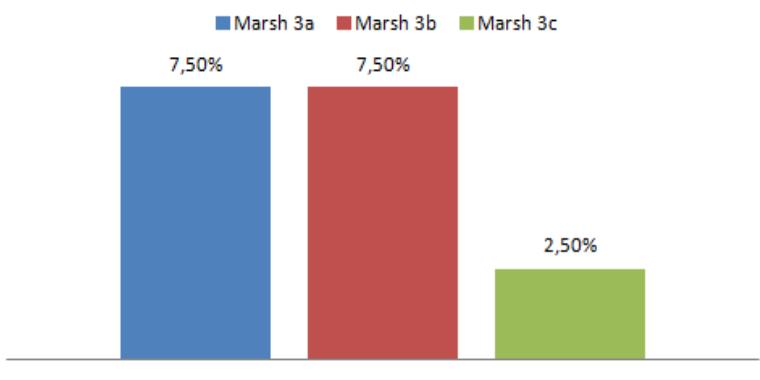


Gráfico 3: Distribución de los grados de lesión según la escala de Marsh encontrados en los pacientes con pruebas serológicas y genéticas positivas.

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 4: Pacientes con pruebas serológicas y genéticas negativas

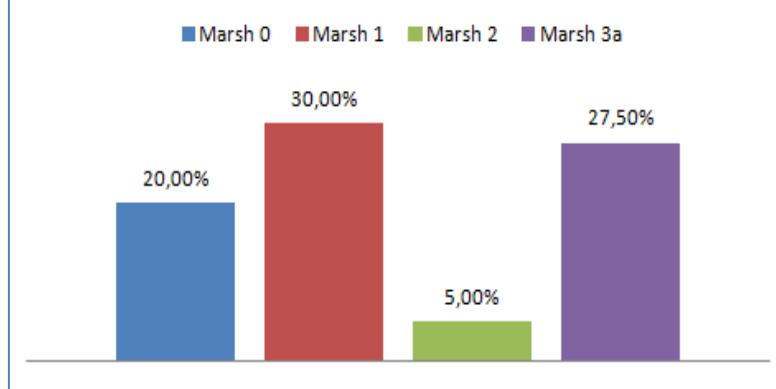


Gráfico 4: Distribución de los grados de lesión según la escala de Marsh encontrados en los pacientes con pruebas serológicas y genéticas negativas.

Fuente: Elaboración propia

La revisión de las muestras permitió evaluar la orientación de los fragmentos de cada una de ellas. Así, de 174 fragmentos evaluados relativos a las 40 muestras estudiadas, se determinó que solo 53 fragmentos (30,3%) presentaron una orientación correcta, frente a 122 (69,7%) que no cumplían los criterios de buena orientación (**Gráfico 5**). En 6 (15%) de las muestras, ningún fragmento cumplía criterios de buena orientación, 26 (65%) muestras presentaban menos de la mitad de los fragmentos bien orientados, 4 (10%) muestras presentaban la mitad de los fragmentos con bien orientación y solo 4

(10%) muestras presentaban una buena orientación en más de la mitad de los fragmentos (**Gráfico 6**).

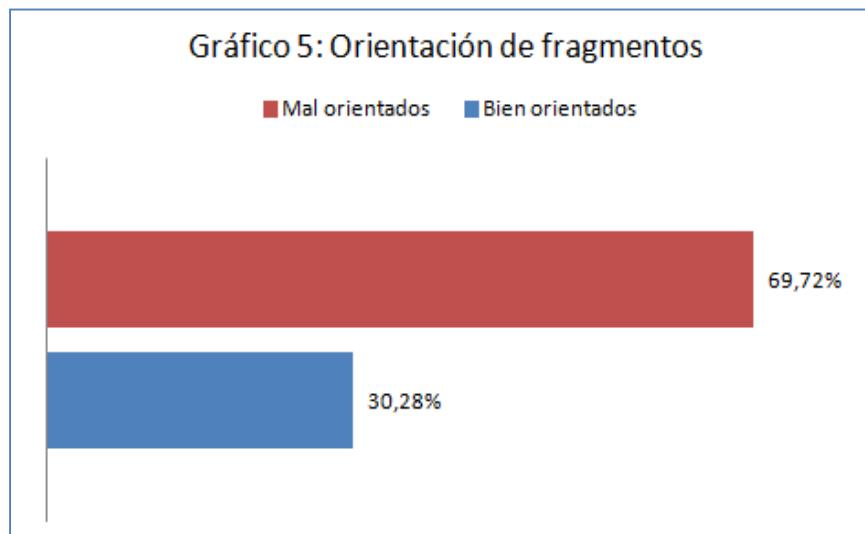


Gráfico 5: Orientación de los fragmentos evaluados en el estudio

Fuente: Elaboración propia

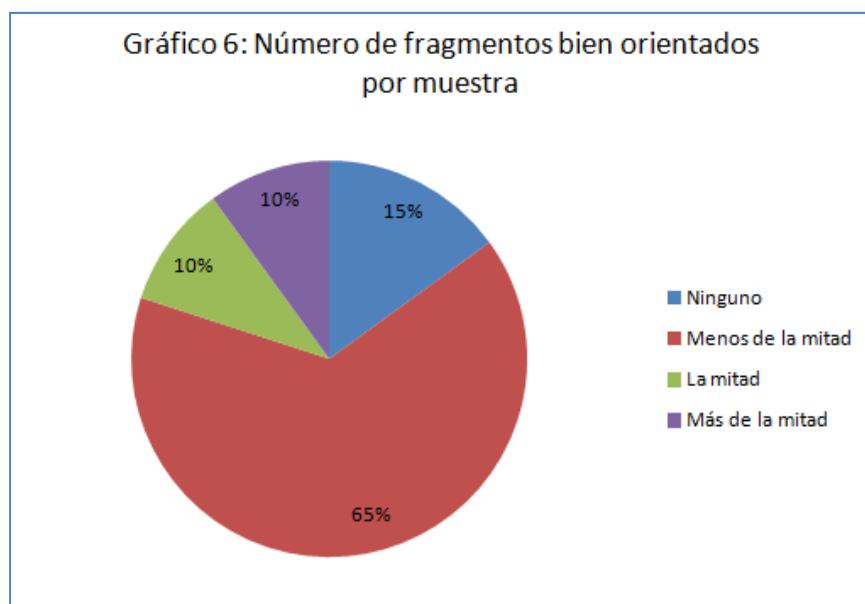


Gráfico 6: Características las muestras en función de la orientación de sus fragmentos

Fuente: Elaboración propia

4.1 Estudio de contraste de hipótesis

Se estudió la relación entre la presencia de *H.pylori* y la lesión Marsh 1 de nuestra muestra encontrándose una asociación estadísticamente significativa por el test de Chi Cuadrado ($p=0,019$) entre dichas variables.

De la misma manera, se evaluó si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos al realizar un conteo linfocitario por 100 enterocitos

vellositarios y los obtenidos al realizar esta misma cuantificación en 20 enterocitos situados en la punta de la vellosidad, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativa entre ambas variables según el test de Chi Cuadrado ($p<0,001$).

Sin embargo, debido al bajo número de efectivos, los resultados de los test estadísticos se deberán interpretar con cautela.

4.2 Variabilidad inter-observador

Se estudió la variabilidad inter-observador existente a la hora de evaluar las siguientes variables:

- **Linfocitosis intraepitelial vellositaria por 100 enterocitos:** El grado de concordancia inter-observador es del 85% con un índice kappa de 0,53 (concordancia moderada)
- **Atrofia vellositaria:** El grado de concordancia es del 70% con un índice kappa de 0,48 (concordancia moderada)
- **Grado de lesión según la escala de Marsh:** El grado de concordancia es del 82,7% con un índice kappa de 0,68 (concordancia buena)

5. DISCUSIÓN

El análisis de los resultados de este trabajo muestra el pequeño porcentaje de individuos (17,5%) que cumple todos los criterios diagnósticos de enfermedad celiaca. De hecho, del total de la muestra estudiada, solo el 20% presentó datos serológicos positivos y hasta un 22,5% de la muestra, no presentó resultados positivos para el HLA DQ-2 o DQ-8.

Una de las explicaciones a estos hallazgos radica en el hecho de que, en muchos de los casos, la obtención de la biopsia duodenal para el estudio de EC, se realizó en situaciones en las que la motivación principal del estudio endoscópico no fue el diagnóstico de celiaquía. Así, la biopsia duodenal se obtuvo para descartar la EC de forma secundaria, solicitándose a posteriori las pruebas serológicas o genéticas necesarias para realizar el diagnóstico. De esta manera, se solicitó un estudio anatómo-patológico en pacientes que

claramente no mostraban indicios desde el punto de vista serológico y genético de presencia de enfermedad.

Por otra parte, los resultados serológicos obtenidos, también pueden ser debidos al hecho ya mencionado anteriormente, de la existencia de falsos negativos en las pruebas serológicas². Esta circunstancia es tenida en cuenta por los especialistas en aparato digestivo que solicitan el estudio anátomo-patológico, pese al resultado negativo de las pruebas serológicas en pacientes en los que la sospecha de EC es muy fundada. También existe la posibilidad de que una gran mayoría de los pacientes con serología negativa, padecieran lo que se conoce como sensibilidad al gluten. Este tipo de trastorno hace referencia a aquellas personas con clínica positiva tras la ingesta de gluten, que responden a una dieta sin gluten pero que carecen de pruebas serológicas o genéticas positivas⁴.

Desde el punto de vista anátomo-patológico, es importante destacar que la mayoría de los casos con serología o tipaje HLA negativo, presentó una lesión tipo 1 o 3a de Marsh. La lesión tipo 1 de Marsh hace referencia al término; duodenitis linfocítica.

La duodenitis linfocítica, es un tipo de lesión poco específica de EC caracterizada por la presencia de un número anormal de linfocitos intraepiteliales en ausencia de alteraciones morfológicas vellositarias¹⁹. Las causas de este tipo de lesión son múltiples, por lo que realizar un diagnóstico diferencial es bastante complejo. Aparte de la EC, este tipo de lesión puede darse en distintas patologías como infección por H.Pylori, sobrecrecimiento bacteriano, infecciones víricas y parasitarias, sensibilidad celiaca, déficit de IgA, inmunodeficiencia común variable y enfermedad de Crohn entre otras. Además, está relacionada con la toma de ciertos medicamentos, especialmente los AINES (Anti-inflamatorios no esteroideos).¹⁹⁻²¹

Existen multitud de trabajos en la literatura que analizan el papel de la duodenitis linfocítica en la enfermedad celiaca y otras patologías. Un ejemplo es el estudio llevado a cabo por Kakar et al²², que analizó a 43 pacientes con duodenitis linfocítica, de los cuales solo un 9% fueron celíacos, encontrando una relación con la toma de AINES en un porcentaje destacable (14%).

En otro estudio (Santolaria et al²¹), siguió a 194 pacientes con duodenitis linfocítica, siendo diagnosticados en su mayor parte (71.5%) de enfermedad celiaca y/o sobrecrecimiento bacteriano. En aquellos que presentaron HLA DQ2/DQ8 positivos, el diagnóstico más frecuente fue el de enfermedad celiaca (46.7%) seguido de sobrecrecimiento bacteriano e infección por *H.pylori* con un 17.5% y un 9.1% respectivamente, mientras que en aquellos que presentaron HLA DQ2/DQ8 negativos, el diagnóstico más frecuente fue el de sobrecrecimiento bacteriano (43.8%), seguido de la infección por *H.pylori* (21.9%) y la toma de AINES (19.4%). Aziz et al²³, en un estudio etiológico acerca de las causas de duodenitis linfocítica en 100 pacientes, establecieron solamente el diagnóstico de EC en el 16% de la muestra.

Por tanto, estos datos reflejan que la lesión de tipo Marsh 1 es un hallazgo histológico altamente inespecífico en lo que refiere al diagnóstico de la EC. De hecho, en nuestro estudio existe una llamativa asociación entre infección por *H.Pylori* y lesión Marsh 1, lo que indicaría la posibilidad de que la lesión tipo Marsh 1 fuera debida en muchos de los pacientes, a una infección por *H.Pylori* y no a una patología propia del espectro de la enfermedad celiaca. Por ello, sería recomendable valorar en aquellos pacientes sospechosos de enfermedad celiaca con tipaje HLA positivo, la respuesta a una dieta libre de gluten²¹.

Existen determinadas pruebas descritas en la literatura, que intentan dar un poco de luz al diagnóstico de enfermedad celiaca en pacientes con duodenitis linfocítica. Estas pruebas son la determinación de linfocitos intraepiteliales $\gamma\delta^+$ y la determinación de depósitos subepiteliales de transglutaminasa tisular IgA²¹.

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$, son un subtipo de linfocito T minoritario en el organismo cuya proporción, en pacientes con EC, se encuentra aumentada a nivel intraepitelial, independientemente del grado de lesión y del tipo de dieta seguida hasta el momento de la determinación. Este aumento de linfocitos $\gamma\delta^+$ no se ha observado en otras enfermedades intestinales comunes, siendo la EC, la única patología en la que este subtipo linfocitario se eleva de forma permanente e intensa²⁴.

Por otra parte, la determinación de los depósitos sub-endoteliales de transglutaminasa tisular IgA ha resultado ser igualmente útil en casos dudosos.

Estos auto-anticuerpos se encuentran presentes a nivel sub-epitelial, antes incluso de que sean detectados en sangre por las pruebas serológicas, en aquellos pacientes con enfermedad celiaca no tratada²⁵. En algún trabajo, se obtienen cifras de sensibilidad y especificidad del 100% y 82% respectivamente, para el diagnóstico de patología celíaca²⁶.

Sin embargo, la utilización de este tipo de pruebas tiene ciertos inconvenientes. Por un lado, la determinación de linfocitos T γδ+, se realiza por citometría de flujo y esta técnica no está disponible en todos los hospitales y, por otro lado, para la determinación de depósitos sub-endoteliales de transglutaminasa tisular IgA, se necesitan muestras frescas o congeladas a -70 C°, por lo que implementar esta prueba en la práctica clínica diaria es verdaderamente difícil.²¹

Respecto a las lesiones de tipo Marsh 2 y Marsh 3a asociadas a pruebas serológicas negativas, nos encontramos ante una situación en la que observamos muestras con signos de atrofia o hiperplasia criptal pero que paradójicamente, no se ven apoyados por otras pruebas diagnósticas. En este caso, vuelve a existir la posibilidad de que haya algún falso negativo en las pruebas clínicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta la influencia que ha podido tener la incorrecta orientación de los fragmentos recibidos en la interpretación de los mismos, haciendo pensar que casos sin alteración estructural real hayan sido considerados como con lesión histopatológica.

Esta circunstancia es tremadamente importante, ya que la orientación de las muestras resulta vital para su correcta interpretación, siendo crucial a la hora de establecer la relación cripta/vellosidad y el grado de atrofia presente. Por tanto, es muy probable que una gran mayoría de las lesiones del tipo Marsh 3, fueran en realidad lesiones de tipo Marsh 1 o Marsh 0 debido a una mala interpretación resultante de una orientación deficiente.

De hecho un estudio llevado a cabo por Taavela et al²⁷, reflejó como todos los patólogos que participaron en él, catalogaron una misma muestra como lesión tipo Marsh 1 o lesión tipo Marsh 3 en función de si el corte fue llevado a cabo de forma perpendicular o tangencial. Por lo tanto, la buena o mala orientación de una muestra es fundamental para su correcta evaluación.

Orientar bien las muestras obtenidas de la mucosa duodenal es una labor difícil que ha supuesto un gran problema no solo en este trabajo sino en otros²⁷⁻²⁸. De hecho, se considera que la mala orientación es la causa más común de artefactos en las muestras de mucosa duodenal en la práctica clínica. Por ello, conseguir que la muestra llegue bien orientada al patólogo supone un reto, tanto para el endoscopista como para todos los que manipulan la muestra hasta su estudio histológico. En relación a ello, se han desarrollado ciertas estrategias con el objetivo de mejorar la orientación de las muestras, entre las que destaca el uso de filtros de celulosa. Gracias a este material, los fragmentos previamente orientados por el endoscopista con la ayuda de un esteromicroscopio, se quedan adheridos al papel de filtro para su posterior inclusión en parafina mejorando de esta manera, su estudio anátomo-patológico. Este método parece haber tenido resultado en el hospital St Mark de Londres donde se ha implantado. Sin embargo, llevarlo a cabo requiere un adiestramiento previo del personal relacionado y una mayor dedicación de tiempo, por lo que su implantación puede resultar costosa.²⁸

Al igual que la orientación, la localización y el número de los fragmentos por muestra han podido influir en los resultados mencionados anteriormente. La razón de ello es que, pese al gran porcentaje de muestras estudiadas (87.5%) con un número de fragmentos adecuados para el estudio (al menos 4 por caso), no se observaron unos criterios uniformes a la hora de elegir el sitio donde se extraía la biopsia. Este hecho influye negativamente en la interpretación anátomo-patológica de las muestras debido a la distribución parcheada de la lesión en la enfermedad celiaca y las diferencias histológicas encontradas entre las distintas regiones del duodeno.²⁹⁻³¹

En la literatura, son muchos los trabajos que estudian la repercusión que tiene la utilización de una localización u otra para la toma de biopsias, en el diagnóstico anátomo-patológico de la EC. Un ejemplo de ello, es el estudio de Kurien et al²⁹, en el que se comparó un grupo control con un grupo de pacientes celíacos a los cuales, se les tomo 8 biopsias, 4 procedentes del bulbo duodenal y 4 de la segunda porción del duodeno. Las biopsias procedentes del bulbo duodenal se tomaron siguiendo la posición de las agujas del reloj (a las 3, a las 6, a las 9 y a las 12) con el paciente en posición lateral

izquierda. Los resultados de este estudio mostraron, por una parte, que la sensibilidad diagnóstica de las biopsias del bulbo duodenal tomadas a las 9h y a las 12 era superior a las tomadas a las 3 y a las 6 (82,1% y 85,7% frente a 60,7% y 64,3% respectivamente). Por otra parte, que al añadir a las biopsias bulbares tomadas a las 9 o a las 12, las 4 biopsias procedentes de la segunda porción del duodeno, la sensibilidad se elevaba hasta el 96,4% en ambos casos.

Otro estudio, llevado a cabo por Evans et al³⁰, comparo de igual manera, un grupo control con un grupo de pacientes celiacos compuesto por enfermos de nuevo diagnóstico y enfermos ya conocidos. En ambos grupos, se tomaron 5 biopsias, 1 biopsia del bulbo duodenal y 4 biopsias de la segunda porción del duodeno. Al añadir la biopsia bulbar, la tasa de detección de atrofia vellositaria se incremento en un 9% en los pacientes de nuevo diagnóstico y en un 14% en los pacientes ya diagnosticados, por lo que se considero necesario la toma de al menos una biopsia bulbar para el diagnóstico de enfermedad celiaca.

De igual forma, un estudio realizado por Gonzalez et al³¹ mostró cómo al 13% de los pacientes celiacos, se les realizó el diagnóstico de la enfermedad únicamente con una biopsia procedente del bulbo duodenal. Al comparar las biopsias procedentes del bulbo duodenal y las de la segunda porción del duodeno, solamente el 35% de estas, mostraron un grado similar de lesión según la escala de Marsh. Además, este estudio reflejó, no solo la naturaleza parcheada de la atrofia vellositaria, sino que encontró este mismo patrón a la hora de evaluar el grado de linfocitosis intraepitelial, ya que hasta en un 30% de los pacientes presentó una discordancia entre el grado de linfocitosis existente en el bulbo y el existente en regiones más distales del duodeno.

Por ello, es fundamental la localización que se elige a la hora de tomar la biopsia. La falta de uniformidad existente en este ámbito, junto con la deficiente orientación, influyeron de forma crucial en los resultados de este estudio, dando lugar a resultados discordantes entre el examen anatómopatológico y las pruebas serológicas.

Otro aspecto importante que se analizó en este trabajo, en relación al diagnóstico anatómopatológico de la EC, es el relativo al conteo linfocitario.

Así, no hemos encontrado diferencias significativas entre el conteo linfocitario por 100 enterocitos vellositarios y el conteo linfocitario por los 20 enterocitos constituyentes de la punta de la vellosidad. Este hallazgo va en la misma dirección que otros estudios que consideran el conteo linfocitario en la punta vellositaria un método fiable y rápido, que puede facilitar el trabajo del patólogo en la práctica clínica, por lo que puede ser utilizado en la práctica diaria¹⁰. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la labor del patólogo, a la hora de valorar tanto el contaje linfocitario como el grado de atrofia, está sujeta a cierto grado de subjetividad.

En este sentido, nosotros hemos encontrado grados moderados de concordancia inter-observador a la hora de valorar la linfocitosis y el grado de atrofia (índice kappa de 0,531 y 0,486 respectivamente) y un grado de concordancia bueno (índice kappa de 0,678) a la hora de valorar el tipo de lesión según la escala de Marsh. Estos resultados no se diferencian mucho de los encontrados por otros trabajos que evaluaban el grado de concordancia inter-observador en relación a la escala de Marsh como los de Mubarak et al¹⁷ y Weile et al³² que mostraron índices kappa de 0,486 y de 0,53-0,57 respectivamente. Por lo que, la subjetividad del patólogo que examina la muestra juega un papel en el diagnóstico de esta enfermedad.

Para intentar solucionar esto, se ha desarrollado otras clasificaciones, como la de Corazza y Villanaci¹⁷ mencionada anteriormente, que simplifica los tipos de lesiones y facilita la clasificación de la enfermedad celiaca y la comunicación entre los distintos especialistas. Sin embargo, la falta de estudios concluyentes acerca de la validez de esta clasificación desaconseja por el momento su uso en la práctica clínica diaria¹³.

5.1 Limitaciones del estudio

Los resultados expuestos han de ser interpretados atendiendo algunas limitaciones del presente estudio. El tamaño muestral es pequeño, por lo que la extrapolación de los resultados de este estudio a la población general es dudosa. Además, no se pudo determinar si los pacientes respondían o no a una dieta libre de gluten o si habían estado expuestos a AINES o a otro medicamento los días previos a la realización de la biopsia, lo que en muchos

de los casos hubiera proporcionado una información muy valiosa en lo que al diagnóstico de la EC se refiere. Por otra parte, la segunda evaluación de las muestras no se realizó por un patólogo experto, sino por un estudiante previamente adiestrado por lo que los resultados de esta segunda observación, deben ser cautelosamente interpretados.

6. CONCLUSIÓN

En definitiva, el estudio anátomo-patológico de la enfermedad celiaca es algo complejo ya que las lesiones histológicas que presentan estos pacientes mimetizan las que se producen en otras enfermedades y la exactitud del examen llevado a cabo por el patólogo está sujeta no solo a la experiencia del mismo, sino a la calidad de muestra que recibe.

Para mejorar el rendimiento diagnóstico de este examen, es necesario, implantar protocolos tanto para obtener y orientar las muestras como para su mejor evaluación, con el objetivo de garantizar una metodología adecuada y protocolizada según unos criterios uniformes de valoración.

En base a la revisión realizada en este estudio, presentamos un protocolo diagnóstico (**Anexo 1**) que para su posible consideración proponemos al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Lozano Blesa de Zaragoza y que si fuera aprobado e implantado, podría ser de ayuda a los patólogos a la hora de estudiar las biopsias duodenales.

Además, ello anima a la colaboración entre los servicios de anatomía patológica y de digestivo con el fin de mejorar tanto la calidad de la muestra que recibe el patólogo, como la de la información diagnóstica que recibe el especialista en digestivo. De esta manera, se mejoraría el control de la calidad diagnóstica del examen anátomo-patológico el cual, deberá interpretarse siempre en relación a la información clínica, serológica y genética del paciente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Begoña Remacha de la Unidad de Enfermedad Celíaca del Servicio de Digestivo del HCU Lozano Blesa y a la Dra. Patricia Carrera del CIBERehd, que dirige el Dr. Ángel Lanas toda la ayuda prestada, en los aspectos clínico e informático respectivamente, para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Villanacci V, Ceppa P, Tavani E, Vindigni C, Volta U. Coeliac disease: The histology report. *Digestive and Liver Disease*. 2011; 43(SUPPL. 4): S385-S395.
2. Castillo N, Theethira T, Leffler D. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology Report* 2015; 3(1): 3-11.
3. Reilly N, Green P. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Seminars in Immunopathology*. 2012; 34(4): 473-478.
4. Fasano A, Catassi C. Celiac disease. *New England Journal of Medicine*. 2012; 367(25): 2419-2426.
5. Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol*. 2009; 29; 9:49.
6. Walker M, Murray J. An update in the diagnosis of coeliac disease. *Histopathology*, 2011; 59(2): 166-179.
7. Ludvigsson J, Leffler D, Kelly C, Bai J, Biagi F, Ciacci C, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013; 62(1): 43-52
8. Bao F, Green P, Bhagat G. An Update on Celiac Disease Histopathology and the Road Ahead. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2012; 136(7): 735-745.
9. Nenna R, Petrarca L, Mennini M, Mastrogiovio G, Bonamico M, Magliocca F, et al. Duodenal bulb in celiac adults: The "whether biopsying" dilemma. *Journal Of Clinical Gastroenterology*. April, 2012; 46(4): 302-307
10. Walker M, Talley N. Clinical value of duodenal biopsies - Beyond the diagnosis of coeliac disease. *Pathology Research and Practice*. 2011; 207(9): 538-544
11. Hayat M, Cairns A, Dixon MF, O'Mahony S. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal?. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;55:393-4
12. Goldstein NS, Underhill J. Morphologic features suggestive of gluten sensitivity in architecturally normal duodenal biopsy specimens. *American Journal of Clinical Pathology*. 2001;116; 63-71
13. Datta Gupta S. Pathology of celiac disease: a brief review. *Tropical Gastroenterology*. 2013; 34(4): 207-226
14. Drut R. Actualización En Patología: Contribución del patólogo en el diagnóstico de enfermedad celíaca. Comentarios sobre recientes avances. *Revista Espanola de Patología*. 2011; 44179-181.
15. Ensari A. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): Controversies in diagnosis and classification. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2010; 134(6): 826-836.
16. Corazza G, Villanacci V, Zambelli C, Milione M, Luinetti O, Donato F, et al. Comparison of the interobserver reproducibility with different histologic criteria used in celiac disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2007; 5(7): 838-843.
17. Mubarak A, Houwen R, Nikkels P, Ten Kate F. Reproducibility of the histological diagnosis of celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2011; 46(9): 1065-1073.
18. Drut R. El diagnóstico histopatológico de la enfermedad celíaca (EC). VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Octubre de 2006
19. Hammer STG, Greenson JK. The clinical significance of duodenal lymphocytosis with normal villus architecture. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2013; 137(9):1216-1219
20. Pai RK. A practical approach to small bowel biopsy interpretation: celiac disease and its mimics. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2014; 31(2):124-36.

21. Santolaria S, Dominguez M, Alcedo J, Abascal M, García-Prats MD, Marigil M, Vera J, Ferrer M, Montoro M. Lymphocytic duodenitis: etiological study and clinical presentations. *Gastroenterología y Hepatología*. 2013; 36(9):565-73
22. Kakar S, Nehra V, Murray JA, Dayharsh GA, Burgart LJ. Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosal architecture. *American Journal of Gastroenterology*. 2003; 98(9):2027-33
23. Aziz I, Evans KE, Hopper AD, Smillie DM, Sanders DS. A prospective study into the aetiology of lymphocytic duodenitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2010; 32(11-12):1392-7
24. Leon F. Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Journal of Immunological Methods*. 2011; 363: 177-86
25. Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Király R, Kovács JB, Fésüs L et al. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by celiac autoantibodies. *Gut*. 2004; 53: 641-8.
26. Koskinen O, Collin P, Lindfords K, Laurila K, Mäki M, Kaukinen K. Usefulness of small bowel mucosal transglutaminase-2 specific antibody deposits in the diagnosis and follow-up of celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2010; 44: 483-8.
27. Taavela J, Koskinen O, Huhtala H, Lähdeaho MJ, Popp A, Laurila K, Collin P, Kaukinen K, Kurppa K, Mäki M. Validation of morphometric analyses of small-intestinal biopsy readouts in celiac disease. *PLoS One*. 2013; 8(10)
28. Ravelli R, Villanacci V. Tricks of the trade: How to avoid histological pitfalls in celiac disease. *Pathology-Research and Practice*. 2012; 208(4):197-202
29. Kurien M, Evans KE, Hopper AD, Hale MF, Cross SS, Sanders DS. Duodenal bulb biopsies for diagnosing adult celiac disease: is there an optimal biopsy site?. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2012;75:1190-6
30. Evans KE, Aziz I, Cross SS, Gursharan RK, Hopper D, Hadjivassiliou M, Sanders DS. A prospective study of duodenal bulb biopsy in newly diagnosed and established adult celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2011; 106:1837-1842
31. Gonzalez S, Gupta A, Cheng J, Tennnyson C, Lewis SK, Bhagat G, Green PHR. Prospective study of the role of duodenal bulb biopsies in the diagnosis of celiac disease. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2010; 72:758-65
32. Weile B, Hansen BF, Hagerstrand I, Hansen JP, Krasilnikoff PA. Interobserver variation in diagnosing coeliac disease. A joint study by Danish and Swedish pathologists. *APMIS*. 2000; 108:380-4.

ANEXO 1

PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

DATOS DE LA MUESTRA

Número de biopsia:

Número de fragmentos por muestra:

Localización de fragmentos: Bulbo duodenal: Nº ___ 2^a porción duodenal: Nº ___

Otra: _____

Orientación: Fragmentos bien orientados Nº ___ Fragmentos mal orientados Nº ___

EVALUACIÓN DE LA BIOPSIA

Linfocitos Intraepiteliales: Normal Aumentados

Normal: Menos de 30 LIE x 100 enterocitos o menos de 5 LIE x 20 enterocitos en la punta

Aumentado: Mayor o igual a 30 LIE x 100 enterocitos o mayor o igual de 5 LIE x 20 enterocitos en la punta

Hiperplasia criptal: Ausente Presente

Relación vellosidad/cripta: 3/1 o superior 2/1 1/1 <1/1

Atrofia Vellostaria: No Leve Moderada Grave

Otros cambios en la lámina propia: No Sí_____ (Citar cuales)

Grado de lesión según Marsh: 0 1 2 3a 3b 3c

Comentarios: _____