

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA  
Y SALUD PÚBLICA (B12.56.1)**

**Estudio del perfil metabolómico en niños celiacos  
y sus diferencias respecto a la población sana:  
probabilidad de desarrollo de biomarcadores.**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**TESIS DOCTORAL**

**RAFAEL MARTÍN MASOT**

**GRANADA 2021**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Rafael Martín Masot  
ISBN: 978-84-1306-971-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/69868>



A Laura, por su tiempo y su paciencia, por acompañarme. Viento que mueve mi vela.

A Rafa, fruto inmenso que colma mi alegría.



## **AGRADECIMIENTOS**

A Pepe Maldonado, incansable, eterno, lleno de vida.

A mi jefe y amigo, Víctor, siempre solícito y cercano.

A Teresa Nestares, inagotable fuente de ideas.

A mis padres, que me han dado todo lo que soy.

A mi hermana, que siempre está.



**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>6</b>
<b>PÁGINA TITULAR</b> .....	<b>9</b>
<b>COMPROMISO DE RESPETO DE LOS DERECHOS DE AUTOR</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>APORTACIONES CIENTÍFICAS</b> .....	<b>16</b>
Artículos científicos directamente relacionados con esta Tesis Doctoral. ....	16
Artículos científicos relacionados con la cohorte de trabajo y resultados complementarios. ....	16
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>19</b>
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA</b> .....	<b>21</b>
<b>ENFERMEDAD CELIACA</b> .....	<b>21</b>
Concepto .....	21
Epidemiología .....	23
Patogenia, estrés oxidativo e inflamación crónica.....	25
Diagnóstico, tratamiento y seguimiento.....	31
<b>METABOLÓMICA: HACIA UNA MEDICINA PERSONALIZADA</b> ....	<b>36</b>
Metabolómica y enfermedad celíaca.....	38
Enfermedad celíaca, microbioma y metabolómica .....	48
Farma-metabolómica y metabolómica y enfermedades crónicas .....	50
Plataformas de la metabolómica.....	51
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	<b>56</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>



<b>POBLACIÓN Y EMPLAZAMIENTO .....</b>	<b>61</b>
<b>CONSENTIMIENTO INFORMADO Y RESPONSABILIDADES ÉTICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>PROTOCOLO DE ESTUDIO. CRONOGRAMA .....</b>	<b>64</b>
<b>FINANCIACIÓN .....</b>	<b>66</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
<b>Manejo de muestras .....</b>	<b>67</b>
<b>Estudio de meatabolitos .....</b>	<b>68</b>
<b>Otros medios.....</b>	<b>72</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
<b>Metabólica dirigida .....</b>	<b>76</b>
<b>Metabólica no dirigida .....</b>	<b>83</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo I. Rasgos analíticos de los metabolitos medidos en plasma mediante     análisis dirigido .....</b>	<b>123</b>
<b>Anexo II. Moléculas estadísticamente diferentes entre los grupos en el     análisis no dirigido .....</b>	<b>127</b>



**PÁGINA TITULAR**

**Título:** Estudio del perfil metabólico en niños celíacos y sus diferencias respecto a la población sana: probabilidad de desarrollo de biomarcadores.

**Autor:** RAFAEL MARTÍN MASOT

**DNI:** 76421097D

**Director de Tesis:** José Maldonado Lozano

**DNI director:** 25925118R

**Proyecto en el que se enmarca:** *“Estudio multidisciplinar del efecto de la dieta sin gluten en niños celíacos para el desarrollo de productos adaptados a sus requerimientos.”*



## **RESUMEN**

La Enfermedad Celiaca es la patología crónica intestinal más frecuente en nuestro medio, cuya incidencia a nivel mundial está aumentando. La gran expresión clínica se debe a la compleja interacción entre factores genéticos, inmunológicos y ambientales, que hace necesaria una visión mucho más holística para tratar de comprender los procesos metabólicos subyacentes. Un mejor conocimiento de dichos procesos podría ofrecer la oportunidad de descubrir nuevos mecanismos fisiopatológicos y biomarcadores potenciales útiles para el diagnóstico de casos dudosos debido a los resultados histológicos, así como para el seguimiento de la enfermedad.

En este sentido, la metabolómica es una aproximación complementaria para estudiar enfermedades multifactoriales, que informa de modo global de los procesos celulares en el organismo dinámico, mejorando nuestra comprensión sobre la fisiología de los sistemas biológicos. En los últimos años, escasos aunque recientes estudios sugieren que se deben considerar las alteraciones metabólicas en sujetos con la enfermedad.

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar el perfil metabolómico en niños con la enfermedad, y comparar sus diferencias respecto a población sana. Para ello, se tomaron como controles hermanos de los pacientes sin la enfermedad, disminuyendo así la variabilidad interindividual debida a la dieta, genética o factores ambientales. Se realizó mediante espectrometría de masas análisis dirigido y no dirigido del plasma de los pacientes.

Los resultados del análisis dirigido mostraron afectación de la vía de la transulfuración, con disminución de cisteína y cistationina, que unido a la normalidad de glutatión y vitamina B6 sugiere un defecto específico a nivel de enzimas implicadas en la defensa antioxidante, la detección de oxígeno, la función mitocondrial, la inflamación y la

señalización de segundos mensajeros. Este hallazgo, además, podría ser justificado por una mutación de SAH hidrolasa que cursa con síntomas típicos de la enfermedad, como retraso del crecimiento, anomalías dentales o hipertransaminasemia.

El análisis no dirigido mostró alteraciones en todo el metaboloma circulante a pesar de la dieta sin gluten, sobre todo en mediadores lipídicos, sugiriendo una huella metabólica característica. Encontramos diferencias en metabolitos implicados en vías inflamatorias, metabolismo de los esteroides y metabolismo de la bilirrubina, sugiriendo alteraciones a nivel hepático y suprarrenal, siendo esta la primera descripción reportada sobre alteraciones a nivel de esta vía. Por último, observamos diferencias en los niveles de diacilglicerol, que juega un papel central en el control de la comunicación neuronal, la fagocitosis y el control de las respuestas inmunes, y que como segundo mensajero desempeña un papel importante en la regulación de mTOR, descrito recientemente como factor clave para mantener una respuesta inflamatoria sostenida en la enfermedad. Los datos aquí presentados, sugieren por primera vez, alteraciones como resultado de la expresión de nuevos mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad. El mayor conocimiento de dichas vías podría ayudar a un mejor entendimiento de la enfermedad, así como al desarrollo de huellas propias que han de ser verificadas.

Estos resultados contribuyen a dilucidar la compleja interacción que se produce entre genética, transcriptoma y metaboloma en la enfermedad, con un mayor conocimiento de dichas vías. El hecho de que probablemente haya una huella característica de la enfermedad es esperanzador. Estas diferencias metabólicas deberán de ser exploradas con una perspectiva inmunológica e interrelacionadas con factores epigenéticos. Con más estudios, quizás, podamos establecer biomarcadores que ayuden a mejorar el diagnóstico o seguimiento de la enfermedad.



## **APORTACIONES CIENTÍFICAS**

### **Artículos científicos directamente relacionados con esta Tesis Doctoral.**

1. Martín-Masot R, Mota-Martorell N, Jové M, Maldonado J, Pamplona R, Nestares T. Alterations in One-Carbon Metabolism in Celiac Disease. *Nutrients*. 2020; 12: 3723.
2. Martín-Masot R, Galo-Licon JD, Mota-Martorell N, Sol J, Jové M, Maldonado J, et al. Plasma Metabolomics Changes in Celiac Disease point to 2 Up-regulation of Specific Lipid Mediators. *Nutrients*. 2021; under review.

### **Artículos científicos relacionados con la cohorte de trabajo y resultados complementarios.**

1. Nestares T, Martín-Masot R, Flor-Aleman M, Bonavita A, Maldonado J, Aparicio VA. Influence of Ultra-Processed Foods Consumption on Redox Status and Inflammatory Signaling in Young Celiac Patients. *Nutrients*. 2021; 13:156.
2. Nestares T, Martín-Masot R, Labella A, Aparicio V, Flor-Aleman M, Alvarez-Frías M, et al. Is a Gluten-Free Diet Enough to Maintain Correct Micronutrients Status in Young Patients with Celiac Disease?. *Nutrients*. 2020;12:844.
3. Diaz-Castro J, Muriel-Neyra C, Martin-Masot R, Moreno-Fernandez J, Maldonado J, Nestares T. Oxidative stress, DNA stability and evoked inflammatory signaling in young celiac patients consuming a gluten-free diet. *Eur J Nutr*. 2019; 59:1577-1584.



4. Nestares T, Martín-Masot R, de Teresa C, Bonillo R, Maldonado J, Flor-Alemany M, Aparicio VA. Influence of Mediterranean Diet Adherence and Physical Activity on Bone Health in Celiac Children on a Gluten-Free Diet. *Nutrients* 2021, 13, 1636.



## **ABREVIATURAS**

DM- Dieta Mediterránea

DSG- Dieta sin gluten

DG- Diacilglicéridos

EC- Enfermedad Celiaca

ESPGHAN- European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition

HLA- Human Leukocyte Antigen

H<sub>2</sub>S- Sulfuro de Hidrógeno

IFN  $\gamma$ - Interferón gamma

Ig- Inmunoglobulina

IL- Interleucina

TNF- Factor de necrosis tumoral

LC-MS- Espectrometría de masas por cromatografía líquida

MS- Espectrometría de masas

NMR- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

PA- Ácido fosfatídico

SAH- S-adenosilhomocisteína.



## **ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA**

### **ENFERMEDAD CELIACA**

#### **Concepto**

La Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN, *por sus siglas en inglés European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) define la enfermedad celíaca (EC) como una “enfermedad sistémica de carácter permanente, inmunomediada, provocada por el gluten y prolaminas relacionadas, en individuos genéticamente susceptibles, y que se caracteriza por la presencia de una combinación variable de: manifestaciones clínicas dependientes del gluten, anticuerpos específicos de EC, haplotipos HLA DQ2 o DQ8 y enteropatía” [1]. Cursa en ocasiones con una atrofia grave de la mucosa del intestino delgado superior y como consecuencia se establece un defecto en la absorción y utilización de nutrientes (principios inmediatos, minerales y vitaminas) a nivel del tracto digestivo, cuya repercusión clínica y funcional va a depender de la edad y la situación fisiopatológica del paciente. Es de destacar que la EC se caracteriza por una expresividad clínica muy variable, con una afectación multisistémica, siendo frecuente la afectación extradigestiva e, incluso, la ausencia completa de síntomas; y que persiste de forma permanente, es decir, se mantiene durante toda la vida. Otros nombres que se han usado para referirse a la enfermedad son esprúe celíaco, enteropatía sensible al gluten o esprúe no tropical [2].

Se trata de una enfermedad que combina elevación de autoanticuerpos específicos de

EC, enteropatía inflamatoria y multitud de síntomas y signos clínicos tanto digestivos como extradigestivos. No obstante, es relativamente frecuente que se presente incluso sin sintomatología [3].

Los granos que contienen las proteínas de activación son el trigo, la cebada y el centeno; existe cierta controversia acerca de si la avena también puede causar la enfermedad. Algunos autores la definen como: “una intolerancia permanente a la gliadina y proteínas afines que están presentes en ciertos cereales (trigo, centeno, cebada y quizás avena), que cursa con atrofia de la mucosa del intestino delgado superior, cuya consecuencia es un defecto de utilización de nutrientes (principios inmediatos, sales y vitaminas) a nivel del tracto digestivo” [4].

Se diferencia de alergias a los alimentos (incluyendo alergia al trigo), que están mediadas por IgE o IgG. En la EC los síntomas se producen días, meses o años después de la ingesta de gluten.

No hay correlación directa con la cantidad de gluten y presenta gran predisposición genética. En la alergia al gluten, como ocurre con otras alergias alimentarias, los síntomas se producen minutos a horas después de la ingesta del gluten, y pequeñas cantidades pueden dar reacciones graves. Es frecuente que el paciente presente otras alergias y no se produce daño intestinal tras la toma de gluten [5].

*Queda claro, por tanto, que se trata de una enfermedad crónica, incurable, y sistémica, que puede afectar incluso a personas asintomáticas.*

## **Epidemiología**

La EC se trata de un problema frecuente en la población. Se ha descrito que presenta dicha enfermedad del 0,5 al 1 % de la población general en Estados Unidos y Europa, respectivamente [6–8]. No obstante, estudios recientes cifran la prevalencia en torno al 1,4%, con un claro aumento en la incidencia en los últimos años, sobre todo en países occidentales, siendo además más frecuente en mujeres que en hombres [9].

En algunas zonas probablemente sea una enfermedad infraestimada debido al limitado acceso a marcadores serológicos o biopsias, y sea confundida con otras patologías causantes de diarrea crónica. Probablemente este sea un motivo de que haya una distribución tan variable de la enfermedad. No obstante su distribución es universal, estando todavía en la actualidad insuficientemente diagnosticada en algunos países [10,11]. Su prevalencia sigue una distribución paralela a la del antígeno humano leucocitario (HLA), siempre y cuando la población también esté expuesta al gluten [12].

Se ha relacionado el aumento en su prevalencia con la generalización de marcadores serológicos y por el estudio de pacientes de alto riesgo, así como por el conocimiento mayor de la enfermedad que hace que se indague cuando se presenta con síntomas atípicos. No obstante, el número de celíacos llamados silentes podría ser mucho más alto que el número de pacientes con enfermedad celíaca clásica.

La prevalencia ha aumentado con la llegada de pruebas de detección altamente sensibles y específicas, que identifican muchos pacientes con síntomas mínimos o nulos. Estudios que usaron test serológicos apoyados por biopsia comprobaron una prevalencia 1: 300 a 1: 500 en la mayoría de los países [13,14]. Un gran estudio de cribado en los Estados Unidos sugirió una prevalencia de 1: 133 entre pacientes sin factores de riesgo o

síntomas. Estas estimaciones son similares a los encontrados en estudios europeos [15–18], pero la cifra podría ser superior; un estudio realizado en nuestro medio encontró una prevalencia de EC silente de 1: 33 en niños de 2 a 4 años, cifra mucho mayor a la descrita en estudios previos (media europea de 1%) [19].

En España la EC es la patología crónica intestinal más frecuente y es 5 veces más frecuente en niños que en adultos [20]. Debido a la cantidad de formas silentes o latentes es difícil estimar su incidencia, pero podría haber unos 3 millones de personas afectadas por EC en toda Europa y unas 450.000 en España[21], aunque según la FACE (Federación de Asociaciones de Celíacos de España), del total de personas diagnosticadas de la enfermedad en España menos de 40.000 personas estarían inscritas a algunas de las asociaciones de celíacos [22].

El hecho de que pueda haber tantas formas silentes y, por tanto, tantos pacientes sin diagnosticar, ha hecho que cobre interés el estudio de cribado de la enfermedad entre distintos grupos de investigación. Actualmente, se recomienda cribado en familiares de primer grado, pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune, Diabetes Mellitus 1 o pacientes con síndrome de Down, Turner y Williams, aunque no hay consenso entre las distintas guías [23]. No obstante, se piensa que el diagnóstico de la enfermedad podría seguir un método piramidal (Figura 1), de modo que se realizarían más diagnósticos en tanto que el abordaje fuese más proactivo en la determinación de pacientes candidatos a realizarse pruebas [23]. Por ello, y en parte ayudado por el desarrollo de los sistemas POCT (point-of-care-testing-patient) varios estudios han explorado la posibilidad de cribado en población general [19,24,25], debido a la rapidez y facilidad de cribar personas a riesgo de la enfermedad. Los resultados, con cifras diagnósticas en torno al 3% [26] hacen que algunos autores planteen el cribado poblacional a la edad de 12 años



como una estrategia costo-efectiva, si bien, el modelo propuesto asume problemas derivados de la EC en pacientes que no realizan la dieta sin gluten (DSG), difícilmente cuantificable.

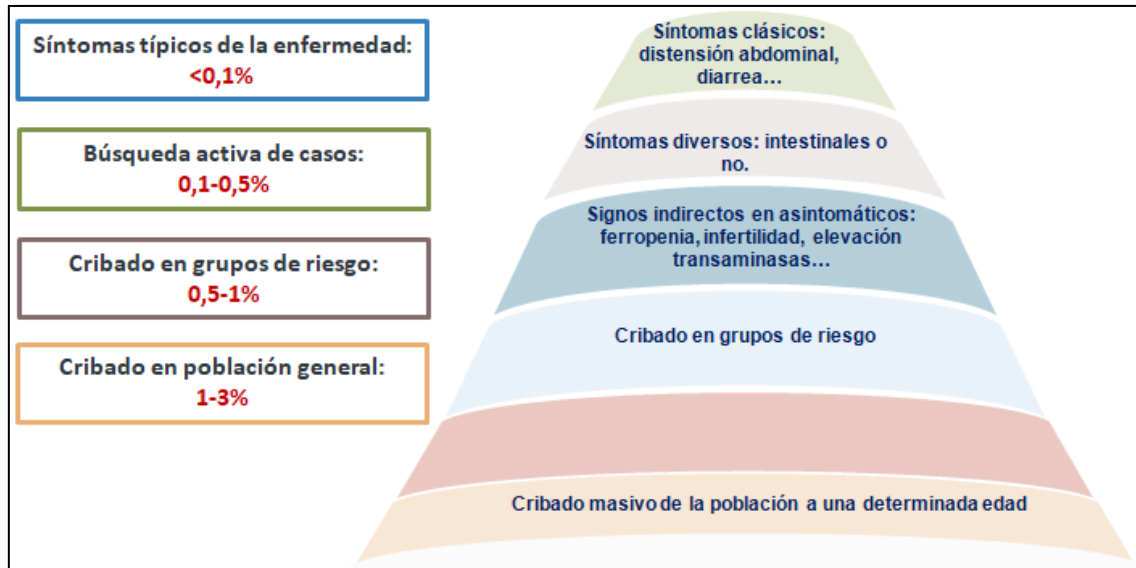


Figura 1. Modelo epidemiológico de tipo piramidal para explicar los diagnósticos de EC en función del tipo de abordaje diagnóstico que se realice. Adaptado de Kivelä [23].

No es de despreciar, por tanto, el aumento considerativo de casos que se está produciendo de la enfermedad, que hace que sea necesario desarrollar técnicas eficaces diagnósticas.

### Patogenia, estrés oxidativo e inflamación crónica

La EC es una enfermedad inflamatoria crónica hereditaria del intestino delgado causada por una intolerancia permanente al gluten, que se caracteriza por una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales [27,28]. Entre el amplio espectro

clínico de la enfermedad celíaca se encuentran los desórdenes inmunitarios, el incremento de moléculas inflamatorias [29] y el estrés oxidativo.

El estrés presente en el organismo inicia y media las adaptaciones fisiológicas para asegurar la supervivencia y mantener la homeostasis [30]. Puede ser debido a factores intrínsecos, como los genes; o extrínsecos, como el calor, toxinas, dieta, infección o radiaciones. Los factores de estrés que afectan al tracto gastrointestinal pueden causar inflamación y reducir su motilidad, con interrupción de la integridad de la mucosa y disfunción de la barrera epitelial [31–33]. Dichos cambios pueden conducir al desarrollo de EC en sujetos genéticamente predispuestos [34] y por tanto se podría decir, más concretamente, que el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos implicados en la patogénesis de esta enfermedad [35].

En condiciones normales las proteínas de los alimentos son degradadas en pequeños péptidos y son transportadas a través de la barrera epitelial. El alto contenido en prolina de las proteínas relacionadas con el gluten de los cereales hace que sean más resistentes a la digestión proteolítica y que se acumulen en la mucosa [36]. El gluten es digerido en péptidos en el intestino delgado, pero restos de prolina y glutamina permanecen intactos en el lumen intestinal. En aproximadamente el 99% de los individuos, incluyendo personas con HLA-DQ2 y HLA-DQ8, esto no es un problema, pero, en los pacientes celíacos, predispuestos genéticamente, pueden ejercer efecto tóxico, ya que estos péptidos parcialmente digeridos pueden llegar a la región subepitelial en la mucosa del intestino delgado. El mecanismo por el cual esto ocurre aún no se entiende completamente; y puede incluir desde el paso paracelular a través de un epitelio anormal o dañado, hasta el paso transepitelial, o transcitosis [37]. En la EC, el transporte de péptidos del gluten parcialmente digerido a través de una barrera epitelial

dañada hacia la lámina propia desencadena el estrés oxidativo y la liberación de citoquinas proinflamatorias [38,39]. Además, juegan un papel clave en la enfermedad la respuesta innata y la adaptativa y la interacción entre ellas [40,41]. Se ha evidenciado que el gluten puede inducir tanto la inmunidad adaptativa (adquirida) como la innata (natural), favoreciendo la producción de interleucina (IL) -15 en las células epiteliales, conduciendo al daño celular mediante la activación intraepitelial de LTCD8+ citotóxicos [41]. Las interacciones entre los péptidos “tóxicos” del gluten y las células de la lámina propia, como macrófagos y células dendríticas, inducen la respuesta inmune innata con expresión de mediadores como la IL-15 y el acúmulo consecuente de linfocitos intraepiteliales [42]. Esto conlleva a daño en la mucosa. La IL-15 está relacionada con proliferación de las criptas de los enterocitos, causando hiperplasia de las mismas. Los datos sobre IL-21, que son producidos por las células CD4 Th1 T, sugieren que esta sería otra fuerza impulsora de la inmunidad innata, que puede actuar junto con IL-15 [43].

Las enzimas transglutaminasas activadas en la lámina propia desaminan residuos de las glutaminas del gluten creando así epítomos con potencial efecto inmunoestimulador. Estos péptidos desaminados son presentados a los linfocitos TCD4+ colaboradores por los HLA-DQ2 y DQ8 en los macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, los cuales promueven la diferenciación hacia anticuerpos antigliadina y antitransglutaminasa. Los péptidos inmunógenos causan una respuesta adaptativa que procede a través de su unión a HLA-DQ2 o -DQ8 de las células presentadoras de antígeno y la posterior estimulación de las células T [44]. La presencia repetitiva de estos residuos los convierte en el sustrato preferido de la enzima transglutaminasa tisular, que forma los complejos péptidos- DQ. Los péptido-DQ activan DQ2 o DQ8 que son presentados a

los LTCD4 y que producen principalmente citoquinas de tipo Th1, particularmente interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Las citocinas Th1 liberan a su vez enzimas como metaloproteinasas que pueden dañar la mucosa intestinal y producir atrofia vellositaria. Aumentan la permeabilidad epitelial produciéndose un mayor paso de péptidos de gluten, que se unirán a moléculas DQ2 y DQ8 en las células presentadoras de antígenos, y que harán que haya una retroalimentación crónica del proceso, siempre y cuando existan péptidos de gluten en el lumen intestinal. Además de producir citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el IFN - $\gamma$  , las células T pueden actuar activando fibroblastos intestinales, conduciendo a mayor daño de la barrera epitelial [45]. Por otra parte, los péptidos de gliadina pueden activar directamente los receptores de reconocimiento de patrones (Toll like receptors) 2 y 4 en los macrófagos y células dendríticas [46], conduciendo a una regulación positiva de citocinas proinflamatorias y quimiocinas [47]. Estos efectos inflamatorios agravan el proceso.

Los efectos producidos por esta cascada inflamatoria van desde apoptosis hasta alteración de la diferenciación celular. La mayoría de los efectos son mediados por incremento del estrés oxidativo inducido por los péptidos en los enterocitos, dada la alteración de la barrera epitelial y el aumento de la permeabilidad, que hacen que los péptidos atraviesen la barrera y se active la respuesta inmunitaria (natural y adquirida) contribuyendo al daño celular y a la atrofia vellositaria. Algunos péptidos de la alfa-gliadina pueden penetrar la barrera epitelial y activar vías de transducción de señales produciendo un aumento de los niveles de radicales libres, tanto especies reactivas de oxígeno como de nitrógeno [48–51]. Así, se ha asumido que el estrés oxidativo es una de las consecuencias de la toxicidad de la gliadina. Usando modelos celulares se ha

visto que la gliadina produce un desequilibrio oxidativo intracelular caracterizado por un aumento en los niveles de productos de peroxidación lipídica, un aumento en la ratio glutatión oxidado entre glutatión reducido y una disminución de grupos sulfhidrilo unidos a proteínas [52]. Además, se han observado daños en la membrana celular y alteraciones en la morfología, proliferación celular, apoptosis y viabilidad de la célula [53–55].

Por tanto, el gluten tiene efecto en el individuo actuando a nivel del estrés oxidativo y también sobre la expresión génica. Los péptidos de gliadina producen un desequilibrio en los enterocitos con activación del factor NF- $\kappa$ B, que induce la transcripción de citocinas proinflamatorias y enzimas tales como la ciclooxigenasa 2 y la óxido nítrico sintetasa inducible, con el consecuente aumento de producción de prostaglandinas y metabolitos del óxido nítrico que contribuyen a aumentar el estrés oxidativo. Dicho estrés oxidativo se relaciona también con la regulación a la baja de la PPAR $\gamma$  mediada por la transglutaminasa tisular, y que podría contribuir en la activación del NF- $\kappa$ B [56].

La asociación entre inflamación y estrés oxidativo está bien documentada. Se ha visto en modelos celulares que péptidos de gliadina son capaces de modular la expresión génica. El aumento de los niveles de radicales libres está implicado en la reducción por parte del sistema ubiquitina-proteasoma de la degradación de enzima transglutaminasa, aumentando sus niveles en la mucosa. Una activación del eje especies reactivas de oxígeno y transglutaminasa tisular (ROS- tTG) inducida por algunos péptidos de la gliadina produce una regulación a la baja de los receptores PPAR $\gamma$ , regulando la expresión de genes inflamatorios y modulando el estrés oxidativo. El aumento de citocinas inflamatorias puede dañar la permeabilidad intestinal y aumentar los efectos tóxicos de los desencadenantes ambientales. Asimismo, la comentada regulación a la

baja de los receptores PPAR $\gamma$  puede contribuir a la activación de NF-kappa B, que a su vez regula la expresión génica de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y enzimas [57].

Las citocinas y quimiocinas son mediadores claves para entender la enfermedad, pues parece que están involucrados en el inicio, mantenimiento o progresión de la enfermedad cuando no está instaurado el tratamiento. Estudios previos [58,59] han descrito un aumento de IL-4, IL-10, IL-1, IL-8 y de IL-21, con correlación con la atrofia vellositaria. En esta línea, nuestro grupo comparó pacientes celíacos con DSG durante más de 12 meses y controles sanos, observando que la DSG reduce la producción de radicales libres, disminuye la cascada inflamatoria y protege el material genético, aunque la fuerte reacción producida por la enfermedad se mantiene en parte tras 12 meses de dieta, con niveles de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IP-10 y TNF- $\beta$  aún elevados, así como el factor de crecimiento endotelial vascular, que podría ser un mecanismo compensador para restaurar la mucosa [60].

Por lo expuesto anteriormente queda claro que la inflamación y el estrés oxidativo debido al aumento de especies reactivas del oxígeno y radicales libres y a una disminución de las defensas, están involucrados en la patogenia de la EC. Podríamos decir, en resumen, que se produce una activación incontrolada de la vía proinflamatoria que mantiene la producción de radicales libres y perpetúa la inflamación crónica y, por tanto, puede darse un estado de inflamación crónica con retroalimentación por medio de la expresión génica y aumento de citocinas proinflamatorias como IFN-gamma o TNF-alfa, que causan estrés oxidativo por medio del aumento de especies reactivas de oxígeno y consecuente daño en el ADN celular.

*Queda claro, que la inflamación crónica, sus mediadores y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la patogenia de la EC, y que un mayor entendimiento de la misma desde todas sus perspectivas es fundamental para conocer las nuevas líneas de investigación y objetivos de tratamiento desde un punto de vista fisiopatológico.*

### **Diagnóstico, tratamiento y seguimiento**

En nuestro medio y en la edad pediátrica, el **diagnóstico** de la enfermedad se ha realizado desde 1970 siguiendo los criterios propuestos por ESPGHAN, estando hasta hace poco vigentes los publicados en 2012[1]. No obstante, recientemente se han publicado los nuevos criterios propuestos para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad[61] modificando la pauta a seguir en la determinación de HLA, el uso de la biopsia intestinal o la utilización de los marcadores serológicos.

La sospecha de EC se debe de tener en sujetos con sintomatología clásica de la enfermedad, como hábito malabsortivo, diarrea crónica o intermitente, fallo en el crecimiento, anemia ferropénica no explicada por otras causa..., pero como comentábamos a modo introductorio, la enfermedad es sistémica y la sintomatología puede ser de la más diversa índole, actuando desde esta perspectiva la enfermedad de modo *camaleónico*, con sintomatología ausente o muy inespecífica. Es por eso que cobra importancia el cribado en personas a riesgo de presentarla y, siguiendo el método piramidal ya descrito, está por ver un cribado universal de la misma en los próximos años.

Además de la sospecha clínica, clásicamente los medios de los que disponemos y en los que se ha fundamentado el diagnóstico han sido tres: el estudio genético, los marcadores serológicos y la biopsia intestinal. Desde los nuevos criterios [61] esta perspectiva ha

cambiado. Actualmente se considera el diagnóstico de la enfermedad incluso en sujetos asintomáticos, siempre y cuando presenten en dos determinaciones analíticas elevación de anticuerpos antitransglutaminasa IgA más de 10 veces el valor superior de la normalidad para el laboratorio y positividad de los anticuerpos anti endomisio IgA. En estos casos, podría ofrecerse a la familia el diagnóstico de la enfermedad sin biopsia intestinal y aún en casos asintomáticos.

Desde el punto de vista genético ha perdido interés la determinación de los haplotipos de compatibilidad, puesto que se consideran los heterodímeros HLA DQ2 y DQ8 necesarios pero no suficientes para el diagnóstico de EC. No obstante, sabemos que es HLA DQ2-DQ8 positivo hasta el 40% de la población mundial [62,63], aunque sólo el 1-3% acabará desarrollando la enfermedad.

Los marcadores serológicos son útiles para el diagnóstico siempre y cuando el paciente esté consumiendo gluten. Los anticuerpos antitransglutaminasa de IgA son considerados de elección como método de cribado cuando se sospecha la enfermedad. Los anticuerpos antiendomiso son muy específicos (98-100%) en manos expertas, y se deben de realizar ante la positividad de los antitransglutaminasa IgA para confirmar el diagnóstico. Los anticuerpos antigliadina deaminada también son específicos y en menores de dos años pueden ser los primeros en elevarse, si bien, ya no se consideran para el cribado de la enfermedad en ninguna franja etaria[61]. Sí es necesario determinar también los niveles de Ig A sérica, y si hay un déficit realizar los de clase Ig G.

El número de biopsias recomendado es de al menos una muestra de bulbo duodenal y cuatro muestras de entre segunda o tercera porción duodenal [64]. Se considera biopsia



diagnóstica de EC cuando presenta un grado II-III de la clasificación de Marsh-Oberhuber [65].

Resumiendo, se podrá considerar el diagnóstico en sujetos sintomáticos o asintomáticos que presenten los criterios serológicos definidos, no considerándose necesaria la determinación de estudio genético. No se incluyen en este grupo casos de sujetos de poblaciones de riesgo o en déficit de IgA. Por tanto, todos los supuestos que no cumplan estos requisitos van a requerir la necesidad de alteración histológica en la biopsia intestinal para confirmar el diagnóstico.

El **tratamiento** de la EC es la DSG estricta y de por vida. Es posible que al diagnóstico el paciente presente desnutrición o déficits carenciales o vitamínicos debido a la malabsorción, pudiendo requerir puntualmente tratamiento de los mismos.

Actualmente hay en marcha diversos estudios clínicos que investigan posibles tratamientos de la enfermedad, atendiendo a la misma desde un punto de vista fisiopatológico. Así, se investiga con fármacos que fijen el gluten o harinas con modificación génica, fármacos que hidrolicen el gluten para hacerlo más fácilmente digerible, fármacos “restauradores” de la permeabilidad intestinal, , moléculas que traten de frenar la cascada inflamatoria antes de que se produzca o una vez producida e incluso se hipotiza con vacunas de dos tipos: unas para eliminar los posibles “triggers” infecciosos de la enfermedad, aún desconocidos, y otras para adquirir tolerancia, con mecanismo similar al usado en alergias al huevo o la leche, induciendo tolerancia al gluten. La realidad es que a día de hoy la mayoría de los estudios están en fase preclínica o fase 1 y 2, encontrándose únicamente en fase 3 la larazaotida. Los resultados hasta ahora son inconsistentes, y además de demostrar eficacia deberán de

demostrar no inferioridad frente a la DSG. Aunque los mecanismos de inducción de tolerancia pudieran presentarse como una estrategia prometedora, los estudios de la vacuna *Nexvax2* [66] han sido recientemente finalizados en fase II por un análisis intermedio que demostró ausencia de mejoría respecto a placebo, siendo por el momento el único tratamiento eficaz la dieta estricta sin gluten de por vida [67].

El **seguimiento** debe realizarse de manera indefinida. Los marcadores serológicos pueden tardar hasta 12 meses en normalizarse y, hasta entonces, el seguimiento debe de ser estrecho. Posteriormente las visitas se pueden espaciar [1]. Hay diversos mecanismos para realizar el seguimiento actualmente. La adherencia a la DSG no es de fácil cumplimiento, además de no realizarse bien en términos generales [68]. Los métodos tradicionales para detectar transgresiones y para realizar el seguimiento (entrevista clínica, encuestas, marcadores serológicos) no son sensibles a pequeñas transgresiones [69,70], además de que no parecen detectar la atrofia vellositaria [71]. Con los marcadores tradicionales, de cada 10 pacientes que realizasen transgresiones únicamente identificaríamos a 2; y de cada 10 pacientes que parece que realizasen bien la dieta, en realidad, 2 la estarían haciendo mal [72]. Entre los métodos tradicionales, los marcadores serológicos parecen ser los más sensibles [70].

Para paliar estos déficits se han creado distintos métodos para tratar de evaluar el seguimiento, como la detección de péptidos inmunogénicos de gluten en heces y orina, que parece que informan correctamente de la presencia de gluten, mostrando una alta sensibilidad [73]. No informan de otros procesos bioquímicos ni de cómo repercute en el organismo, únicamente de la presencia de gluten en el paciente, muy distinto de la perspectiva metabólica.

Durante el seguimiento e incluso al diagnóstico hay que prestar también atención a la aparición de enfermedad metabólica ósea, monitorizando niveles de vitamina D y calcio, además de realizando densitometría mediante absorciometría dual de rayos X en pacientes seleccionados. Hay autores que consideran que debería de formar parte del manejo de rutina en todos los pacientes [74].

*El diagnóstico, tratamiento y seguimiento siguen un flujo acelerado y variable. Los pocos cambios que ha habido durante siglos han cambiado el rumbo en los últimos 50 años, estando expuestos a las nuevas evidencias científicas y mayor conocimiento de la enfermedad. El hecho de estos cambios justifica la necesidad de seguir invirtiendo esfuerzos en un mejor conocimiento de la enfermedad.*

## **METABOLÓMICA: HACIA UNA MEDICINA PERSONALIZADA**

La medicina personalizada o de precisión se refiere a la aplicación de la biotecnología, los perfiles genéticos y las ciencias “ómicas” así como a la incorporación de factores clínicos y ambientales para evaluar riesgos individuales y diseñar estrategias de prevención, diagnóstico, tratamiento o seguimiento de la enfermedad en el momento adecuado y en el paciente adecuado, con la mínima toxicidad y la máxima eficacia posible. Una de las ciencias que más auge está teniendo en los últimos años es la metabolómica.

La metabolómica es la ciencia que se encarga del estudio de procesos químicos en los que se miden pequeñas moléculas, llamadas metabolitos, que pueden ser tanto endógenas como xenobióticas. Nicholson [75] la definió hace aproximadamente veinte años como la identificación y cuantificación no dirigida de todos los productos finales de bajo peso molecular del metabolismo, llamados metabolitos, que representan un grupo diverso de estructuras que incluyen lípidos, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, vitaminas, tioles y carbohidratos.

Estas moléculas pueden ser medidas en líquidos corporales, tejidos u órganos, y el objetivo de las mismas es proveer información acerca de un proceso metabólico que ha tenido lugar en el organismo, pudiendo considerarse la metabolómica, desde esta perspectiva, como una aproximación al metabolismo celular [76] que otras ciencias “ómicas” no pueden proporcionar [77]. Sin ir más lejos, en comparación con los 250.000 genes que componen el genoma humano y más del millón de proteínas que codifican, el metaboloma humano consta de aproximadamente 3.000 metabolitos, haciendo que sea mucho más sencillo realizar análisis metabolómicos que genómicos o

proteómicos [78], además de proveer la ventaja de que su información va más allá de la que proporciona la proteómica y la transcriptómica, puesto que el metaboloma informa de modo global de los procesos celulares en el organismo dinámico, mejorando nuestra comprensión de la biología celular y la fisiología de los sistemas biológicos.

La enfermedad condiciona cambios en el organismo para mantener la homeostasis, produciendo cambios en sus metabolitos [79], mateniéndose además en balance con los de sus tejidos y biofluidos.

Por tanto, la metabolómica mediante el estudio dirigido o no dirigido de fluidos y tejidos y la cuantificación de los metabolitos en los mismos, podría usarse para obtener nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz o incluso para predecir el comportamiento de una enfermedad, mediante la monitorización de los cambios que se producen en el organismo como respuesta a una enfermedad o a un proceso al que se exponga el cuerpo. En este sentido, la metabolómica se presenta como una herramienta rápida y no invasiva que podría suponer un paso adelante en el conocimiento de muchas enfermedades a través del estudio del perfil metabólico, obteniendo lo que se conoce como “huellas metabólicas”, resultado de la interacción del genoma, epigenoma, transcriptoma, proteoma y el ambiente.

Podríamos resumir sus principales ventajas en tres: la posibilidad de identificar nuevos marcadores y obtener una comprensión bioquímica; la integración de los resultados de la metabolómica con el del resto de las ciencias “ómicas”; y la descripción del estado metabólico en tiempo real del sistema estudiado [80].

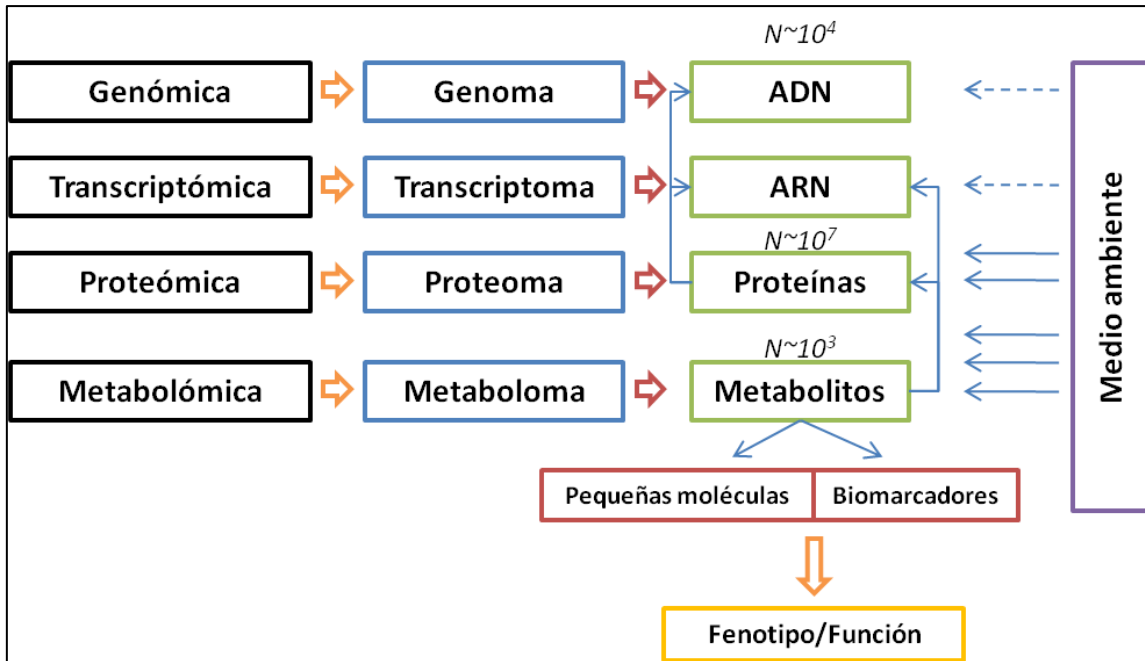


Figura 2. Adaptado de Calabró [81]. Relación entre las distintas ciencias ómicas.

### Metabolómica y enfermedad celíaca

Uno de los objetivos de la metabolómica es el de evitar pruebas más cruentas para el paciente o costosas para el sistema. Como ejemplo, patologías como la celiaquía precisan biopsia en un alto porcentaje de casos para el diagnóstico, además de análisis sanguíneo periódico para el seguimiento. En dicha enfermedad, donde la dieta juega un papel principal, puede tener importancia la metabolómica. En la fisiopatología de la enfermedad juegan un papel importante la genética y el ambiente, incluyendo la dieta. Se sabe que la condición genética es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de EC [82], lo que hace que se busquen mecanismos que puedan precipitar el desarrollo de la enfermedad en unos sujetos y en otros no. Aproximadamente el 90% de los celíacos presentan los alelos que codifican la molécula HLA-DQ2, y la mayoría de los enfermos restantes HLA-DQ8, pero aunque el 25% de la población europea presenta estos alelos,

sólo en torno al 1% desarrollará la enfermedad. Tecnología como la metabolómica podría definir las alteraciones que se producen en el individuo genéticamente predispuesto, así como tras unos determinados cambios, como podría ser la DSG, ayudando a entender mejor estas complejas interacciones y pudiendo servir, por tanto, para el diagnóstico y para el seguimiento de la enfermedad [83].

Recientemente, se ha publicado un trabajo [84] en el que se analiza el metaboloma de 230 niños de aproximadamente 4 meses, mediante muestra sérica, que se seguían hasta la edad de 8 años, momento en el que se categorizaban de celíacos o no. El objetivo era saber si el perfil metabolómico a la edad de 4 meses era distinto en el grupo que posteriormente desarrollaba la EC, lo que pudiera constituir un biomarcador de diagnóstico precoz o seguimiento más estrecho. Además, investigaron la relación de los alelos HLA- DQ2/8 con el perfil metabolómico. El resultado del estudio fue que no se observó diferencias en el metaboloma a la edad de 4 meses en los niños, no guardando relación con el desarrollo de la enfermedad a esa edad ni con la genética. Concluyen los investigadores que, quizás, los cambios producidos en la microbiota tras la introducción de la alimentación complementaria y el gluten ayudarían a categorizar a los pacientes a riesgo, suponiendo que el metaboloma se modificase una vez se produjesen estos cambios.

En 2009, el grupo de Tenori [85] publica el primer estudio en el que se analiza el perfil metabolómico de población celíaca, y lo comparan con población sana. En este estudio, realizado en 34 adultos con EC (edad media de 38 años) y 34 controles sanos, comparan el perfil metabolómico de celíacos de reciente diagnóstico, celíacos con más de 12 meses de DSG y controles sanos, observando cambios significativos en los metabolitos en sangre y en orina encontrados entre los controles sanos y los celíacos no tratados y

diferenciando, por tanto, un patrón claro entre pacientes sanos y enfermos adultos celíacos. Definieron, además, tres patrones asociados a la enfermedad en base al metaboloma: uno relativo a la malabsorción, otro en relación al metabolismo energético y un último en relación a las alteraciones de la microbiota o la permeabilidad intestinal. Los niveles de la mayoría de metabolitos revertían a la normalidad tras 12 meses de DSG. Cuando compararon el suero de enfermos celíacos con controles sanos observaron niveles más bajos de varios aminoácidos (aspargina, isoleucina, metionina, prolina, valina), metilamina, piruvato, creatinina, colina, metilglutarato, lactato, lípidos y glicoproteínas; y niveles mayores de glucosa y 3-ácido hidroxibutírico. En orina encuentran un perfil en los pacientes con EC caracterizado por niveles menores de manitol, glutamato, glutamina y pirimidinas; niveles mayores de indoxyl sulfato, colina, glicina, acetoacetato, ácido meta-hidroxyfenil-propiónico y de fenilacetilglicina. Los metabolitos encontrados en sangre y orina, relatan los autores, podrían corresponder a la alteración en la microbiota intestinal que se produce en la enfermedad, haciendo que presenten metabolitos derivados característicos.

Dos años más tarde, el mismo grupo italiano [86] amplía sus resultados con un mayor tamaño muestral, contando con un total de 141 adultos (61 enfermos celíacos). Confirman la mayoría de los resultados obtenidos con anterioridad. Comparan los resultados del metaboloma de enfermos celíacos, enfermos potencialmente celíacos (criterios clínicos pero con biopsia todavía normal) y controles sanos. Encuentran un perfil de metabolitos muy similar entre los enfermos potenciales y los ya diagnosticados, sugiriendo que el metaboloma se altera con anterioridad a la atrofia vellositaria. Obtienen, nuevamente, patrones de metabolitos distintos entre EC y controles sanos.



Cuando compararon muestras sanguíneas de celíacos con controles sanos, encontraron que en los pacientes con EC había niveles más bajos de colina, creatinina, isoleucina, lactato, leucina, metionina, valina, lípidos y glicoproteínas y niveles mayores de glucosa, citrato, serina y fenilalanina. En orina, en EC encontraron niveles mayores de acetoacetato, colina, glutamato/glutamina, indoxyl sulfato, ácido meta-hidroxyfenil-propiónico, fenilacetilglicina, ácido 3-hidroxybutírico, metilamina, ácido valérico, sarcosina, p-cresolsulfato y 1-metilnicotinamida. Comparando los niveles séricos entre EC y EC potenciales, sólo se encontraron diferencias en los niveles de dimetilglicina (más bajos en los enfermos potenciales) y más altos en los niveles de glutamato y lípidos. En orina se encontraron más diferencias, obteniendo niveles más bajos de glutamato/glutamina, indoxyl sulfato, ácido meta-hidroxyfenil-propiónico, fenilacetilglicina, p-cresolsulfato y citrato en los enfermos potenciales. Las diferencias entre metabolitos en suero de EC potencial y controles fueron bastante similares a aquéllas encontradas entre EC y controles: potenciales celíacos presentaron niveles más bajos de creatinina, leucina, dimetilglicina, arginina, lípidos y niveles mayores de glucosa, prolina y glutamato. En orina mostraron niveles más bajos de hipurato y más altos de dimetilamina, 1-metilnicotinamida y citrato. Además, observan niveles de citrulina significativamente distintos entre EC y potencial EC respecto a controles sanos, como reflejo de la masa enterocitaria.

Di Cagno y colaboradores [87], analizan en 19 enfermos celíacos el perfil metabólico y su relación con la microbiota, respecto a 15 controles sanos. En este caso, analizaron el perfil de metabolitos en muestras fecales y en orina. Observaron niveles de treonina, prolina, histidina metionina, rimetilamina, asparagina y tiramina más elevados en las muestras fecales de los pacientes con EC con DSG desde hacía 2 años,

respecto a los controles sanos. En orina observaron niveles más altos de lisina, arginina, creatina y metilamina en los pacientes con EC y niveles más altos de de carnosina, glucosa, glutamina y ácido 3-metil-2-oxobutanoico en los controles sanos. Encontraron mayor nivel de ésteres en controles sanos mientras que el etil-acetato y octil-acetato parecían estar sintetizados en exceso en niños con EC. Concluyen que a los dos años no se puede decir que hayan desaparecido todos los cambios en el metaboloma, sugiriendo además una huella metabólica de la EC, caracterizada por niveles de etil-acetato, octil-acetato, glutamina y ácidos grasos de cadena corta. Los cambios en el metaboloma son correlato de las alteraciones en la microbioma intestinal, que precisa más tiempo para volver a un estado de normalidad, similar al de controles sanos, acorde a lo encontrado en otros estudios [81].

Sellito y colaboradores [88] realizan un estudio sobre la importancia de la exposición precoz o tardía al gluten y su relación con el microbioma y el perfil metabólico en heces. Incluyeron niños a riesgo de EC, y analizaron los datos desde los 6 meses hasta los dos años de vida. Un niño desarrolló la enfermedad, y el análisis retrospectivo del mismo mostró dato que los autores identificaron como posibles biomarcadores específicos que podrían ayudar a identificar datos predictivos de desarrollo de autoinmunidad en sujetos genéticamente en riesgo, lo que facilitaría el desarrollo de posibles intervenciones durante el período preclínico de la enfermedad.

En 2013, Sitkin y colaboradores [89] encontraron en 35 pacientes adultos con EC, en sangre, elevación de IAA, ácido 3-indolepropiónico, ácido succínico y ácido fumárico.

También se han observado diferencias en el perfil lipídico antes de la introducción de la DSG [90]. En análisis de muestras de una cohorte de niños finlandeses, los autores

encontraron diferencias en el perfil lipídico, en ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilinositoles, esfingomielinas y triacilgliceroles. Las principales diferencias se hallaron en los ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfatilcolinas, antes del desarrollo de la enfermedad y del inicio de la DSG. En esta misma dirección apuntaron los resultados realizados por Auricchio y colaboradores [91], que observaron asimismo cambios sobre todo en fosfatidilcolinas incluso antes del desarrollo de la enfermedad, sugiriendo un curso independiente a la atrofia vellositaria y al desarrollo de la enfermedad.

Por contra y a diferencia de los dos estudios previos, el estudio realizado con la cohorte PreventCD [92] no encontró diferencias a la edad de 4 meses, pero a diferencia de los estudios previos, realizaron un análisis metabólico dirigido que se centró en un subconjunto de fosfolípidos y acilcarnitinas y no midieron triglicéridos ni ésteres de colesterol, justo donde hubo más diferencias en el estudio de Sen [90].

Recientemente, el grupo de Sharma [93] analizó perfiles metabólicos de 64 pacientes celíacos, y los compararon con 30 sujetos afectados de otras enfermedades y 39 controles sanos. Tomaron muestras de biopsias intestinales, de orina y de sangre. La edad media de los sujetos fue de 28 años, teniendo el paciente más joven 13 años. La muestra fue obtenida antes de iniciar la DSG, y las muestras fueron analizadas por espectroscopia. Cuando compararon los resultados con controles sanos, encontraron diferencias en 13 metabolitos: alanina, glutamato, glutamina, prolina, glucosa, lactato, acetato, beta-hidroxiacetato, hidroxibutirato, acetoacetato, piruvato, citrato, succinato y creatina. De acuerdo a estos metabolitos, los autores relacionaron nueve vías metabólicas alteradas en los pacientes con EC, implicadas en la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, glicolisis, gluconeogénesis, y metabolismo de distintos metabolitos.

La principal limitación de los estudios anteriores es que la evidencia en pediatría sería indirecta, al ser estudios en adultos. Además, el escaso tamaño muestral hace que haya que controlar muy bien los análisis estratificados, al poder actuar varias variables como confusoras. Son, por otra parte, estudios heterogéneos entre sí, que valoran distintos parámetros y que hace, por tanto, que se puedan extraer difícilmente conclusiones.

La tabla 1 muestra un resumen de los estudios publicados hasta la fecha.

Tabla 1. Estudios en enfermedad celíaca en los que se ha analizado perfil de metabolitos en muestras biológicas

Estudio	Población	EC (n)	Grupo control (n)	Muestra	Hallazgos	
Bertini, 2009[85]	Adulta	34	34	Sangre y orina	Suero de enfermos celíacos con controles sanos: niveles más bajos de varios aminoácidos (asparagina, isoleucina, metionina, prolina, valina), metilamina, piruvato, creatinina, colina, metilglutarato, lactato, lípidos y glicoproteínas; y niveles mayores de glucosa y 3-ácido hidroxibutírico.	En orina: niveles más altos de glutamato, metionina, acetato y fenilalanina.
Bernini, 2011[94]	Adulta	61	80	Sangre y orina	En sangre: en EC había niveles más bajos de colina, creatinina, isoleucina, lactato, leucina, metionina, valina, lípidos y glicoproteínas y niveles mayores de glucosa, citrato, serina y fenilalanina.	En orina: niveles más altos de acetato, sulfato, fenilalanina, metilglutarato y cresol.

Di Cagno, 2011[87]	Pediátrica	19	15	Orina y heces	En heces de EC con DSG de más de dos años: niveles de treonina, prolina, histidina metionina, rimetilamina, aspargina y tiramina más elevados.	En orina: creatinina, niveles de glutamato, control de ácidos grasos, ésteres, acetato, en exc...
Sellito, 2012[95]	Pediátrica	1	15	Heces	Cambios en succinato, propionato, acetato complementaria.	
Sitkin, 2013 (sólo abstract disponible)[89]	Adulta	35	20	Sangre	En sangre, en EC elevación de ácido succínico y ácido fumárico.	
Kirchberg, 2016[92]	Pediátrica	33	197	Sangre	No hubo diferencias en los perfiles de meta...	
Sen, 2019[90]	Pediátrica	23	23	Sangre	Las principales diferencias se hallaron en fosfatilcolinas, antes del desarrollo de la en...	

---

Auricchio, 2019[91]	Pediátrica	30	20	Sangre	Diferencias principalmente en los niveles de aminoácidos y diferencias presentes antes del desarrollo de la enfermedad.
Upadhyay, 2020[93]	Adulta	133	64	Sangre, orina, biopsia intestinal	En sangre, diferencias en 13 metabolitos: alanina, glutamato, glutamina, prolina, glucosa, lactato, acetato, beta-hidroxiacetato, hidroxibutirato, acetoacetato, piruvato, citrato, succinato y creatina. En orina, diferencias en prolina, altos en creatinina comparado con el grupo control.

---

### **Enfermedad celíaca, microbioma y metabolómica**

La EC se produce, como hemos revisado, en sujetos genéticamente predispuestos, pero esto no es condición suficiente para su desarrollo. En su patogenia, la introducción del gluten también es necesaria. De hecho, estudios previos ya comentados [92] han demostrado que el perfil metabolómico antes de la introducción del gluten es igual antes del desarrollo de la enfermedad. Es todavía desconocido qué factores hacen que finalmente se desarrolle la enfermedad, y se han formulado hipótesis respecto a la relación de determinados “triggers” infecciosos [96] en la primera infancia como causa para el desarrollo de la enfermedad. Además, se ha investigado el papel de la lactancia materna, la exposición a antibióticos en edades tempranas o el tipo de parto y su influencia en el desarrollo de la enfermedad [97].

La aparición de la enfermedad en edad adulta también hace pensar en la importancia de los factores ambientales. Cada vez más, se presta mayor atención a los cambios en la composición de la microbiota intestinal en sujetos celíacos, y a su relación como factor en la patogénesis de la enfermedad [98]. Diversos estudios han demostrado diferencias en cuanto a su composición mediante el análisis de heces y en biopsias intestinales, encontrando diferencias no sólo tras la instauración de la DSG sino también antes, pudiendo ser una de las causas determinantes. Así, se ha visto que los pacientes celíacos presentan, entre otras, una relación entre bacterias beneficiosas (*bifidobacterium* y *lactobacillus*) inferior frente a las perjudiciales (*bacteroides* y *escherichi coli*) [99].

La DSG, además, puede afectar la composición de la microbiota, sobre todo debido a la composición en fibra [100–102]. La DSG se caracteriza en general por menor contenido de fibra y almidón resistente. Además y como se ha comentado anteriormente, fruto de



la fuerte interrelación entre las distintas partes que afectan a la enfermedad, estudios cuyo objetivo era demostrar el efecto de la DSG sobre la microbiota intestinal, han observado cambios en paralelo en sangre periférica a nivel de la cascada inmunológica, con disminución de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (TNF-alfa, IFN-gamma, IL-8 e IL-10) [103] y de radicales libres en el epitelio intestinal, así como de la capacidad antioxidante y de los niveles de superóxido dismutasa, similares en los grupos controles una vez instaurada la DSG [60].

Pero no sólo la DSG afecta a la microbiota (y por tanto al metaboloma), sino que el perfil metabolómico puede estar influenciado directamente por el microbioma. Los metabolitos producidos por el cuerpo pueden ser medidos en distintos tejidos: orina, saliva, heces, sangre... siendo estos últimos de interés, puesto que al haber pasado por distintas barreras biológicas (como la piel o la pared intestinal) y hacerse sistémicos, pueden ser más descriptivos de los efectos en el organismo [104]. El microbioma tiene capacidad de producir metabolitos, que incluyen moléculas de señalización, factores de virulencia y productos naturales, entre otros. Así, en estudios en ratones tratados con antibióticos frente a controles no tratados, se ha visto la influencia de la composición de la microbiota y se han obtenido distintos metabolitos en función de la misma (más de 600 tipos) [105]. Siguiendo esta línea, es interesante destacar que el microbioma y el metaboloma están influenciados por lo que se denomina el exposoma, es decir, todos los factores exógenos que pueden alterar el microbioma y el metaboloma, siendo la dieta el agente más representativo, puesto que en función de la ingesta de unos determinados alimentos u otros se producen composiciones de la microbiota intestinal distinta, con producción distinta de metabolitos, caso similar al que comentábamos anteriormente con la DSG.

No obstante, el perfil metabolómico informa de cómo el organismo se encuentra en un momento determinado, una vez se han interrelacionado entre sí los distintos procesos que llevan a los cambios celulares y las reacciones bioquímicas que se producen, es decir, la metabolómica nos informa de algún modo de en qué estado se encuentra el organismo, tras la interrelación de la microbiota, la actividad física, las noxas ambientales, la dieta o el estado de salud o enfermedad que tenga en ese momento; siendo, por tanto, un resumen de la biología celular del organismo. Con un análisis metabolómico en el que se minimicen sesgos entre los grupos de comparación, podremos conocer la importancia de la enfermedad sobre las reacciones celulares y el perfil metabolómico.

### **Farma-metabolómica y metabolómica y enfermedades crónicas**

La metabolómica se ha aplicado con éxito en variedad de estudios, proporcionando biomarcadores [106,107], comprensión a la fisiopatología de la enfermedad y su interacción con fármacos [108–110], predicción de toxicidad inducida por fármacos [111,112] y datos sobre el metabolismo [113].

Así, se han realizado estudios para predecir la respuesta al fármaco o la dosis más eficaz con la menor toxicidad sobre todo en el campo de los fármacos y la patología cardiovascular. Se ha investigado, entre otros, en relación a aspirina, simvastatina, atenolol, y en otros campos, como en enfermedades depresivas y la sertralina [114–118]. Todo esto ha podido hacer que se presupongan “buenos” o “malos” respondedores al fármaco, llevando esto a una atención más personalizada del paciente.

En enfermedades crónicas se ha usado ampliamente. En enfermedad inflamatoria

intestinal se ha comparado el metaboloma de estos pacientes con población sana, observándose cambios en los niveles de butirato y acetato entre ambos, también se han sugerido alteraciones que pudieran sugerir inflamación colónica sin necesidad de biopsia. Se han realizado también análisis del metaboloma entre los distintos tipos de enfermedad inflamatoria intestinal y se han observado diferencias entre pacientes con Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa [119]. Otros estudios, como el de Lin et. al., ponen de manifiesto que el análisis de metabolitos podría ayudar a distinguir los efectos del ambiente [120]. Holmes et. al, analizaron el metaboloma por Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y observaron que mediante el simple análisis de orina se podía correlacionar la dieta, presión arterial y actividad microbiana intestinal [121].

Se ha utilizado también la metabolómica en distintos campos, como en diversas enfermedades reumatológicas, pulmonares, cardiológicas, renales, Diabetes Mellitus o incluso en técnicas de reproducción [122–126], principalmente con el objetivo de encontrar biomarcadores.

Como vemos, son muchas las enfermedades que están usando la metabolómica actualmente, ayudando la misma a comprender mejor la enfermedad y quién sabe si erigiéndose en una herramienta clave para el diagnóstico o el seguimiento en el futuro.

### **Plataformas de la metabolómica**

La metabolómica se sirve de instrumental de alta resolución para el análisis de metabolitos junto con herramientas estadísticas. A pesar de la aparición de nuevas técnicas, los métodos más aceptados son la NMR y Espectrometría de masas (MS). El

rápido avance de la metabolómica se debe, en parte, al desarrollo de estas técnicas en los últimos diez años [127]. Dada la diferente cobertura analítica de estas tres plataformas, se han utilizado para estudios metabolómicos específicos o no dirigidos, ya sea individualmente o en combinación para detectar metabolitos. Ambos detectan gran variedad en una única medida. La MS mediante técnica de ionización mide el peso molecular de los compuestos, determinando la distribución de las moléculas en función de su masa. Se usan espectrometría de gases o de líquidos para la separación física de los metabolitos antes del análisis de masas. La NMR estima la resonancia magnética de los núcleos, reuniendo información estructural a través de patrones de frecuencia y resonancia. No obstante, cada una de las técnicas presenta ventajas e inconvenientes inherentes a las mismas. Los métodos fueron comparados por Lin et. al., [120] y quedan reflejados en la tabla 2. En general, la NMR es superior en la identificación de metabolitos y cuantificación, pero con menor sensibilidad y mayor costo de puesta en marcha [127].

MÉTODO	MS	NMR
<b>Cuantificación y reproductibilidad</b>	Menor	Mayor
<b>Sensibilidad</b>	Mayor	Menor
<b>Rango de detección</b>	Más amplio si se hace con separación cromatográfica	Más estrecho
<b>Muestras</b>	No pueden ser reutilizadas	Pueden reutilizarse

Tabla 2. Comparación de MS (espectrometría de masas) y NMR (espectroscopia de resonancia magnética nuclear).

- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

La NMR es una técnica de análisis que se vale de las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos que absorben radiación electromagnética para determinar las propiedades físicas y químicas de las moléculas. Un núcleo atómico activo sometido a un campo magnético absorbe la radiación electromagnética a unas frecuencias determinadas, para después volver a emitirla. Las distintas frecuencias de los núcleos activos conformarán un espectro de resonancia. Estas frecuencias se pueden usar para determinar la estructura de la molécula donde se encuentra, puesto que la frecuencia de resonancia y la intensidad de señal dependen del entorno químico en el que se encuentre el núcleo (la estructura molecular) y de la concentración de la molécula.

La NMR es una técnica reproducible que no destruye las moléculas. En una muestra biológica, todas las moléculas que contienen por ejemplo hidrógeno darán un H-NMR espectro siempre y cuando superen la cantidad mínima de detección del sistema. El espectro por tanto de un fluido será la superposición de miles de pequeñas moléculas diferentes presentes en la muestra a una concentración mínima determinada, además de presentar gran precisión. Debido a la necesidad de tener una concentración mínima puede ser que potenciales biomarcadores estén por debajo del límite de detección, constituyendo esto una desventaja, siendo por tanto su principal inconveniente la baja sensibilidad del método, además de su coste, por lo que es inapropiado para el análisis de grandes cantidades de metabolitos de baja abundancia [128]. Otra ventaja es que las muestras requieren poco tratamiento previo al análisis [81].

- Espectrometría de masas (MS)

La MS es la técnica más utilizada para la identificación y cuantificación de metabolitos conocidos así como para la detección de moléculas con señales de baja abundancia [80]. Determina de manera muy precisa la masa de las moléculas que se someten al proceso. Las moléculas de una muestra reciben un rayo de electrones (haz electrónico), convirtiéndose a iones. Posteriormente, los iones son acelerados por placas con carga y separados en un campo magnético en función de su relación entre masa y carga. En el detector se genera un espectro con una serie de picos en función de la intensidad de cada ion. Es una técnica destructiva pero presenta la ventaja de que necesita muy poca cantidad de muestra. Al contrario de la NMR, para la MS se precisa separación de los metabolitos antes del análisis, usándose para tal fin gas cromatografía o líquido cromatografía.

*Estamos, por tanto, ante el advenimiento de una ciencia nueva, la metabolómica, que mediante sus plataformas proveerá mayor conocimiento sobre la fisiopatología de las enfermedades que otras ciencias ómicas, permitiendo una aproximación al metabolismo celular que nos ayudará a mejorar el diagnóstico e idear estrategias terapéuticas más individualizadas. En la propia EC parece que hay cambios importantes en vías claves de desarrollo y progresión de la enfermedad.*



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

El presente estudio tiene como objetivo general determinar diferencias metabólicas plasmáticas entre niños afectados de Enfermedad Celiaca y controles sanos.

- **Objetivo 1.** *Analizar el perfil metabólico de niños celíacos mediante análisis dirigido y no dirigido de metaboloma en plasma.* Para ello se realizará análisis de metabolómica dirigida y no dirigida tanto a los pacientes como a los controles. En la actualidad, se dispone de un número muy limitado de estudios metabólicos de la EC, pero parecen verificar la existencia de diferencias metabólicas menores pero significativas entre individuos sanos y pacientes celíacos. La mayoría de los estudios analizan fluidos biológicos de pacientes adultos, siendo los estudios en pediatría escasos y muy heterogéneos, pues no todos han utilizado la misma plataforma metabólica, y no todos han realizado análisis dirigido y no dirigido, como es nuestro caso. El plasma sanguíneo es fácil de obtener y es el principal portador de metabolitos en el cuerpo[129], y la composición de este fluido biológico es bien conocida, incluso si está en continuo cambio, reflejando los estados fisiológicos en salud y enfermedad[130,131].

***Hipótesis 1.*** Obtendremos resultados interesantes en el perfil metabólico de los pacientes, que permitirán ayudar a conocer si existe una huella característica de la enfermedad, derivada de alteraciones en la microbiota intestinal o la permeabilidad intestinal, malabsorción o alteraciones en el metabolismo de principios inmediatos, o bien si se produce normalización total del metaboloma



una vez realizada la DSG por los pacientes. La DSG induce una reversión de los signos y síntomas de la EC y cambios histológicos, así como cambios metabólicos, y las posibles alteraciones metabólicas remanentes o persistentes deberían ser, si están presentes, específicas de la enfermedad de la EC

- **Objetivo 2.** *Comparar el metaboloma obtenido de los pacientes con la enfermedad con el de sus hermanos, genéticamente idénticos.* Se usarán como controles a los hermanos de los pacientes, usando muestra plasmática de ambos. El metaboloma se puede influenciar por la microbiota, dieta, actividad física y otros factores ambientales, por lo que a efectos comparativos, el hecho de estudiar hermanos genéticamente idénticos y que conviven en domicilio con los pacientes, se presentan como controles ideales para tal fin.

***Hipótesis 2.*** Las diferencias que se observen, de haberlas, se deberán exclusivamente a la enfermedad, pues se habrán podido controlar otra serie de factores que son muy difícilmente controlables en investigación. Con el análisis del perfil metabolómico de hermanos, podremos predecir en los hermanos sanos cuándo se va a producir la enfermedad (cuando se parezca al del hermano enfermo) probablemente antes de la aparición de la clínica o la modificación de los datos histológicos, llevándonos a realizar un diagnóstico precoz.

- **Objetivo secundario 1.** *Describir mediante el análisis metabolómico potenciales vías fisiopatogénicas involucradas en el desarrollo y progresión de la enfermedad.* La metabolómica provee mayor conocimiento sobre la fisiopatología de las enfermedades que otras ciencias ómicas, permitiendo una aproximación al metabolismo celular que nos ayuda a mejorar el diagnóstico e

idear estrategias terapéuticas más individualizadas. En la propia EC parece que hay cambios importantes en vías claves de desarrollo y progresión de la enfermedad.

**Hipótesis.** Observaremos alteraciones como resultado de la expresión de nuevos mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad. El mayor conocimiento de dichas vías podría ayudar a un mejor entendimiento de la enfermedad, así como al desarrollo de huellas propias que habrán de ser verificadas.

- **Objetivo secundario 2.** *Establecer nuevas vías de estudio para el potencial desarrollo de biomarcadores.*

**Hipótesis.** Si conseguimos discriminar metabolitos asociados únicamente a la enfermedad podremos paliar el hecho de presentarse en la clínica diagnósticos dudosos debido a escasa afectación histológica (Marsh 1), siendo considerado a este respecto como biomarcador diagnóstico. Potencialmente, podremos determinar en sangre metaboloma plasmático en sujetos a riesgo de la enfermedad, pudiendo ampliar estudio cuando el metaboloma presente huellas características de la enfermedad, pudiendo plantearse nuevamente como biomarcador de diagnóstico precoz. Por último, la presencia de un metaboloma, si se encuentra, normalizado, nos ayudará a determinar la eficacia de la DSG en sujetos ya diagnosticados, presentándose en este caso el metaboloma como biomarcador de seguimiento. Los marcadores tradicionales no son en ocasiones fiel reflejo de las transgresiones alimentarias o el mal cumplimiento [69–71], y el perfil metabolómico podría ser probablemente una buena alternativa, al ser un

método rápido y barato una vez estandarizado, además de ser mucho más dinámico e infomar de los procesos celulares en continuo cambio.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

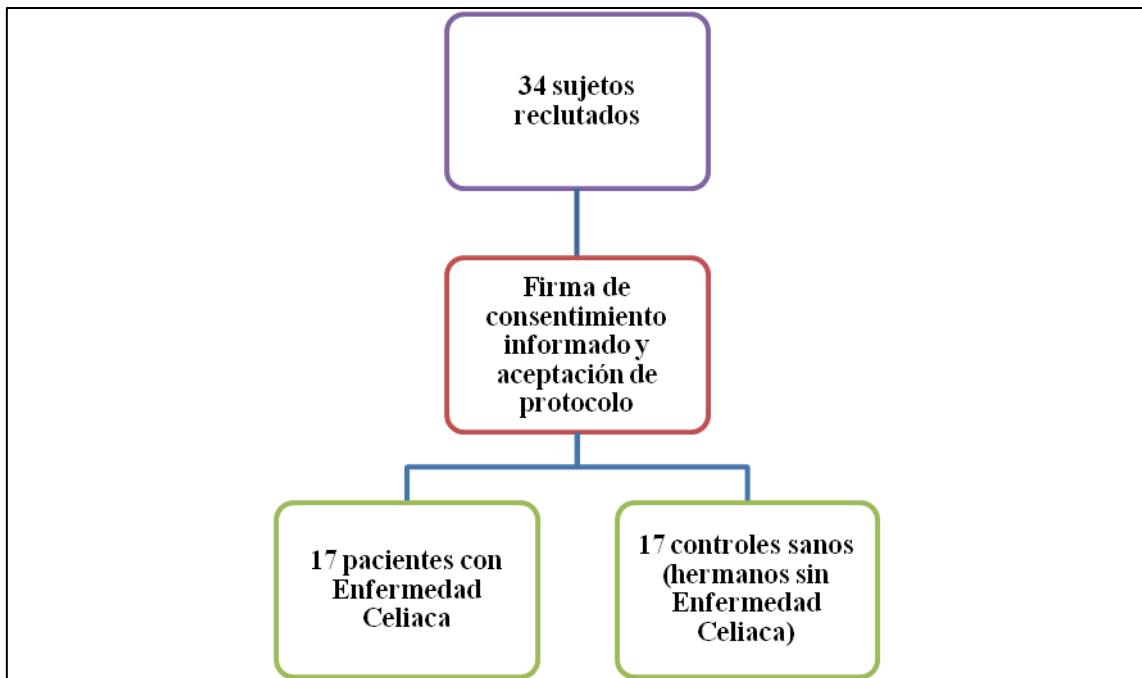
### **POBLACIÓN Y EMPLAZAMIENTO**

El presente estudio se ha llevado a cabo en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN) de Granada con la participación del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix Verdú" (INYTA) y el Departamento de Medicina Experimental de Lleida.

Se incluyeron niños de entre 1 y 16 años vistos en Consulta de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas del HUVN, así como controles sanos que voluntaria y desinteresadamente hubiesen decidido participar. Para la comparación de datos entre grupos de hermanos genéticamente idénticos (pero no presentando la enfermedad todos), se animó a los padres a participar, decidiendo libremente así los padres su entrada en el estudio. El diagnóstico de la EC se realizó según los criterios validados en el momento de la recolección de pacientes, incluyendo: serología (presencia de anticuerpos antitransglutaminasa, antiendomiso IgA) y análisis histológico de la mucosa de intestino según procediese. Según las recomendaciones ESPGHAN de 2012 [1], también fueron incluidos los sujetos diagnosticados sin biopsia, pero con sintomatología y resto de criterios para cumplir el triple test positivo (marcadores serológicos y susceptibilidad genética HLA-DQ2/DQ8).

A los sujetos incluidos en el estudio se les extrajo para análisis muestra sanguínea y de orina, y se les realizó encuesta alimentaria y de actividad física, así como medición de otros parámetros antropométricos.

Se excluyeron del estudio los pacientes que estuvieran sufriendo un proceso agudo en el momento de la extracción de la muestra, así como los afectos de enfermedad hepática, reumatológica o renal crónica. Se excluyeron los pacientes obesos (según criterios de la International Task Force [132], con enfermedad inflamatoria intestinal, diabéticos, y aquéllos que presentasen asma crónica incontrolada [133], además de los pacientes que estuviesen tomando fármacos antioxidantes y aquéllos que no firmasen el consentimiento informado.



*Figura4. Algoritmo de recolección de pacientes y sujetos finalmente incluidos.*

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO Y RESPONSABILIDADES ÉTICAS**

El estudio realizado ha requerido el uso de muestra de sangre de los sujetos, pero esto no ha implicado la extracción de la misma de forma expresa, sino que se ha utilizado la sangre que se extrae a los sujetos en su revisión rutinaria al diagnóstico de la enfermedad o durante su seguimiento semestral o anual, tal y como indica el protocolo de seguimiento de estos pacientes. A los pacientes captados al diagnóstico se extrajo la muestra en la analítica que confirmaba la enfermedad o el día de la biopsia intestinal (incluyéndose en el estudio si finalmente se diagnosticaban de enfermedad celíaca).

A los hermanos de pacientes se ha extraído sangre en el contexto de cribado como familiares de primer grado de pacientes con la enfermedad o en análisis rutinario requerido por otra causa.

El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki y ha sido aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Granada (Ref. 201202400000697). Los pacientes que se han reclutado han sido informados del estudio y han firmado el debido consentimiento informado.

## **PROTOCOLO DE ESTUDIO. CRONOGRAMA**

Una vez reclutados los pacientes por los métodos anteriormente comentados, se les acompañó a sala de extracciones para la recolección de las muestras biológicas. Posteriormente se concertó una cita para realización de cuestionarios y densitometría ósea.

El trabajo presentado se ha desarrollado durante 3 años, atendiendo al siguiente cronograma:

1. Primer y segundo año (2018-19). Preparación de manuales de procedimiento y puesta a punto de los mismos. Inclusión de pacientes y extracción de muestras sanguíneas y de orina. Encuestas alimentarias. Evaluaciones iniciales y construcción de base de datos.
2. Tercer año (2020): análisis estadístico y estudio del perfil de metabolitos. Análisis de otros parámetros, como status oxidativo y análisis del metabolismo fosfocálcico.
3. Tercer- cuarto año (2020-2021): análisis y discusión de resultados. Preparación y publicación de resultados. Lectura de tesis doctoral.



<b>Actividad</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>
<b>Preparación de manuales de procedimientos</b>	XXXX			
<b>Puesta a punto de los procedimientos</b>	XXXXXXXX			
<b>Reclutamiento de pacientes</b>	XXXXXX			
<b>Evaluaciones iniciales</b>	XXXXX	XXX		
<b>Cuestionarios y toma de muestras</b>		XXXX		
<b>Construcción de bases de datos</b>		XXXXXXXXXX		
<b>Análisis estadísticos</b>			XXXXX	
<b>Preparación de artículos y publicación de resultados</b>			XXXXX	XXXXXX
<b>Lectura de Tesis Doctoral</b>				XXXXXX

*Tabla 3. Cronograma de realización de estudio y tesis doctoral.*

## FINANCIACIÓN

Para la realización del estudio se solicitaron diversas ayudas, concediéndose las siguientes:

- Subvencionado por la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía (Proyectos de Investigación de Excelencia, convocatoria 2012). Título del proyecto: Estudio multidisciplinar del efecto de la dieta sin gluten en niños celíacos, para el desarrollo de productos adaptados a sus requerimientos (Referencia: P12-AGR-2581).
- Subvencionado por la Universidad de Granada. Título del proyecto: estudio multidisciplinar del valor nutricional de la dieta sin gluten y su impacto sobre el estado nutricional, la respuesta metabólica y calidad de vida en niños celíacos. (Referencia: PP2017.PIP014).
- Subvencionado por la Sociedad Pediatría Andalucía Oriental (SPAOr) mediante beca para ayuda a la Investigación 2020.
- Premio Especial de Investigación sobre Enfermedad Celíaca, concedido por la Asociación de Celíacos y Sensibles al Gluten de la Comunidad de Madrid, en convocatoria de 2020.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Manejo de muestras

- **Extracción de muestra sanguínea**

Se extrajeron 5 ml de sangre venosa a los pacientes con 8 horas de ayunas, en tubos anticoagulados con heparina sódica. La sangre se centrifugó a  $2500 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 10 minutos para la obtención de plasma. Posteriormente, las muestras de plasma se congelaron ( $-80^\circ C$ ).



*Figura 5. Sala de extracciones pediátrica Hospital Universitario Virgen de las Nieves*

- **Envío de muestras**

Para el análisis metabolómico las muestras fueron enviadas en hielo seco al Laboratorio de Metabolómica del Departamento de Medicina Experimental de Lleida.



Figura 6. Tratamiento de las muestras previo envío

## Estudio de metabolitos

- **Preparación de la muestra: extracción de metabolitos**

Para la extracción de metabolitos se siguió el método publicado por Jove [134]. Se almacenaron las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ , usándose metanol como disolvente orgánico para la extracción. Para la precipitación de proteínas se agregaron 3 volúmenes de metanol frío con  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  de fenilalanina isotópica marcada con  $^{13}\text{C}$ , como patrón interno y  $1\ \mu\text{M}$  de BHT como antioxidante, y tras agitarse en vórtice se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a  $12,000\ \times\ g$  a  $4^{\circ}\ \text{C}$  durante 3 minutos, logrando la precipitación de toda la proteína. Finalmente, el sobrenadante se

filtró a través de Eppendorfs Ultra Free de 5 kDa (UFC3LTK00, Millipore, Bredford, MA, EUA) y se pipetearon 200  $\mu$ L en viales de Agilent. Se usó un pool de extractos como control de calidad [135].

- **Espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC-MS)**

Para los análisis de especies metabólicas moleculares basadas en LC-Q-TOF, se utilizó un sistema LC Agilent 1290 acoplado a un instrumento ESI-Q-TOF MS / MS 6520 (Agilent Technologies, Barcelona, España). El análisis LC-MS / MS se sometió a 2  $\mu$ l de muestra extraída, que se aplicó en una columna de fase inversa (Zorbax SB-Aq 1,8  $\mu$ m 2,1 X 50 mm; Agilent Technologies, Barcelona, España) equipada con una precolumna (Zorbax-SB -C8 Cartucho de resolución rápida 2.1 X 30 mm 3.5  $\mu$ m; Agilent Technologies, Barcelona, España) con una temperatura de columna de 60 ° C. La velocidad de flujo se ajustó a 0,6 ml / min. El solvente A estaba compuesto de agua que contenía 0.2% de ácido acético y el solvente B estaba compuesto de metanol al 0.2% de ácido acético. El gradiente comenzó en 2% de B y aumentó a 98% de B en 13 min y se mantuvo en 98% de B durante 6 min. Pot-time se estableció en 5 min [136]. Los datos se recolectaron en modo de electrospray positivo y negativo TOF operado en modo de exploración completa a 50–1600 m / z en un rango dinámico extendido (2 GHz), utilizando N<sub>2</sub> como el gas nebulizador (10 L / min, 350 ° C). El voltaje capilar fue de 4000 V con una velocidad de 1,5 escaneos / s. La fuente de ESI usó un nebulizador separado para la introducción continua de bajo nivel (10 L / min) de compuestos de masa de referencia: 121.050873, 922.009798 (modo de iones positivos) y 119.036320, 966.000725 (modo de iones negativos).

Estas determinaciones se han realizado en los laboratorios del Departamento de Medicina Experimental e Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de Lleida.

- **Identificación de Metabolitos**

Se utilizó el software de análisis cualitativo MassHunter, una de las bases de datos más ampliamente utilizadas en todo el mundo de forma actual (Agilent Technologies, Barcelona, España) para obtener las características moleculares de las muestras, que representan diferentes especies iónicas comigratorias de una determinada entidad molecular utilizando el algoritmo Extractor de características moleculares (MFE) (Agilent Technologies, Barcelona, España). El software profesional MassHunter Mass Profiler (Agilent Technologies, Barcelona, España) y el software Metabolanalyst[137,138] se utilizaron para realizar un análisis metabólico y lipidómico no dirigido sobre las características extraídas. El diseño está encaminado a poder enlazar tres tipos de datos: químicos, clínicos y de biología molecular.

- **Análisis de datos metabolómicos y análisis estadístico**

Solo se seleccionaron aquellas características con una abundancia mínima de 5000 recuentos y 2 iones como mínimo. Después de eso, las características moleculares en las muestras se alinearon usando una ventana de tiempo de retención de 0.1% } 0.25 min y 20.0 ppm } 2.0 mDa. Se realizó una corrección basada en el control de calidad para corregir las intensidades de la muestra según el orden de inyección. Se realizó una

regresión LOESS para cada metabolito de CC, utilizando polinomios de segundo grado y con un parámetro de suavizado óptimo cada vez. Se predijeron los valores de la muestra y se obtuvo la relación entre los valores reales y los valores pronosticados, con base en protocolos y guías publicados previamente[139,140]. Solo las características comunes (que se encuentran en al menos el 70% de las muestras de CC) se tuvieron en cuenta para corregir el sesgo individual. Las estadísticas multivariadas (Análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), mínimos cuadrados parciales ortogonales - análisis discriminante (orthoPLS-DA) y análisis jerárquico y de clasificación) se realizaron utilizando el software Metaboanalyst [137,138]. Características que representan diferencias significativas por estadística univariante t de Student ( $p < 0.05$ ), definido por la masa exacta y el tiempo de retención, se buscaron contra el HMDB8 (precisión 30 ppm) bases de datos (precisión  $< 20$  ppm). Las identidades obtenidas se compararon con el tiempo de retención de los estándares auténticos añadidos.

Los resultados se expresaron como media y desviación estándar para las variables cuantitativas y el porcentaje de participantes (%) para las variables categóricas y para describir las características basales de la población. Se usó t de Student o test de Welch para explorar las diferencias entre las variables continuas. Además, se evaluaron las diferencias en las variables categóricas mediante el uso de la prueba de chi-cuadrado. Se realizaron estadísticas multivariadas utilizando el software Metaboanalyst en datos transformados (autoescalados y transformados logarítmicamente). Se realizaron estadísticas univariadas utilizando R versión 3.6.1. Se utilizó t de Student para medir las diferencias entre hermanos. El nivel mínimo de significación se fijó en  $p < 0,05$ . Los gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism (v8.0.1).

## Otros medios

### ○ Control dietético

Se realizó encuesta dietética por un Dietista nutricionista (entrenado para tal fin) tanto a los niños como a sus padres. Dicho registro estaba acompañado de instrucciones detalladas para la compilación y un atlas fotográfico que incluía diferentes imágenes de alimentos del tamaño de las porciones y un conjunto de medidas domésticas [141]. La encuesta incluyó un registro dietético de 3 días de todos los alimentos consumidos durante las diferentes comidas (desayuno, media mañana, almuerzo, merienda, cena). Para cada comida, se solicitó a los participantes que detallaran los alimentos y las recetas utilizadas (incluyendo los métodos de cocción y el azúcar o las grasas añadidas durante la preparación de la comida), la cantidad de alimentos (según el atlas) y las marcas de los alimentos consumidos.

Todos los registros fueron analizados por el mismo dietista, utilizando el software Evalfinut que incluye la Base de datos española de composición de alimentos [142]. El programa estimó el aporte energético (kilocalorías) y macronutrientes (proteínas, grasas totales, grasas saturadas, carbohidratos, azúcares simples y fibra, expresados en gramos) y el porcentaje de energía aportado por cada macronutriente. Los niveles recomendados de ingesta de energía y nutrientes para la población española [142] se tomaron como valores de referencia para la ingesta de energía y nutrientes y para el consumo de grupos de alimentos. Se completó la información nutricional de los productos sin gluten con los datos del etiquetado de los alimentos proporcionado por los fabricantes.

Además, se realizó cuestionario de consumo de frecuencia de alimentos y se evaluó la adherencia a patrones dietéticos adecuados, en concreto a la Dieta Mediterránea (DM),



utilizando la encuesta Kidmed y calculando la puntuación de adherencia (Índice de calidad de la dieta mediterránea en niños y adolescentes) [143]. Este índice se determina a partir de un cuestionario de 16 puntos que evalúa varios hábitos alimentarios. Cada respuesta se puntúa según sea coherente con los hábitos asociados al patrón mediterráneo, y se suman las puntuaciones para cuantificar el índice total de adherencia del sujeto a la DM. El índice KIDMED varía de 4 (sin adherencia a la DM) a 12 (adherencia completa a la DM).

- **Encuesta de actividad física**

La actividad física fue registrada mediante el cuestionario IPAQ [144]. Incluye algunas preguntas sobre la actividad física realizada en la última semana. Mediante este cuestionario se asignó una puntuación de 0 a 5. Se consideró la intensidad y frecuencia de cada actividad, realizándose una valoración cuantitativa y cualitativa de los datos de actividad física.



## **RESULTADOS**

Las características clínicas basales de la muestra del estudio se muestran en la Tabla 3. Un total de 34 niños participaron en el estudio; 17 EC y 17 hermanos sanos. No hubo diferencias entre los grupos, incluidos los factores que podrían afectar el análisis metabólico, como el estilo de vida (actividad física y hábitos alimentarios). En general hubo una adecuada adherencia a la DM en ambos grupos.

Tabla 4. Características sociodemográficas

<b>Variable</b>	<b>Controles (n=17)</b>	<b>Celíacos (n=17)</b>	<b><i>p</i>-valor</b>
<b>Edad (años)</b>	11.25 (4.23)	9.39 (2.77)	0.145
<b>Sexo (mujer, n [%])</b>	10 (58.8)	13 (76.4)	0.271
<b>Peso (kg)</b>	38.54 (16.9)	30 (9.63)	0.082
<b>Talla (cm)</b>	140.66 (20.32)	131.2 (19.56)	0.178
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	18.5 (3.98)	17 (1.58)	0.166
<b>Moderada actividad física (min/semana)</b>	69.64 (37)	81.4 (56.9)	0.52
<b>Adherencia a Dieta Mediterránea(%)</b>			
<b><i>Baja</i></b>	1 (5.9)	1 (5.9)	

<b>Media</b>	8 (47.1)	7 (41.2)	0.936
<b>Alta</b>	7 (41.2)	8 (47.1)	
<b>DSG</b>	7 (41.2)	8 (47.1)	
<b>Menos de 12 meses con DSG</b>		5	
<b>Más de 12 meses con DSG</b>		12	

Valores mostrados como media (desviación estándar) a menos que indicado; DSG: dieta sin gluten.

### Metabolómica dirigida

Se utilizó un enfoque metabolómico dirigido para analizar 7 intermediarios del metabolismo energético (Tabla 5), 12 aminoácidos (Tabla 6) y 18 metabolitos relacionados con el metabolismo de la metionina y la colina (Tabla 7), en pacientes con EC (17) y hermanos de control sanos (17).

En primer lugar, y para tener una visión global de cómo afecta la EC a estos 37 metabolitos, se aplicó un enfoque de estadística multivariante. Como muestra la Figura 8, los Análisis de Componentes Principales (PCA) no revelaron la existencia de un perfil metabólico específico del plasma asociado con el metabolismo de la metionina y la colina, los aminoácidos o los intermediarios del metabolismo energético para los celíacos (Figura 7). Además, no se observó un perfil metabolómico similar entre hermanos.

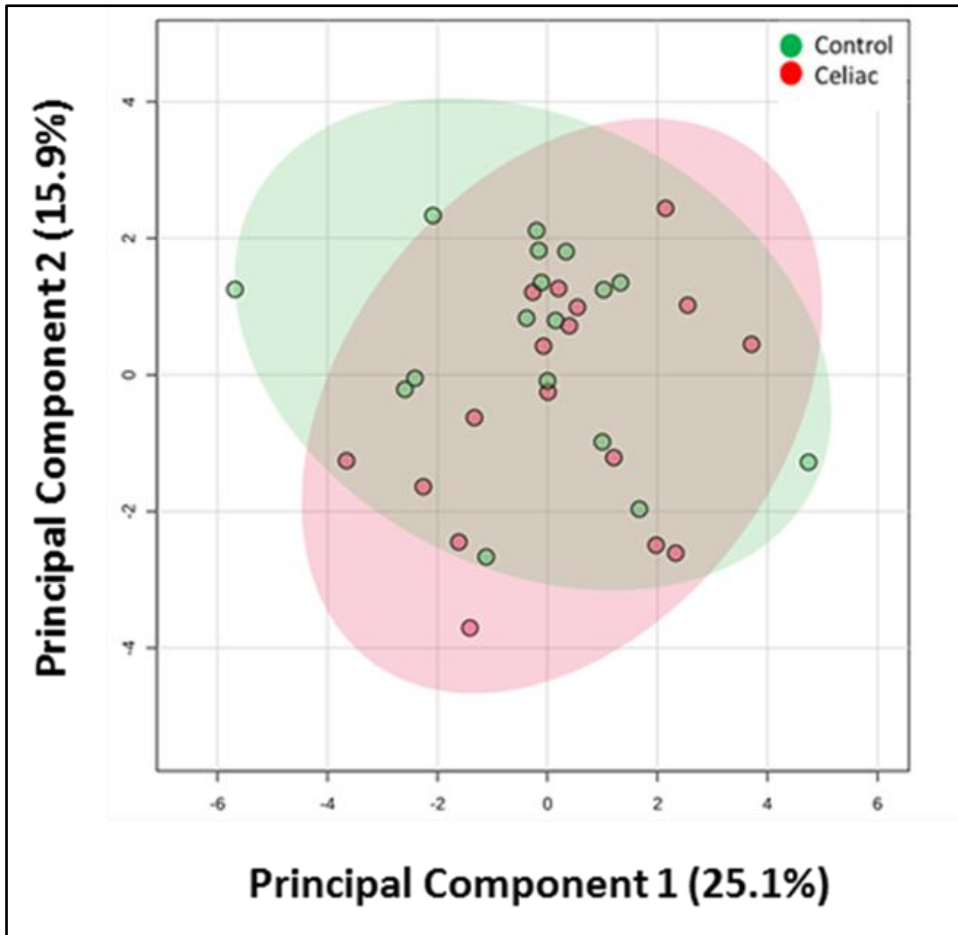


Figura 7. Los análisis de componentes principales no muestran diferencias en el metaboloma plasmático de los metabolitos analizados entre pacientes con enfermedad celíaca y hermanos sanos.

En segundo lugar, y con el fin de determinar específicamente si los niveles plasmáticos de cada metabolito se veían afectados por la enfermedad de la EC, se aplicó una estadística univariante (prueba T pareada). De acuerdo con las estadísticas multivariadas, este análisis confirmó pequeños cambios en el metaboloma analizado. Específicamente, no se encontraron diferencias para los intermediarios del metabolismo energético plasmático (Tabla 4) y los aminoácidos plasmáticos (Tabla 5) entre niños con EC y hermanos de control sanos.

Tabla 5. Intermediarios del metabolismo energético plasmáticos en hermanos sanos (controles) y niños celíacos.

<b>Metabolito</b>	<b>Controles</b>	<b>Celíacos</b>	<b>P T-test</b>
<b><math>\alpha</math>-Ketoglutarato</b>	100 $\pm$ 4.2	95.7 $\pm$ 3.8	0.282
<b>Citrato</b>	100 $\pm$ 6.7	101.4 $\pm$ 6.3	0.713
<b>Fumarato</b>	100 $\pm$ 4.6	101.5 $\pm$ 3.7	0.684
<b>Isocitrato</b>	100 $\pm$ 7.5	104.4 $\pm$ 7.1	0.471
<b>Malato</b>	100 $\pm$ 6.4	101.7 $\pm$ 5.7	0.776
<b>Piruvato</b>	100 $\pm$ 6.9	97.2 $\pm$ 10	0.720
<b>Succinato</b>	100 $\pm$ 5.4	99.4 $\pm$ 4.3	0.909

*Los valores se expresaron como% con respecto a los controles.*

Tabla 6. Variaciones de aminoácidos plasmáticos en hermanos sanos (controles) y niños celíacos.

<b>Aminoácido</b>	<b>Controles</b>	<b>Celíacos</b>	<b>P T-test</b>
<b>Alanina</b>	100 ± 4.2	96.6 ± 7.4	0.621
<b>Arginina</b>	100 ± 6.1	92.9 ± 5.5	0.385
<b>Asparagina</b>	100 ± 3.3	103.6 ± 3.9	0.376
<b>Ácido aspártico</b>	100 ± 4.8	109.9 ± 5.8	0.085
<b>Histidina</b>	100 ± 3	100.2 ± 2	0.938
<b>Leucina/Isoleucina</b>	100 ± 5	96.1 ± 4.5	0.515
<b>Fenilalanina</b>	100 ± 3.9	96.6 ± 4.1	0.334
<b>Prolina</b>	100 ± 8.5	90.2 ± 6.4	0.283
<b>Treonina</b>	100 ± 6.5	100.1 ± 6	0.995
<b>Triptófano</b>	100 ± 4	93.4 ± 3.5	0.231
<b>Tirosina</b>	100 ± 8.8	100.3 ± 7.1	0.967
<b>Valina</b>	100 ± 5.2	99.7 ± 3.9	0.965

*Los valores se expresaron como% con respecto a los controles.*

Cuando nos centramos en el metabolismo de la colina y la metionina, observamos resultados similares. No se observó ninguna diferencia para los metabolitos implicados en el metabolismo de la colina, el ciclo del folato, y el ciclo de la metionina (Tabla 6).

Tabla 7. Variaciones de metabolitos plasmáticos en hermanos sanos (controles) y niños celíacos.

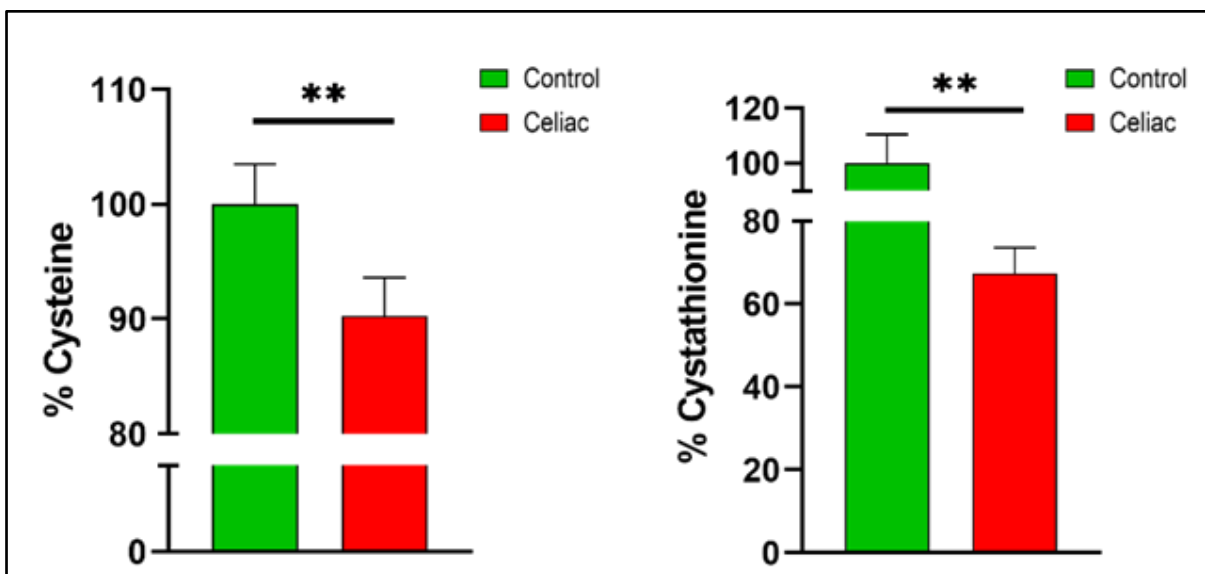
<b>Metabolito</b>	<b>Controles</b>	<b>Celíacos</b>	<b>P T-test</b>
<b>Betaína</b>	100 ± 6.4	93.7 ± 3.8	0.249
<b>Colina</b>	100 ± 5.2	95.1 ± 6.4	0.468
<b>Cisteína</b>	<b>100 ± 3.5</b>	<b>90.3 ± 3.4</b>	<b>0.008</b>
<b>Cistationina</b>	<b>100 ± 10.4</b>	<b>67.4 ± 6.2</b>	<b>0.024</b>
<b>Glutation</b>	100 ± 7.2	110.9 ± 10.1	0.368
<b>Glumato</b>	100 ± 14.3	109.7 ± 13.3	0.611
<b>Glicina</b>	100 ± 43.3	101.3 ± 27.8	0.982
<b>Homocisteína</b>	100 ± 12.7	86.4 ± 9.1	0.266
<b>Metionina</b>	100 ± 4.6	94.9 ± 5.6	0.360
<b>Piridoxal fosfato</b>	100 ± 18.4	105.7 ± 18.1	0.485
<b>Piridoxal</b>	100 ± 10.8	108.2 ± 11.8	0.123
<b>Piridoxamina</b>	100 ± 5.6	94.4 ± 6.3	0.244
<b>S-Adenosil-Homocisteína</b>	100 ± 6.5	134.5 ± 22.2	0.158
<b>S-Adenosil-Metionina</b>	100 ± 20.1	89.1 ± 19.9	0.282
<b>Serina</b>	100 ± 4.4	103 ± 3.5	0.519
<b>Espermidina</b>	100 ± 28.6	105.3 ± 28.4	0.186



<b>Taurina</b>	100 ± 16.2	105.9 ± 17	0.576
<b>N-Óxido Trimetilamina</b>	100 ± 30.6	66.1 ± 21.7	0.329

*Los valores se expresaron como% con respecto a los controles.*

Por el contrario, se observaron diferencias en la vía de transulfuración. Más específicamente, las estadísticas univariadas revelaron una reducción del contenido plasmático de cisteína y cistationina (10% y 30%, respectivamente) en individuos con EC en comparación con hermanos sanos (Figura 8).



*Figura 8. El contenido de cisteína y cistationina en plasma disminuye en los niños con EC en comparación con los hermanos sanos.*

La colina y la metionina, así como otros micronutrientes como el ácido fólico, las vitaminas B y la betaína, participan en una red metabólica compleja conocida como

metabolismo de un carbono [17-19]. Funcionalmente, el metabolismo de un carbono participa en la transferencia de restos de un carbono para la biosíntesis de fosfolípidos, aminoácidos y ADN, así como la metilación de proteínas, ARN y ADN. Más específicamente, esta red comprende el metabolismo de la colina, el ciclo del folato, el ciclo de la metionina o la vía de transmetilación, la vía salvaje de la metionina y la vía de transulfuración (Figura 9).

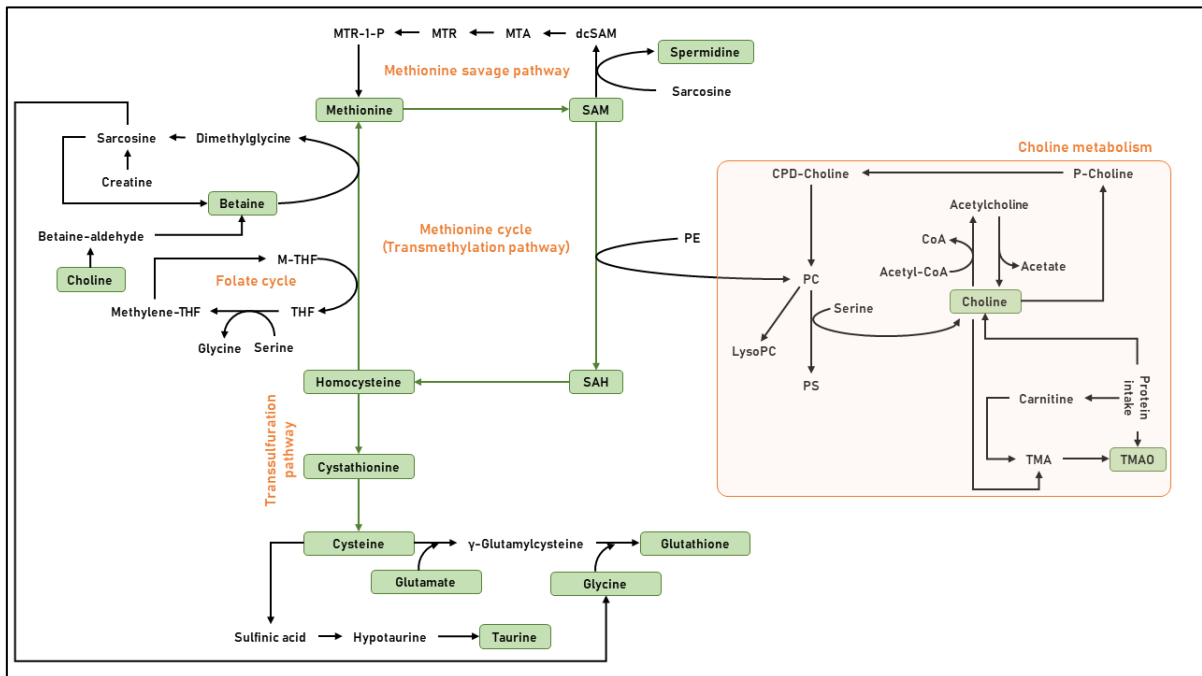


Figura 9. Esquema general del metabolismo de un carbono. La colina, un micronutriente esencial, se puede obtener de fuentes exógenas -por ejemplo, de alimentos como huevos, frijoles, pescado, nueces, semillas y cereales integrales- y de la biosíntesis endógena. La síntesis de novo de colina es catalizada por la actividad enzimática de la fosfatidiletanolamina-metiltransferasa (PEMT) a través de la metilación secuencial de PE utilizando S-adenosilmetionina (SAM) como donante de metilo. La oxidación de colina en su metabolito betaína por la colina oxidasa juega un papel en la formación de metionina y SAM, donantes de

*metilo que participan en las vías de metilación. SAM se considera el principal donante de metilo para las metiltransferasas de histonas (HMT) y las metiltransferasas de ADN (DNMT), enzimas clave que catalizan la metilación tanto de histonas como de ADN. La colina también puede acetilarse en acetilcolina (Ach) por la actividad enzimática de la colina acetiltransferasa (ChAT). La metionina es fundamental en una vía metabólica compleja que se puede dividir en tres partes: ciclo de la metionina, vía de transulfuración y biosíntesis de poliaminas. Por lo tanto, la metionina se convierte en el donante de metilo universal SAM, que tras la donación de un grupo metilo se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH). La SAH se hidroliza en homocisteína, que se puede usar para regenerar metionina a través del ciclo de betaína o folato. Además, la homocisteína puede volver a metilarse en metionina a través del ciclo del folato, o también puede entrar en la vía de transulfuración y convertirse secuencialmente en cistationina y cisteína en una serie de reacciones catalizadas por enzimas que utilizan la vitamina B6 como cofactor. Finalmente, esta cisteína puede dirigirse a la síntesis de glutatión o a la síntesis de taurina.*

### **Metabolómica no dirigida**

Con el objetivo de analizar el efecto de la EC en todo el metaboloma circulante, se realizó un análisis metabolómico no dirigido. La corrección de la línea de base, la selección de picos y la alineación de picos se realizaron en los datos adquiridos, lo que resultó en un total de 48952 moléculas de ambos modos de ionización (negativo y positivo). Después de la evaluación del control de calidad, el filtrado y la corrección de la señal, quedaron 4893, que se utilizaron para el análisis estadístico. Las estadísticas multivariadas reforzaron la idea de que no existe una firma metabolómica específica asociada con la enfermedad celíaca (datos no mostrados), pero cuando buscamos biomarcadores celíacos específicos, encontramos 209 moléculas estadísticamente

diferentes entre los grupos (anexo II). Entre estas moléculas, 36 se anotaron en función de la masa exacta, el tiempo de retención, la distribución isotópica y / o el espectro de MS / MS (Figura 1 y 2), 23 (64%) aumentaron en celíacos y 13 (36%) disminuyeron. Específicamente, describimos 2 ácidos carboxílicos y derivados aumentados en CD, 4 acilos grasos, 5 glicerolípidos, 11 glicerofosfolípidos, 1 compuesto organoxígeno y 2 esfingolípidos afectados por EC. Además, entre 36 moléculas con una identidad potencial, 8 de ellas eran especies de lípidos pertenecientes al metabolismo de los esteroides y 2 estaban involucradas en el metabolismo de la bilirrubina. Curiosamente, 9 de estas moléculas identificadas han estado involucradas en las vías de señalización celular (diacilglicéridos (DG), lisofosfolípidos y ceramidas) y están principalmente aumentadas en sujetos con EC.

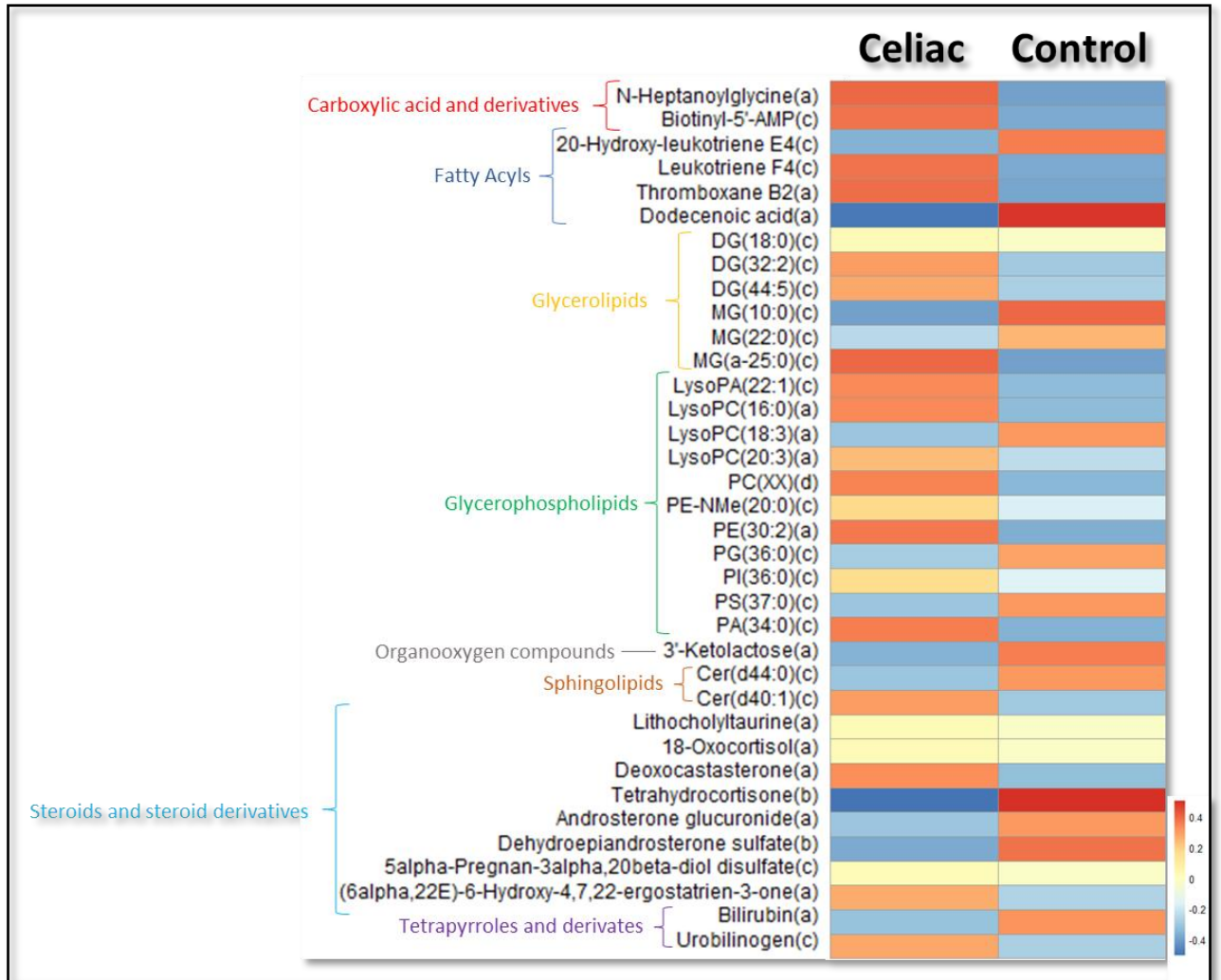


Figura 10. Metabolitos plasmáticos identificados significativamente diferentes en sujetos con EC en comparación con hermanos sanos. Los niveles de moléculas estadísticamente significativas se representan mediante un mapa de calor. Cada línea del mapa de calor representa una especie de lípidos coloreada por su intensidad de abundancia normalizada con un estándar interno, transformada logarítmicamente y autoescalada. La escala de azul a rojo muestra las abundancias normalizadas en unidades arbitrarias. (a) ID basada en masa exacta, RT y espectro MS / MS (alta confiabilidad); (b) ID basada en masa exacta, RT y espectro MS / MS (confiabilidad media); (c) ID basado en masa exacta y RT; (d) ID basada en el espectro MS / MS. PC (XX): no se pudo anotar la especie específica de fosfatidilcolina, pero su espectro MS / MS mostró un patrón característico de PC.

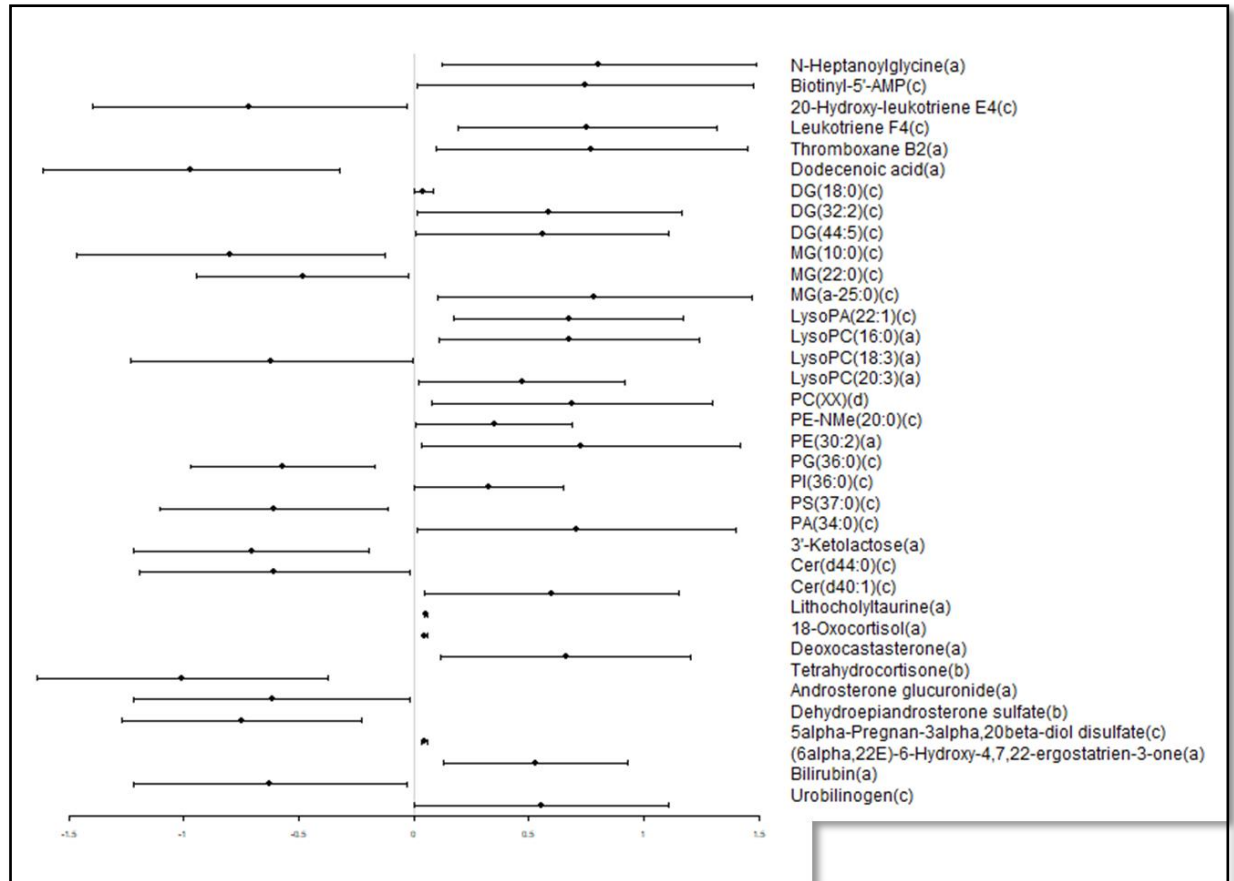


Figura 11. El metabolismo de los lípidos parece verse afectado preferentemente por la EC. Los niveles de moléculas estadísticamente significativas se representan mediante forest plot. Para el forest plot, los puntos representan la diferencia estimada en las medias y los bigotes representan los intervalos de confianza.

(a) ID basada en masa exacta, RT y espectro MS / MS (alta confiabilidad); (b) ID basada en masa exacta, RT y espectro MS / MS (confiabilidad media); (c) ID basado en masa exacta y RT; (d) ID basada en el espectro MS / MS. Fosfatidilcolina (PC) (XX): no se pudo anotar la especie específica de fosfatidilcolina, pero su espectro MS / MS mostró un patrón característico de fosfatidilcolina.



## **DISCUSIÓN**

La variabilidad en las manifestaciones clínicas de la EC se debe a la vulnerabilidad diferencial interindividual sustentada por factores genéticos, inmunológicos y ambientales. A la diversidad de signos y síntomas que genera la EC, observaciones recientes sugieren que también se deben considerar las alteraciones metabólicas en sujetos con EC. Aunque hoy en día en la mayoría de los casos el diagnóstico de EC requiere ser confirmado por una biopsia, un mejor conocimiento de los procesos metabólicos subyacentes a esta patología podría ofrecer la oportunidad de descubrir nuevos mecanismos fisiopatológicos y biomarcadores potenciales útiles para el diagnóstico de casos dudosos debido a los resultados histológicos, así como para el seguimiento de la enfermedad. La metabolómica es una aproximación complementaria para estudiar enfermedades multifactoriales, siendo por tanto una herramienta potencialmente útil para el estudio de la EC.

En la actualidad, se dispone de un número muy limitado de estudios metabolómicos de la EC, pero parecen verificar la existencia de diferencias metabólicas menores pero significativas entre individuos sanos y pacientes celíacos (niños y adultos)[85,87,88,90,92,94]. En estos estudios, utilizando métodos basados en NMR o MS, se analizaron diferentes tipos de muestras biológicas, incluidos suero, plasma, orina y materia fecal. En general, la huella metabólica encontrada deriva de alteraciones en la microbiota intestinal o la permeabilidad intestinal, malabsorción y alteraciones en el metabolismo[85,87,88,90,92,94]. Parece, además, que la introducción de una DSG estricta parece revertir en parte el perfil metabólico de los pacientes con EC a una condición saludable.



En estudios previos, las principales diferencias observadas en los metabolitos séricos entre pacientes con EC y controles fueron niveles más bajos de aminoácidos, como asparagina, isoleucina, prolina, valina y metionina, y diversos metabolitos como metilamina, piruvato, creatinina, colina, metilglutarato, lactato y lípidos (fosfatidicolinas) y niveles más altos de glucosa, ácido 3-hidroxi-butírico y triacilglicéridos[85,87,88,90,92,94]. Los niveles reducidos de colina, metionina y lípidos (particularmente fosfatidilcolinas) podrían ser relevantes porque estos metabolitos podrían expresar defectos en el metabolismo de un carbono. Los resultados presentados en esta Tesis confirman esta idea, descubriendo la vía de transulfuración como potencialmente afectada por la EC, mientras que las otras vías involucradas en el metabolismo de un carbono parecen conservarse.

Considerando la vía de la transulfuración, la disminución de la concentración de cisteína y cistationina en pacientes con EC podría deberse a defectos en las enzimas que participan en su biosíntesis. Así, el paso de homocisteína a cistationina está mediado por cistationina beta-sintasa (CBS; EC 4.2.1.22), y la conversión de cistationina en cisteína es catalizada por la enzima cistationina gamma-liasa o cistationasa (CTH; EC 4.4.1.1)[145–147]. Curiosamente, ambas enzimas son homotetrámeros citoplasmáticos que requieren vitamina B6 (fosfato de piridoxal) como cofactor, y ambas son capaces de producir sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), un gasotransmisor, mediante el uso de cisteína [146–149]. El hecho de que no se observaron diferencias en el contenido de glutatión y vitamina B6 en niños con EC sugiere un defecto específico a nivel de estas enzimas. En consecuencia, además de los problemas potenciales derivados de deficiencias en el contenido de cisteína, los defectos en la síntesis de H<sub>2</sub>S podrían ser especialmente relevantes en pacientes con EC, debido a los importantes procesos fisiológicos

regulados por esta molécula gaseosa. De hecho, el H<sub>2</sub>S modula varios aspectos de la fisiología celular como la proteostasis, la defensa antioxidante, la detección de oxígeno, la función mitocondrial, la inflamación y la señalización de segundos mensajeros, así como la fisiología del sistema que afecta las funciones cardiovascular, nerviosa e inmunitaria [150–152]. Sorprendentemente, el H<sub>2</sub>S parece desempeñar un papel regulador clave en la producción de energía mitocondrial [153]. Por lo tanto, las alteraciones en la síntesis de H<sub>2</sub>S en sujetos con EC podrían asociarse con defectos en el metabolismo energético, como de hecho se demostró en otros estudios, que mostraron un menor contenido en metabolitos energéticos [85,86].

Una posible alternativa o interpretación adicional es que una mutación en la SAH hidrolasa (compatible con niveles más altos de SAH, no significativa en este estudio) podría conducir a niveles reducidos de HCys (no significativo en este estudio), y por lo tanto, cistationa y cisteína reducidos. Según Malacards[154], la deficiencia de SAH hidrolasa causa síntomas como retraso del crecimiento, anomalías dentales, hipertransaminasemia, elevación de creatina quinasa [155] o hipermetioninemia (que es común en la EC recién diagnosticada y tiende a normalizar tras el inicio de DSG).

Por otra parte, con el objetivo de analizar el efecto de la EC en todo el metaboloma circulante, se realizó un análisis metabolómico no dirigido. Los resultados que se presentan demuestran la persistencia de alteraciones en todo el metaboloma circulante de los pacientes con EC a pesar de la intervención dietética, sobre todo en mediadores lipídicos.

Estudiar el lipidoma y los productos de degradación de la alterada absorción y metabolismo lipídico podría ofrecer interesantes biomarcadores para la EC. El perfil

lipídico ha sido propuesto como biomarcador nutricional del metabolismo de los niños [156,157]. La lipidómica se considera una herramienta prometedora no sólo para monitorizar los aspectos nutricionales de una patología sino también para predecir el desarrollo de las mismas[158]. Los lípidos no tienen sólo función estructural en la composición de las membranas y organelas, sino que presentan funciones de señalización claves. El metabolismo lipídico es una huella de la homeostasis energética, estructura de la membrana, y señalización de procesos dinámicos. El desequilibrio en su metabolismo puede por tanto contribuir a definir distintos fenotipos de estados patológicos, tanto agudos como crónicos, contribuyendo al mejor entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades.

Los cambios que hemos observado son importante aunque sutiles, ya que solo parecen estar afectados 209 metabolitos, que representan solo alrededor del 4% del metaboloma plasmático total analizado. Entre estos 209 metabolitos, solo se identificaron 36, 23 (64%) aumentaron y 13 (36%) disminuyeron en la EC. Curiosamente, identificamos moléculas que pertenecen principalmente a familias de lípidos e implicadas en la señalización celular (DG, lisofosfolípidos y ceramidas). Estas especies de lípidos aumentan principalmente en la EC. Además, también encontramos derivados de ácidos grasos implicados en vías inflamatorias como leucotrienos y tromboxanos. Cabe destacar que 8 de las especies lipídicas identificadas pertenecían al metabolismo de los esteroides y 2 de ellas estaban involucradas en el metabolismo de la bilirrubina, sugiriendo posibles alteraciones a nivel hepático, así como en el sistema endocrino y, en particular, en las glándulas suprarrenales. Aunque se han descrito manifestaciones endocrinas en la enfermedad celíaca [159], esta es la primera vez que se reportan alteraciones potenciales que afectan la función de la glándula suprarrenal.

Entre los cambios observados en las especies moleculares de lípidos, es particularmente relevante el mayor contenido de DG (3 especies) y ácido fosfatídico (PA) (1 especie), que requiere una atención especial. DG tiene funciones exclusivas como constituyente de las membranas celulares, intermedio en el metabolismo de los lípidos y la señalización mediada por lípidos, y sus niveles están estrictamente regulados[160]. En esta línea, las señales de DG son particularmente relevantes en los tejidos neuronales e inmunes que juegan un papel central en el control de la comunicación neuronal, la fagocitosis y el control de las respuestas inmunes[161]. Básicamente, DG se genera por hidrólisis de PI (4,5) P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) que también es el sustrato para la actividad de PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa). DG se fosforila en una reacción catalizada por DG quinasas (DGK) para generar PA, el primer paso de una serie de reacciones que reponen los niveles de PI (4,5) P2 en el ciclo del fosfatidilinositol. Otras fuentes de DG incluyen el conjunto generado a partir de fosfatidilcolina y ceramidas. Es importante destacar que DG y PA, como segundos mensajeros de lípidos, desempeñan un papel importante en la regulación de varias proteínas diana, incluidas, entre otras, numerosas proteínas quinasas como mTOR [162]. Curiosamente, recientemente se ha descrito una respuesta inflamatoria sostenida mediada por la activación de mTOR en la EC [163]. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren posibles defectos de estos procesos biológicos posteriores a la regulación al alza del metabolismo de DG y cuyas consecuencias deben evaluarse en pacientes con EC.

Se cree que la malabsorción lipídica es debida a la atrofia vellositaria característica de la enfermedad [164] pero el hecho de que las diferencias en el lipidoma se hayan encontrado en sujetos antes del desarrollo de la enfermedad hace necesario buscar otras hipótesis. Nuestros resultados también corroboran esta idea, pues los cambios se

produjeron en el análisis plasmático de sujetos en su mayoría con DSG mayor de 12 meses. Una explicación plausible es que la malabsorción lipídica puede conducir a una reducción de las lipoproteínas transportadoras de colesterol y a la secreción de apolipoproteína A1 [165,166]. La malabsorción lipídica podría ocurrir mucho antes del desarrollo de la enfermedad, llevando a lipogénesis de novo [167], como reflejan los resultados del estudio de Sen [90]. Los cambios en el perfil lipídico antes de la DSG podrían ser, por tanto, debidos a la absorción de lípidos alterada y la lipogénesis de novo, siendo ambos parte de la respuesta inmunitaria [90].

### **Fortalezas y limitaciones**

El presente trabajo tiene algunas limitaciones: (1) el tamaño de la muestra del presente estudio fue relativamente pequeño y, en consecuencia, los resultados actuales deben interpretarse con cautela. Además, el hecho de que cinco de los niños celíacos estuvieran en una DSG durante menos de 12 meses (aunque límite) podría influir en los resultados, ya que una DSG a largo plazo podría actuar sobre las vías metabólicas a los 12 meses, como mostraron otros estudios en una población adulta [86]. Por contra, los estudios hasta la fecha presentan escaso tamaño muestral, lo que podría limitar la validez de los mismos, pero el estudio que se presenta es el primer abordaje metabólico de hermanos en EC pediátrica. Este hecho reduce las diferencias que pueden ocurrir en los procesos metabólicos[168], que podrían estar influenciados por diversos mecanismos, como realizar una DSG, disminuyendo la variabilidad, ya que, además, la mayoría de las familias con un miembro con EC se adhieren ampliamente a este tipo de dieta[169]. Además de ser hermanos genéticamente idénticos unos controles ideales, se ha tenido en cuenta y se han controlado otros factores que pueden influenciar en el metaboloma, como la actividad física.

(2) Se obtuvieron muestras de plasma después de un ayuno nocturno, para evitar el efecto de la dieta en el metaboloma plasmático. Sin embargo, no podemos descartar que las diferencias observadas en la vía de transulfuración pudieran reflejar otras alteraciones no directamente relacionadas con esta vía.

(3) No todos los metabolitos del metabolismo de un carbono pudieron detectarse y analizarse, por lo que debe tenerse en cuenta que la vista que obtuvimos de esta vía metabólica no era completa.

(4) Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, hubo diferencias tanto en sexo como en edad y se sabe que muchos metabolitos podrían variar según ella. No obstante, la prevalencia de la enfermedad es asimétrica, con mayor porcentaje de mujeres [9], por lo que nuestra variabilidad no significativa se debe a la distribución propia de la enfermedad.

(5) Otra limitación que debe tenerse en cuenta es que no se pudo evaluar completamente el metabolismo de los glicerofosfolípidos porque se cree que el método de extracción de metabolitos utilizado extrae componentes más polares y no se extrajeron ni detectaron triacilglicéridos. En consecuencia, se ha descartado el papel potencial de estas moléculas como fuente bioenergética.





## **CONCLUSIONES**

### **CONCLUSIÓN PRIMERA**

La vía de la transulfuración parece estar afectada en pacientes con Enfermedad Celiaca, mientras que otras vías involucradas en el metabolismo de un carbono parecen conservarse. Concretamente, la disminución de cisteína y cistationina unido a la normalidad de glutatión y vitamina B6 sugieren un defecto específico a nivel de las enzimas que participan en su biosíntesis.

### **CONCLUSIÓN SEGUNDA**

Los defectos en el contenido de cisteína y potencialmente en la síntesis de sulfuro de hidrógeno podrían afectar a la proteostasis, la defensa antioxidante, la detección de oxígeno, la función mitocondrial, la inflamación y la señalización de segundos mensajeros.

### **CONCLUSIÓN TERCERA**

Los niveles disminuidos de cisteína y cistationina podrían ser justificados por una mutación de SAH hidrolasa que, además, cursa con síntomas típicos de la Enfermedad Celiaca, como retraso del crecimiento, anomalías dentales, hipertransaminasemia, elevación de creatina quinasa o hipermetioninemia.

### **CONCLUSIÓN CUARTA**

El análisis metabolómico no dirigido mostró alteraciones en todo el metaboloma circulante de los pacientes con EC a pesar de la DSG, sobre todo en mediadores lipídicos, lo que sugiere una huella metabólica característica.

### **CONCLUSIÓN QUINTA**

Hay diferencias en metabolitos derivados del metabolismo de los lípidos que están implicados en vías inflamatorias, metabolismo de los esteroides y metabolismo de la bilirrubina, sugiriendo alteraciones a nivel hepático y en el sistema endocrino, concretamente las glándulas suprarrenales, siendo esta la primera descripción reportada sobre alteraciones a nivel de esta vía fisiopatogénica.

### **CONCLUSIÓN SEXTA**

Se han observado diferencias en los niveles de diacilglicerol, que es un mediador importante que juega un papel central en el control de la comunicación neuronal, la fagocitosis y el control de las respuestas inmunes. Como segundo mensajero desempeña un papel importante en la regulación de mTOR, que ha sido descrito recientemente como factor clave para mantener una respuesta inflamatoria sostenida en la enfermedad.

## CONCLUSIÓN GENERAL

Los datos aquí presentados, sugieren por primera vez, alteraciones significativas en la vía de transulfuración de los sujetos con EC a pesar de estar bajo una DSG, como resultado de la expresión de un nuevo mecanismo fisiopatológico subyacente a la enfermedad. Además, las alteraciones menores pero significativas en el metabolismo lipídico de sujetos con EC a pesar de una DSG sugieren, asimismo, la expresión de nuevas vías fisiopatogénicas alteradas y descritas por primera vez. El mayor conocimiento de dichas vías podría ayudar a un mejor entendimiento de la enfermedad, así como al desarrollo de huellas propias que han de ser verificadas con más estudios.

Los resultados propuestos no pueden ser considerados biomarcadores para el diagnóstico de la EC, pero contribuyen a dilucidar la compleja interacción que se produce entre genética, transcriptoma y metaboloma en la enfermedad. Con el advenimiento de nuevos estudios y un mejor entendimiento de estos procesos quizás podamos establecer biomarcadores que ayuden de manera fidedigna a paliar las trabas a las que nos sometemos cada día con esta enfermedad. El hecho de que probablemente haya una huella característica de la enfermedad es esperanzador. Estas diferencias metabólicas deberán de ser exploradas e interrelacionadas con una perspectiva inmunológica y un mejor entendimiento de la regulación de los linfocitos T, que junto a los probables cambios epigenéticos que interactúan con la misma nos lleven a prever el desarrollo de la enfermedad en sujetos genéticamente predispuestos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:136–60.
2. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013;62:43–52.
3. Polanco I, Ribes C. Enfermedad celíaca. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP. 2010. Madrid, España.
4. Polanco I. Enfermedad Celíaca. *Pediátrika.* 2000;5–21.
5. Rodrigo L, Salvador A. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca.. Editado por: OmniaScience (Omnia Publisher S.L.). España. 2013. 506
6. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003;163:286–92.
7. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010;42:587–95.
8. Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, Eisenbarth GS, Bao F, Haas JE, et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr.* 2003;143:308–14.

9. King JA, Jeong J, Underwood FE, Quan J, Panaccione N, Windsor JW, et al. Incidence of Celiac Disease Is Increasing over Time: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol*.2020;115:507–25.
10. Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, Garcia S, Ocio G. Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35:398–402.
11. García Novo C, Acuña Quirós J, Asensio G, Zancada S, Barrio Gutierrez J. Prevalencia de la enfermedad celiaca en donantes de sangre de la Comunidad de Madrid. *Rev esp enferm dig*. 2007;337–42.
12. Cataldo F, Montalto G. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol*. 2007;13:2153–9.
13. Størdal K, Bakken IJ, Surén P, Stene LC. Epidemiology of Coeliac Disease and Comorbidity in Norwegian Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57:467–71.
14. Fasano A. Where have all the American celiacs gone? *Acta Paediatr*. 1996;412:20–4.
15. Grodzinsky E. Screening for coeliac disease in apparently healthy blood donors. *Acta Paediatr*. 1996;412:36–8.
16. Pittschieler K, Ladinsler B. Coeliac disease: screened by a new strategy. *Acta Paediatr*. 1996;412:42–5.
17. Johnston SD, Watson RG, McMillan SA, McMaster D, Evans A. Preliminary results from follow-up of a large-scale population survey of antibodies to gliadin,

- reticulin and endomysium. *Acta Paediatr.* 1996;412:61–4.
18. Stenhammar L. Childhood coeliac disease in Sweden. *Lancet.* 1994;344:341–2.
  19. Almazán MV, Ortega E, Moreno Torres R, Tovar M, Romero J, López-Casado MÁ, et al. Diagnostic screening for subclinical celiac disease using a rapid test in children aged 2–4. *Pediatr Res.* 2015;78:280–5.
  20. Mariné M, Farre C, Alsina M, Vilar P, Cortijo M, Salas A, et al. The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:477–86.
  21. Rodrigo L, Garrote JA, Vivas S. Enfermedad Celiaca. *Med Clin.* 2008;264–70.
  22. Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE). ¿Qué es FACE? Disponible en: <https://celiacos.org/sobre-nosotros/que-es-face/> [Consultado:27/05/2021].
  23. Kivelä L, Kurppa K. Screening for coeliac disease in children. *Acta Paediatr.* 2018;107:1879–87.
  24. Korponay-Szabó IR, Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmány É, Nemes É, et al. Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: Diagnostic accuracy and feasibility study. *Br Med J.* 2007;335:1244–7.
  25. Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Mäki M, Kelly CP, et al. Diagnostic Accuracy of Point of Care Tests for Diagnosing Celiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Gastroenterol.* 2019;53:535–42.

26. Myléus A, Ivarsson A, Webb C, Danielsson L, Hernell O, Högberg L, et al. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49:170–6.
27. Sollid LM, Jabri B. Is celiac disease an autoimmune disorder? *Curr Opin Immunol.* 2005;17:595–600.
28. van Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. *Gut.* 2006;55:1037–46.
29. Green PHR, Cellier C. Celiac Disease. *N Engl J Med.* 2007;357:1731–43.
30. Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:332–9.
31. Lyte M, Vulchanova L, Brown DR. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell Tissue Res.* 2011;343:23–32.
32. Lewis K, McKay DM. Metabolic stress evokes decreases in epithelial barrier function. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:327–37.
33. John LJ, Fromm M, Schulzke J-D. Epithelial Barriers in Intestinal Inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:1255–70.
34. Szaflarska-Poplawska A, Siomek A, Czerwionka-Szaflarska M, Gackowski D, Rozalski R, Guz J, et al. Oxidatively Damaged DNA/Oxidative Stress in Children with Celiac Disease. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010;19:1960–5.
35. Diosdado B, van Oort E, Wijmenga C. "Coelionomics": towards understanding

- the molecular pathology of coeliac disease. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:685–95.
36. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med.* 2010;16:537–50.
  37. Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest.* 2007;117:41–9.
  38. Alaedini A, Green PHR. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med.* 2005;142:289–98.
  39. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of Disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3:516–25.
  40. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin. Gastroenterol.* 2005;19:373–87.
  41. Jabri B, Kasarda DD, Green PHR. Innate and adaptive immunity: the Yin and Yang of celiac disease. *Immunol Rev.* 2005;206:219–31.
  42. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003;362:30–7.
  43. Meresse B, Verdier J, Cerf-Bensussan N. The cytokine interleukin 21: a new player in coeliac disease? *Gut.* 2008;57:879–81.
  44. Qiao S-W, Sollid LM, Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr. Opin. Immunol.* 2009;21:111–7.



45. Sziksz E, Pap D, Veres G, Fekete A, Tulassay T, Vannay Á. Involvement of heat shock proteins in gluten-sensitive enteropathy. *World J Gastroenterol.* 2014;20:6495–503.
46. Szebeni B, Veres G, Dezsfi A, Rusai K, Bokodi G, et al. Increased Mucosal Expression of Toll-like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45:187–93.
47. Takeda K, Kaisho T, Akira S. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:335–76.
48. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the 2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 2008;57:747–54.
49. Heyman M, Menard S. Pathways of Gliadin Transport in Celiac Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:274–8.
50. Zimmer K-P, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, et al. Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut.* 2010;59:300–10.
51. Maiuri L, Troncone R, Mayer M, Coletta S, Picarelli A, De Vincenzi M, et al. In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31:247–53.
52. Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, et al. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative

- stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*. 2010;59:311–9.
53. Elli L, Dolfini E, Bardella MT. Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. *Toxicol Lett*. 2003;146:1–8.
54. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, D’Alò S, Parroni R, Millimaggi D, Cifone MG, et al. Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*. 2001;49:380–6.
55. Giovannini C, Sanchez M, Straface E, Scazzocchio B, Silano M, De Vincenzi M. Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology*. 2000;145:63–71.
56. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. Celiac disease, inflammation and oxidative damage: a nutrigenetic approach. *Nutrients*. 2012;4:243–57.
57. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol*. 2006;176:2512–21.
58. Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, Konikkara J, Naiyer AJ, Lee AR, et al. Serum cytokine elevations in celiac disease: Association with disease presentation. *Hum Immunol*. 2010;71:50–7.
59. Iervasi E, Auricchio R, Strangio A, Greco L, Saverino D. Serum IL-21 levels from celiac disease patients correlates with anti-tTG IgA autoantibodies and

- mucosal damage. *Autoimmunity*. 2020;53:225–30.
60. Diaz-Castro J, Muriel-Neyra C, Martin-Masot R, Moreno-Fernandez J, Maldonado J, Nestares T. Oxidative stress, DNA stability and evoked inflammatory signaling in young celiac patients consuming a gluten-free diet. *Eur J Nutr*. 2019;59: 1577-1584.
  61. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019;1.
  62. Romanos J, Rosén A, Kumar V, Trynka G, Franke L, Szperl A, et al. Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants. *Gut*. 2014;63:415–22.
  63. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:493–525.
  64. Tringali A, Thomson M, Dumonceau J-M, Tavares M, Tabbers M, Furlano R, et al. Pediatric gastrointestinal endoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Guideline Executive summary. *Endoscopy*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;49:83–91.
  65. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: Time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol*

- Hepatol.1999;11:1185–94.
66. Truitt KE, Daveson AJM, Ee HC, Goel G, MacDougall J, Neff K, et al. Randomised clinical trial: a placebo-controlled study of subcutaneous or intradermal NEXVAX2, an investigational immunomodulatory peptide therapy for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;50:547–55.
  67. Haridy J, Lewis D, Newnham ED. Investigational drug therapies for coeliac disease – where to from here? *Expert Opin Investig Drugs.* 2018;27:225–33.
  68. Barratt SM, Leeds JS, Sanders DS. Quality of life in Coeliac Disease is determined by perceived degree of difficulty adhering to a gluten-free diet, not the level of dietary adherence ultimately achieved. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2011;20:241–5.
  69. Comino I, Real A, Vivas S, Síglez MÁ, Caminero A, Nistal E, et al. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:670–7.
  70. Gerasimidis K, Zafeiropoulou K, Mackinder M, Ijaz UZ, Duncan H, Buchanan E, et al. Comparison of Clinical Methods With the Faecal Gluten Immunogenic Peptide to Assess Gluten Intake in Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;67:356–60.
  71. Silvester JA, Kurada S, Szwajcer A, Kelly CP, Leffler DA, Duerksen DR. Tests for Serum Transglutaminase and Endomysial Antibodies Do Not Detect Most Patients With Celiac Disease and Persistent Villous Atrophy on Gluten-free Diets: a Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2017;153:689-701.e1.

72. Martín Masot R, Ortega Páez E. El péptido del gluten en heces puede ser útil en el seguimiento de la enfermedad celíaca - Evidencias en pediatría. *Evidencias en Pediatría* 2018;14:37.
73. Comino I, Fernández-Bañares F, Esteve M, Ortigosa L, Castillejo G, Fambuena B, et al. Fecal Gluten Peptides Reveal Limitations of Serological Tests and Food Questionnaires for Monitoring Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *Am J Gastroenterol.* 2016;111:1456–65.
74. Margoni D, Chouliaras G, Ducas G, Voskaki I, Voutsas N, Papadopoulou A, et al. Bone Health in Children With Celiac Disease Assessed By Dual X-ray Absorptiometry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:680–4.
75. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999;29:1181–9.
76. Kell DB, Goodacre R. Metabolomics and systems pharmacology: why and how to model the human metabolic network for drug discovery. *Drug Discov Today.* 2014;19:171–82.
77. Allen J, Davey HM, Broadhurst D, Heald JK, Rowland JJ, Oliver SG, et al. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol.* 2003;21:692–6.
78. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to

- metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:40.
79. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem*. 2003;75:384A-391A.
80. Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R. Metabolomics of Human Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73:640–57.
81. Calabrò A, Gralka E, Luchinat C, Saccenti E, Tenori L. A metabolomic perspective on coeliac disease. *Autoimmune Dis*. 2014;2014:756138.
82. Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3:843–51.
83. Gundamaraju R, Vemuri R, Eri R, Ishiki HM, Coy-Barrera E, Yarla NS, et al. Metabolomics as a Functional Tool in Screening Gastro Intestinal Diseases: Where are we in High Throughput Screening? *Comb Chem High Throughput Screen*. 2017;20:247–54.
84. Kirchberg FF, Werkstetter KJ, Uhl O, Auricchio R, Castillejo G, Korponay-Szabo IR, et al. Investigating the early metabolic fingerprint of celiac disease – a prospective approach. *J Autoimmun*. 2016;72:95–101.
85. Bertini I, Calabrò A, De Carli V, Luchinat C, Nepi S, Porfirio B, et al. The Metabonomic Signature of Celiac Disease. *J Proteome Res*. 2009;8:170–7.
86. Bernini P, Bertini I, Calabrò A, la Marca G, Lami G, Luchinat C, et al. Are Patients with Potential Celiac Disease Really Potential? The Answer of Metabonomics. *J Proteome Res*. 2011;10:714–21.

87. Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol.* 2011;11:219.
88. Sellitto M, Bai G, Serena G, Fricke WF, Sturgeon C, Gajer P, et al. Proof of Concept of Microbiome-Metabolome Analysis and Delayed Gluten Exposure on Celiac Disease Autoimmunity in Genetically At-Risk Infants. *PLoS One.* 2012;7:e33387.
89. Sitkin SI, Tkachenko EI, Vakhitov TI, Oreshko LS, Zhigalova TN. [Serum metabolome by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in patients with ulcerative colitis and celiac disease]. *Eksp Klin Gastroenterol.* 2013;44–57.
90. Sen P, Carlsson C, Virtanen SM, Simell S, Hyöty H, Ilonen J, et al. Persistent alterations in plasma lipid profiles before introduction of gluten in the diet associated with progression to celiac disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019;10.
91. Auricchio R, Galatola M, Cielo D, Amoresano A, Caterino M, De Vita E, et al. A Phospholipid Profile at 4 Months Predicts the Onset of Celiac Disease in at-Risk Infants. *Sci Rep.* 2019;9.
92. Kirchberg FF, Werkstetter KJ, Uhl O, Auricchio R, Castillejo G, Korponay-Szabo IR, et al. Investigating the early metabolic fingerprint of celiac disease – a prospective approach. *J Autoimmun.* 2016;72:95–101.
93. Upadhyay D, Singh A, Das P, Mehtab J, Dattagupta S, Ahuja V, et al. Abnormalities in metabolic pathways in celiac disease investigated by the metabolic profiling of small intestinal mucosa, blood plasma and urine by NMR

- spectroscopy. *NMR Biomed.* 2020;33:e4305.
94. Bernini P, Bertini I, Calabrò A, la Marca G, Lami G, Luchinat C, et al. Are Patients with Potential Celiac Disease Really Potential? The Answer of Metabonomics. *J Proteome Res.* 2011;10:714–21.
  95. Sellitto M, Bai G, Serena G, Fricke WF, Sturgeon C, Gajer P, et al. Proof of concept of microbiome-metabolome analysis and delayed gluten exposure on celiac disease autoimmunity in genetically at-risk infants. *PLoS One.* 2012;7.
  96. Bouziat R, Hinterleitner R, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Ikizler M, Mayassi T, et al. Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science.* 2017;356:44–50.
  97. Cenit M, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y. Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution? *Nutrients.* 2015;7:6900–23.
  98. De Angelis M, Vannini L, Di Cagno R, Cavallo N, Minervini F, Francavilla R, et al. Salivary and fecal microbiota and metabolome of celiac children under gluten-free diet. *Int J Food Microbiol.* 2016;239:125–32.
  99. Girbovan A, Sur G, Samasca G, Lupan I. Dysbiosis a risk factor for celiac disease. *Med. Microbiol Immunol.* 2017;206:83–91.
  100. Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes.* 2010;1:135–7.
  101. Baranska A, Tigchelaar E, Smolinska A, Dallinga JW, Moonen EJC, Dekens JAM, et al. Profile of volatile organic compounds in exhaled breath changes as a



- result of gluten-free diet. *J Breath Res.* 2013;7:037104.
102. Angelis M De, Montemurno E, Vannini L, Cosola C, Cavallo N, Gozzi G, et al. Effect of Whole-Grain Barley on the Human Fecal Microbiota and Metabolome. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:7945–56.
103. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr.* 2009;102:1154.
104. Shaffer M, Armstrong AJS, Phelan V V., Reisdorph N, Lozupone CA. Microbiome and metabolome data integration provides insight into health and disease. *Transl Res.* 2017;189:51–64.
105. Lamichhane S, Sen P, Dickens AM, Orešič M, Bertram HC. Gut metabolome meets microbiome: A methodological perspective to understand the relationship between host and microbe. *Methods.* 2018;149:3–12.
106. Crutchfield CA, Thomas SN, Sokoll LJ, Chan DW. Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clin Proteomics.* 2016;13:1.
107. Rodrigues D, Jerónimo C, Henrique R, Belo L, de Lourdes Bastos M, de Pinho PG, et al. Biomarkers in bladder cancer: A metabolomic approach using *in vitro* and *ex vivo* model systems. *Int J Cancer.* 2016;139:256–68.
108. den Ouden H, Pellis L, Rutten GEHM, Geerars-van Vonderen IK, Rubingh CM, van Ommen B, et al. Metabolomic biomarkers for personalised glucose lowering drugs treatment in type 2 diabetes. *Metabolomics.* 2016;12:27.
109. He J, Wang K, Zheng N, Qiu Y, Xie G, Su M, et al. Metformin suppressed the

- proliferation of LoVo cells and induced a time-dependent metabolic and transcriptional alteration. *Sci Rep.* 2015;5:17423.
110. Palau-Rodriguez M, Tulipani S, Isabel Queipo-Ortuño M, Urpi-Sarda M, Tinahones FJ, Andres-Lacueva C. Metabolomic insights into the intricate gut microbial–host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. *Front Microbiol.* 2015;6.
  111. Zhao Y-Y, Tang D-D, Chen H, Mao J-R, Bai X, Cheng X-H, et al. Urinary metabolomics and biomarkers of aristolochic acid nephrotoxicity by UPLC-QTOF/HDMS. *Bioanalysis.* 2015;7:685–700.
  112. García-Cañaveras JC, Jiménez N, Gómez-Lechón MJ, Castell J V., Donato MT, Lahoz A. LC-MS untargeted metabolomic analysis of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Electrophoresis.* 2015;36:2294–302.
  113. Chen MX, Wang S-Y, Kuo C-H, Tsai I-L. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *J Formos Med Assoc.* 2018; S10-S22.
  114. Ellero-Simatos S, Lewis JP, Georgiades A, Yerges-Armstrong LM, Beitelshes AL, Horenstein RB, et al. Pharmacometabolomics Reveals That Serotonin Is Implicated in Aspirin Response Variability. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2014;3:e125.
  115. Trupp M, Zhu H, Wikoff WR, Baillie RA, Zeng Z-B, Karp PD, et al. Metabolomics Reveals Amino Acids Contribute to Variation in Response to Simvastatin Treatment. *PLoS One.* 2012;7:e38386.
  116. Yerges-Armstrong LM, Ellero-Simatos S, Georgiades A, Zhu H, Lewis J p,

- Horenstein RB, et al. Purine Pathway Implicated in Mechanism of Resistance to Aspirin Therapy: Pharmacometabolomics-Informed Pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94:525–32.
117. Rotroff DM, Shahin MH, Gurley SB, Zhu H, Motsinger-Reif A, Meisner M, et al. Pharmacometabolomic Assessments of Atenolol and Hydrochlorothiazide Treatment Reveal Novel Drug Response Phenotypes. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2015;4:669–79.
118. Zhu H, Bogdanov MB, Boyle SH, Matson W, Sharma S, Matson S, et al. Pharmacometabolomics of Response to Sertraline and to Placebo in Major Depressive Disorder – Possible Role for Methoxyindole Pathway. *PLoS One.* 2013;8:e68283.
119. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res.* 2007;6:546–51.
120. Lin H-M, Helsby NA, Rowan DD, Ferguson LR. Using metabolomic analysis to understand inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011;17:1021–9.
121. Holmes E, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IKS, Chan Q, et al. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature.* 2008;453:396–400.
122. Pintus R, Bassareo PP, Dessì A, Deidda M, Mercurio G, Fanos V. Metabolomics and Cardiology: Toward the Path of Perinatal Programming and Personalized Medicine *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–8.

123. Bracewell-Milnes T, Saso S, Abdalla H, Nikolau D, Norman-Taylor J, Johnson M, et al. Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review. *Hum. Reprod. Update.* 2017;23:723–36.
124. Kan M, Shumyatcher M, Himes BE. Using omics approaches to understand pulmonary diseases. *Respir Res.* 2017;18:149.
125. Rysz J, Gluba-Brzózka A, Franczyk B, Jabłonowski Z, Ciałkowska-Rysz A. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1702.
126. Gao S, Luo H, Zhang H, Zuo X, Wang L, Zhu H. Using multi-omics methods to understand dermatomyositis/polymyositis. *Autoimmun Rev.* 2017;16:1044–8.
127. Li B, He X, Jia W, Li H. Novel Applications of Metabolomics in Personalized Medicine: A Mini-Review. *Molecules.* 2017;22:1173.
128. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst.* 2012;137:293–300.
129. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The human serum metabolome. *PLoS One.* 2011;6:16957.
130. Jové M, Maté I, Naudí A, Mota-Martorell N, Portero-Otín M, De La Fuente M, et al. Human Aging Is a Metabolome-related Matter of Gender. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol Sci Med Sci.* 2016;71:578–85.
131. Burla B, Arita M, Arita M, Bendt AK, Cazenave-Gassiot A, Dennis EA, et al. MS-based lipidomics of human blood plasma: A community-initiated position

- paper to develop accepted guidelines. *J Lipid Res.* 2018;59:2001–17.
132. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* 2000;320:1240–3.
133. GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2018; Available from: <https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
134. Jové M, Naudí A, Portero-Otín M, Cabré R, Rovira-Llopis S, Bañuls C, et al. Plasma lipidomics discloses metabolic syndrome with a specific HDL phenotype. *FASEB J.* 2014;28:5163–71.
135. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc.* 2013;8:17–32.
136. Jové M, Naudí A, Ramírez-Núñez O, Portero-Otín M, Selman C, Withers DJ, et al. Caloric restriction reveals a metabolomic and lipidomic signature in liver of male mice. *Aging Cell.* 2014;13:828–37.
137. Broadhurst D, Goodacre R, Reinke SN, Kuligowski J, Wilson ID, Lewis MR, et al. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics.* 2018;14:72.
138. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-Mcintyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using

- gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6:1060–83.
139. Chong J, Xia J. MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics.* 2018;34:4313–4.
140. Xia J, Wishart DS. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinforma.* 2016;1-14.
141. Ruiz MD, Artacho R. Guía Para Estudios Dietéticos: Álbum Fotográfico de Alimentos; Universidad de Granada: Granada, Spain, 2011.
142. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española. In *Tablas de Composición de Alimentos*, 18th ed.; Ediciones Pirámide: Madrid, Spain, 2016.
143. Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, Ortega RM, García A, Pérez-Rodrigo C et al. Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public Health Nutr.* 2004, 7, 931–935.
144. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-Country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35:1381–95.
145. Sbodio JI, Snyder SH, Paul BD. Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol.* 2019;176:583–93.
146. Jonsson WO, Margolies NS, Anthony TG. Dietary sulfur amino acid restriction and the integrated stress response: Mechanistic insights. *Nutrients.* 2019;11:1349.

147. Zuhra K, Augsburg F, Majtan T, Szabo C. Cystathionine- $\beta$ -synthase: Molecular regulation and pharmacological inhibition. *Biomolecules*. 2020;10:697.
148. Gregory JF, DeRatt BN, Rios-Avila L, Ralat M, Stacpoole PW. Vitamin B6 nutritional status and cellular availability of pyridoxal 5'-phosphate govern the function of the transsulfuration pathway's canonical reactions and hydrogen sulfide production via side reactions. *Biochimie*. 2016;126:21–6.
149. Ueland PM, Ulvik A, Rios-Avila L, Midttun O, Gregory JF. Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B6 Status. *Annu Rev Nutr*. 2015;35:33–70.
150. Paul BD, Snyder SH. Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health and disease. *Biochem Pharmacol*. 2018;149:101–9.
151. Kumar M, Sandhir R. Hydrogen Sulfide in Physiological and Pathological Mechanisms in Brain. *CNS Neurol Disord*. 2018;17:654–70.
152. Kolluru GK, Shen X, Kevil CG. Reactive sulfur species: A new redox player in cardiovascular pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40:874–84.
153. Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*. 2012;109:2943–8.
154. Espe S. Malacards: The human disease database. *J Med Libr Assoc*. 2018;106:140–1.
155. Selimoglu MA, Ertekin V, Altinkaynak S. Hyper-CK-emia in pediatric celiac disease: Prevalence and clinical importance. *J Clin Gastroenterol*. 2007;41:667–

- 70.
156. Acharjee A, Prentice P, Acerini C, Smith J, Hughes IA, Ong K, et al. The translation of lipid profiles to nutritional biomarkers in the study of infant metabolism. *Metabolomics*. 2017;13.
157. Ghosh A, Nishtala K. Biofluid lipidome: a source for potential diagnostic biomarkers. *Clin Transl Med*. 2017;6.
158. Wenk MR. Lipidomics: New tools and applications. *Cell*. 2010;143:888–95.
159. Freeman HJ. Endocrine manifestations in celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22:8472–9.
160. Carrasco S, Mérida I. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci*. 2007;32:27–36.
161. Almena M, Mérida I. Shaping up the membrane: Diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. *Trends Biochem Sci*. 2011;36:593–603.
162. Sakane F, Hoshino F, Murakami C. New era of diacylglycerol kinase, phosphatidic acid and phosphatidic acid-binding protein. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1–36.
163. Sedda S, Dinallo V, Marafini I, Franzè E, Paoluzi OA, Izzo R, et al. mTOR sustains inflammatory response in celiac disease. *Sci Rep*. 2020;10.
164. Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17:169–83.



165. Farnetti S, Assunta M, Garcovich M, Gasbarrini A, Capristo E. Functional and metabolic disorders in celiac disease: New implications for nutritional treatment. *J Med Food*. 2014;17:1159–64.
166. Capristo E, Addolorato G, Mingrone G, Scarfone A, Greco A V., Gasbarrini G. Low-serum high-density lipoprotein-cholesterol concentration as a sign of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:3331–2.
167. Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63:895–902.
168. Johnson CH, Gonzalez FJ. Challenges and opportunities of metabolomics. *J Cell. Physiol*. 2012;227:2975–81.
169. Russo C, Wolf RL, Leichter HJ, Lee AR, Reilly NR, Zybert P, et al. Impact of a Child's Celiac Disease Diagnosis and Management on the Family. *Dig Dis Sci*. 2020;65:2959–69.



**ANEXOS****Anexo I. Rasgos analíticos de los metabolitos medidos en plasma mediante análisis dirigido**

Tabla 8. Rasgos analíticos de los metabolitos medidos en plasma.

Compuesto	Precursor Ion	Producto Ion	Fragmentador	CE	CAV	RT	RT Ventana	Polaridad
<b>AMINOÁCIDOS</b>								
Alanine	90.06	44.2	40	8	7	0.376	2	Positive
Arginine	175.1	70.2	60	20	7	0.320	2	Positive
Arginine	175.1	60.2	60	15	7	0.320	2	Positive
Asparagine	133	74.1	60	15	7	0.376	2	Positive
Aspartate	134	43.2	60	15	7	0.362	2	Positive
Aspartate	132	88.1	60	15	7	0.362	2	Negative
Glutamate	146	102.1	60	15	7	0.363	2	Negative
Glutamate	146	41	60	15	7	0.363	2	Negative
Glycine (ND)	76.04	48	40	0	7	0.340	2	Positive
Glycine (ND)	76.04	30	40	4	7	0.340	2	Positive
Histidine	156	110.1	60	15	7	0.320	2	Positive
Histidine	156	56.2	60	25	7	0.320	2	Positive
Leucine/Isoleucine	132.1	86	64	8	7	0.591	2	Positive
Leucine/Isoleucine	132.1	69	64	16	7	0.591	2	Positive

Phenylalanine	164	147	100	15	7	0.841	2	Negative
Phenylalanine	164	103.1	100	15	7	0.841	2	Negative
Proline	116	70.2	60	15	7	0.392	2	Positive
Serine	106.05	60	64	8	7	0.350	2	Positive
Serine	106.05	42	64	24	7	0.350	2	Positive
Serine	104.03	74	64	8	7	0.350	2	Negative
Threonine	120	74.2	60	15	7	0.358	2	Positive
Threonine	120	56.2	60	15	7	0.358	2	Positive
Tryptophan	205	188.1	60	15	7	1.230	2	Positive
Tryptophan	205	146.1	60	15	7	1.230	2	Positive
Tyrosine	180.1	163.1	100	15	7	0.548	2	Negative
Tyrosine	180.1	119.1	100	15	7	0.548	2	Negative
Valine	118.08	72	64	8	7	0.430	2	Positive
Valine	118.08	55	64	20	7	0.430	2	Positive

**METABOLISMO METIONINA**

Betaine	118.09	59.2	136	16	7	0.425	2	Positive
Betaine	118.09	58.2	136	32	7	0.425	2	Positive
Cysteine	122.02	76	64	12	7	6.312	2	Positive
Cysteine	122.02	59	64	24	7	6.312	2	Positive
Cystathionine	223.07	134	88	8	7	6.818	2	Positive
Cystathionine	223.07	88	88	28	7	6.818	2	Positive
Glutathione	308.09	179	88	8	7	0.500	2	Positive
Glutathione	308.09	76	88	24	7	0.500	2	Positive
Homocysteine	136.18	90.1	135	15	7	7.225	2	Positive
Homocysteine	136.18	56.2	135	15	7	7.225	2	Positive
Methionine	150.05	104	64	4	7	0.480	2	Positive
Pyridoxal	168.05	150	64	8	7	0.522	2	Positive

Pyridoxal	168.05	94	64	24	7	0.522	2	Positive
PLP (Pyridoxal-5'-P)	248.03	150	112	12	7	0.700	2	Positive
PLP (Pyridoxal-5'-P)	248.03	67	112	32	7	0.700	2	Positive
Pyridoxamine	169.09	152	64	8	7	0.366	2	Positive
Pyridoxamine	169.09	134	64	20	7	0.366	2	Positive
SAH	385.1	136	112	20	7	1.130	2	Positive
SAH	385.1	88	112	48	7	1.130	2	Positive
SAM	399.1	250	112	12	7	0.396	2	Positive
SAM	399.1	136	112	28	7	0.396	2	Positive
Spermidine	146.1	84	88	24	7	0.300	2	Positive
Spermidine	146.1	72	88	12	7	0.300	2	Positive
Taurine	126.02	108	88	8	7	0.380	2	Positive
Taurine	124	80	112	20	7	0.380	2	Negative

#### INTERMEDIARIOS CICLO KREBS

$\alpha$ -Ketoglutarate	145.01	101	64	4	7	0.435	2	Negative
$\alpha$ -Ketoglutarate	145.01	57	64	20	7	0.435	2	Negative
Citrate	191.01	111	88	8	7	0.637	2	Negative
Citrate	191.01	87	88	16	7	0.637	2	Negative
Fumarate	115.01	71	64	4	7	0.550	2	Negative
Fumarate	115.01	27	64	4	7	0.550	2	Negative
Isocitrate	191.01	111	88	8	7	0.393	2	Negative
Isocitrate	191.01	87	88	16	7	0.393	2	Negative
Malate	133.02	115	64	8	7	0.400	2	Negative
Malate	133.02	71	64	12	7	0.400	2	Negative
Pyruvate	87.01	43	64	4	7	0.413	2	Negative
Succinate	117.02	73	64	8	7	0.570	2	Negative
Succinate	117.02	55	64	20	7	0.570	2	Negative

**INTERMEDIARIOS LIPÍDICOS**

Choline	104.11	60.2	112	16	7	0.390	2	Positive
TMAO	76.08	59.2	64	8	7	0.400	2	Positive
TMAO	76.08	58.2	64	20	7	0.400	2	Positive

**ESTÁNDARES INTERNOS ETIQUETADOS SOTÓPICAMENTE**

PheC13	167.09	120.1	70	8	7	0.870	2	Positive
PheC13	167.09	77	70	44	7	0.870	2	Positive
PheC13	167.09	103	70	28	7	0.870	2	Positive
PheC13	167.09	51.1	70	60	7	0.870	2	Positive

*El fragmento, la energía de colisión (CE) y el voltaje de aceleración de la celda (CAV) se dan como voltaje de RT en minutos; y producto e ión precursor como m/z.*

## Anexo II. Moléculas estadísticamente diferentes entre los grupos en el análisis no dirigido

Tabla 9. Moléculas estadísticamente diferentes entre los grupos en el análisis no dirigido (*Dataset*)

Metabolite	Compound	Mass	m/z	Retention Time	Ionization	Estimate	Confidence interval 2.5	Confidence interval 97.5	Mean (control gr
105.058_4.936369	105.058@4.936369	105,058	106,058	4,94	positive	0,79034882	0,096948284	1,48374935	-0,395
n109.0283_3.488423	109,0283@3,488423	109,0283	108,0283	3,49	negative	-0,83920603	-1,472615048	-0,205797003	0,419
110.1098_8.401777	110,1098@8,401777	110,1098	111,1098	8,40	positive	-0,50236476	-0,952598166	-0,052131358	0,251
n130.0994_6.46524	130,0994@6,46524	130,0994	129,0994	6,47	negative	0,81188482	0,223727054	1,400042579	-0,405
n144.1153_7.598674	144,1153@7,598674	144,1153	143,1153	7,60	negative	0,61855088	0,178547611	1,058554154	-0,309
n158.1308_8.462865	158,1308@8,462865	158,1308	157,1308	8,46	negative	-0,72599607	-1,419283052	-0,032709081	0,362
n160.1101_5.236737	160,1101@5,236737	160,1101	159,1101	5,24	negative	0,96423578	0,324262768	1,604208789	-0,482
n172.1466_9.16185	172,1466@9,16185	172,1466	171,1466	9,16	negative	0,50667711	0,056726312	0,956627901	-0,253
n187.1209_4.070423	N-Heptanoylglycine(a)	187,1209	186,1209	4,07	negative	0,80301585	0,119293848	1,486737859	-0,401
n189.9937_1.139627	189,9937@1,139627	189,9937	188,9937	1,14	negative	0,53505423	0,007982099	1,062126365	-0,267
192.148_0.45864186	192,148@0,45864186	192,148	193,148	0,46	positive	-0,73833748	-1,223238552	-0,2534364	0,369
198.1622_8.406365	5Z-Dodecenoic acid(a)	198,1622	199,1622	8,41	positive	-0,96721554	-1,609082954	-0,325348128	0,483
n205.9887_0.9862709	205,9887@0,9862709	205,9887	204,9887	0,99	negative	0,71815318	0,032338778	1,403967574	-0,359
n209.103_4.070671	209,103@4,070671	209,103	208,103	4,07	negative	0,64587023	0,00441526	1,287325189	-0,322
Z16.1123_4.9361024	216,1123@4,9361024	216,1123	217,1123	4,94	positive	0,81060333	0,08473292	1,536473741	-0,405
n226.1575_7.788946	226,1575@7,788946	226,1575	225,1575	7,79	negative	-0,66181281	-1,189231851	-0,134393777	0,330
n228.2093_11.03665	228,2093@11,03665	228,2093	227,2093	11,04	negative	0,7762906	0,101829453	1,450751746	-0,3
n234.1625_9.430028	234,1625@9,430028	234,1625	233,1625	9,43	negative	-0,3765731	-0,682724658	-0,070421545	0,188
n235.1578_9.640042	235,1578@9,640042	235,1578	234,1578	9,64	negative	-1,05570364	-1,549080866	-0,562326412	0,527
n240.134_8.463669	240,134@8,463669	240,134	239,134	8,46	negative	-0,76932093	-1,350602443	-0,188039424	0,384
n244.204_10.03406	244,204@10,03406	244,204	243,204	10,03	negative	0,89543523	0,318835123	1,472035331	-0,447
251.152_9.772261	251,152@9,772261	251,152	252,152	9,77	positive	-1,00193033	-1,586739914	-0,417120755	0,500
254.1857_8.024937	254,1857@8,024937	254,1857	255,1857	8,02	positive	0,71798974	0,116626314	1,319353157	-0,358
254.1857_6.903918	254,1857@6,903918	254,1857	255,1857	6,90	positive	0,86528998	0,360207727	1,370372236	-0,432
n257.0667_3.738664	257,0667@3,738664	257,0667	256,0667	3,74	negative	0,71623293	0,061183106	1,371282747	-0,358
n267.0692_0.9506905	267,0692@0,9506905	267,0692	266,0692	0,95	negative	-0,83896353	-1,508922996	-0,169004071	0,419
n268.1646_9.74598	MG(10:0)(c)	268,1646	267,1646	9,75	negative	-0,79558449	-1,464997386	-0,126171598	0,397
n278.1892_9.183144	278,1892@9,183144	278,1892	277,1892	9,18	negative	0,83830167	0,176507912	1,50009542	-0,419
n284.1175_11.10369	284,1175@11,10369	284,1175	283,1175	11,10	negative	-0,53573279	-1,061095563	-0,01037002	0,267
n286.1679_11.0378	286,1679@11,0378	286,1679	285,1679	11,04	negative	0,82517014	0,155713716	1,494626571	-0,412
287.282_8.031484	287,282@8,031484	287,282	288,282	8,03	positive	0,74496219	0,070441765	1,41948262	-0,372
295.2507_10.115041	295,2507@10,115041	295,2507	296,2507	10,12	positive	0,66516577	0,116025139	1,214306398	-0,332
n302.1045_7.226359	302,1045@7,226359	302,1045	301,1045	7,23	negative	0,00268686	0,001230866	0,004142843	-0,001
n310.2131_11.03825	310,2131@11,03825	310,2131	309,2131	11,04	negative	0,79352356	0,081377115	1,505670009	-0,396
325.2724_2.7851336	325,2724@2,7851336	325,2724	326,2724	2,79	positive	-0,61516465	-1,198503137	-0,031826172	0,307
325.2728_5.565955	325,2728@5,565955	325,2728	326,2728	5,57	positive	-0,7122606	-1,217966733	-0,206554473	0,356
n339.253_4.754441	339,253@4,754441	339,253	338,253	4,75	negative	-0,54962428	-1,018927671	-0,080320896	0,274
342.1216_5.210733	342,1216@5,210733	342,1216	343,1216	5,21	positive	0,54778694	0,027199493	1,068374383	-0,273
348.2084_11.04387	348,2084@11,04387	348,2084	347,2084	11,04	negative	0,71588711	-1,08019843	0,033744338	0,357

n358.1798_11.39691	Tetrahydrocortisone(b)	358,1798	357,1798	11,40	negative	-1,00533877	-1,635549893	-0,375127645	0,5
361.2953_11.895524		361,2953	362,2953	11,90	positive	0,83926728	0,172399549	1,506135005	-0,4
n362.076_11.03728		362,076	361,076	11,04	negative	0,7702202	0,096903765	1,443536629	-0,3
n362.1158_1.590084	3'-Ketolactose(a)	362,1158	361,1158	1,59	negative	-0,70631385	-1,214768254	-0,197859452	0,3
n363.0433_1.559344		363,0433	362,0433	1,56	negative	0,60543479	0,036815177	1,174054405	-0,3
363.2491_6.778304		363,2491	364,2491	6,78	positive	0,84013215	0,139742934	1,540521365	-0,4
n368.1661_9.323768	Dehydroepiandrosterone sulfate(b)	368,1661	367,1661	9,32	negative	-0,74785896	-1,265874967	-0,22984296	0,3
n370.2212_11.04112	Thromboxane B2(a)	370,2212	369,2212	11,04	negative	0,77225345	0,093734889	1,450772007	-0,3
n375.2991_9.58043		375,2991	374,2991	9,58	negative	0,85996175	0,309257431	1,410666076	-0,4
n376.1866_8.324323	18-Oxocortisol(a)	376,1866	375,1866	8,32	negative	0,04781978	0,03696982	0,058669731	-0,0
n378.2383_10.648		378,2383	377,2383	10,65	negative	0,65382469	0,085029519	1,222619868	-0,3
n384.1975_12.13687		384,1975	383,1975	12,14	negative	0,51300542	0,022557561	1,003453271	-0,2
n384.3612_12.80983		384,3612	383,3612	12,81	negative	0,67206441	0,161360941	1,182767871	-0,3
n386.1988_11.03826		386,1988	385,1988	11,04	negative	0,77111764	0,096592011	1,445643266	-0,3
n392.2162_11.03788		392,2162	391,2162	11,04	negative	0,78911245	0,104175255	1,474049643	-0,3
394.2688_10.123808	DG(18:0)(c)	394,2688	395,2688	10,12	positive	0,04193681	0,001835102	0,082038509	-0,0
396.1414_10.417604		396,1414	397,1414	10,42	positive	0,45692388	0,018925042	0,894922722	-0,2
n402.1715_11.04045		402,1715	401,1715	11,04	negative	0,80178799	0,163544918	1,440031067	-0,4
n402.3098_8.861039		402,3098	401,3098	8,86	negative	-0,67495264	-1,216699538	-0,133205735	0,3
n406.0794_3.351732		406,0794	405,0794	3,35	negative	-0,47023926	-0,925655964	-0,014822561	0,2
n410.3197_12.23992	(Gamma,22E)-6-Hydroxy-4,7,22-ergostatrien-3-one(a)	410,3197	409,3197	12,24	negative	0,52879907	0,127162852	0,930435289	-0,2
n414.371_12.04201	MG(22:0)(c)	414,371	413,371	12,04	negative	-0,48385165	-0,944490202	-0,023213095	0,2
n418.1391_12.13785		418,1391	417,1391	12,14	negative	0,51616041	0,096774536	0,935546279	-0,2
422.1913_8.767319		422,1913	423,1913	8,77	positive	-0,81654019	-1,488843928	-0,144236448	0,4
n427.2163_12.13806		427,2163	426,2163	12,14	negative	0,61717248	0,028326125	1,206018832	-0,3
n427.3058_6.771328		427,3058	426,3058	6,77	negative	-0,72378297	-1,417614905	-0,029951032	0,3
n429.159_10.24151		429,159	428,159	10,24	negative	0,48420239	0,011512125	0,956892664	-0,2
n429.1951_11.03828		429,1951	428,1951	11,04	negative	0,91201262	0,28275363	1,54127161	-0,
n434.0316_0.5037398		434,0316	433,0316	0,50	negative	0,81410956	0,18076683	1,447452296	-0,4
n446.1953_7.668829		446,1953	445,1953	7,67	negative	0,79480989	0,126392413	1,463227359	-0,3
448.1551_6.0926275		448,1551	449,1551	6,09	positive	-0,90774221	-1,562286953	-0,253197458	0,4
n450.1577_9.580955		450,1577	449,1577	9,58	negative	0,76120534	0,088371421	1,434039261	-0,3
n452.2246_11.04338		452,2246	451,2246	11,04	negative	0,66889828	0,054416724	1,283379825	-0,3
454.3266_8.335878		454,3266	455,3266	8,34	positive	-0,61767388	-1,181161159	-0,05418659	0,3
n454.3296_10.70401		454,3296	453,3296	10,70	negative	-0,60527325	-1,191828194	-0,018718299	0,3
n463.2547_7.114936		463,2547	462,2547	7,11	negative	-0,51473512	-0,939061839	-0,090408393	0,2
n466.2571_8.808856	Androsterone glucuronide(a)	466,2571	465,2571	8,81	negative	-0,61719032	-1,216212584	-0,018168057	0,
n468.1242_11.039		468,1242	467,1242	11,04	negative	0,85460615	0,185408602	1,523803704	-0,4
n470.2616_11.10174		470,2616	469,2616	11,10	negative	-0,83194848	-1,499514275	-0,164382692	0,4
n474.297_9.610547	LysoPA(22:1)(c)	474,297	473,297	9,61	negative	0,6726865	0,174631055	1,170741944	-0,
n477.2152_5.191932	20-Hydroxy-leukotriene E4(c)	477,2152	476,2152	5,19	negative	-0,71319609	-1,397350914	-0,029041267	0,3
477.3212_10.7663765	LysoPC(16:0)(c)	477,3212	478,3212	10,77	positive	0,67380379	0,10879634	1,238811235	-0,3
n478.401_11.03609	MG(a-25:0)(c)	478,401	477,401	11,04	negative	0,78492927	0,101907632	1,467950915	-0,3
n484.1747_11.04063		484,1747	483,1747	11,04	negative	0,73364407	0,140392318	1,326895816	-0,3
n486.2922_13.3185		486,2922	485,2922	13,32	negative	0,8138166	0,238079388	1,389553807	-0,4
489.2111_5.115216		489,2111	490,2111	5,12	positive	-0,81260624	-1,531193164	-0,094019319	0,4
n490.2553_9.280876		490,2553	489,2553	9,28	negative	-0,66319723	-1,266947864	-0,059446594	0,3
n501.2417_10.90481		501,2417	500,2417	10,90	negative	0,04891163	0,03423991	0,063583344	-0,0
n510.3916_11.97462	6-Deoxocastasterone(a)	510,3916	509,3916	11,97	negative	0,65919607	0,115428342	1,202963788	-0,3
517.3159_10.188426	LysoPC(18:3)(c)	517,3159	518,3159	10,19	positive	-0,61796177	-1,233564134	-0,002359409	-0,3
524.1494_9.663331		524,1494	525,1494	9,66	positive	0,73412903	0,095721567	1,372536487	-0,3
n538.4093_11.03663		538,4093	537,4093	11,04	negative	0,73155757	0,086835218	1,376279916	-0,3
n540.1918_8.093249	Salpina-Pregnan-3alpha,20beta-diol disulfate(c)	540,1918	539,1918	8,09	negative	0,0464246	0,033726885	0,059122311	-0,0
n542.1323_11.04014		542,1323	541,1323	11,04	negative	0,46257216	0,000860456	0,924283856	-0,2
n543.2998_13.15163	Lithocholyltaurine(a)	543,2998	542,2998	13,15	negative	0,05215026	0,043791208	0,060509306	-0,0
545.3627_13.090117	LysoPC(20:3)(a)	545,3627	546,3627	13,09	positive	0,46940319	0,021777456	0,917028923	-0,2
548.2183_11.367543		548,2183	549,2183	11,37	positive	0,72683226	0,060499838	1,393164689	-0,3
550.2779_12.069596		550,2779	551,2779	12,07	positive	-0,66432795	-1,203278198	-0,125377692	0,3
n556.2225_11.04287		556,2225	555,2225	11,04	negative	0,73848972	0,090279469	1,386699961	-0,3
n564.3207_6.112509		564,3207	563,3207	6,11	negative	0,79124238	0,069023385	1,513461372	-0,3
n566.1778_11.04247		566,1778	565,1778	11,04	negative	0,80485434	0,184828484	1,424880197	-0,



n410.3197_12.23992	(6alpha,22E)-6-Hydroxy-4,7,22-ergostatrien-3-one(a)	410,3197	409,3197	12,24	negative	0,52879907	0,127162852	0,930435289	-0,2
n414.371_12.04201	MG(22:0)(c)	414,371	413,371	12,04	negative	-0,48385165	-0,944490202	-0,023213095	0,2
n418.1391_12.13785	418,1391@12,13785	418,1391	417,1391	12,14	negative	0,51616041	0,096774536	0,935546279	-0,2
422.1913_8.767319	422,1913@8,767319	422,1913	423,1913	8,77	positive	-0,81654019	-1,488843928	-0,144236448	0,4
n427.2163_12.13806	427,2163@12,13806	427,2163	426,2163	12,14	negative	0,61717248	0,028326125	1,206018832	-0,3
n427.3058_6.771328	427,3058@6,771328	427,3058	426,3058	6,77	negative	-0,72378297	-1,417614905	-0,029951032	0,3
n429.159_10.24151	429,159@10,24151	429,159	428,159	10,24	negative	0,48420239	0,011512125	0,956892664	-0,2
n429.1951_11.03828	429,1951@11,03828	429,1951	428,1951	11,04	negative	0,91201262	0,28275363	1,54127161	-0,
n434.0316_0.5037398	434,0316@0,5037398	434,0316	433,0316	0,50	negative	0,81410956	0,18076683	1,447452296	-0,4
n446.1953_7.668829	446,1953@7,668829	446,1953	445,1953	7,67	negative	0,79480989	0,126392413	1,463227359	-0,3
448.1551_6.0926275	448,1551@6,0926275	448,1551	449,1551	6,09	positive	-0,90774221	-1,562286953	-0,253197458	0,4
n450.1577_9.580955	450,1577@9,580955	450,1577	449,1577	9,58	negative	0,76120534	0,088371421	1,434039261	-0,3
n452.2246_11.04338	452,2246@11,04338	452,2246	451,2246	11,04	negative	0,66889828	0,054416724	1,283379825	-0,3
454.3266_8.335878	454,3266@8,335878	454,3266	455,3266	8,34	positive	-0,61767388	-1,181161159	-0,05418659	0,3
n454.3296_10.70401	454,3296@10,70401	454,3296	453,3296	10,70	negative	-0,60527325	-1,191828194	-0,018718299	0,3
n463.2547_7.114936	463,2547@7,114936	463,2547	462,2547	7,11	negative	-0,51473512	-0,939061839	-0,090408393	0,2
n466.2571_8.808856	Androsterone glucuronide(a)	466,2571	465,2571	8,81	negative	-0,61719032	-1,216212584	-0,018168057	0,
n468.1242_11.039	468,1242@11,039	468,1242	467,1242	11,04	negative	0,85460615	0,185408602	1,523803704	-0,4
n470.2616_11.10174	470,2616@11,10174	470,2616	469,2616	11,10	negative	-0,83194848	-1,499514275	-0,164382692	0,4
n474.297_9.610547	LysoPA(22:1)(c)	474,297	473,297	9,61	negative	0,6726865	0,174631055	1,170741944	-0,
n477.2152_5.191932	20-Hydroxy-leukotriene E4(c)	477,2152	476,2152	5,19	negative	-0,71319609	-1,397350914	-0,029041267	0,3
477.3212_10.7663765	LysoPC(16:0)(c)	477,3212	478,3212	10,77	positive	0,67380379	0,10879634	1,238811235	-0,3
n478.401_11.03609	MG(a-25:0)(c)	478,401	477,401	11,04	negative	0,78492927	0,101907632	1,467950915	-0,3
n484.1747_11.04063	484,1747@11,04063	484,1747	483,1747	11,04	negative	0,73364407	0,140392318	1,326895816	-0,3
n486.2922_13.3185	486,2922@13,3185	486,2922	485,2922	13,32	negative	0,8138166	0,238079388	1,389553807	-0,4
489.2111_5.115216	489,2111@5,115216	489,2111	490,2111	5,12	positive	-0,81260624	-1,531193164	-0,094019319	0,4
n490.2553_9.280876	490,2553@9,280876	490,2553	489,2553	9,28	negative	-0,66319723	-1,266947864	-0,059446594	0,3
n501.2417_10.90481	501,2417@10,90481	501,2417	500,2417	10,90	negative	0,04891163	0,03423991	0,063583344	-0,0
n510.3916_11.97462	6-Deoxocasterone(a)	510,3916	509,3916	11,97	negative	0,65919607	0,115428342	1,202963788	-0,3
517.3159_10.188426	LysoPC(18:3)(c)	517,3159	518,3159	10,19	positive	-0,61796177	-1,233564134	-0,002359409	0,3
524.1494_9.663331	524,1494@9,663331	524,1494	525,1494	9,66	positive	0,095721567	0,73412903	1,372536487	-0,3
n538.4093_11.03663	538,4093@11,03663	538,4093	537,4093	11,04	negative	0,73155757	0,086835218	1,376279916	-0,3
n540.1918_8.093249	Salpho-Pregnan-3aloha, 20beta-diol disulfate(c)	540,1918	539,1918	8,09	negative	0,0464246	0,033726885	0,059122311	-0,0
n542.1323_11.04014	542,1323@11,04014	542,1323	541,1323	11,04	negative	0,46257216	0,000860456	0,924283856	-0,2
n543.2998_13.15163	Lithocholytaurine(a)	543,2998	542,2998	13,15	negative	0,05215026	0,043791208	0,060509306	-0,0
545.3627_13.090117	LysoPC(20:3)(a)	545,3627	546,3627	13,09	positive	0,46940319	0,021777456	0,917028923	-0,2
548.2183_11.367543	548,2183@11,367543	548,2183	549,2183	11,37	positive	0,72683226	0,060499838	1,393164689	-0,3
550.2779_12.069596	550,2779@12,069596	550,2779	551,2779	12,07	positive	-0,66432795	-1,203278198	-0,125377692	0,3
n556.2225_11.04287	556,2225@11,04287	556,2225	555,2225	11,04	negative	0,73848972	0,090279469	1,386699961	-0,3
n564.3207_6.112509	564,3207@6,112509	564,3207	563,3207	6,11	negative	0,79124238	0,069023385	1,513461372	-0,3
n566.1778_11.04247	566,1778@11,04247	566,1778	565,1778	11,04	negative	0,80485434	0,184828484	1,424880197	-0,
566.4744_11.561595	566,4744@11,561595	566,4744	567,4744	11,56	positive	0,82556773	0,142621645	1,508513817	-0,4
568.1496_12.071947	568,1496@12,071947	568,1496	569,1496	12,07	positive	0,6307389	0,058472178	1,203005616	-0,3
n568.2942_13.31804	Leukotriene F4(c)	568,2942	567,2942	13,32	negative	0,75411088	0,190949317	1,317272436	-0,3
n568.3252_10.04287	568,3252@10,04287	568,3252	567,3252	10,04	negative	0,67259943	0,037773431	1,30742542	-0,3
n570.2741_6.083182	570,2741@6,083182	570,2741	569,2741	6,08	negative	-0,23935903	-0,463329362	-0,015388703	0,1
n570.3595_11.03651	570,3595@11,03651	570,3595	569,3595	11,04	negative	0,94351407	0,310100888	1,576927253	-0,4
572.173_10.938984	Biotinyl-S-AMP(c)	572,173	573,173	10,94	positive	0,7452187	0,012631035	1,47780636	-0,3
n572.423_11.03848	572,423@11,03848	572,423	571,423	11,04	negative	0,70010858	0,111998111	1,288219056	-0,3
n578.1589_11.65697	578,1589@11,65697	578,1589	577,1589	11,66	negative	-0,70530265	-1,397058398	-0,013546904	0,3
582.2469_6.3524823	582,2469@6,3524823	582,2469	583,2469	6,35	positive	-0,82972661	-1,476711431	-0,18274179	0,4
n583.3955_8.62726	583,3955@8,62726	583,3955	582,3955	8,63	negative	0,55853923	0,043782541	1,073295919	-0,2
584.2632_6.347387	584,2632@6,347387	584,2632	585,2632	6,35	positive	-0,64906879	-1,231194635	-0,066942943	0,3
584.2635_7.583382	Bilirubin(a)	584,2635	585,2635	7,58	positive	-0,62026316	-1,199933925	-0,04059239	0,3
n584.2644_7.705892	Bilirubin(a)	584,2644	583,2644	7,71	negative	-0,62583469	-1,220773629	-0,030895744	0,3
n594.4168_11.34544	594,4168@11,34544	594,4168	593,4168	11,35	negative	-0,72159725	-1,402252976	-0,040941517	0,3
597.2932_5.967226	597,2932@5,967226	597,2932	598,2932	5,97	positive	0,71422718	0,033236258	1,395218103	-0,
n598.2663_11.90251	598,2663@11,90251	598,2663	597,2663	11,90	negative	0,67917149	0,003438076	1,354904898	-0,3
n598.4234_11.82193	598,4234@11,82193	598,4234	597,4234	11,82	negative	0,71887763	0,078060921	1,359694346	-0,3
n600.2594_5.92773	600,2594@5,92773	600,2594	599,2594	5,93	negative	-0,76338917	-1,489585839	-0,037192491	0,3
n604.1752_11.79096	604,1752@11,79096	604,1752	603,1752	11,79	negative	-0,70680879	-1,392335233	-0,019766354	0,3

n610.2696_11.79419	610,2696@11,79419	610,2696	609,2696	11,79	negative	0,75549537	0,075602732	1,435388002
n612.2854_12.14069	Urobilinogen(c)	612,2854	611,2854	12,14	negative	0,55418146	0,001932171	1,106430745
632.4971_12.9622135	632,4971@12,9622135	632,4971	633,4971	12,96	positive	0,73069468	0,091109717	1,370279632
636.2718_12.009117	636,2718@12,009117	636,2718	637,2718	12,01	positive	0,6044201	0,022941063	1,185899134
n636.2854_11.95452	636,2854@11,95452	636,2854	635,2854	11,95	negative	0,6772299	0,085070534	1,269389257
n638.5069_11.77984	DG(32:2)(c)	638,5069	637,5069	11,78	negative	0,5863831	0,011699154	1,161067045
n639.3045_6.07657	639,3045@6,07657	639,3045	638,3045	6,08	negative	0,71781726	0,029763105	1,40587141
n652.3628_11.03679	652,3628@11,03679	652,3628	651,3628	11,04	negative	0,79405014	0,087503249	1,500597037
n652.5226_11.78066	652,5226@11,78066	652,5226	651,5226	11,78	negative	0,82896002	0,161641773	1,49627827
n654.4147_11.43439	654,4147@11,43439	654,4147	653,4147	11,43	negative	0,69730917	0,091944232	1,302674114
658.5136_12.970692	PA(34:0)(c)	658,5136	659,5136	12,97	positive	0,70800535	0,014150257	1,401860434
n659.4616_5.181882	659,4616@5,181882	659,4616	658,4616	5,18	negative	0,70199221	0,008907504	1,395076909
659.481_10.628082	PE-NMMe(20:0)(c)	659,481	660,481	10,63	positive	0,34785665	0,007650425	0,68806287
n670.1995_10.24357	670,1995@10,24357	670,1995	669,1995	10,24	negative	0,70784546	0,065487364	1,350203564
672.1804_11.702855	672,1804@11,702855	672,1804	673,1804	11,70	positive	0,73766458	0,049857717	1,42547145
n672.2762_11.64592	672,2762@11,64592	672,2762	671,2762	11,65	negative	0,70747466	0,227057161	1,187892168
n672.2935_12.14304	672,2935@12,14304	672,2935	671,2935	12,14	negative	0,58513503	0,113075131	1,057194934
676.3933_11.369002	PE(30:2)(a)	676,3933	677,3933	11,37	positive	0,72748838	0,036366446	1,418610313
676.4876_7.4159427	676,4876@7,4159427	676,4876	677,4876	7,42	positive	0,67749741	0,064009991	1,290984823
n681.6277_13.37328	Cer(d44:1)(c)	681,6277	680,6277	13,37	negative	0,59669611	0,045084427	1,148307786
n684.5468_12.13779	684,5468@12,13779	684,5468	683,5468	12,14	negative	0,63094694	0,04309126	1,21880262
686.4326_11.361195	686,4326@11,361195	686,4326	687,4326	11,36	positive	0,7990102	0,125989481	1,472030918
688.224_11.570826	688,224@11,570826	688,224	689,224	11,57	positive	0,74420909	0,057174794	1,431243377
n692.452_11.65244	692,452@11,65244	692,452	691,452	11,65	negative	-0,68573989	-1,371045611	-0,000043466
n694.2882_12.14193	694,2882@12,14193	694,2882	693,2882	12,14	negative	0,69538591	0,145974094	1,24479773
n699.2955_11.64723	699,2955@11,64723	699,2955	698,2955	11,65	negative	0,53131865	0,044595348	1,018041956
n702.4151_11.03888	702,4151@11,03888	702,4151	701,4151	11,04	negative	0,73641708	0,059759007	1,413075156
704.3726_11.520019	704,3726@11,520019	704,3726	705,3726	11,52	positive	0,71669491	0,128739355	1,304650456
n715.472_8.341656	715,472@8,341656	715,472	714,472	8,34	negative	-0,92055543	-1,624798657	-0,216312194
716.2822_10.989324	716,2822@10,989324	716,2822	717,2822	10,99	positive	-0,55467653	-1,074155324	-0,035197729
n721.5053_13.03906	721,5053@13,03906	721,5053	720,5053	13,04	negative	0,77593921	0,095509658	1,456386763
n724.4098_11.03819	724,4098@11,03819	724,4098	723,4098	11,04	negative	0,82648737	0,283000197	1,369974536
n726.5944_11.03517	DG(44:5)(c)	726,5944	725,5944	11,04	negative	0,55799217	0,007445675	1,108538661
n727.5518_13.33686	727,5518@13,33686	727,5518	726,5518	13,34	negative	0,74142148	0,067386959	1,415456001
n734.3656_11.03737	734,3656@11,03737	734,3656	733,3656	11,04	negative	0,87835898	0,233216328	1,523501632
n739.7052_13.95031	Cer(d44:0)(c)	739,7052	738,7052	13,95	negative	-0,60599123	-1,193849412	-0,018133043
n754.2956_12.14376	754,2956@12,14376	754,2956	753,2956	12,14	negative	0,64124146	0,041140952	1,241341974
n760.5099_7.507405	760,5099@7,507405	760,5099	759,5099	7,51	negative	-0,62860142	-1,245932171	-0,011270658
n765.3829_11.03963	765,3829@11,03963	765,3829	764,3829	11,04	negative	0,82675325	0,161518805	1,491987689
n778.1827_8.695025	778,1827@8,695025	778,1827	777,1827	8,70	negative	-0,72714398	-1,337177545	-0,11711041
n784.4185_11.04171	784,4185@11,04171	784,4185	783,4185	11,04	negative	0,7544352	0,11118378	1,397686628
n788.1373_8.69514	788,1373@8,69514	788,1373	787,1373	8,70	negative	-0,41186806	-0,820078812	-0,00365731
n790.69_11.65027	790,69@11,65027	790,69	789,69	11,65	negative	0,68632697	0,096832581	1,275821365
n796.258_6.195993	796,258@6,195993	796,258	795,258	6,20	negative	0,61853737	0,101647839	1,135426903
798.5202_12.768137	PC(X)(d)	798,5202	799,5202	12,77	positive	0,68655844	0,076185165	1,296931709
n801.3627_10.91448	801,3627@10,91448	801,3627	800,3627	10,91	negative	-0,70471124	-1,223039061	-0,186383427
n805.5834_13.40394	PS(37:0)(c)	805,5834	804,5834	13,40	negative	-0,60779715	-1,105358684	-0,110235619
n806.4496_8.09536	806,4496@8,09536	806,4496	805,4496	8,10	negative	-0,7376867	-1,324829317	-0,150544078
n810.455_5.672341	810,455@5,672341	810,455	809,455	5,67	negative	-0,56787889	-1,109558571	-0,026199211
n816.3688_11.03925	816,3688@11,03925	816,3688	815,3688	11,04	negative	0,83754174	0,207155532	1,467927945
n824.5638_7.672484	824,5638@7,672484	824,5638	823,5638	7,67	negative	-0,59973259	-1,065440426	-0,134024761
n832.4626_6.186595	832,4626@6,186595	832,4626	831,4626	6,19	negative	0,83337425	0,155186153	1,511562347
n838.5789_8.187704	PG(36:0)(c)	838,5789	837,5789	8,19	negative	-0,57117248	-0,970712592	-0,17163236
n842.1615_0.5322573	842,1615@0,5322573	842,1615	841,1615	0,53	negative	-0,7768701	-1,453150111	-0,100590096
n846.4907_12.13779	846,4907@12,13779	846,4907	845,4907	12,14	negative	0,50254088	0,015706423	0,989375331
n854.4723_6.184263	854,4723@6,184263	854,4723	853,4723	6,18	negative	-0,83356973	-1,500691176	-0,166482888
n866.4221_11.03949	866,4221@11,03949	866,4221	865,4221	11,04	negative	0,64959884	0,062556074	1,236641607
n866.6459_7.510208	866,6459@7,510208	866,6459	865,6459	7,51	negative	0,75840081	0,097217088	1,419584536
n884.713_11.77947	884,713@11,77947	884,713	883,713	11,79	negative	0,77743794	0,111797366	1,443078515
n888.4145_11.03923	888,4145@11,03923	888,4145	887,4145	11,04	negative	0,79731006	0,016833917	1,577786209
n888.5705_8.673934	888,5705@8,673934	888,5705	887,5705	8,67	negative	-0,7366462	-1,413834068	-0,059458328

n892.5965_11.03709	892,5965@11,03709	892,5965	891,5965	11,04	negative	0,82917284	0,158709679	1,499636007	-0,4145
n906.5042_13.0228	906,5042@13,0228	906,5042	905,5042	13,02	negative	1,03283713	0,340117348	1,725556908	-0,5164
n909.6065_13.46254	909,6065@13,46254	909,6065	908,6065	13,46	negative	0,45173483	2,48E-05	0,903444808	-0,2258
n926.5959_13.03385	p1(36,0)(c)	926,5959	925,5959	13,03	negative	0,32554578	0,002763842	0,648327714	-0,1627
n931.7107_11.77888	931,7107@11,77888	931,7107	930,7107	11,78	negative	0,78942466	0,113337579	1,465511738	-0,3947
n946.4935_12.54268	946,4935@12,54268	946,4935	945,4935	12,54	negative	-0,81555203	-1,454076956	-0,177027102	0,4077
n980.4356_11.45993	980,4356@11,45993	980,4356	979,4356	11,46	negative	0,64658948	0,012011689	1,281167272	-0,3223
n984.5558_11.03676	984,5558@11,03676	984,5558	983,5558	11,04	negative	0,74184927	0,091032458	1,392666089	-0,3709
n1004.626_8.311804	1004,626@8,311804	1004,626	1003,626	8,31	negative	0,57818068	0,100464372	1,055896986	-0,2899
1010.6791_11.702832	1010,6791@11,702832	1010,6791	1011,6791	11,70	positive	0,87828389	0,214872047	1,541695727	-0,4391
n1013.709_11.77888	1013,709@11,77888	1013,709	1012,709	11,78	negative	0,88607289	0,169248679	1,602897108	-0,4430
n1017.665_11.65171	1017,665@11,65171	1017,665	1016,665	11,65	negative	0,69450781	0,199961136	1,189054479	-0,3472
n1026.641_10.90788	1026,641@10,90788	1026,641	1025,641	10,91	negative	-0,49016963	-0,978137	-0,002202252	0,2450
n1042.684_11.78083	1042,684@11,78083	1042,684	1041,684	11,78	negative	0,71379385	0,034001497	1,393586194	-0,3568
n1044.431_11.64787	1044,431@11,64787	1044,431	1043,431	11,65	negative	0,76731482	0,093718931	1,4409107	-0,3836
n1058.646_11.45296	1058,646@11,45296	1058,646	1057,646	11,45	negative	0,56822678	0,034627776	1,101825791	-0,2841
n1072.711_8.253734	1072,711@8,253734	1072,711	1071,711	8,25	negative	-0,60875546	-1,165175365	-0,052335559	0,3043
n1076.7_11.07535	1076,7@11,07535	1076,7	1075,7	11,08	negative	-0,72017438	-1,407149892	-0,033198864	0,3600
n1084.075_0.4965201	1084,075@0,4965201	1084,075	1083,075	0,50	negative	0,09178221	0,013144117	0,170420299	-0,0458
1110.592_12.0529995	1110,592@12,0529995	1110,592	1111,592	12,05	positive	0,03563984	0,014911111	0,05636856	-0,0178
n1138.605_11.03561	1138,605@11,03561	1138,605	1137,605	11,04	negative	0,55690611	0,011781433	1,102030784	-0,2784
n1155.386_11.1277	1155,386@11,1277	1155,386	1154,386	11,13	negative	-0,7890126	-1,470579423	-0,10744577	0,3945
n1176.784_13.20184	1176,784@13,20184	1176,784	1175,784	13,20	negative	0,7121959	0,033623354	1,390768436	-0,3560
n1286.687_10.672	1286,687@10,672	1286,687	1285,687	10,67	negative	0,71687486	0,05275393	1,380995796	-0,3584
n1304.699_11.64054	1304,699@11,64054	1304,699	1303,699	11,64	negative	0,74568482	0,195779927	1,295589702	-0,3728
n1418.607_13.04636	1418,607@13,04636	1418,607	1417,607	13,05	negative	-0,80154462	-1,459135462	-0,143953787	0,4007
n1460.097_0.6051732	1460,097@0,6051732	1460,097	1459,097	0,61	negative	0,59470611	0,11029417	1,079118046	-0,2973

