



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 285 155**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03744496 .5**

(86) Fecha de presentación : **14.02.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1485715**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

(54) Título: **Procedimiento serológico para detectar atrofia de las microvellosidades intestinales en pacientes que padecen enfermedad celíaca.**

(30) Prioridad: **15.03.2002 IT RM02A0144**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

(73) Titular/es: **Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie
Università degli Studi di Cagliari
Via Jenner s/n
09121 Cagliari, IT**

(72) Inventor/es: **De Virgiliis, Stefano y
Clemente, Maria Grazia**

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento serológico para detectar atrofia de las microvellosidades intestinales en pacientes que padecen enfermedad celíaca.

La presente invención se refiere a un procedimiento serológico para detectar atrofia de las microvellosidades intestinales en pacientes que padecen enfermedad celíaca.

Más específicamente la invención se refiere a un procedimiento para detectar atrofia de las microvellosidades intestinales en pacientes que padecen enfermedad celíaca por detección de anticuerpos anti-actina en el suero del paciente.

La diagnosis de la enfermedad celíaca o de la intolerancia permanente al gluten se basa en la demostración de síntomas clínicos de dependencia del gluten, anticuerpos circulantes y lesiones histológicas de la mucosa del intestino. El procedimiento de diagnóstico incluye actualmente llevar a cabo al menos una biopsia de intestino, prueba instrumental invasiva que requiere a menudo sedación o anestesia general (Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Arch Dis Child 1990; 65:909-11).

Las metodologías serológicas actuales para la determinación de anticuerpos anti-gluten, anti-endomisio y anti-transglutaminasa que demuestran la presencia de una reacción autoinmune en sujetos susceptibles, solamente permite sospechar a modo de diagnóstico la enfermedad celíaca y sugerir que se lleve a cabo una biopsia intestinal para confirmar la diagnosis.

Es digno de mención destacar que la expresión de la diagnosis y la prescripción de abstinencia y terapia dietética solamente se pueden llevar a cabo después de la detección de lesiones intestinales.

Adicionalmente en sujetos serológicamente positivos es a menudo difícil que la biopsia intestinal se interprete exactamente porque muestra situaciones variables en comparación con la histología normal (enfermedad celíaca potencial), signos inflamatorios ligeros y no específicos con microvellosidades intestinales normal y grados variables de atrofia de las microvellosidades intestinales.

Además puede que no se distribuyan uniformemente las lesiones dentro de la mucosa intestinal por lo que es posible una mala interpretación dependiendo de las áreas de la mucosa en las que se ha llevado a cabo el muestreo bióptico.

A partir de recientes estudios de los autores de la invención (Clemente MG, Musu MP, Frau F, Busco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S. Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. Gut 2000; 47(4): 520-6) se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-F-actina de suero en pacientes que padecen enfermedad celíaca. Se ha demostrado que la presencia de estos anticuerpos en suero está estrictamente relacionada con la incidencia de atrofia de las microvellosidades intestinales en pacientes que padecen enfermedad celíaca. Sin embargo la metodología descrita no es suficientemente sensible puesto que aproximadamente 20% de los pacientes que padecen atrofia intestinal no se descubren dando como resultado potenciales errores de diagnosis.

Hoy en día no está disponible todavía una prueba no invasiva adecuada que revele la presencia de alteraciones de la mucosa intestinal debidas a enfermedad celíaca y que sea suficientemente sensible y por lo tanto fiable como alternativa a la biopsia intestinal.

En vista de lo anterior es clara por lo tanto la necesidad de proporcionar procedimientos más sensibles para la diagnosis serológica de la atrofia de las microvellosidades intestinales cuando aparece enfermedad celíaca que, además de evitar una prueba instrumental invasiva, permita también que se reduzcan los posibles errores de diagnóstico.

Los autores de la presente invención proporcionan ahora un procedimiento de diagnosis de atrofia de las microvellosidades intestinales en pacientes que padecen enfermedad celiaca en fase activa por detección de anticuerpos anti-actina en sueros de dichos pacientes que cumple los requisitos anteriormente reseñados permitiendo la identificación en el 100% de los casos.

El procedimiento se basa en la detección en la sangre periférica de autoanticuerpos circulantes de tipo IgA frente a F-actina que representa la proteína principal del citoesqueleto celular. La presencia de esos autoanticuerpos en sueros de pacientes celíacos se relaciona con la presencia de atrofia vellosa en mucosa intestinal por lo que se proporciona una importante herramienta de diagnóstico que permite que se evite la biopsia intestinal.

Se ha observado que anticuerpos anti-F-actina ya no se detectan después de la recuperación de lesiones de mucosa intestinal a continuación de la interrupción de ingestión de alimentos que contienen gluten. Por lo tanto el procedimiento se usa ventajosamente para estudiar los efectos de la dieta o las acciones terapéuticas en un paciente.

La detección de anticuerpos anti-actina según la presente invención usa análisis de inmunofluorescencia indirecta llevado a cabo sobre cultivo de células epiteliales de intestino delgado de rata. Los expertos en la materia reconocerán que células de otros animales también están dentro del alcance de la invención.

Las células se cultivan en portaobjetos de microscopio en presencia de colchicina para fomentar el aumento intracelular de F-actina. Luego se fijan las células y se hacen permeables. Los portaobjetos así preparados se incuban con muestra de sueros que se han de probar. La presencia de anticuerpos anti-F-actina en los sueros del paciente se detecta usando antisuero anti-inmunoglobulina tipo IgA conjugado con isotiocianato de fluoresceína. La evaluación de los resultados se lleva a cabo usando microscopio óptico de fluorescencia. Procedimientos alternativos de detección también están dentro del alcance de la invención.

El procedimiento para detectar anticuerpos anti-F-actina según la invención se puede usar para enfermedad celíaca que se sospeche clínicamente y pacientes positivos para anticuerpos específicos (anti-gluten, anti-endomisio o anti-transglutaminasa) y puede evitar que se lleve a cabo una biopsia intestinal en todos los pacientes positivos.

Por lo tanto un objeto de la presente invención es un procedimiento para detectar atrofia de las microvellosidades intestinales en un paciente que padece enfermedad celíaca que incluye detección de autoanticuerpos anti-F-actina en un fluido biológico de dicho paciente que consiste en las siguientes etapas:

- a) preparación de un cultivo de células epiteliales normales de intestino delgado de un animal de experimentación;
- b) incubación con el fluido del paciente
- c) detección de la unión de los autoanticuerpos anti-F-actina a las células.

Adicionalmente el procedimiento según la invención puede incluir, después de la etapa a), la incubación con una sustancia capaz de inducir la polimerización de actina globular a filamentos tal como colchicina.

El cultivo de células epiteliales de intestino delgado adecuadas para usarse consiste en un cultivo de células de rata. Preferiblemente se usan células epiteliales de la familia IEC-6.

El procedimiento para detectar la unión de anticuerpos anti-F-actina a las células puede incluir la adición de antisuero anti-inmunoglobulina tipo IgA conjugado con un fluorocromo tal como isotiocianato de fluoresceína y la detección de señal de fluorescencia, por ejemplo por medio de microscopía de fluorescencia.

Factores que permiten que el procedimiento de la invención sea más sensible que los conocidos se derivan del uso de células epiteliales intestinales (IEC-6) que son del mismo tipo celular que las que provocan *in vivo* la producción de autoanticuerpos anti-F-actina en pacientes celíacos y la inducción de una cantidad más alta de actina intracelular por medio de la adición de colchicina. De hecho esta última, aumentando la cantidad de filamentos intracelulares de actina, también provoca el aumento de la cantidad de antígeno reconocido por autoanticuerpos que permite detectar la presencia de autoanticuerpos también en los sueros con un índice más bajo de ellos.

La presente invención se describirá ahora, a manera de ilustración pero no de limitación, usando los ejemplos que se reseñan a continuación.

Ejemplo 1

Comparación entre la sensibilidad del procedimiento según la invención y del procedimiento basado en el uso de célula epitelial de carcinoma laríngeo (HEP- 2)(Clemente MG, Musu MP, Frau F, Busco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S. Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. Gut 2000; 47(4): 520-6).

Ciento dos pacientes celíacos (intervalo de edad: 1-60 años) serológicamente positivos para anticuerpos anti-endomisio, anti-transglutaminasa y anti-gluten fueron estudiados según ambos procedimientos. Cuando se llevaron a cabo biopsias intestinales 17 pacientes no mostraron en absoluto atrofia de las microvellosidades intestinales mientras que los restantes 85 mostraron un grado moderado a severo de la misma según la Tabla 1.

TABLA 1

	procedimiento de células Hep-2	procedimiento de células IEC-6
Total	102	102
Edad (intervalo, años)	1-60	1-60
Positivo para anti-endomisio IgA	102	102
Positivo para anti-	102	102

ES 2 285 155 T3

	transglutaminasa IgA		
5	Atrofia de las microvellosidades intestinales	85	85
10	Ausencia de atrofia de las microvellosidades intestinales	17	17
15	Seropositivo para anti-F-actina IgA	69	85
20	Seronegativo para anti-F-actina IgA	33	17
	Positivo para F-actina con atrofia	69	85
25	Positivo para F-actina sin atrofia	0	0
30	Negativo para F-actina con atrofia	16	0
35	Negativo para F-actina sin atrofia	17	17

Materiales y Procedimientos

Cultivo de células IEC-6

Se cultivaron células epiteliales de intestino delgado de ratas (IEC-6, ATCC n. CRL-1592, Colección Tipo Americano, Manassas, VA, EE.UU.) en matraces de cultivo celular (material de laboratorio Falcon) a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. El medio de cultivo para el crecimiento fue medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, Colección Tipo Americano, Manassas, VA, EE.UU.) que contenía 4.500 mg/L de D-glucosa, clorhidrato de piroxidina, suero bovino fetal (FBS) al 5% inactivado térmicamente (56°C, 30 minutos), 0,1 U/ml de insulina bovina, 4 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, y 50 µg/ml de estreptomina.

Cultivo de células IEC-6 sobre portaobjetos de pocillos múltiples en presencia de colchicina

Cuando las células que crecen están a una confluencia de 80-90%, se lavan en suero salino (solución tampón de fosfato, PBS) y se raspan cuidadosamente del matraz de cultivo por tratamiento durante 2-3 minutos con una solución que contiene 0,25% de tripsina, 1 mM de EDTA (Gibco brl). Después de la resuspensión en medio de cultivo las células (2 x 10⁴ células/ml) se siembran en pocillos de portaobjetos multipunto (ICN). Cuando las células que crecen están a una confluencia de 30-50%, se añade colchicina al medio de cultivo a una concentración final de 0,1 mM durante un período de incubación de dos horas.

Inmunofluorescencia indirecta para determinación de anticuerpos anti-F-actina en el suero del paciente

Se lavan portaobjetos dos veces en PBS y se cubren con solución fijadora que contiene paraformaldehído al 2% en PBS (se añade 1 g de paraformaldehído a 50 ml de PBS con agitación continua hasta su disolución con posterior adición de una "gota" sólida de NaOH, se ajusta el pH a 7,4-7,6 con H₃-PO₄) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS los portaobjetos se cubren durante 15 minutos a temperatura ambiente con solución permeabilizante de PBS que contiene Triton X-100 al 0,5%. Después de tres lavados con PBS, se añaden los sueros de prueba, previamente inactivados a 56°C durante 30 minutos y centrifugados (20000 rcf) durante 10 minutos, a los pocillos a una dilución 1:5 en PBS. Se incuban los sueros durante 1 hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Después de 3 lavados en PBS, se añade a los pocillos antisuero anti-IgA humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (MEDIC), diluido 1:100 en PBS y centrifugado (20000 rcf) durante 10 minutos. Se incuban antisuero durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda en la oscuridad. Luego se lavan los portaobjetos dos veces

en PBS solo y una vez más en presencia de azul de Evans durante 10 minutos. Después de dos lavados posteriores en PBS se montan cubreobjetos usando una solución de glicerol al 50% en PBS y se analizan los resultados usando un microscopio de fluorescencia (Olympus).

- 5 Se usan células de control Hep-2 según se describen en Clemente MG, Musu MP, Frau F, Busco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S. Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. Gut 2000; 47(4): 520-6.

Evaluación de resultados

- 10 En presencia de anticuerpos anti-F-actina, los haces de filamentos de actina se detectan por microscopía de fluorescencia debido a su coloración fluorescente. Tanto los filamentos intracelulares, que se ven como haces paralelos que se extienden de un polo celular al otro, como los constituyentes de las microvellosidades de la membrana celular que aparecen como extroversiones radiales sobre el lado exterior de las células.

15 *Procedimiento de la invención que usa células IEC-6*

- Ochenta y cinco de los 102 (83%) pacientes celíacos estudiados fueron positivos respecto a IgA anti-F-actina. Todos esos pacientes tenían un grado histológico moderado o severo de atrofia de las microvellosidades intestinales. Ninguno (0%) de los 17 pacientes sin atrofia de las microvellosidades intestinales fue positivo respecto a anticuerpos anti-F-actina.

Procedimiento que usa células Hep-2

- 25 Sesenta y nueve de los 102 pacientes celíacos observados (68%) fueron positivos. Los pacientes positivos tenían un grado histológico moderado o severo de atrofia de las microvellosidades intestinales. Treinta y tres pacientes fueron negativos respecto a anticuerpos anti-F-actina. Por lo tanto usando este procedimiento dieciséis pacientes no se revelaron (48,8% de pacientes negativos).

- 30 La diferencia estadística entre los resultados obtenidos usando los dos procedimientos anteriores es muy significativa. Prueba- χ^2 , $p=0,0007$.

Los valores de sensibilidad de los procedimientos anteriormente descritos con referencia a la presencia de lesiones histológicas de atrofia moderada o severa en sujetos celíacos son como sigue:

- 35 - 100% para el procedimiento según la invención que usa células IEC-6 y adición de colchicina;
- 81% para el procedimiento conocido que usa células Hep-2.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para detectar atrofia de las microvellosidades intestinales en un paciente que padece enfermedad celíaca que incluye detección inmunológica de autoanticuerpos anti-F-actina en un fluido biológico de dicho paciente que consiste en las siguientes etapas:

a) preparación de un cultivo de células epiteliales normales de intestino delgado de un animal de experimentación;

10 b) incubación con el fluido del paciente

c) detección de la unión de los autoanticuerpos anti-F-actina a las células.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1 que incluye adicionalmente, después de la etapa a), la incubación con una sustancia capaz de inducir la polimerización de actina globular a filamentos.

3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que la sustancia capaz de inducir la polimerización de actina globular a filamentos es colchicina.

20 4. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que el cultivo de células epiteliales de intestino delgado es de rata.

5. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que el cultivo de células epiteliales de intestino delgado es de línea celular IEC-6.

25 6. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que el procedimiento para detectar la unión de autoanticuerpos anti-F-actina a las células incluye la adición de antisuero anti-inmunoglobulina tipo IgA conjugado con fluorocromo y detección de señal de fluorescencia.

30 7. Procedimiento según la reivindicación 6 en el que el fluorocromo es isotiocianato de fluoresceína.