

DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRICIA I
GINECOLOGIA

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA.

ESTER DONAT ALIAGA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 de setembre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Juan Carlos Vitoria Cormenzana
- Dra. Isabel Polanco Allue
- Dr. Carlos Bousoño García
- Dra. Dolores Planelles Silvestre
- Dra. Julia Colomer Revuelta

Va ser dirigida per:

Dra. Carmen Ribes Koninckx

Dr. Francesc Palau Martínez

Dra. M^a Angeles Dasi Carpio

©Copyright: Servei de Publicacions
Ester Donat Aliaga

Dipòsit legal: V-3428-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7975-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



TESIS DOCTORAL

**“ANÁLISIS GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD
CELIACA”**

DOCTOR en MEDICINA Y CIRUGÍA

Departament de Pediatria, Obstetricia i Ginecologia

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA DE
VALENCIA

ESTER DONAT ALIAGA

AÑO 2010

Departament de Pediatria, Obstetricia i Ginecologia
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA DE
VALENCIA

“ANÁLISIS GENÉTICO DE LA ENFERMEDAD
CELIACA”

Memoria presentada por **ESTER DONAT ALIAGA**
para optar al grado de **DOCTOR en MEDICINA Y CIRUGÍA**

Directores

Dr. DRA. CARMEN RIBES KONINCKX

DR. FRANCESC PALAU MARTINEZ

Prof. Dra. M^aANGELES DASI CARPIO

Tutor:

Prof. Dr. JOAQUIN DONAT COLOMER

Valencia, 2010

Dña. **Carmen Ribes Koninckx**, Doctora en Medicina por la Universitat de Valencia, **D. Francesc Palau Martinez**, Doctor en Medicina por la Universitat de Valencia, **Dña. M^a Angeles Dasí Carpio**, Doctora en Medicina y Profesora Asociada del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universitat de Valencia y **Dr. Joaquin Donat Colomer** Doctor en Medicina y Profesor del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universitat de Valencia

CERTIFICAN que,

Dña Ester Donat Aliaga, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universitat de Valencia y con título de Médico Especialista en Pediatría y sus áreas específicas, ha realizado íntegramente y bajo nuestra dirección el trabajo titulado “Análisis genético de la enfermedad celíaca” para optar al grado de Doctora en Medicina.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia a 8 de Junio 2010

Dra. Carmen Ribes Koninckx

Dr. Francesc Palau

Prof. Dra. M^a Ángeles Dasí

Prof. Dr. Joaquin Donat

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer a todas las personas que durante este largo periodo han estado a mi lado y de una manera u otra me han ayudado.

En primer lugar agradecerle a mis directores de tesis M^aAngeles Dasi, Francesc Palau y Carmen Ribes por su tiempo y conocimientos, y en especial a Carmen por descubrirme el apasionante mundo de la Enfermedad Celiaca.

A todo el servicio de Gastroenterología Pediátrica de la Fe: Puri, M^aRosa, Agueda, Begoña, M^aAngeles, Ana L. y todos los demás que me han ayudado técnica y moralmente en este largo proceso.

Al laboratorio de Biomedicina y al de Histocompatibilidad del Centro de Trasfusiones, cuyos miembros siempre han estado dispuestos a ayudar; especialmente a Amalia y M^a Dolores, sin ellas este trabajo no habría sido posible.

A A.Pereda, M.Oltra, I.Vitoria y M.Calabuig que de forma desinteresada siempre han estado dispuestos a colaborar.

Al Dr Roman y a E. Nagore por su saber estadístico.

A todos los niños y familiares con Enfermedad Celiaca protagonistas indiscutibles de este estudio.

A mi madre y a mi padre, hermanos, tíos y amigos por su apoyo incondicional, gracias por vuestras palabras de aliento.

Finalmente a Pache y a mis hijos Nacho y Cristina, gracias por hacerme tan feliz.

Esta tesis ha sido posible gracias a la obtención de una beca en la III convocatoria de Proyectos de Investigación Hospital Universitario LA FE de la Fundación para la Investigación y a una beca del Fondo de Investigación Sanitaria (PI 02573, AC-V).

A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota.

Madre Teresa de Calcuta

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

- AAE- Anticuerpos antiendomiso
- AAG- Anticuerpos antigliadína
- AcF- Ácido Fólico
- ADN- Ácido Desoxiribonucleico
- Alb- Albúmina
- APL- Atrofia vellositaria parcial leve
- APS-Atrofia vellositaria parcial severa
- AST/GOT-Aspartatoaminotransferrasa/ transaminasa glutámico - oxalacética
- AST/GPT- Alanina aminotransferrasa/ transaminasa glutámico - pirúvica
- ASV- Atrofia vellositaria Subtotal
- ATGt- Anticuerpos antitrasglutaminasa tisular
- B12- Vitamina B12
- cc- centímetros cúbicos
- ClNa- Cloruro Sódico
- DE- desviación estandar

- DL- desequilibrio de ligamiento
- DMID- Diabetes Mellitus insulino dependiente
- EC- Enfermedad Celiaca
- ESPGAN- Sociedad europea de GASTROENTEROLOGÍA y
Nutrición Pediátrica
- Fe- Hierro
- FE-Fracción etiológica
- FP-Fracción Preventiva
- GGT - Gamma-glutamyl transferasa
- Hb- Hemoglobina
- HLA- Antígeno Leucocitario Humano
- HLA- Antígenos de Histocompatibilidad
- IFN- Interferon
- IgA - Inmunoglobulina A
- IgG- Inmunoglobulina B
- IL-5- Interleukina 5
- IQ - Índice de Quick
- LIE- Linfocitos intraepiteliales
- ml- mililitros
- N- normal

- NK- Linfocitos T Natural Killer
- NS- No significativo
- P- p valor
- PAGE- electroforesis en gel de poliacrilamida
- PCR- reacción en cadena de la polimerasa
- Prot- Proteinas
- RFLPs- polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
- rpm- revoluciones por minuto
- RR- Riesgo Relativo
- SNPs: single nucleotide polymorphism o polimorfismo de nucleótido simple
- T helper- Linfocitos T helper
- TGt- Trasglutaminasa tisular
- TNF- Factor de necrosis tumorel
- TP- Tiempo de trombina
- VCM- Volumen Corpuscular medio

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN -----	1
1.1- DEFINICIÓN-----	1
1.2- EPIDEMIOLOGIA-----	3
1.3- ESPECTRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD-----	4
1.3.1.-EC SINTOMÁTICA-----	5
1.3.2.-EC SILENTE-----	7
1.3.3.-EC LATENTE-----	7
1.3.4.-EC POTENCIAL-----	8
1.4-ETIOPATOGENIA-----	10
1.5- DIAGNÓSTICO-----	16
1.6- MARCADORES GENETICOS-----	20
1.6.1.- SISTEMA HLA-----	27
1.6.2.- LOCUS CTLA-4-----	36
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO -----	37
3.- OBJETIVOS -----	39
3.1. COLECCIONAR MUESTRAS DE DNA DE FAMILIAS CON ENFERMEDAD CELÍACA-----	39
3.2. CLASIFICAR LA SERIE SEGÚN EL GENOTIPO HLA DE LOS PACIENTES-----	39
3.3.- ESTUDIO EXHAUSTIVO DE LOS HAPLOTIPOS HLA Y SU ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD CELIACA-----	40

3.4. INVESTIGAR EL PAPEL QUE PUEDAN JUGAR OTROS LOCI GENÉTICOS EN LA ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD-----	40
4.- TIPO DE DISEÑO -----	41
5.- LUGAR DE EJECUCIÓN -----	43
6.- MATERIAL Y MÉTODO -----	45
6.1.-SUJETOS DE ESTUDIO-----	45
6.2.-MÉTODOS-----	46
6.2.1.- IDENTIFICACIÓN DE FAMILIAS-----	46
6.2.2.- RECOGIDA DE DATOS-----	47
6.2.3.- RECOGIDA DE MUESTRAS DE SUERO Y ADN DE FAMILIAS CON ENFERMEDAD CELÍACA-----	50
6.2.4.- RECOGIDA DE MUESTRAS DE ADN DE SUJETOS SANOS CONTROL-----	51
6.2.5 - DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DR Y DQ DEL SISTEMA HLA, EN LOS ENFERMOS Y FAMILIARES ASÍ COMO EN SUJETOS CONTROL SANOS-----	53
6.2.6.- ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL MARCADOR CTLA4-----	55
6.2.7.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS-----	58
6.2.8.- ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE GENES HLA Y ENFERMEDAD CELIACA-----	58

6.2.9.-ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE MARCADOR CTLA 4 Y ENFERMEDAD CELIACA---	64
7.- RESULTADOS -----	67
7.1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN CELIACA ESTUDIADA-----	67
7.2.- CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN CELIACA ESTUDIADA-----	71
7.2.1.- DATOS BIOLÓGICOS-----	71
7.2.2.-DATOS SEROLÓGICOS-----	73
7.2.3-DATOS HISTOLÓGICOS-----	76
7.2.4-PACIENTES CON ALGÚN MARCADOR SEROLOGICO NEGATIVO-----	78
7.3.- ESTUDIO HLA EN PACIENTES-----	80
7.3.1.- FRECUENCIAS ALELICAS. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CONTROL-----	80
7.3.2.- FRACCIÓN ETIOLÓGICA Y FRACCIÓN PREVENTIVA-----	84
7.3.3- HAPLOTIPOS. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CONTROL -----	85
7.3.4.-DESEQUILIBRIO DE LA UNIÓN (DE LIGAMIENTO) SEGÚN LA FÓRMULA DE MATTIUZ-----	90
7.3.5- TEST DE INDEPENDENCIA-----	91

7.3.6.- EFECTO SINÉRGICO DE LAS ASOCIACIONES DE LOS HAPLOTIPOS-----	97
3.7.- HOMOCIGOTOS-----	98
7.3.8.- VALOR DIAGNÓSTICO DEL TIPAJE HLA -----	99
7.4.-ANÁLISIS DETALLADO DE LOS HAPLOTIPOS EN LA ENFERMEDAD CELIACA. MANIFESTACIONES CLÍNICAS-----	100
7.4.1- HAPLOTIPOS Y PACIENTES-----	100
7.4.2- HAPLOTIPOS Y DATOS CLÍNICO-BIOLÓGICOS-----	107
7.5.-ESTUDIO HLA EN FAMILIARES-----	115
7.5.1- CONCORDANCIA DE HAPLOTIPOS EN FAMILIARES AFECTOS. CONCORDANCIA / DISCORDANCIA CLINICA-----	115
7.5.2- FRECUENCIAS ALELICAS EN FAMILIARES. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CELIACA---- -----	122
7.5.3.- FRECUENCIAS ALELICAS EN FAMILIARES. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CONTROL-- -----	125
7.5.4.- HAPLOTIPOS EN FAMILIARES-----	128
7.6.- LOCUS CTLA 4-----	130
8.- DISCUSIÓN -----	133
8.1-CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN CELIACA ESTUDIADA-----	133

8.2- ESTUDIO HLA -----	139
8.3.- HAPLOTIPO HLA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS-----	146
8.3- ESTUDIO HLA EN FAMILIARES-----	147
8.4-LOCUS CTLA4-----	149
9.- CONCLUSIONES -----	151
10.- BIBLIOGRAFÍA -----	155
11.- ANEXOS -----	183

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-DEFINICIÓN:

La enfermedad celiaca (EC) es una intolerancia permanente a las proteínas del gluten (gliadinas, secalinas, hordeínas y, posiblemente, aveninas) que se da en sujetos genéticamente predispuestos (HLA DQ2 y HLA DQ8, entre otros marcadores) y que cursa con una atrofia de las vellosidades intestinales y una hiperplasia de las criptas a nivel de yeyuno, aunque otros tramos (duodeno, ileon) también pueden estar afectos (Marsh MN, 1992).

Como consecuencia, se establece una malabsorción de nutrientes, cuya repercusión clínica y funcional, en general, va a estar en dependencia de la edad y la situación previa clínico-nutricional del paciente (Goggins MMB, 1994).

La única actitud terapéutica es la supresión de la dieta de todos los productos que contienen gluten, concretamente todos los productos que incluyen harinas de cebada, centeno, avena y trigo. Aunque recientemente se ha puesto en entredicho la toxicidad de la avena, especialmente en pacientes pediátricos, no se dispone de estudios concluyentes. Un régimen estricto sin gluten conduce a la desaparición de los síntomas clínicos y de la alteración funcional, así como a la normalización de la mucosa intestinal (Vader LW, 2002; Janatuinen EK, 2002; Kilmartin C, 2003).

1.2-EPIDEMIOLOGIA

La EC suele darse en personas de raza blanca aunque también puede ocurrir en individuos procedentes de la India o de Pakistán, siendo rara al sur del Sahara, en China y en Japón. Ha sido difícil explicar hasta ahora por qué en Estados Unidos con una población similar a la europea (descendientes de inmigrantes) la prevalencia de esta enfermedad era baja.

La EC es aproximadamente 2 veces más frecuente en las mujeres que en los hombres, tanto en series pediátricas como de adultos.

En los últimos años la EC ha despertado un gran interés, tanto clínico como científico. Ello se debe, principalmente, a que se ha demostrado que la prevalencia real de la enfermedad es muy superior al número de casos identificados, pudiendo afectar hasta a un 1% de la población general frente a datos que indicaban una prevalencia de 1/1000-1500 recién nacidos vivos (Troncone R, 2000). En la Comunidad Valenciana, en los años 90, se estimó, en el contexto de un estudio multicéntrico europeo, una incidencia de entre 1:2000 y 1:2500 recién nacidos (Ribes- Koninckx C, 1992). En este estudio, promovido por la ESPGAN, se obtuvo una gran disparidad de resultados en zonas geográfica y genéticamente similares lo que incentivó la investigación en este sentido. Estudios recientes prospectivos de despistaje en población sana arrojan, sin embargo, prevalencias mucho más elevadas de 1:300 hasta 1:140, obteniendo resultados similares en regiones tan distintas como Italia y

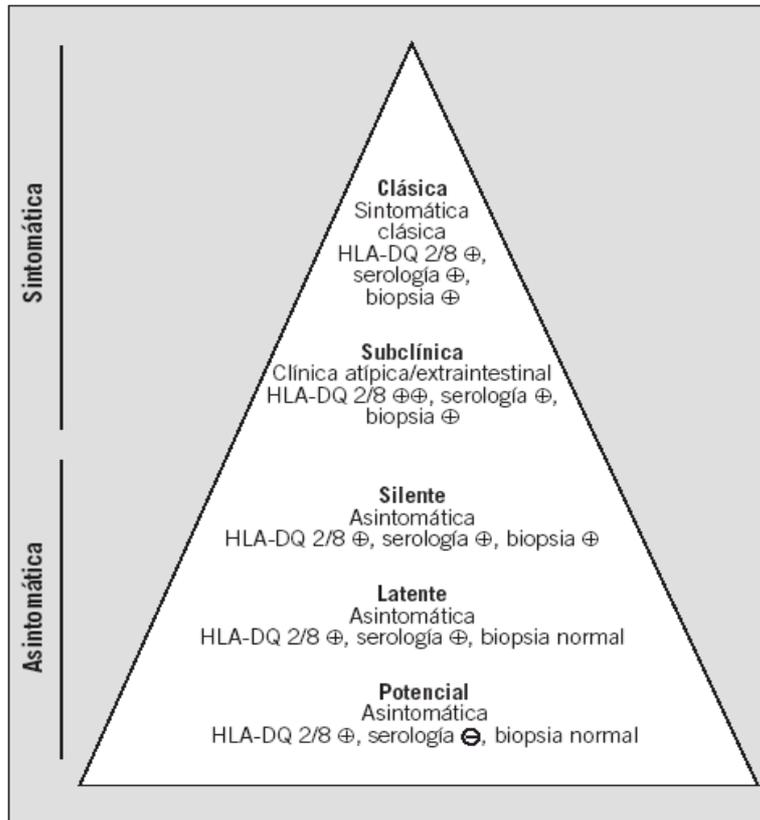
Holanda. En Italia se realizó un despistaje de la EC en una población escolar asintomática del centro de Italia (Catassi C, 1996) a un total de 3351 niños con edades comprendidas entre 11 y 15 años. Con este estudio se demostró que la prevalencia real de la enfermedad era mucho mayor de la estimada, existiendo un gran número de formas silentes u oligosintomáticas; con una prevalencia de casos conocidos de 1/2-2500 distinta de la real obtenida tras despistaje de 1/300 (por cada caso diagnosticado existen 6-7 nuevos casos por diagnosticar). Semejantes resultados se obtienen en Holanda con un estudio de características parecidas, siendo los casos conocidos de 1/2700 y los casos obtenidos por despistaje poblacional de 1/300 (Csizmadia CG, 1999).

Recientes estudios de despistaje realizados en USA muestran una prevalencia similar sobretodo de casos atípicos o silentes (Kumar PJ, 2003; Fasano A, 2003).

En España, estudios de prevalencia ofrecen resultados similares, así en el País Vasco se obtiene una prevalencia de EC de 1:118 recién nacidos (Castaño L, 2004), en Asturias 1:389 (Riestra S, 2000), y en Madrid de 1:220 (Cilleruelo ML, 2002).

Es por este motivo que se habla del Iceberg de la EC siendo los casos conocidos la punta del mismo y quedando por diagnosticar la mayoría de casos de EC. Figura 1.

Figura 1.-El Iceberg de la EC



1.3.-ESPECTRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD

Las formas clínicas sintomáticas representan tan solo la punta del Iceberg, cuya base incluiría no sólo las formas silentes sino también las situaciones denominadas EC latente y EC potencial. Todo este espectro clínico quedaría englobado en el término acuñado en los últimos años como Condición Celiaca.

1.3.1.-EC SINTOMÁTICA:

La llamada *sintomatología clásica* incluye diarrea malabsortiva, vómitos, cambios de carácter, falta de apetito, estacionamiento de la curva de peso y retraso del crecimiento. El abdomen prominente y las nalgas aplanadas completan el aspecto característico de estos enfermos. Si la enfermedad evoluciona sin tratamiento, pueden aparecer formas graves (*Crisis celiaca*), con presencia de hemorragias cutáneas o digestivas (por defecto de síntesis de vitamina K y otros factores K dependientes), grave deshidratación hipotónica y alteraciones hidroelectrolíticas como tetania hipocalcémica y marcada hipopotasemia, así como gran distensión abdominal, malnutrición extrema y edemas por hipoalbuminemia. Esta sintomatología es más frecuente en la primera infancia.

La *sintomatología atípica* es más frecuente en niños mayores y en la edad adulta. Estas formas no clásicas pueden presentarse con estreñimiento, asociado o no a dolor abdominal de tipo cólico o de distensión abdominal, retraso de talla o de la pubertad, en forma de anemia ferropénica, debida a la malabsorción de hierro y folatos. En celíacos no tratados se ha descrito hipoplasia del esmalte dentario, aunque esta alteración no sería específica de la EC (Farmakis E, 2005; Bossu M, 2007). Dentro de las enfermedades neurológicas asociadas a la EC se ha referido la tríada epilepsia, calcificaciones intracraneales occipitales bilaterales y enfermedad celíaca (enfermedad de Gobbi) en la población pediátrica (Gobbi G, 1992) y la ataxia

inducida por el gluten, descrita fundamentalmente en adultos (Hjadjivassiliou M, 2003), así como neuropatía, migraña y cefalea.

En la tabla 1 se muestran algunas de las manifestaciones atípicas más habituales, como la dermatitis herpetiforme (considerada, realmente, como la enfermedad celíaca de la piel).

Se han descrito numerosas *asociaciones* de EC con otras patologías, muchas con base inmunológica, como déficit selectivo de IgA, diabetes mellitus tipo I o tiroiditis y hepatitis autoinmune, entre otras.

Tabla 1- Algunas manifestaciones atípicas de la EC.

Talla Corta	Epilepsia (con o sin calcificaciones cerebrales)
Retraso puberal	Ataxia
Abortos de repetición	Ansiedad o depresión
Infertilidad	Esquizofrenia
Estomatitis aftosa recurrente	Disqueratosis
Dolor abdominal recurrente	Alopecia
Esteatorrea	Autismo
Anemia por déficit de folatos	Osteopenia u osteoporosis
Anemia ferropénica	Artralgia o artropatía
Déficit de Vitamina K	Hipoplasia del esmalte dental
Trombocitosis (hipoesplenismo)	Dermatitis herpetiforme
Hipertransaminasemia	

1.3.2.-EC SILENTE representada por pacientes que con atrofia vellositaria intestinal que se normaliza tras dieta exenta de gluten y que no refieren manifestaciones clínicas o éstas son mínimas (Farrell RJ, 2002; Ruiz Díaz A, 2002; Collin P, 2002).

En estos casos el diagnóstico de sospecha se establece tras estudios de *despistaje* aplicados a poblaciones de riesgo:

- Familiares de celíacos de primer grado
- Enfermedades asociadas a la EC (Tabla 2)

Tabla 2- Algunas enfermedades asociadas a la EC.

Déficit de IgA
Diabetes tipo I
Tiroiditis autoinmune
Síndrome de Sjögren
Colitis microscópica
Artritis reumatoide
Síndrome de Down
Nefropatía IgA

1.3.3.-EC LATENTE se refiere a pacientes con un estudio histológico de la mucosa intestinal normal estando con una dieta variada, sin restricciones, pero que en algún momento anterior han tenido una atrofia vellositaria que se ha recuperado tras una dieta exenta de gluten.

Es frecuente detectar AAG y AAE en el suero, aunque su presencia no es constante. Como es fácilmente comprensible

dadas sus características se trata del subgrupo que entraña mayor dificultad diagnóstica (Troncone R, 1995; Barbato M, 1999).

1.3.4.-EC POTENCIAL

El término potencial hace referencia a la presencia, con o sin síntomas, de un recuento de linfocitos intraepiteliales elevados junto con un patrón de producción de anticuerpos característico a nivel de mucosa o una provocación rectal con gluten positiva. El seguimiento clínico y serológico es la actitud clínica recomendable en estos casos (Ferguson A, 1993; Arranz E, 1993; Arranz E 1995; Troncone R, 1996; Arranz E, 1994; Collin P, 1993).

La EC se ha convertido en un auténtico problema de salud no solo por la prevalencia real de la enfermedad, sino también por la alta morbilidad asociada a la misma. Así casos de osteopenia, osteoporosis, abortos prematuros, infertilidad, enfermedades autoinmunes (Peña AS, 1987; Calero P, 1996) o procesos neoplásicos (Holmes GKT, 1996) que generan una importante morbilidad y un elevado gasto sanitario, han impulsado el desarrollo de diversos proyectos europeos de investigación. Proyectos como Biomed "Coeliac disease and Non Hodgkin lymphoma" o el "ESPGHAN Multicenter Study on cancer mortality in relatives of coeliac disease patients". Igualmente la alta prevalencia de la enfermedad ha generado el desarrollo de proyectos ligados a estrategias de prevención como *PreventCD*. Así, en la patología Obstétrico- ginecológica: la literatura es controvertida, ya que si bien se le ha atribuido a la mujer con EC

no tratada, problemas de infertilidad, abortos de repetición, bajo peso al nacimiento y retrasos de crecimiento intrauterino (Stazi AV, 2000; Eliakim R, 2001; Rostami K, 2001), en las últimas publicaciones esta asociación parece no estar tan clara, excepto en el caso del retraso en el crecimiento intrauterino (Tata LJ, 2005; Sheiner E, 2006). También se ha relacionado con la infertilidad masculina.

En cuanto a la mineralización ósea: se ha publicado que hasta un 75% de pacientes EC sin tratar presentan una pérdida de masa ósea (Corazza GR, 2005), padeciendo osteoporosis hasta en un 27% de los casos (Meyer D, 2001) estos porcentajes disminuyen drásticamente con la dieta exenta de gluten.

El riesgo de desarrollar cáncer en pacientes celíacos se ha estimado que puede duplicar o triplicar al de la población general; carcinomas de la boca, faringe y esófago duplican su riesgo en la población celíaca, el linfoma de células T relacionado con enteropatía es 43 veces más frecuente que en la población general (Holmes GK, 1989), sin embargo estudios recientes como el realizado en la población sueca demuestran que aunque el riesgo está aumentado (1.3 veces más) este es inferior al previamente referido (Askling J, 2002). En el último estudio multicéntrico sobre el linfoma no-hodgkin (Mearin ML, 2006) establecen que los pacientes con EC tienen un riesgo significativamente mayor de linfoma no-hodgkin con una Odds Ratio de 2.6, especialmente de intestino delgado (OR 11.8) y de linfoma de células T relacionado con enteropatía (OR 28). La

presencia de estos tumores esta en relación con el tiempo de exposición al gluten y se da más en las formas de presentación con clínica, siendo la única forma de prevención la adherencia al tratamiento dietético, equiparándose el riesgo al de la población general tras 5 años de dieta exenta de gluten (Catassi C, 2005). Existen complicaciones como la EC refractaria y la yeyunitis ulcerativa que pueden progresar a linfoma de células T relacionado con enteropatía (Brousse N, 2005). La importancia de un diagnóstico precoz radica en la realización de un tratamiento dietético lo antes posible ya que los beneficios del mismo son indiscutibles, así tras 5 años de dieta el riesgo de neoplasias en la edad adulta es el mismo que el de la población general. Tras 1 año de dieta exenta de gluten se observa una notable mejoría de la densidad ósea en niños, adolescentes y adultos. En patología obstétrico-ginecológica, las mujeres jóvenes diagnosticadas de EC en la 1º infancia y que han llevado un tratamiento dietético adecuado tienen el mismo riesgo de padecer este tipo de patología que el resto de la población.

1.4.-ETIOPATOGENIA

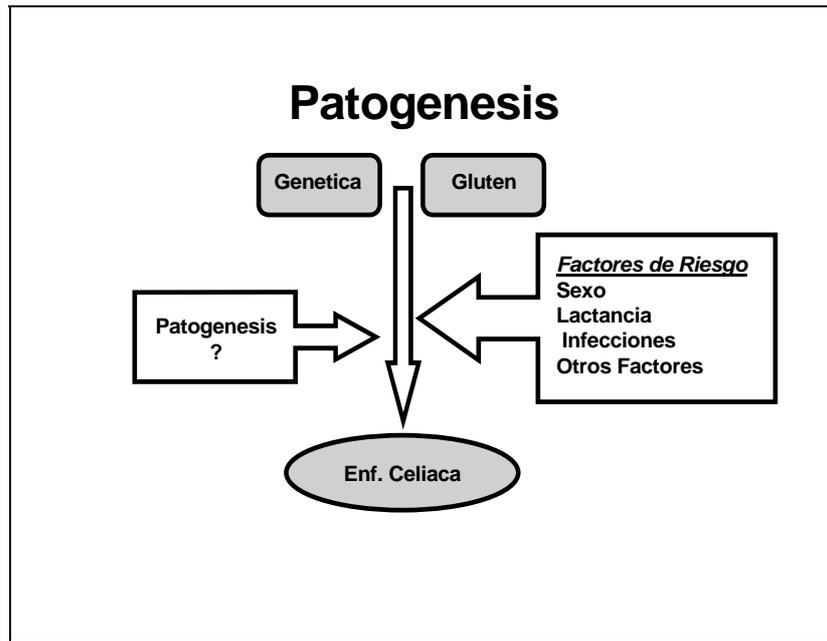
La patogenia de la EC no ha sido claramente establecida si bien la mayoría de los modelos descritos la consideran una enfermedad inmunológica en la que concurren factores genéticos y ambientales (Figura 2).

Como factores ambientales, además del gluten y concretamente

su fracción proteica la gliadina, se ha especulado sobre el papel de infecciones víricas y de la ingestión de dosis elevadas de gluten, así como de la introducción temprana del mismo en la dieta. La lactancia materna podría jugar un papel protector frente a la EC, siempre y cuando el gluten se introduzca mientras el lactante está siendo alimentado con leche materna (Ivarsson A, 2002; Ivarsson A, 2003). La importancia de los factores genéticos viene apoyada por la alta prevalencia de la enfermedad entre familiares (aproximadamente 10% en familiares de primer grado) y una concordancia de aproximadamente un 70% en los gemelos monocigotos. La agregación familiar viene medida con el cociente denominado λ (ratio de recurrencia en familiares) que si está próximo a 1 es que no hay evidencia de agregación familiar. El riesgo para hermanos de pacientes con EC (λ_s) comparado con la población general se estima que es al menos 20 veces superior ($\lambda_s = 20-60$) (Bevan S, 1999), este valor es elevado si lo comparamos con otras enfermedades complejas como la diabetes ($\lambda_s = 15$) o la artritis reumatoide ($\lambda_s = 2-8$).

Se ha encontrado una fuerte asociación entre los genes que codifican para moléculas HLA de clase II y la EC, concretamente con la molécula heterodímera DQ2, situada en la superficie de células implicadas en la respuesta inmune, codificada por los alelos DQA1*0501 DQB1*0201.

Figura 2. Esquema de la patogénesis de la EC.



Aunque no se conoce el mecanismo molecular preciso por el cual se produce la EC, la identificación de la Transglutaminasa tisular (TGt) como el autoantígeno frente al cual se dirigen principalmente los anticuerpos tisulares ha permitido conocer nuevos datos que explican algunos de los sucesos que acontecen en la enfermedad (Dieterich W, 1997). La TGt pertenece a una familia heterogénea de enzimas calcio-dependientes que cataliza la formación de enlaces entre proteínas. Está ampliamente distribuida en el organismo humano, encontrándose asociada a las fibras que rodean el músculo liso y las células endoteliales del tejido conectivo. La TGt interviene en el ensamblaje de la matriz extracelular y en los mecanismos de reparación tisular,

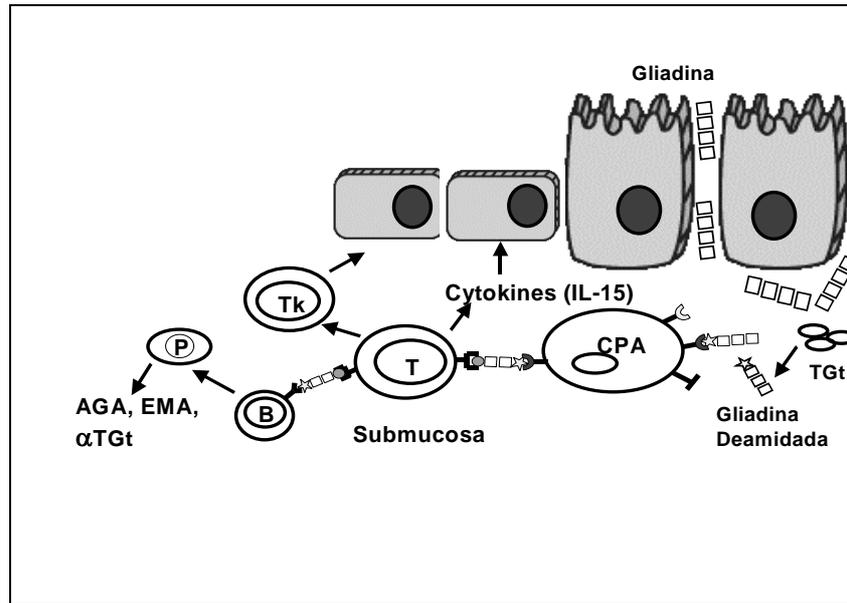
actuando las gliadinas del trigo como sustrato de estas reacciones. En tejidos lesionados, como la mucosa del intestino delgado de la EC no tratada, los niveles de TGt aumentan. Existen datos que apoyan que la TGt actúa de forma específica sobre los péptidos de las gliadinas, produciendo residuos cargados negativamente por desamidación de una glutamina a ácido glutámico (Molberg 1998, van de Wal 1998, Molberg 2001). Esta actividad produce complejos entre el autoantígeno (TGt) y la gliadina que actúa como transportadora, generándose epítomos nuevos capaces de unirse muy eficazmente a las moléculas DQ2 o DQ8 (codificada por los alelos DQB1*0302 DQA1*03), ambas con preferencia por cargas negativas (van de Wal 1996), expresadas en la superficie de las células presentadoras de antígeno a nivel intestinal y que son reconocidos por células T derivadas del intestino de pacientes celíacos. El estímulo de estas células T CD4+ (cooperadoras), específicas para gliadina, por el complejo TGt-gliadina actúa sobre las células B para la producción de anticuerpos frente a TGt y frente a gliadina. Este modelo coincide con el hecho que la mayoría de los pacientes celíacos son portadores de HLA-DQ2 o, en su defecto, de DQ8. También explica la existencia de autoanticuerpos frente a antígenos tisulares, cuyos niveles fluctúan en función de antígenos de la dieta (gliadina), sin necesidad de la existencia de homologías entre las gliadinas y el autoantígeno. Si la cooperación con células B específicas para la formación de anticuerpos anti-TGt (ATGt) proviniese de células

T específicas para TGt y no de células T específicas para gliadina, la respuesta inmune sería crónica y no estaría regulada a través de la ingesta de gluten, como de hecho ocurre en la EC (Sollid LM, 2000). (Figura 3). Sin embargo, se han descrito péptidos de gliadina capaces de estimular la respuesta de las células T en su forma nativa. Habitualmente, los antígenos ingeridos en la dieta son procesados por los enzimas intestinales, pero los péptidos de gliadina son altamente resistentes a este efecto por su alto contenido en prolina (Hausch F, 2002). Así en un estudio realizado (Shan L, 2002) para intentar degradar a la α -gliadina, se encuentran un péptido 33-mer que permanece intacto a pesar de su exposición a las proteasas. Recientes estudios muestran que el gluten puede inducir respuesta en individuos genéticamente susceptibles no solo a través de unión de péptidos con moléculas HLA y estimulación de los linfocitos T, sino también mediante la activación de la inmunidad innata. Ciertas fracciones del gluten, como el péptido 31-43/49 (Koning F, 2005; Stepniak D 2006), pueden inducir la producción de IL-15 en las células mononucleares de la lámina propia de los pacientes con EC (Maiuri L, 2000; 2003), y esta IL-15 estimula la expresión de moléculas MIC en el intestino de estos pacientes (Hue S, 2004). Estas moléculas MIC interactúan con los receptores de los linfocitos *Natural Killer* (NK) NKG2D que se expresan en la superficie de los LIE TCR $\alpha\beta$ + CD8+ -, TCR $\gamma\delta$ + -, y de la mayoría de las células NK. Esto puede provocar que estas células T se transformen en células NK-like y esto es lo

que se ha sugerido que provoca la destrucción del epitelio intestinal mediado por los LIE (Hue S, 2004). La producción de citoquinas por estas células T activadas como el interferón (IFN)- γ (Nilsen EM, 1995; Nilsen EM, 1998) e IL-2, típicamente secretado por los linfocitos T helper (Th) 1, así como, por el contrario IL-4 e IL-10 secretado por los Th-2 mediarían en la respuesta inflamatoria en la EC junto con el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , producido por los macrófagos. Tanto el IFN- γ como TNF- α se ha demostrado que poseen un efecto citotóxico en las células del epitelio intestinal (Westerholm-Ormio M, 2002).

No se conoce el mecanismo por el cual la gliadina atraviesa la barrera intestinal, ya que esta es prácticamente impermeable para macromoléculas como la gliadina en circunstancias fisiológicas (Fasano A, 1998). La Zonulina es un modulador de la permeabilidad intestinal recientemente descrito (Wang W, 2000), que se ha visto que está más aumentada en la fase aguda de la EC (Fasano A, 2000). La gliadina activaría la señal de la zonulina de manera que se reduciría la función de barrera de la mucosa intestinal y así pasaría la gliadina a la lámina propia (Drago S, 2006). Este proceso depende de la presencia de receptores de zonulina.

Figura 3. Deamidación de la gliadina por la transglutaminasa tisular y formación de anticuerpos.



1.5.- DIAGNÓSTICO

Aunque el diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza con el estudio histológico de la mucosa intestinal encontrándose la característica atrofia vellositaria subtotal, hiperplasia críptica y aumento de linfocitos intraepiteliales (LIE), el desarrollo de distintos marcadores serológicos de la enfermedad (anticuerpos antigliadina, anticuerpos antiendomisio y anticuerpos antitransglutaminasa) ha sido determinante en el diagnóstico de la misma, siendo muy sensibles y específicos para las formas de enfermedad activa y especialmente interesantes para las formas paucisintomáticas, que anteriormente pasaban desapercibidas en la clínica. Estas formas son precisamente las que revisten mayor

morbilidad al asociarse a la aparición de otras enfermedades autoinmunes y/o a procesos neoplásicos, posiblemente por el retraso en su diagnóstico y en su tratamiento. Pero en las formas de presentación silentes (grupos de riesgo) la presencia de marcadores serológicos negativos en un momento puntual no descarta la EC de por vida, lo que obliga a la realización periódica de determinaciones reiteradas.

El diagnóstico de sospecha se establece en base a datos clínicos y analíticos, aunque es imprescindible la realización de, al menos, una biopsia intestinal y el estudio histológico de una muestra de mucosa obtenida a nivel duodeno- yeyuno, aunque puede existir lesión bien continua o parcheada a otros niveles (Dickson BC, 2006).

Para aumentar la superficie de absorción, un intestino normal presenta múltiples vellosidades que se dirigen hacia la luz intestinal, entre estas se encuentran las criptas que es donde la proliferación celular tiene lugar. Ambas, tanto las criptas como las vellosidades están recubiertas por una única capa de células epiteliales que actúa de barrera entre el exterior y el interior del organismo. Estas células epiteliales poseen en la zona apical numerosas profusiones denominadas microvilli. En un intestino sano las vellosidades son por lo menos dos veces más largas que la profundidad de las criptas.

En la EC el hallazgo histológico específico, aunque no patognomónico, es una atrofia vellositaria grave (atrofia subtotal) con hiperplasia de las criptas y aumento de linfocitos

intraepiteliales y de las células mononucleares de la lámina propia (Trier J.S, 1991). Se pierde así la superficie absortiva, cuando el paciente inicia una dieta exenta de gluten se produce una resolución completa de las lesiones, aunque la densidad de LIE no se normaliza completamente (Ferguson A, 1977). Sin embargo, esta lesión significa el estadio final de un amplio espectro de cambios histológicos de la mucosa intestinal en la EC. En 1975, Alexander (Alexander EL, 1975) describió los cambios en la mucosa observados en la dermatitis herpetiforme, consideraba cuatro estadios (siendo el I normal y el IV atrofia subtotal) pero no tenía en cuenta los LIE. En 1992, aparece la nueva clasificación propuesta por MARSH (Marsh MN, 1992), con los siguientes patrones de cambio en la mucosa intestinal:

- **Tipo 0- Preinfiltrativo**, no se diferencia histológicamente de una mucosa normal, si bien presenta altos títulos de anticuerpos antigliadina clase IgA e IgG en las secreciones intestinales (lesión propia de pacientes con EC latente o dermatitis herpetiforme)
- **Tipo 1- Infiltrativa**: aumento de linfocitos intraepiteliales (LIE) con arquitectura vellositaria conservada (>40 LIEs/100 células epiteliales)
- **Tipo 2- Hiperplásica**: Hiperplasia críptica y aumento de LIE, con arquitectura vellositaria conservada.
- **Tipo 3- Destructiva**: atrofia vellositaria con hiperplasia críptica y aumento de LIE. Existe una subdivisión en tres

grupos en función del grado de atrofia vellositaria (Oberhuber G, 1999)

a* Atrofia vellositaria parcial

b* Atrofia vellositaria subtotal

c* Atrofia vellositaria total

- **Tipo 4- Hipoplásica:** lesión atrófica irreversible de la mucosa, que no responde a la dieta exenta de gluten, tras el establecimiento de un clon de células T maligno en el tracto intestinal. Las criptas y los LIE son normales.

La infiltración de los LIE es un dato muy característico de la EC. El número de LIE no está relacionado con el grado de severidad de la lesión.

Las 3 poblaciones de LIE más importantes de la mucosa intestinal son los receptores de células T (TCR) $\alpha\beta + CD8 + CD4 -$, $TCR \alpha\beta + CD8 - CD4 +$, y $TCR \gamma\delta + CD8 - CD4-$. Tanto los $TCR \alpha\beta + CD8 +$ y los $TCR \gamma\delta +$ están aumentados en la EC (Sollid LM, 2000; Lionetti P, 2002). Tras una dieta exenta de gluten tan solo los LIE $TCR \alpha\beta + CD8 +$ vuelven a su número normal, mientras los $TCR \gamma\delta +$ permanecen elevados (Kutlu T, 1993). Ambos reconocen los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad. También hay un aumento de proliferación las células epiteliales en las criptas (Lionetti P, 2002).

Los criterios diagnósticos establecidos por la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN 1969) incluyeron la realización de al menos 3 biopsias intestinales. Con el hallazgo de una atrofia de las vellosidades grave en una

1ª biopsia intestinal (siendo obligatorio el estar con una dieta con gluten), en una 2ª biopsia intestinal normalización histológica probada, tras un periodo de dos años de dieta exenta de gluten, y reaparición de la lesión vellositaria comprobada mediante una 3ª biopsia intestinal tras reintroducción del gluten en la dieta (prueba de provocación). En 1989 estas normas fueron revisadas (Walker-Smith JA, 1990), puntualizando que la segunda y la tercera biopsia sólo serían necesarias en: niños pequeños menores de 2 años, cuando no se ha realizado la 1ª biopsia o los hallazgos histológicos de la misma son dudosos o no específicos o cuando la respuesta clínica a la exclusión del gluten no es concluyente.

La presencia de marcadores serológicos (anticuerpos antigliadina, antiendomiso y/o transglutaminasa) elevados en la fase activa de la enfermedad (cuando el paciente esté consumiendo gluten) y su desaparición tras suprimir el gluten de la dieta, es un dato biológico que apoya el diagnóstico, pero no se considera un criterio suficiente "per se".

1.6.- MARCADORES GENÉTICOS

La evidencia de que incluso a pesar de la utilización rutinaria de marcadores serológicos, solo se diagnostica la punta del Iceberg de la enfermedad, junto con la morbilidad ligada a la enfermedad celiaca no diagnosticada y no tratada, ha propiciado el interés por otros posibles marcadores que identifiquen precozmente a la población de riesgo.

Por ello en los últimos años el interés y las investigaciones se han centrado en marcadores genéticos ya que si bien el mecanismo patogénico de la enfermedad no es del todo conocido, se sabe que el sistema inmune juega un papel fundamental, especialmente el complejo mayor de histocompatibilidad, y que la enfermedad tiene una base genética.

Desde 1973 en que se encontró la asociación entre la espondilitis anquilopoyética y el sistema HLA (Brewerton DA, 1973), numerosos estudios han demostrado la asociación de diversas enfermedades con distintos antígenos HLA. Aunque ninguna asociación es absoluta, hay casos como la espondilitis anquilosante (Alexander EL, 1981) y la narcolepsia (Planelles D, 1997), en los que la asociación es muy fuerte. Otras enfermedades con una asociación menor como la diabetes mellitus (Thorsby E., 1992), el lupus eritematoso sistémico (Galeazzi M, 1992), la artritis reumatoide juvenil (Lulli P, 1983) o la enfermedad de Graves (Dong RP, 1992), ponen de manifiesto que la mayor parte de las asociaciones con antígenos HLA se relacionan con la respuesta inmune.

No se conoce con exactitud la base de estas asociaciones, si bien parece estar claro que los antígenos HLA predisponen a la enfermedad, si bien otros factores genéticos y/o ambientales intervienen en la susceptibilidad a la misma.

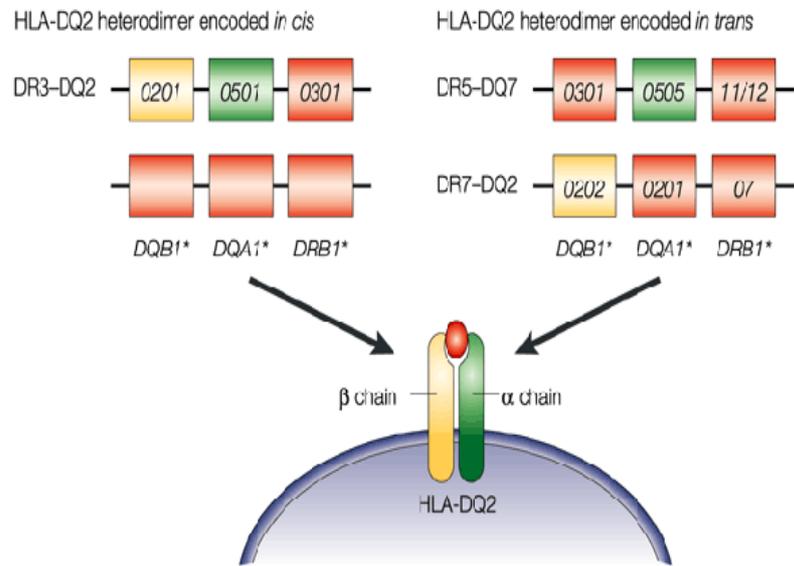
En efecto, se ha demostrado que el 90% de los pacientes celíacos presentan, en la región II del sistema HLA, los alelos de

riesgo DQA1*05 y DQB1*02 que codifican la molécula heterodimera DQ2, en cis en el haplotipo DR3 y en trans en los heterocigotos DR5/DR7 (Spurkland A, 1992) Figura 4. La mayor parte del resto de los pacientes celíacos negativos para DQ2 portan la molécula DQ8.

La implicación de la molécula DQ2 en la patogénesis de la enfermedad ha sido demostrada, sugiriendo diversos estudios que actúa como presentadora de epitopos deaminados de las prolaminas tóxicas a los linfocitos T de la mucosa intestinal, precipitando la cascada inmunológica. Esta observación concuerda con el hecho de que en los análisis genéticos de enfermedad celíaca, basados en estudios poblacionales, el locus HLA se comporta como un factor mendeliano único.

Sin embargo no todos los enfermos celíacos son portadores de esta molécula DQ2; así una pequeña proporción es portadora de la molécula DQ8 codificada por los alelos DQA1*03 y DQB1*0302 en pacientes DQ2 negativos y solo una fracción minoritaria es DQ2 DQ8 negativa (Polvi A, 1998). En resumen las moléculas DQ2 y DQ8 juegan un papel clave en la patogénesis de la enfermedad estableciéndose que los HLA-DQA1 y HLA-DQB1 son los principales determinantes genéticos de enfermedad celíaca en la región HLA (Sollid LM, 2000).

Figura 4. Moléculas HLA en Cis y en Trans tomado de Sollid LM Nat Rev Immunol (Sollid LM, 2002).



Nature Reviews | Immunology

A pesar de esta fuerte asociación, existen sin embargo datos que apoyan la implicación de otros factores genéticos. Aproximadamente un 20-30% de la población general es portadora de las moléculas DQ de riesgo y sin embargo no llega a desarrollar la enfermedad; así, en cuanto a los individuos DQ2 positivos, solo un 5% de ellos desarrollan una enfermedad celiaca, lo que apoya que aunque ciertos alelos DQ son necesarios para el desarrollo de la enfermedad, deben existir otros factores de riesgo genéticos o ambientales (Lui J, 2002). Por otra parte se sabe que la prevalencia de la enfermedad celiaca en familiares de primer grado es de un 10% (Maki M, 1991) y la concordancia entre gemelos monocigotos es mayor del 70% (Polanco I, 1981; Hervonen K, 2000) sin embargo la tasa de concordancia entre hermanos idénticos para los alelos DQ de riesgo es solo del 30%, la diferencia entre ambas tasas indica pues la importancia de otros factores genéticos distintos al DQ. Finalmente estudios en familias dirigidos a estimar el riesgo de recurrencia en hermanos y en población general, demuestran que el factor de riesgo asociado a HLA solo representa entre el 29-40% de los casos de familiaridad (Mearin ML, 1983; Petronzelli F, 1997). En resumen, a la región HLA por si misma se le confiere hasta un 40% de aumento de riesgo para padecer la EC en hermanos de sujetos afectos. El 60% restante será atribuido a otros genes no-HLA.

Con el objetivo de identificar otros factores genéticos no HLA, se han llevado a cabo en los últimos años distintos estudios

genómicos (proyecto de cartografiado genómico). El primero, en Irlanda, demostró la asociación con 6 regiones: región secundaria en 6p, 7q31, 11p11, 15q26, 19q y 22cen; la asociación con la región 15q26 no fue sin embargo confirmada en una reevaluación posterior (Zhong F, 1996). Un segundo estudio genómico realizado por L. Greco et al. en población italiana (Greco L, 2001), sugiere una asociación con el cromosoma 5q y en un subgrupo de 39 enfermos emparentados, con formas sintomáticas de la enfermedad, con el cromosoma 11q; curiosamente, sin embargo no se confirmó esta asociación en un grupo compuesto por enfermos en que uno de los hermanos presentaba una enfermedad clínica sintomática y el otro una forma silente. El estudio de familias finlandesas también ha encontrado una asociación con los cromosomas 5q y 11q (Holopainen P, 2001). Un tercer estudio, en el Reino Unido, que incluye 16 familias con múltiples casos, sugiere la asociación con 6q, 11p y 19 q, en concordancia con los resultados realizados previamente en población irlandesa (King AL, 2000). También se ha obtenido evidencia de que en población del norte de Europa, la región CTLA4/CD28 en el cromosoma 2q33 confiere susceptibilidad para la enfermedad (Torinsson Nalvai A, 2000).

Otro estudio publicado por el grupo de Markku Maki en 60 familias finlandesas, (Lui J, 2002) con varios individuos afectados en cada una; se encontró una asociación con la región HLA en 6p21.3. Los resultados obtenidos por otra parte sugerían una

asociación con otras 6 regiones cromosómicas, la 1p36, la 4p15, la 5q31, la 7q21, la 9p21-23 y la 16q12. Posteriormente fueron analizadas las regiones más convincentes, la 4p15, la 5q31 y la 7q21, sin que este estudio reforzara la evidencia de asociación. En este trabajo además se observó que solo un paciente no era portador de al menos uno de los alelos DQ de riesgo, y que un 65% de los portadores de HLA-DQ2 presentaban la enfermedad. En la publicación realizada en *Gastroenterology* por Van Belzen et al, (Van Belzen MJ, 2003) identifican varias regiones asociadas a la enfermedad celiaca; se realizó en un grupo de 270 sujetos de la población holandesa (67 familias con 2 o más hermanos afectos) un rastreo por todo el genoma utilizando un total de 326 marcadores microsatélites. El valor del Multipoint Maximum Lod Score (MMLS = 4,31) indicaba un ligamiento significativo en la región 19p13.1, con el pico en el marcador D19S899.

Hasta el momento actual no hay realmente evidencia de asociación genética entre locus no-HLA y enfermedad celiaca, por ello es necesario continuar la investigación en esta dirección a la vez que se sigue explorando la asociación con la región HLA. Puesto que la región HLA contiene un gran número de genes involucrados en la respuesta inmune, otros genes ligados al sistema HLA no DQ pueden también contribuir a la susceptibilidad para la enfermedad celiaca (Lie BA, 1999).

En base a estos estudios se establecen 4 regiones cromosómicas, asociadas a EC:

CELIAC 1, situada en el cromosoma 6p21.3, que comprende a los genes HLA.

CELIAC 2, en el cromosoma 5q31-33 (Ryan AW, 2005), que comprende a genes implicados en la respuesta inmunológica y activación de sustancias mediadoras como las Interleukinas.

CELIAC 3, en el cromosoma 2q33, comprende a los genes CD28, CTLA4 e ICOS. Implicados en la activación de los linfocitos T (Amundsen SS, 2004).

CELIAC 4, en el cromosoma 19p13.1, contiene genes implicados en la remodelación del citoesqueleto (Van Belzen MJ, 2003; Diosdado B, 2004; Monsuur AJ, 2005).

1.6.1.- SISTEMA HLA

Las moléculas del sistema HLA (antígeno leucocitario humano) forman parte del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Son glicoproteínas de membrana que se expresan en la superficie de toda célula humana. Su función es la de distinguir moléculas propias de las ajenas, fundamentalmente a través de la unión de péptidos de antígenos y su presentación a los Linfocitos T. Estas moléculas están codificadas por un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21. Los genes del sistema HLA ocupan aproximadamente 4000 kb, más de 200 gene loci. Estos genes codifican productos estructuralmente homólogos que son divididos en moléculas HLA clase I y clase II en función de la estructura, tejido, distribución y origen del péptido-antígeno, así como de la función de la célula T implicada en la respuesta

inmune. Las moléculas HLA clase I están codificadas por tres loci genéticos distintos denominados HLA-A, B y C, las moléculas de clase II incluyen HLA- DR, DP y DQ. La región clase III, localizada entre la de clase I y II, contiene genes con diversas funciones. Figura 5.

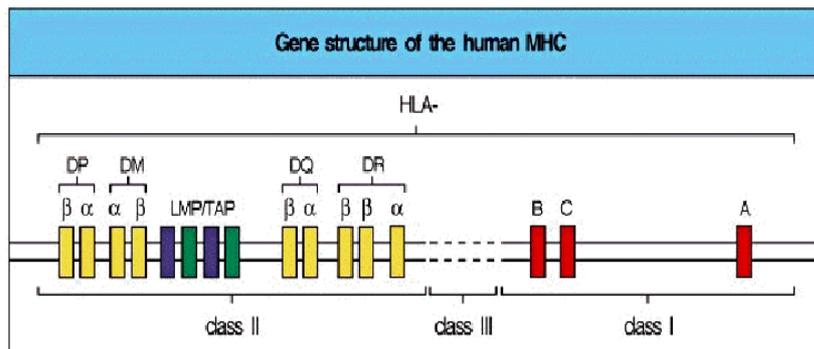


Figura 5. La estructura del MHC humano, localizado en el cromosoma 6p21 (Current Biology, Ltd. Garland Publishing, 1997).

Los distintos alelos del sistema HLA se heredan en bloque, como una unidad, denominada haplotipo. El genotipo HLA esta formado por la suma del haplotipo del padre y de la madre. Ambos haplotipos son codominantes, es decir, cada progenitor expresa fenotípicamente ambos haplotipos y transmite, de forma mendelina, uno u otro al hijo, de manera que cada progenitor y cada hijo comparten 1 sólo haplotipo y existe una probabilidad del 25% de que 2 hermanos hereden haplotipos idénticos, del 50% de que hereden sólo un mismo haplotipo y del 25% que hereden los 2 haplotipos distintos. Debido al gran polimorfismo del HLA, la mayoría de la población es heterocigota para el HLA completo, aunque algunos individuos puedan ser homocigotos para 1 o más alelos. Este polimorfismo hace que resulte difícil que individuos no emparentados sean idénticos (Giphart MJ, 1991). Teóricamente, en una población en equilibrio y con procreación al azar, la identidad de los haplotipos HLA sería imposible, pero los alelos del sistema HLA no están en equilibrio, pueden combinarse con una frecuencia mayor de lo que cabría esperar si lo hicieran al azar según sus frecuencias individuales, fenómeno conocido como *desequilibrio de ligamiento* (Giphart MJ, 1991), por lo que es posible encontrar haplotipos idénticos o similares en poblaciones exogámicas.

Las moléculas HLA son glicoproteínas de membrana que se expresan como moléculas heterodímeras con una cadena α y otra β , cada una de las cadenas α y β de las moléculas DR, DP y DQ están codificadas por los genes de la región Clase II A y B (Sollid LM, 1993; McCluskey, 1999).

El sistema HLA es altamente polimórfico, es decir un gen tiene múltiples variaciones alélicas. La alta variabilidad de las moléculas HLA clase II había sido determinada fenotípicamente mediante serología (Van Leeuwen, 1973; Ceppellini R, 1974) y cultivo de linfocitos mixtos (van Rood, 1975), pero en la actualidad, las técnicas de biología molecular, sobre todo las derivadas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han hecho posible la genotipificación con un alto grado de definición del polimorfismo genético.

La PCR fue descubierta en 1985 (Saiki RK, 1986; Mullis K, 1992) y permite amplificar el ADN para después analizarlo. Esta técnica consta de 3 fases (desnaturalización del DNA, replicación y extensión). Emplea 2 cebadores (nucleótidos de secuencia conocida) que hibridan en dos zonas conocidas de ADN, una de cada cadena, acotando la región a amplificar. La polimerasa de ADN se une a dichos cebadores y comienza a generar una cadena complementaria de cada hebra de ADN, utilizando los nucleótidos que conforman el ADN (adenina: dATP, guanina: dGTP, citosina: dCTP y timina: dTTP). Se irán generando las copias de la secuencia y tras 20-30 ciclos se habrá producido la cantidad de ADN deseada.

La genotipificación puede realizarse por una PCR simple o específica, con cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) o mediante PCR genérica seguida de hibridación por sondas-oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO). Con la primera en un solo paso se pueden determinar los alelos presentes en una muestra. Descrita por Olerup y Zetterstqui (Olerup O. & Zetterquist H, 1992; Olerup O, 1993). La posterior visualización de los productos de amplificación sobre gel de agarosa, mediante electroforesis, permite comprobar la ausencia o presencia de un determinado alelo o grupo de alelos. La genotipificación por sondas (PCR-SSO) fue descrita por Buyse (Buyse I, 1993). Consiste en una PCR genérica que utiliza dos cebadores dirigidos a una región conservada del fragmento de ADN de interés. La discriminación entre alelos tiene lugar en un paso posterior, en el que el producto de la amplificación se enfrenta a una batería de sondas específicas de secuencia, hibridando sólo aquella específica del alelo contenido en el locus. El revelado se puede realiza por colorimetría, quimioluminiscencia o radiografía.

Mediante PCR se ha podido definir las múltiples especificidades de las moléculas clase II.

Locus DR:

Gen A (DRA)

Genes B (DRB1, DRB2, DRB3, DRB4, DRB5, DRB6). Los alelos DRB2 y DRB6 son Pseudogénes y por tanto no funcionantes.

Locus DQ y DP:

Gen A (DQA1 y DPA1)

Genes B (DQB1 y DPB1)

Pseudogenes: DQA2; DQB2 y DPA2; DPB2

La nomenclatura de los alelos genotipados (Schreuder GM, WHO-HLA Nomenclature Committee, 2005) mantiene la denominación de los grupos tipificados por serología, añadiendo la denominación de los alelos especificados por PCR.

- **LOCUS DR**: Tablas 3 y 4

Gen A: es monomorfo y no presenta variabilidad

Los genes B1: los alelos se designarán con el grupo serológico y 4 cifras las 2 primeras de la denominación serológica y las otras 2 correspondientes a la denominación por tipificación.

- **LOCUS DQ**: Son activos los genes A1 y B1. La nomenclatura es igual que para los DR, con la diferencia que DQA no había sido descrita por serología (Tabla 5).

Tabla 3- Locus DRB1

GRUPO SEROLÓGICO	ALELOS
DR1	DRB1* 0101-0105
DR103	DRB1*0103
DR2 (DR15-DR16)	DRB1*1501-1508 DRB1*1601-1608
DR3 (DR17)	DRB1*0301-0312
DR5 (DR11 y DR12)	DRB1*1101-1134 DRB1*1201-1205
DR6 (DR13 y DR14)	DRB1*1301-1334 DRB1*1401-1431
DR7	DRB1*0701-0704
DR8	DRB1*0801- 0821
DR9	DRB1*0901
DR10	DRB1* 1001

Tabla 4-Locus DRB3/ DRB4/ DRB5

Grupo serológico	ALELOS	Se asocian con:
DR52	DRB3* 0101-0105 DRB3* 0201-0208 DRB3* 0301-0303	DRB1 (DR3, DR5 y DR6)
DR53	DRB4*0101 -0105 DRB4* 0201N (alelo Nulo) DRB4* 0301N (alelo Nulo)	DRB1 (DR4, DR7 y DR9)
DR51	DRB5*0101-0109 DRB5* 0202-0204	DRB2

Tabla 5. Locus DQ

GRUPO SEROLÓGICO	ALELOS
-	DQA1*0101-0105
-	DQA1*0201
-	DQA1*0301-0304
-	DQA1* 0401
-	DQA1*0501-0505
-	DQA1*0601
DQ5 (1)	DQB1*0501-0504
DQ6 (1)	DQB1*0601-0615
DQ2	DQB1*0201-0203
DQ3	DQB1*0301-0308
DQ4	DQB1*0401-0402

Estas moléculas del sistema HLA se expresan en la superficie de los linfocitos B y de otras células presentadoras de antígeno; se unen a fragmentos de péptidos de proteínas antigénicas procesadas y las presentan a los linfocitos T. En la EC las células T reconocen a los péptidos de gliadina sólo si estos están presentados por las moléculas HLA de clase II unidas a la célula presentadora de antígeno. Los linfocitos T-helper que reconocen a los péptidos del gluten son portadores de moléculas DQ2 y/o DQ8 y pueden ser aislados en las biopsias de pacientes con EC. La gliadina es deamidada por la TGt (se convierte la glutamina en ácido glutámico) resultando de esta modificación una respuesta inmune específica a través de los linfocitos T que expresan un receptor constituido por las cadenas α/β . Otros linfocitos (T y B) son posteriormente activados generando citoquinas y produciendo daño tisular en la mucosa intestinal. Otra consecuencia es la activación de células plasmáticas con la producción de anticuerpos (Sollid LM, 2000). Aunque se ha establecido una clara influencia del sistema HLA, a través de distintos alelos específicos, en la predisposición a padecer la enfermedad celíaca, los estudios realizados en familias de pacientes celíacos indican que otros genes no HLA podrían contribuir incluso de una forma mayor que los genes HLA en la susceptibilidad genética para la enfermedad. Recientemente existen indicios de que otras regiones localizadas en la misma región HLA y en otras regiones del genoma, podrían jugar un

papel importante en la susceptibilidad para la enfermedad celíaca.

1.6.2.- LOCUS CTLA-4

En la región CELIAC 3, en el cromosoma 2q33 se localizan los genes CD28, CTLA4 e ICOS, implicados en la activación de los linfocitos (Amundsen SS, 2004).

Las últimas publicaciones que han hecho otros autores sobre diferentes regiones genómicas que pudieran estar asociadas con la enfermedad se han descrito resultados dispares en estudio del gen CTLA4; encontrando asociación con la enfermedad celíaca en poblaciones como la inglesa (King AL, 2003), finlandesa (Holopainen P, 1999), noruega (Naluai AT, 2000), sueca y francesa, pero no en la italiana ni en la tunecina (Clot F, 1999). Este gen está asociado a otras enfermedades autoinmunes como la DMID, enfermedad de Addison y tiroiditis autoinmune. Su asociación o no con la enfermedad celíaca en la población española no ha sido estudiada, aunque si se ha estudiado en la población vasca no encontrando asociación (Martín-Pagola A, 2003).

Este locus codifica para una molécula de superficie de linfocitos T cuya unión con la molécula B7 de superficie de células presentadoras de antígeno daría lugar a una señal inhibidora de la célula T que podría mediar su apoptosis y de esta forma frenar una respuesta inmunológica excesiva.

2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

La enfermedad celíaca tiene un origen multifactorial y poligénico, por lo que se puede clasificar como una enfermedad de herencia compleja. El complejo mayor de histocompatibilidad, HLA, es el factor genético de susceptibilidad más importante en la EC; no obstante, los estudios basados en afectación de parejas de hermanos ("sibpairs") sugieren que hay otros genes de susceptibilidad para la EC, medido mediante el cociente λ_s , al igual que ocurre para otras enfermedades comunes como es el caso de la diabetes tipo I. Este parámetro mide la relación existente entre el riesgo de los hermanos del paciente probando de desarrollar la enfermedad comparado con la prevalencia en la población general. El valor del mismo calculado para la EC es de 30-60, el cual es muy alto comparado con otras enfermedades multifactoriales como la diabetes mellitus tipo 1, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple. La fuerte influencia genética que se postula está reforzada por la alta tasa de concordancia, 70%, entre gemelos monozigotos. La agregación en fratrias atribuible al complejo HLA se ha estimado en un valor de λ_s 2,3-5,5. Asumiendo estas estimaciones y un modelo aditivo de genes de susceptibilidad para la enfermedad, se calcula que la importancia de los loci no-HLA es mayor que la de los genes HLA. Los datos disponibles hasta el momento procedentes del análisis genético en distintas poblaciones europeas no han mostrado la existencia de ningún

locus definitivo a excepción de HLA, si bien se han postulado diversos loci candidatos. En este contexto, y asumiendo que los distintos genes tengan distinta influencia en las diferentes poblaciones, nos planteamos la hipótesis de que la etiopatogenia de la EC en la población española está influida por diversos genes, HLA y no-HLA.

3.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es investigar la variabilidad genética de la enfermedad celíaca en la población española y buscar aquellos factores genéticos implicados en la inmunorespuesta anormal al gluten y la variabilidad en cuanto a la expresión clínica de la enfermedad.

Para ello nos proponemos realizar una serie de objetivos secundarios que se detallan a continuación:

3.1.-COLECCIONAR MUESTRAS DE DNA DE FAMILIAS CON ENFERMEDAD CELÍACA.

El primer objetivo es coleccionar un número suficiente de muestras de DNA de familias en las que hay uno (familias simples) o más enfermos (familias múltiples), incluyendo a los progenitores. En una primera instancia se trabajaría con las familias controladas en la Sección de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del H.U. La Fe. Se pretende alcanzar una serie de 125-130 familias simples y 15-20 familias múltiples. Posteriormente se contará con la colaboración de otros centros como el Hospital General Universitario de Valencia, el Hospital Lluís Alcanyis de Játiva y el H. Francisco de Borja de Gandia.

Se determinará las relaciones genotipo-fenotipo, incluyendo datos clínicos y serológicos relativos a la presencia de anticuerpos anti-gliadina y anti-transglutaminasa tisular.

3.2.- CLASIFICAR LA SERIE SEGÚN EL ESTATUS HLA DE LOS PACIENTES.

Clasificación del material familiar en DQ2 positivos y DQ2

negativos.

3.3.- ESTUDIO EXHAUSTIVO DE LOS HAPLOTIPOS HLA Y SU ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD CELIACA.

Valoración de la posible asociación entre la sensibilización al gluten y los genes HLA. Valoración del riesgo relativo, equilibrio de ligamiento, efecto sinérgico y valor predictivo.

3.4.- INVESTIGAR EL PAPEL QUE PUEDAN JUGAR OTROS LOCI GENÉTICOS EN LA ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.

Análisis de ligamiento y de asociación de genes candidatos seleccionados y de regiones genómicas localizados en áreas distintas del complejo HLA. Inicialmente, se considerará como loci candidato el gen CTLA4/CD28, que se ha postulado como un gen de susceptibilidad a la EC.

4.- TIPO DE DISEÑO

Se realizará un estudio analítico longitudinal observacional (casos control), con una parte retrospectiva y otra prospectiva.

En la parte analítica, se evalúa una presunta relación entre los determinados factores genéticos y el desarrollo de la enfermedad.

Es un estudio observacional, dado que el factor de estudio no es asignado por los investigadores sino que estos se limitan a observar, medir y analizar determinadas variables sin ejercer un control directo de la intervención, tipo casos control. Los casos son los pacientes diagnosticados de enfermedad celíaca y los controles son sujetos sanos donantes de médula ósea o adultos voluntarios sanos.

En una primera instancia se trabajaría con las familias controladas en la Sección de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del H.U. La Fe. Se pretende alcanzar una serie de 125-130 familias simples y 15-20 familias múltiples.

Se determinará las relaciones genotipo-fenotipo, incluyendo datos clínicos y serológicos relativos a la presencia de anticuerpos anti-gliadina y anti-transglutaminasa tisular.

Posteriormente se clasificará el material familiar en DQ2 positivos y DQ2 negativos. En algunos pacientes estos datos ya obtenidos previamente, se recuperaran a partir de las historias clínicas.

Análisis genético de genes y loci de susceptibilidad para la enfermedad celíaca en la población española.

5.- LUGAR DE EJECUCIÓN:

S. Gastroenterología Pediátrica H. La Fe. (Dra. Ribes-Koninckx)

Centro de Trasfusiones de la Comunidad Valenciana.

Laboratorio de Genética y Medicina Molecular del Instituto de
Biomedicina de Valencia (Dr. Palau)

6.- MATERIAL Y MÉTODOS:

6.1.-SUJETOS DE ESTUDIO

6.1.1 - POBLACIÓN AFECTA:

Sujetos diagnosticados de EC, según criterios de la ESPGAN de 1989, controlados por la Sección de Gastroenterología y Hepatología Pediátrica del H.U. La Fe, el Hospital General Universitario de Valencia, el Hospital Lluís Alcanyis de Játiva y el Hospital Francesc de Borja de Gandía y sus familiares. Estos criterios incluyen la realización de una o varias biopsias intestinales y la determinación de marcadores serológicos de la enfermedad celíaca (anticuerpos antigliadina y anticuerpos antitransglutaminasa).

La información se mantendrá en una base de datos específica, garantizando el carácter confidencial de la misma.

Criterio de Inclusión: Pacientes con diagnóstico de Enfermedad Celiaca (según los criterios diagnósticos de ESPGHAN 1989), realizado dicho diagnóstico en la edad pediátrica (hasta 13 años)

El número total de individuos con EC ha sido de 194, de ellos 185 son casos probando y los 9 restantes hermanos de los mismos.

Se dividen en 45 casos aislados y 140 familias de ellas:

- 42 son tríos (caso índice - padre- madre)
- 83 son familias compuestas por caso índice, padre, madre y hermano/s

- 6 son familias compuestas por caso índice, un progenitor y hermano/s
- 5 son familias compuestas por caso índice y hermano/s
- 4 progenitor e hijo afecto

El origen de la población es el siguiente:

- Hospital La Fe: 98 familias y 38 casos probando
- Hospital Francisc de Borja de Gandía: 19 familias y dos casos probando
- Hospital Luis Alcanyis de Játiva: 17 familias y 1 caso probando
- Hospital general Universitario: 6 familias y 4 casos

6.1.2. POBLACIÓN CONTROL HLA:

577 donantes de médula ósea o de cordón umbilical.

6.3. POBLACIÓN CONTROL CTLA 4

Como serie control dispusimos de 107 individuos no celíacos seleccionados aleatoriamente y 64 tríos sanos (padre, madre e hijo).

6.2.-MÉTODOS:

6.2.1.- IDENTIFICACIÓN DE FAMILIAS.

Se he realizado una revisión de enfermos y familias con el diagnóstico de Enfermedad celiaca, según criterios de la ESPGAN de 1989 (Walker-Smith JA, 1990), controlados por la Unidad de Gastroenterología Pediátrica. Estos criterios incluyen la realización de una o varias biopsias intestinales y la determinación de marcadores serológicos de la enfermedad

celíaca (anticuerpos antigliadina y anticuerpos antitransglutaminasa).

Para la obtención de un listado de pacientes, dado que en el momento de iniciar el estudio no existía una informatización de todos estos datos, en la Unidad de Gastroenterología pediátrica, se ha procedido a la revisión de:

- Ficheros manuales de pacientes con el diagnóstico de EC.
- Revisión de protocolos médicos de pacientes con EC de nuestra consulta
- Revisión de informes de biopsias intestinales.

6.2.2.- RECOGIDA DE DATOS.

Con el fin de disponer de un sistema de recogida de datos, del cual posteriormente sea posible la recuperación de información, se ha elaborado una Base de datos con el programa Open Acces de la que se detallan sus páginas principales (Anexo 1).

Se han introducido todos los datos clínicos y biológicos disponibles, a partir de la revisión de historias clínicas.

➤ Los datos clínicos recogidos han sido:

Datos de filiación: centro de origen, sexo, lugar de residencia, teléfono de contacto

Edad de inicio de síntomas y edad de diagnóstico (coincidiendo con la fecha de la biopsia)

Clínica principal motivo de consulta; dividiéndose en *Forma digestivo-nutricional*, que se manifiesta como estancamiento ponderal, diarrea, anorexia y distensión abdominal.

Formas oligosintomáticas o atípicas: talla baja, anemia ferropénica, dermatitis herpetiforme, Diabetes Mellitas insulina dependiente (DMID), etc.

➤ Datos biológicos:

En la Tabla 6 y 7 se realiza la referencia de los valores determinados, las unidades de los mismos y el rango de referencia utilizado en el Servicio de Análisis Clínico de nuestro centro.

Tabla 6. Valores de referencia de resultados analíticos.

Valor	siglas	Unidades	Rango de referencia
Hemoglobina	Hb	g/dl	11.5-14.5
Volumen Corpuscular Medio	VCM	fl	80-90
AST/GOT		UI/L	20-60
ALT/GPT		UI/L	5-45
GGT		UI/L	7-32
Proteínas totales	Prot	g/dL	6.60-8.70
Albúmina	Alb	g/dL	3.50-5.00
Hierro	Fe	µg/dL	39-147
Índice de Quick	IQ	%	70-100
Tiempo de protrombina	TP	seg	11-14
Vitamina B12		pg/ml	200-900
Ácido Fólico		µg/mL	3-17

Tabla7. Valores de referencia para las Inmunoglobulinas de clase IgA e IgG por rangos de edad.

	IgA (mg/dl)	IgG (mg/dl)
0-30 días	0-1	980-1500
1-3 meses	5-30	300-700
4-6	8-35	300-650
7-12	15-45	400-850
1-2 años	20-65	450-900
2-3 años	30-100	600-1100
3-5 años	50-110	650-1100
6-8 años	70-150	650-1200
9-11 años	70-160	650-1300
12-16 años	70-210	650-1300
Adulto	70-310	650-1400

➤ Datos serológicos:

En el suero de los pacientes se determina los marcadores serológicos para la enfermedad celiaca:

Anticuerpos antigliadina (AAG); de clase IgA, mediante un método ELISA propio casero. Los valores de referencia, expresados en unidades arbitrarias (UA) son < 0.3 UA en niños y < 0.6 UA en adultos (Ribes-Koninckx C, 1984)

Anticuerpos antitransglutaminasa tisular recombinante humana (ATGt); mediante un método ELISA comercial (Celikey® Pharmacia & Upjohn). El valor de corte es >6 UI/ml.

➤ Datos histológicos: Todos los pacientes presentaban lesión histológica compatible con EC, según los criterios de diagnóstico histológico para la enfermedad celiaca (MARSH 3) (Marsh MN, 1992)

En función del grado de atrofia vellositaria de la mucosa intestinal, se ha realizado la siguiente clasificación:

- Atrofia parcial leve y atrofia parcial severa: Marsh 3a
- Atrofia subtotal vellositaria: Marsh 3b.

➤ Datos HLA:

Los resultados obtenidos de la determinación de los alelos de los genes HLA DRB, DQB1 y DQA1 para cada paciente y sus familiares.

➤ Datos CTLA 4:

Los resultados obtenidos de la determinación de los polimorfismos +49 A/G y CT60 para cada paciente y sus familiares.

6.2.3.- RECOGIDA DE MUESTRAS DE SUERO Y ADN DE FAMILIAS CON ENFERMEDAD CELÍACA.

6.2.3.1.- Se identificaron pacientes ya controlados clínicamente y nuevos, verificando que se cumplían los criterios diagnósticos de la ESPGAN de 1989. En los familiares se verificó su estado clínico. Se realizó la determinación de marcadores serológicos en todos ellos.

6.2.3.2.- Se realizó extracción sanguínea para muestra de ADN. Esta extracción de ADN se efectuó mediante fenol/etanol, posteriormente se procedió a la codificación y almacenamiento en el banco de ADN. Se tomó muestra del caso probando, ambos progenitores, casos secundarios y de hermanos. Se obtuvo el consentimiento informado de los tutores legales (Anexo 2) aprobado por el Comité de ética de nuestro centro.

6.2.4.- RECOGIDA DE MUESTRAS DE ADN DE SUJETOS SANOS CONTROL.

Se extrajo ADN a partir de sangre periférica de sujetos sanos adultos, voluntarios, previa obtención del consentimiento informado.

La extracción de ADN a partir de sangre periférica se ha realizado siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

-Reactivos necesarios:

- EDTA
- Suero fisiológico o ClNa 0.9%
- Solución de lisis (Tris-HCl 2M, pH 7,5: 1ml; MgCl₂ 0.2M 2,5ml; H₂O cps 100ml)
- Nonidet P-40 al 0.1%.
- Proteinasa K
- Solución A (NaCl 2,5M 2ml, EDTA 0,025M-pH8 5ml, SDS 0,5% 2,5ml, H₂O cps 50ml).
- Fenol-cloroformo
- Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)

- Etanol al 70%
- TE (Tris-HCl 10mM - pH 7,5 y EDTA 1mM- pH 8.0)

- Procedimiento:

1.-Extracción de sangre periférica del sujeto en un tubo con EDTA, aproximadamente 14 cc.

2.- Lavado de la sangre con suero fisiológico (ClNa). Se añade el volumen de ClNa necesario para enrasar un tubo Falcon de 50cc. Posteriormente se centrifuga 10 minutos a 4500 rpm. Se elimina el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no eliminar el disco de leucocitos depositado en el fondo. Este proceso se realiza dos veces. En este momento se puede congelar.

3.- Lisis de glóbulos rojos.

Se añade la solución de lisis hasta 50cc, tras mezclar suavemente se centrifuga durante 15 minutos a 4500 rpm. Se decanta el sobrenadante y se procede a romper el pellet. Este proceso se realiza dos veces.

4.- Tras añadir 25 ml de Nonidet P-40 al 0.1%, se mezcla suavemente, y se centrifuga durante 15 minutos a 4500rpm. Se decanta el sobrenadante y se rompe el pellet (es importante que quede bien roto).

5.- Lisis con Proteinasa K. Se añade al pellet roto entre 5 y 10 ml (7,5ml) de solución A. Se agita en vortex. Se añade 20µl/ml de Proteinasa K (10mg/ml) según la proporción de 150µl para 7,5 ml de solución A.

6.- Se incuba a 56° C toda la noche.

7.- Se añade el mismo volumen de Fenol-cloroformo que de ADN (7,5 ml). Tras mezclado de la muestra centrifugamos durante 10 minutos a 4000rpm. El ADN queda en la fase acuosa que es la superior, eliminamos con una pipeta la fase inferior. Este paso se repite una segunda vez.

8.- Al volumen que queda se le añade la misma cantidad de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclándolo bien, se centrifuga 10 minutos a 4000rpm. Se elimina de nuevo la fase inferior, este paso lo repetimos una segunda vez.

9.- Para precipitar el ADN, en nuevos eppendorf de 1,5 ml se le añade a la fase superior que hemos transvasado con un volumen final de 100µl, 16µl de C1Na y etanol absoluto frío (congelador) 200µl. Se agita suavemente hasta que aparezca el ADN precipitado formando “la medusa”.

10.- Se obtiene el ADN con una pipeta y se pasa dos veces por un tubo de Etanol al 70%, disolviéndola en TE (Tris-HCl 10mM - pH 7,5 y EDTA 1mM- pH 8.0), y se deja agitándose hasta su disolución (toda la noche).

6.2.5.- DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DR Y DQ DEL SISTEMA HLA, EN LOS ENFERMOS Y FAMILIARES ASÍ COMO EN SUJETOS CONTROL SANOS.

Se han determinado los alelos de los genes HLA DRB, DQB1 y DQA1.

El análisis molecular se ha realizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando primers específicos (SSP-PCR), de acuerdo con el método descrito por Zetterquist y Olerup et al. y Olerup et al. (Olerup O. & Zetterquist H. ,1992; Olerup O., 1993). El ADN genómico se obtuvo de linfocitos de sangre periférica tras digestión con proteinasa K (Kawasaki, 1990), tal como se ha descrito en el apartado anterior.

- Cada reacción de PCR se realizó con:

Aproximadamente 60-90 ng de DNA, 0,15 U de Taq polimerasa (Sigma Chemicals, St Louis, MO) 1x PCR Master Mix (DynaL Biotech Ltd., UK o Olerup, GenoVision AS, Oslo, Norway) que contiene nucleótidos ($200\mu\text{mol L}^{-1}$ cada uno) PCR tampón (50 mmol L^{-1} KCl, $1,5\text{mmol L}^{-1}$ MgCl_2 , 10 mmol L^{-1} Tris HCl pH 8,3, 0,001% w/v gelatina), 5% glicerol y $100\mu\text{g mL}^{-1}$ rojo cresol, $0,25\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada alelo o grupo específico de pares de primers y $0,1\mu\text{mol L}^{-1}$ de un control interno positivo de pares de primers que se unen a un segmento del gen de la hormona de crecimiento humana en un volumen final de $10\mu\text{L}$. La PCR se llevó a cabo con un volumen final de $10\mu\text{l}$ en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, The Netherlands). Con una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 2 temperaturas (10seg a 94° y 60seg a 65°) y 20 ciclos de 3 temperaturas (10seg a 94°C , 50seg a 61°C y 30seg a 72°C). La detección de los alelos amplificados se realizó por electroforesis en un gel de agarosa.

Esto ha sido llevado a cabo en el Centro de transfusiones de la comunidad Valenciana (Drs. Planelles Silvestre y Montoro Alberola).

6.2.6.- ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DEL MARCADOR CTLA 4.

Nos hemos centrado en el estudio de dos marcadores genéticos de CTLA4 en los que se ha comprobado, en otras poblaciones, que realmente existe un desequilibrio de transmisión en pacientes celíacos, en el caso del primer marcador y en diabéticos, en el caso del segundo.

Estos dos marcadores son SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) que consisten en cambios de un solo nucleótido en una posición determinada del gen, que podría acarrear diferentes variaciones en la proteína para la que codifica.

El primero de ellos es el polimorfismo +49 A/G, denominado así porque se trata de un cambio (adenina - guanina) en la posición del nucleótido 49 en el exón 1 del gen CTLA4 que da lugar a un cambio de aminoácido, de alanina a treonina. Algunos estudios indican que la posesión del alelo A podría estar relacionada con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

El segundo, es el SNP que se encuentra dentro del marcador intragénico CT60 situado en la región no codificante del gen CTLA4, a 6.1 Kb del extremo 3'. Se ha comprobado que la presencia del alelo G en este SNP provoca un cambio en el *splicing* (corte y empalme) de la molécula de RNA mensajero, dando lugar a un cambio cuantitativo, es decir, que se produce

una menor cantidad de mensajero y por lo tanto de molécula CTLA4, con lo cual la función inmunomoduladora estaría atenuada y sería menos eficaz, siendo así un alelo de susceptibilidad a la enfermedad.

El estudio de los SNPs se realizó mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs).

Éstos han sido analizados con el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), digestión con enzimas de restricción que reconocen específicamente la presencia de un alelo u otro y posterior electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 12%. La detección se realizó mediante tinción de plata siguiendo el protocolo descrito por Monrós et al (Monrós E, 1994).

La PCR para amplificar el ADN genómico, se realizó en un volumen final de 25 μ L que contenía 20 ng de ADN, 4 pmol de cada cebador (directo y reverso), 2.5 nmol de cada dNTP y 1U de Taq Polimerasa.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) posibilita una alta resolución de los ácidos nucleicos de bajo peso molecular, siendo muy útil en la separación de fragmentos de ADN de tamaño inferior a 500 pb. También permite la buena resolución de los fragmentos de ADN de tamaños muy parecidos (pueden separarse fragmentos que difieren de un solo par de bases).

La técnica de RFLP se basa en la utilización de enzimas de restricción que reconocen una secuencia de ADN precisa y que tienen la capacidad de cortar el segmento de ADN a nivel de

esta secuencia. Una vez digerido por un enzima de restricción específico, puede presentar tres posibilidades de patrón, correspondiendo cada uno a uno de los genotipos posibles. En la elección del enzima que más se adecuaría al estudio de los distintos polimorfismos, utilizamos el programa Web cutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>).

Para la digestión de los productos de PCR, en los casos en los que se llevó a cabo esta técnica, se tomaron 10 µL del producto de PCR, 2.5 µL del tampón recomendado por cada casa comercial para cada enzima utilizado, 1U de enzima / muestra y la cantidad necesaria de H₂O para completar hasta un volumen final de 25 µL. Los tubos que contenían la digestión se incubaron a la temperatura óptima señalada para cada enzima durante 4-24 horas.

1. Polimorfismo A/G en la región 6.1 Kb 3': Primers

AC1: CTLA4-CT60 dir.5'-CAGTATCTGGTGGAGTCTCC-3'

AC2: CTLA4-CT60 rev.5'-GCAGGCGGTAAGAAAGGGG-3'

Estos primers amplifican una región del gen CTLA4 en el cromosoma 2q33 de 263 pb que abarcan el marcador CT60 para este gen. Este marcador contiene un SNP que provoca un cambio G/A que es reconocido por el enzima de restricción Mae II (o Tai I).

Éste provoca un corte a 174 pb del inicio de la secuencia amplificada, dando lugar a dos bandas en el caso de que esté presente el alelo G, una de 174 y la otra de 89 pb. Si se encuentra el alelo A, el enzima no reconocerá el sitio de corte y

sólo obtendremos una banda de 263 pb.

2. Polimorfismo +49A/G

AC3: CTLA4-49 dir. 5'-GCTCTACTTCCTGAAGACCT-3'

AC4: CTLA4-49 rev. 5'-CCAGCCAAGCCAGATTGGAG-3'

Estos primers sirven para amplificar la parte de secuencia del gen CTLA4 que contiene el dimorfismo A/G en la posición +49. La secuencia amplificada, en el caso de que contenga el nucleótido G, será reconocida por el enzima de restricción BbvI y dará lugar a 2 bandas, una de 89 pb y otra de de 174; en el caso de que la secuencia contenga el nucleótido A, no se producirá ningún corte y se obtendrá una banda de 263 pb.

6.2.7.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Valoración de los resultados clínicos, biológicos y de HLA con el programa estadístico SPSS para Windows.

Para la valoración de los resultados clínicos y biológicos se determinaron la media, el mínimo, máximo y la desviación estándar. Para la correlación de diferentes variables se utilizo el análisis de la varianza o test de ANOVA.

6.2.8.- ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE GENES HLA Y ENFERMEDAD CELIACA

La valoración de la posible asociación entre la sensibilización al gluten y los genes HLA se realizó comparando las frecuencias fenotípicas de estos genes entre el grupo de pacientes y la población control. La significación estadística de las diferencias en las frecuencias de ambos grupos se analizó mediante χ^2 a partir de tablas de 2 x 2, utilizando la prueba exacta de Fisher en

el caso de que algún valor de la tabla fuera inferior a 5. Se consideró significativo un valor de $p \leq 0.05$ (Tiwari JL, Terasaki PI, 1985).

6.2.8.1.- ANÁLISIS PARA CORREGIR LAS COMPARACIONES MÚLTIPLES

Debido a la comparación múltiple que implica el estudio de asociación entre una enfermedad y el sistema HLA y como se recomienda por Tiwari and Terasaki (Tiwari JL, Terasaki PI, 1985), se utilizó un método de corrección para identificar la presencia de una verdadera asociación de la enfermedad con un grupo génico concreto y diferenciable de la simple asociación al azar. Para ello se aplicó el método de desigualdad de Bonferroni a los valores p obtenidos en el análisis χ^2 de comparación entre las frecuencias de pacientes y controles. Por lo tanto dichos valores de p se corrigieron multiplicando por el número de alelos comparados.

6.2.8.2.- CÁLCULO DE LAS FRECUENCIAS Y ANÁLISIS DEL RIESGO RELATIVO, FACTOR ETIOLÓGICO Y DE LA FRACCIÓN PREVENTIVA.

- Las *frecuencias fenotípicas* (FF) se calcularon por conteo directo de los alelos:

$$FF = \frac{\text{suma de los alelos}}{\text{Nº de individuos}}$$

- Las *frecuencias génicas* (FG) se calcularon a partir de las frecuencias fenotípicas mediante la fórmula de Mattiuz detallada

en Duquesnoy & Tranetzki (Duquesnoy, R.J & Tranetzki M.S, 1983).

$$FG = 1 - (1 - FF)^{1/2}$$

- El *Riesgo Relativo* (RR) se calculó mediante la fórmula de Wolf o modificada por Haldane (si algún valor es igual a 0) según detallan Tiwari and Terasaki (Tiwari JL, Terasaki PI, 1985). Con un intervalo de Confianza del 95% para el Riesgo Relativo.

Gen	Nº de individuos	
	+	-
Pacientes	a	b
Controles	c	d

Fórmula de WOLF:

$$RR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Modificada por HALDANE:

$$RR = \frac{(2a + 1) \times (2d + 1)}{(2b + 1) \times (2c + 1)}$$

- Para los alelos con las frecuencias significativamente aumentadas respecto al grupo control, cuando $RR > 1$, se calculó

la *Fracción Etiológica* (FE), según la fórmula de Hu et al (Hu CHY, 1993).

$$FE = \frac{FF \times (RR - 1)}{(1 + FF)(RR - 1)}$$

- Para los alelos con las frecuencias significativamente disminuidas respecto al grupo control, cuando $RR < 1$, se calculó la *Fracción Preventiva* (FP), según la fórmula de Hu et al (Hu CHY, 1993).

$$FP = FF(1 - RR)$$

6.2.8.3.- CÁLCULO DEL DESEQUILIBRIO DE LA UNIÓN (Δ) Y DE LAS FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS:

Para ello se aplicó la fórmula de Mattiuz, detallada por Duquesnoy & Tranetzki (Duquesnoy R.J & Tranetzki M.S, 1983)

$$\Delta = [(1 - FFa - FFb + FFab)]^{1/2} - [(1 - FFa)(1 - FFb)]^{1/2}$$

FFa: frecuencia fenotípica del alelo a
FFb: frecuencia fenotípica del alelo b
FFab: frecuencia fenotípica del haplotipo

Para calcular la frecuencia génica del haplotipo, es necesario conocer en valor de Δ

$$FG \text{ del Haplotipo} = FGa + FGb + \Delta$$

FG del haplotipo: es la frecuencia génica del haplotipo
FGa: frecuencia génica del alelo a
FGb: frecuencia génica del alelo b
 Δ : Desequilibrio de la unión

6.2.8.4.- ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN COMBINADA.

Cuando alelos de 2 o más loci en desequilibrio de unión aparecen asociados con la enfermedad se aplica un análisis de asociación combinada para valorar si la asociación se daba primariamente con un alelo y la observada con el otro era debida sólo al desequilibrio de la unión del segundo alelo con el primero. Dicha prueba se realizó según el método descrito por Svejgaard & Ryder (Svejgaard A, 1994). En este análisis se valora la asociación del segundo alelo en ausencia y en presencia del primero. El riesgo relativo fue calculado utilizando la fórmula de Woolf o la modificada por Haldane, la significación estadística se mide mediante una prueba de χ^2 o F de Fisher y el valor correspondiente a p se corrige por el número de comparaciones realizadas.

6.2.8.5.- ANÁLISIS DE LA TENDENCIA A LA RECESIVIDAD DE LOS GENES ASOCIADOS:

Para estudiar el posible carácter recesivo del gen asociado, el número observado de pacientes homocigotos a dicho gen fue comparado, mediante una prueba de χ^2 , con el número esperado, obtenido a partir de su frecuencia génica.

$\text{N}^\circ \text{ de homocigotos esperado} = FG a^2 \times N$
--

FGa: es la frecuencia génica del alelo a
N es el número de individuos totales

6.2.8.6.- EFECTO SINÉRGICO:

Valoración del riesgo conferido por la asociación de dos haplotipos frente al doble de la dosis de un haplotipo en

homocigosis.

El riesgo relativo fue calculado utilizando la fórmula de Woolf o la modificada por Haldane, la significación estadística se mide mediante una prueba de χ^2 o F de Fisher.

6.2.8.7.- VALOR DEL TIPAJE HLA:

Se evaluó el valor del tipaje HLA para el diagnóstico de la EC según el método descrito por Tiwari and Terasaki (Tiwari JL. 1985), calculando las frecuencias de “falsos positivos” y “falsos negativos” para los alelos o grupos de alelos en los que se había encontrado asociación con la enfermedad, siendo:

$$pA+ = [(1-FN) \times Pp] / \{[(1-FN) \times Pp] + [FP \times (1-Pp)]\}$$
$$pA- = [FN \times Pp] / \{(FN \times Pp) + 1-FP) \times (1-Pp)\}$$

A es el alelo asociado a la EC

pA+ es la probabilidad de que un paciente con EC sea positivo para A

pA- es la probabilidad de que un paciente con EC sea negativo para A

FN es la frecuencia de falsos negativos (1- frecuencia de A en los pacientes)

FP es la frecuencia de falsos positivos (frecuencia de A en los controles)

Pp es la probabilidad previa de EC (la probabilidad de que un paciente tenga la enfermedad previa al tipaje HLA)

6.2.8.8.- RIESGO DE RECURRENCIA EN FAMILIARES:

El Riesgo de Recurrencia en Familiares, que es el riesgo de que un hermano de un caso índice pueda desarrollar EC.

$$RRF = \text{casos de hermanos con EC} / \text{total hermanos}$$

6.2.9.-ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE MARCADOR CTLA 4 Y ENFERMEDAD CELIACA

Los estudios de asociación se realizan principalmente a partir de marcadores moleculares SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) que son polimorfismos en un solo nucleótido en la secuencia de un gen. Cambios en dicho nucleótido pueden suponer cambios en la molécula codificada por el gen que contiene el nucleótido de tal manera que la función de esta molécula puede ser diferente y de esta manera estar implicada en el desarrollo de la enfermedad.

Existen diversas formas de llevar a cabo el estudio de asociación entre un determinado locus y una enfermedad compleja:

1. ESTUDIO CASO-CONTROL:

Comparación de dos grupos, por un lado individuos afectados no emparentados y por otro, controles sanos no emparentados, mediante un estadístico como la χ^2 de Pearson. Se basa en la comparación de las frecuencias obtenidas con las frecuencias esperadas, considerando como Hipótesis Nula (H_0) que la distribución en las frecuencias de los genotipos entre los dos grupos de individuos es la misma.

2. TDT:

Para el estudio familiar se utiliza el *Transmisión Disequilibrium Test* (TDT) que es un test estadístico robusto y muy fiable, que se basa en la probabilidad de que un alelo de un determinado locus se transmita con mayor frecuencia por parte de los padres a un hijo enfermo que a su hermano sano. Es un test exigente

debido a la restricción con la que se pueden emplear los datos disponibles y es más fiable cuanto mayor es el número de familias disponible para el estudio (Spilman RS, 1993).

7.- RESULTADOS

7.1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN CELIACA ESTUDIADA

7.1.1.- DISTRIBUCIÓN POR SEXO.

La prevalencia en nuestra serie es mayor en mujeres. En una proporción 1.8/1, siendo casi el doble de mujeres que de hombres, con un total de 120 mujeres y 65 varones.

7.1.2.- EDAD DE INICIO DE SÍNTOMAS Y EDAD DEL DIAGNÓSTICO.

En la Tabla 8 se muestra la media de inicio de los síntomas y de diagnóstico, trascurriendo una media de 10 meses entre el debut y la fecha de realización de la biopsia. Sin embargo este dato debe ser considerado con cautela por haber sido obtenido con carácter retrospectivo y estar por ello sometido al sesgo de la memoria de los padres; este inconveniente es sin lugar a dudas todavía mayor en los pacientes de edad mayor y/o con formas clínicas atípicas o poco sintomáticas, en los que es difícil establecer con fiabilidad y rigor el momento de inicio de la enfermedad. No se ha incluido aquellos pacientes asintomáticos en los que conocer el momento de inicio de la enfermedad no es posible. Destaca que la mayoría debutó a una edad precoz, un 71 % de los pacientes tenían una edad inferior a los 3 años en el momento del diagnóstico.

7.1.3 FORMAS DE PRESENTACIÓN:

Existen dos grandes grupos en cuanto a la forma de presentación los que presentaron una sintomatología clásica, es decir digestiva nutricional (desmedro, diarrea, distensión abdominal) y aquellos con otras formas atípicas u oligosintomáticas como se especifica en la tabla 9

Tabla 8. Edad de inicio de síntomas y de diagnóstico (en meses)

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Edad de inicio de síntomas	165	6,00	132,0	27,52	28,54
Edad de diagnóstico	176	8,00	160,0	37,09	33,02

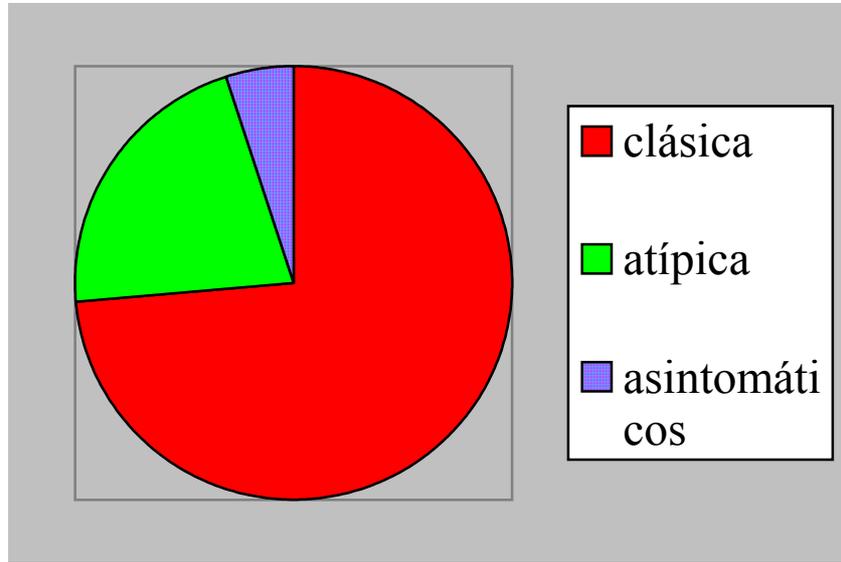
Tabla 9.- Formas clínicas de presentación.

FORMAS	N	%
Digestiva-Nutricional	136	73.5
Asintomático	9	4.9
Familiar de EC	3	1.6
Diabetes Mellitus	6	3.3
Oligosintomáticas	40	21.6
Anemia Refractaria	11	6
Talla Corta	8	4.3
Distensión Abdominal	5	2.7
Dermatitis Herpetiforme	4	2.2
Dolor Abdominal	2	1.1
Síndrome de Down	2	1.1
Estreñimiento	2	1.1
Artritis Reumatoide	2	1.1
Hipoparatiroidismo	1	0.5
Hipertransaminasemia	1	0.5
Alopecia	1	0.5
Enfermedad de Crohn	1	0.5

La mayoría de nuestros pacientes, i.e.136 casos que corresponden al 73.5% de la población estudiada, debutaron con una forma clásica o digestiva con diarrea, crónica, distensión abdominal y afectación nutricional. Solo 40 niños, lo que supone el 21.6%, presentaron una forma atípica u

oligosintomática y 9 fueron diagnosticados por despistaje de la enfermedad (4.9%), como queda reflejado en el Grafico 1.

Gráfico 1: Distribución de la muestra en porcentajes según forma de presentación clínica.



De la forma de presentación clásica, es decir con afectación nutricional y diarrea la edad media de inicio de los síntomas fue de 18,68 meses (DE 19,35) y de diagnóstico de 27,00 meses (DE 23,75).

Para las formas atípicas la edad media de inicio de los síntomas, en los casos en los que esto fue posible, ya que la edad de debut en ocasiones fue difícil de concretar, como en el caso de talla corta, fue de 55,1 meses (DE 34, 6) y de diagnóstico de 65.58 meses (DE 38,75).

El tiempo medio de retraso en el diagnóstico para la población estudiada fue de aproximadamente 10 meses, resultados que se

mantiene al analizar por separado los pacientes con formas clásicas y aquellos con formas atípicas.

7.2.- CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN CELIACA ESTUDIADA.

7.2.1.- DATOS BIOLÓGICOS

A todos los pacientes se les practicó la determinación de una serie de parámetros biológicos, previos a la realización de la biopsia intestinal (tabla 10).

Tabla 10. Resultados biológicos obtenidos en nuestra muestra.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Hb	159	7,0	14,5	11,807	1,290
VCM	99	58.3	93.3	78,6	6.3
GOT	149	16	420	49,97	34,88
GPT	149	3	147	37,96	16,88
GGT	75	4	77	13,71	11,96
Prot	140	3,6	8,0	6,281	0,707
Alb	133	2,2	5,1	3,994	0,517
Fe	138	3	165	47,84	31.86
B12	47	70	6690	890,28	1214,06
AcF	49	0,30	20	4,9	4,5
TP	86	9.7	38	15.56	7.66
IQ	97	31	115	93.44	13.58

Si analizamos por separado cada uno de estos parámetros biológicos observamos:

➤ En cuanto a la hemoglobina: aunque la anemia ferropénica fue motivo de consulta y síntoma princeps para el diagnóstico de EC en 11 casos (6%), la media de la muestra permanece dentro del rango de referencia, si bien 53 pacientes presentaron un valor de hemoglobina inferior a 11.5g/dl al diagnóstico. De los 11 casos en los que fue motivo de consulta, la Hb media fue de 10.6 g/dl y el valor mínimo de 9.3 g/dl. El paciente que presentó el valor de Hb más bajo que fue de 7 g/dl y consultaba, sin embargo, por sintomatología digestivo-nutricional.

Sin embargo aunque el valor medio de la sideremia permanecía dentro de los límites, en 65 casos (35%) este resultado se encontraba por debajo de los mismos, con un rango de 3 a 38,1 µg/dL y una media de 23.8.

➤ En la valoración de las transaminasas, se observa que la hipertransaminasemia fue la causa de sospecha y estudio de EC en una única paciente, con valores de GOT/AST de 89 UI/L y GPT/ALT 149 UI/L.

Del resto, 22 pacientes presentaban un valor por encima del valor de referencia para la GOT/AST, siendo el máximo 420 UI/L y la media de 92UI/L, 38 pacientes presentaban GPT/ALT por encima de rango con un máximo de 147 UI/L y una media de 58 UI/L. La GGT en 6 casos estaba por encima de rango con

un máximo de 77 UI/L y media 47.5 UI/L. El paciente que presentaba GOT de 428 UI/L consultaba por clínica de diarrea, distensión abdominal y pérdida de peso y la GPT/ALT era de 52 UI/ML.

No se realizó biopsia hepática, siendo la evolución favorable con descenso progresivo de los valores de AST y ALT hasta su normalización tras instaurar una dieta exenta de gluten.

➤ El valor medio de las proteínas totales fue inferior al rango de referencia, presentando 87 pacientes (47%) una cifra inferior a 6.6 g/dL. Si bien la albúmina, como marcador nutricional más específico permaneció dentro de rango, ya que únicamente en 23 (12,4%) casos esta fue inferior a 3.5 d/dL.

➤ En el estudio de las pruebas de coagulación 7 pacientes presentaban alteraciones en las mismas (mínimo IQ 35, media 52,7) sin embargo, en ningún caso fue motivo de consulta. En todos ellos la alteración revirtió tras la administración de vitamina K parenteral. Todos los pacientes tenían edades comprendidas entre los 11 y 15 meses al diagnóstico, con un tiempo de evolución clínica de entre 1 a 3 meses; excepto un caso de un niño de 12 años que refería clínica digestiva desde los 7 años.

➤ Únicamente una paciente presentaba déficit selectivo de IgA (Ig A serica 0 mg/dL).

7.2.2.-DATOS SEROLÓGICOS

En la tabla 11 mostramos los resultados de los marcadores serológicos de EC, de aquellos pacientes en los que

determinación se realizó en el mismo laboratorio o con técnicas de determinación similares. Los valores de referencia para los anticuerpos antigliadina eran de $< 0.3\text{UA}$, siendo el límite de detección de 3 UA , en cuanto a los anticuerpos antitransglutaminasa el rango es $<6\text{UI/ml}$ con una detección máxima de 200UI/ml .

El valor medio tanto para AAG como para ATGt fue superior a los valores de referencia para cada uno de los dos marcadores.

Todos los pacientes presentaban alguno de los dos marcadores positivo, excepto la paciente con déficit de IgA que no se incluye en la tabla por haberse realizado la determinación en otro centro, de los pacientes con algún marcador negativo, 4 presentaron negativos los AAG y 9 los ATGt.

El valor de la media en lo referente a marcadores serológicos debe observarse desde un punto de vista relativo ya que en parte depende del valor máximo de detección de cada uno de estos anticuerpos.

Tabla 11. Valor de los marcadores serológicos (AAG y ATGt) al diagnóstico.

	N	Mínimo	Máximo*	Media	Desviación estándar
AAG	170	0	3	1.68	0.97
ATGt	114	0	200	115.51	72.77

*límite superior de detección.

➤ Si dividimos en 2 los **grupos de edad** (menores y mayores de 3 años) con comportamiento serológico diferenciado, observamos que la correlación entre ellos es la que se muestra en la tabla 12. Existen diferencias discretamente significativas para los AAG frente a los ATGt en el grupo de menores de 3 años, ya que este marcador presenta un valor medio mayor en este grupo de edad. En la Tabla 13 se pueden observar aquellos pacientes con marcadores serológicos negativos, según grupos de edad, si excluimos la paciente con déficit de IgA, destaca que en 6 pacientes pequeños (menores de 3 años) los ATGt eran negativos.

Tabla 12. Pacientes con algún marcador serológico negativo según rango de edad.

	<3 años	>3 años
AAG negativos	0	3
ATGt negativos	6	2

* Se excluye el déficit de IgA

Tabla 13. Relación entre la edad del paciente y los valores de los marcadores serológicos.

	<3a		>3a		Análisis Varianza
	media	DE	media	DE	p
AAG	1.79	0.94	1.35	0.96	0.010
ATGt	123.12	75.10	96.002	63.39	0.073

➤ Las diferencias entre la forma **de presentación** (clásica versus no clásica) y la presencia de anticuerpos la vemos reflejada en la tabla 14. Observamos que en los pacientes con forma de presentación clásica la positividad para los AAG es estadísticamente significativa si la comparamos con el grupo de pacientes con formas oligosintomáticas. Sin embargo no existen diferencias para los ATGt.

Tabla 14. Resultados de AAG y ATGt según forma de presentación.

	Clínica típica			Clínica atípica			Análisis Varianza
	n	media	DE	n	media	DE	p
AAG	125	1,83	0.96	45	1.25	0.84	0.001
ATGt	82	121,08	74.8	31	104.44	64.78	NS

7.2.3-DATOS HISTOLÓGICOS:

Todos los pacientes presentaban un grado de lesión 3 de Marsh. Tanto en nuestro centro como en los que han colaborado se ha utilizado clásicamente una descripción del grado de atrofia en parcial leve y moderada; tras revisar la descripción histológica se ha traducido el grado de lesión utilizando la clasificación de Marsh. Un 78.3% de los sujetos (145/185) presentaban un grado de atrofia 3b de Marsh. Si relacionamos la **forma clínica** de presentación con el grado de atrofia, no observamos diferencias significativas entre la lesión histológica y las manifestaciones clínicas (tabla 15).

Tabla 15. Relación entre forma de presentación y lesión histológica.

	M3a N=40 (21.7%)	M3b N=145 (78,3%)	p
CLINICA TÍPICA	28 (70%)	108 (74%)	NS
CLINICA ATÍPICA	12 (30%)	37 (26%)	NS

- Si relacionamos la presencia de los distintos **marcadores serológicos** con el grado de atrofia (tabla 16) observamos que a mayor grado de lesión mayor es el valor de ambos marcadores aunque únicamente es estadísticamente significativo para los AAG. Pero si analizamos el grado de lesión en aquellos pacientes con ATGt >200, observamos que el 84.8% tienen un grado 3b de Marsh.

Tabla 16. Relación entre marcadores serológicos y lesión histológica (media y DE)

	M3a	M3b	p
AAG	1.26 (0.85)	1.8 (0.96)	0.001
ATGt	98.4(69.4)	123.05 (72.6)	0.11

7.2.4-PACIENTES CON ALGÚN MARCADOR SEROLOGICO NEGATIVO

Si bien todos los pacientes, tenían al diagnóstico valores elevados tanto para AAG IgA como para ATGt IgA, un número reducido de pacientes presentaba un solo marcador positivo.

A continuación se describen los pacientes que presentan algún marcador serológico negativo:

➤ Pacientes con AAG negativos:

En 4 pacientes los valores de AAG resultaron inferiores al valor de referencia, siendo la clínica la que a continuación se detalla:

Caso 1: niña con déficit de IgA. No se realizó determinación de TGt. Presentaba el haplotipo HLA asociado a la EC DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

Caso 2: varón con Dermatitis herpetiforme, que se diagnosticó a los 11 años. Los AAG eran negativos mientras que los ATGt eran de 99UI/ml, en el estudio histológico se observaba una lesión Marsh 3a. Era portador del haplotipo HLA asociado a la EC DRB1*03- DQB1*0201-DQA1*0501.

Caso 3: niña de 10 años, con hipertransaminasemia, Marsh 3b y haplotipo HLA DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501 en homocigosis. Los ATGt eran de 200UI/ml.

Caso 4: Niña de 3 años con clínica digestiva nutricional, con estudio histológico con lesión Marsh 3b, que presentaba AAG negativos y ATGt positivos, estudio HLA DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 en homocigosis. Posteriormente, en

la provocación con gluten a la edad de 6 años, si que presentó positividad para ambos marcadores.

Si excluimos el caso de déficit de IgA ello supone 3/169 i.e. 1.7%, siendo los 3 casos niños mayores de 3 años.

➤ Pacientes con ATGt negativos:

En 9 niños la determinación de los anticuerpos antitransglutaminasa fue negativa. Si excluimos el caso de déficit de IgA supone 8 /113 i.e. 7.7%. De estos 6 pacientes eran menores de 3 años con forma clínica de presentación clásica; 2 eran niños mayores con 6 y 12 años respectivamente, 1 con forma clínica digestiva y otro con anemia.

Caso 1: Varón de 2 años y 5 meses de edad, con clínica clásica, lesión marsh 3a y como único marcador los AAG positivos. En el estudio HLA presentaba el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 junto con otro.

Caso 2: Niña con Sd. Down y clínica digestivo-nutricional en la que se realizó biopsia intestinal a la edad de 11 meses. El estudio histológico correspondía a Marsh 3b. Los AAG eran positivos, así como los anticuerpos antiendomisio. En el estudio HLA no presenta ninguno de los haplotipos asociados a la EC, aunque sí el alelo DQA1*0505.

Caso 3: Niña de 11 m con clínica digestivo-nutricional. El estudio histológico correspondía a Marsh 3b. Estudio HLA DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

Caso 4: Niña de 2 años y 3 meses, con clínica clásica, Marsh 3b y estudio HLA DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501 en

homocigosis. Presentaba AAG positivos, ATGt negativos y antiendomiso positivos.

Caso 5: Niña de 11 m con clínica digestivo-nutricional. El estudio histológico correspondía a Marsh 3b. Estudio HLA DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

Caso 6: Niña de 2 años y 10m con clínica digestivo-nutricional. El estudio histológico correspondía a una Marsh 3a. Estudio HLA DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

Caso 7: niño de 6 años con clínica digestivo-nutricional. El estudio histológico correspondía a Marsh 3b. Estudio HLA DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

Caso 8: niña de 12 años, con clínica de anemia refractaria al tratamiento, con AAG de 0,5UA y anticuerpos antiendomiso positivos. Presentaba Marsh 3b y estudio HLA DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501.

Caso 9: niño con Sd. De Down, familiar de EC (abuela), que a nivel histológico presentaba una lesión tipo Marsh 3a y estudio HLA DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03.

7.3.- ESTUDIO HLA EN PACIENTES

7.3.1.- FRECUENCIAS ALELICAS. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CONTROL

Tras realizar el tipaje de los alelos, se calcularon las frecuencias fenotípicas de los alelos DRB, DQB1 y DQA1 y se compararon estadísticamente mediante la prueba de chi-cuadrado o F de Fisher con las obtenidas en el grupo control

Se aplicó el método de desigualdad de Bonferroni a los valores p obtenidos en el análisis χ^2 de comparación entre las frecuencias de pacientes y controles para identificar la presencia de una verdadera asociación de la enfermedad con un grupo génico concreto y diferenciarla de la simple asociación al azar, multiplicando este valor p por el número de alelos (15 en el caso de DRB1, 8 en DQB1, y 13 en los DQA1). Se calculó el riesgo relativo de cada alelo con un intervalo de confianza del 95%. Tabla 17, 18 y 19.

Los alelos DRB1*03, DRB1*07, DRB3*, DQB1* 0201, DQB1* 0202, DQA1* 0201 y DQA1* 0501 presentan asociación positiva con la EC, sin embargo no encontramos asociación o incluso la presencia en casos es menor que en los controles para los alelos DRB1*04 y DQB1* 0302, siendo esta diferencia significativa.

Tabla 17. Frecuencia fenotípica y riesgo relativo de los loci DRB1 en EC comparado con población control sana.

DRB	pacientes (%)	Control (%)	pc	RR (IC 95%)
DRB1*01	5.4	20.6	0,000	0.220 (0.113-0.423)
DRB1*0103	0	2.8	NS	0.752 (0.722-0.784)
DRB1*03	71.4	20.8	0,000	9.485 (6.507-3.826)
DRB1*0302	0	0.3	NS	0.757 (0.727-0.788)
DRB1*04	7.6	23.2	0.000	0.271 (0.152-0.482)
DRB1*07	49.7	29.5	0.000	2.368 (1.687-3.325)
DRB1*08	2.2	7.1	NS	0.289 (0.102-0.818)
DRB1*09	0.5	2.1	NS	0.256 (0.033-1.981)
DRB1*10	0	2.4	NS	0.753 (0.722-0.784)
DRB1*11	28.6	24.1	NS	1.265 (0.873-1.834)
DRB1*12	0.5	1.9	NS	0.280 (0.36-2.181)
DRB1*13	10.3	24.1	0.000	0.361 (0.216-0.602)
DRB1*14	1.6	5.2	NS	0.301 (0.091-0.996)
DRB1*15	8.6	20.8	0.000	0.361 (0.208-0.625)
DRB1*16	1.1	3.5	NS	0.304 (0.070-1.315)

RR: riesgo Relativo, NS: no significativo, Pc: valor de p corregido

Tabla 18. Frecuencia fenotípica y riesgo relativo de los loci DQB1 y DQA1 en EC comparado con población control sana.

DQ	Paciente (%)	Control (%)	Pc	RR (IC)
DQB1* 0201	71.4	20.8	0.000	9.485(6.507-3.826)
DQB1* 0202	50.3	25.5	0.000	2.957(2.097-4.170)
DQB1* 0301	34.6	34.8	NS	0.989(0.699-1.401)
DQB1* 0302	6.5	18	0.000	0.315(0.169-0.588)
DQB1* 0303	1.1	6.8	0.024	0.151(0.036-0.631)
DQB1* 04	2.2	6.1	NS	0.342(0.120-0.976)
DQB1* 05	9.2	33.3	0.000	0.202(0.120-0.344)
DQB1* 06	12.4	36.2	0.000	0.250(0.156-0.399)
DQA1* 0101	5.4	22.7	0.000	0.19 (0.100-0.379)
DQA1* 0102	9.7	28.4	0.000	0.271(0.126-0.456)
DQA1* 0103	4.3	13.3	0.013	0.293(0.139-0.620)
DQA1* 0104	1.6	4.5	NS	0.349(0.105-1.168)
DQA1* 0105	0.5	2.3	NS	0.236(0.031-1.815)
DQA1* 0201	50.8	27.6	0.000	2.716(1.931-3.820)
DQA1* 0301	4.9	15.9	0.000	0.270(0.133-0.546)
DQA1* 0302	1.6	2.6	NS	0.618(0.177-2.157)
DQA1* 0303	2.7	8.1	NS	0.313(0.123-0.800)
DQA1* 0401	1.6	6.2	NS	0.248(0.075-0.814)
DQA1* 0501	71.9	20.8	0.000	9.741(6.676-14.22)
DQA1* 0505	30.3	28.1	NS	1.112(0.774-1.598)
DQA1* 0601	0.5	1.2	NS	0.443(0.054-3.621)

Pc: valor de p corregido, NS: no significativo, RR: riesgo Relativo

Tabla 19. Frecuencia fenotípica y riesgo relativo de los loci DRB3, DRB4 y DRB5 en pacientes EC comparado con población control sana.

DRB	pacientes (%)	controles (%)	pc	RR (IC 95%)
DRB3*(52)	95.1	63.8	0.00 0	11.106 (5.565-2.165)
DRB4*(53)	56.2	48.9	NS	1.343 (0.963-1.874)
DRB5*(51)	9.2	23.9	0.00 0	0.322 (0.189-0.549)

RR: riesgo Relativo, NS: no significativo, Pc: valor de p corregido

7.3.2.- FRACCIÓN ETIOLÓGICA Y FRACCIÓN PREVENTIVA.

Para los alelos que presentaron un valor de p significativo, es decir, con frecuencias significativamente aumentadas o disminuidas respecto al grupo control, se calculó la fracción etiológica y la fracción preventiva, según la fórmula de Hu et al (Hu CHY, 1993). Tabla 20. Para el loci DRB1* la fracción etiológica mayor es para el alelo DRB1*03 y para el loci DQB1* con un 71% es para DQB1* 0201.

Tabla 20. Fracción etiológica y Fracción preventiva de los loci DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQB1 y DQA1

DRB	FE yFP (%)	DQ	FE y FP (%)
DRB1*01	FP: 15	DQB1* 0201	FE: 71
DRB1*03	FE: 65	DQB1* 0202	FE: 32
DRB1*04	FP: 16	DQB1* 0302	FP: 12
DRB1*07	FE: 28	DQB1* 0303	FP: 5
DRB1*13	FP: 15	DQB1* 05	FP: 26
DRB1*15	FP: 17	DQB1* 06	FP: 27
DRB3* (52)	FE : 87	DQA1* 0101	FP: 16
DRB5* (51)	FP: 15	DQA1* 0102	FP: 20
		DQA1* 0103	FP: 9
		DQA1* 0201	FE: 32
		DQA1* 0301	FP: 10
		DQA1* 0501	FE: 64

FE: fracción etiológica, FP: fracción preventiva

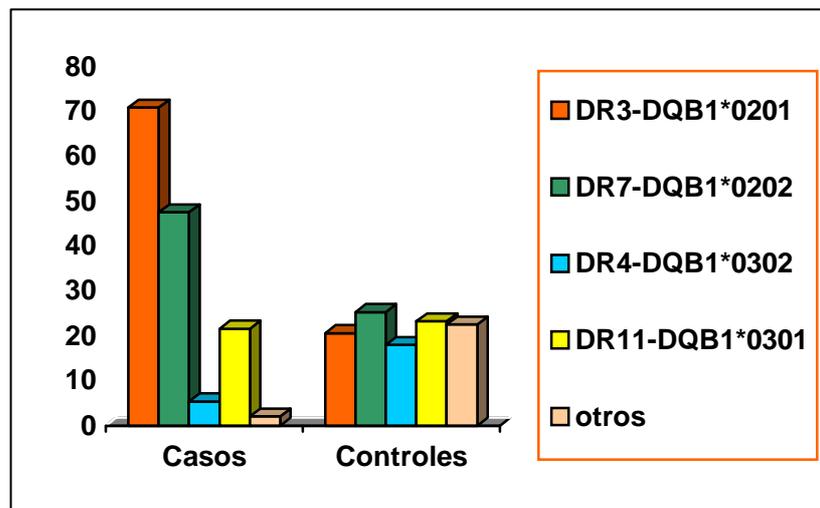
7.3.3.- HAPLOTIPOS. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CONTROL

Como los alelos del sistema HLA se encuentran en desequilibrio de ligamiento, encontramos diversos haplotipos que se repiten entre la población con EC con una frecuencia mayor que en la población celiaca. Gráfico 2.

La distribución de los haplotipos en casos y controles se muestra en las tablas 21, 22 y 23 considerando que el número total de pacientes es de 185 y controles 577. La mayoría de los pacientes

son portadores del haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 (71.3%), aunque también es llamativo el número considerable de sujetos (18.9%) con el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202- DQA1*0201 combinado con DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505.

Gráfico 2. Distribución de los distintos haplotipos en casos y controles (en %).



La distribución de los haplotipos si los englobamos en positivos o negativos para DQ2, es la siguiente:

- Positivos para DQ2(92,9%): DR3-DQ2 homocigotos 11,3%, con DR7-DQ2 24.5%, con DR4-DQ8 1,6%, en trans (DR7-DQ2 con DRB1*11-DQA1*0505-DQB1*0301) 21,6% y con otros alelos 33,5%.

➤ Positivos para DQ8 y negativos para DQ2 (3,7%): 0,5%
en homocigosis y 3,2% con otros alelos.

➤ Otros haplotipos (3.2%):

1 paciente homocigoto para DR7-DQ2

2 pacientes DR7-DQ2/otro haplotipo

Únicamente 3 pacientes frente a 172 controles poseen haplotipos distintos a los clásicamente asociados a la enfermedad. Son los siguientes:

- DRB1*04-DQB1*04-DQA1*0301 / DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505
- DRB1*08-DQB1*04-DQA1*0401/ DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505
- DRB1*01-DQB1*05-DQA1*0101 / DRB1*15-DQB1*06-DQA1*0102

Tabla 21. Distribución en casos y controles del haplotipo
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

	Pacientes n=185 (%)	Controles n=577 (%)
Total	132 (71.3)	119 (20.6)
Homocigosis	21(11.3)	13 (2.2)
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501	1 (0.5)	
DRB1*15-DQB1*0201-DQA1*0501		
Combinado con DRB1*07- DQB1*0202-DQA1*0201	45 (24.3)	16 (2.7)
Combinado con DRB1*04- DQB1*0302- DQA1	3 (1.6)	14 (2.4)
Combinado con otros alelos	62 (33.5)	76 (13.1)

Encontramos una asociación rara de DQB1*0201- DQA1*0501 con DRB1*15 combinado con DRB1*03- DQB1*05- DQA1*0501.

Tabla 22. Distribución en casos y controles del haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201

	Pacientes n=185 (%)	Controles n=577(%)
Total	91(49.1)	146 (25.3)
Homocigosis	1 (0.5)	7 (1.2)
Combinado con DRB1*11- DQB1*0301-DQA1*0505	35 (18.9)	19 (3.2)
Combinado con DRB1*13- DQB1*0301-DQA1*0505	5 (2.7)	19 (3.2)
Combinado con DRB1*04-DQB1*0302- DQA1*03	3 (1.6)	25 (4.3)
Combinado con otros alelos	2 (1.08)	60 (10.3)
Combinado con DRB1*03- DQB1*0201-DQA1*0501	45 (24.3)	16 (2.7)

Tabla 23. Distribución en casos y controles del haplotipo DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03

	Pacientes n=185(%)	Controles n=577(%)
Total	10 (5.4)	104 (18.02)
Homocigosis	1 (0.5)	7 (1.2)
Combinado con DRB1*03- DQB1*0201-DQA1*0501	3 (1.6)	14 (2.4)
Combinado con DRB1*07- DQB1*0202-DQA1*0201	3 (1.6)	25 (4.3)
Asociado con otros alelos	3 (1.6)	58 (10.05)

7.3.4- DESEQUILIBRIO DE LA UNIÓN (DE LIGAMIENTO) SEGÚN LA FÓRMULA DE MATTIUZ

El análisis del desequilibrio de ligamiento (DL) entre aquellos alelos asociados a la EC. Aunque previamente se ha establecido que los alelos DRB1*03, DQB1* 0201, DQA1* 0501 y DRB1*07, DQB1* 0202, DQA1* 0201 están en desequilibrio de ligamiento (DL) en la población Caucásica, hemos calculado el DL (Δ) entre esos alelos en el grupo de pacientes con EC y en el grupo de sujetos control. Para ello se ha aplicado la fórmula de **Mattiuz**. En la tabla 24 podemos observar como los haplotipos estudiados presentan un DL positivo en ambos grupos con un p valor corregido en todos los casos inferior a 0.0001.

Podemos observar que las frecuencias génicas de los haplotipos son muy superiores en los casos que en los controles.

Tabla 24. Coeficientes del DL (Δ) y las frecuencias génicas (fg) de los haplotipos.

	PACIENTES		CONTROLES	
	Δ	fg	Δ	fg
DRB1*03-DQB1*0201	0.24	0.46	0.09	0.10
DQB1*0201-DQA1*0501	0.24	0.46	0.09	0.10
DRB1*07-DQB1*0202	0.20	0.28	0.11	0.13
DQB1*0202-DQA1*0201	0.20	0.29	0.11	0.13

7.3.5-TEST DE INDEPENDENCIA

Comprobada la asociación individual de los alelos que constituyen los haplotipos DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 y DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 se procedió a analizar si la asociación de la sensibilización al gluten se daba con el haplotipo entero o si era primaria con un alelo y secundaria con los otros dos como consecuencia del desequilibrio de unión. Para ello se ha realizado un test de independencia entre aquellos alelos en los que se ha encontrado asociación con la EC según el método descrito por Svejgaard & Ryder (Svejgaard A, 1994). En las tablas 25, 26, 27 y 28 se muestra los test de independencia para DRB1*03 y DQB1*0201, DQB1*0201 y DQA*0501, DRB1*07 y DQB1*0202 y por último DQB1*0202 y DQA1*0201.

El test de independencia para DRB1*03 y DQB1*0201 y para DQB1*0201 y DQA*0501, muestra que la asociación a EC es atribuible al haplotipo en conjunto, siendo imposible saber que alelo tiene una asociación mayor. Sin embargo en el caso del haplotipo DRB1*07- DQB1*0202-DQA1*0201 el test de independencia muestra que la asociación con DQB1* 0202 y DQA1*0201 no difiere, mientras que la asociación con DRB1*07 es secundaria a DQB1/DQA1.

Tabla 25. Test de independencia entre DRB1*0301 y DQB1*0201

DRB1*0301	DQB1*0201	Pacientes	Controles
+	+	131	119
+	-	0	0
-	+	1	1
-	-	52	457
total		185	577

	a	b	c	d	RR	Fisher (p)	comentarios
++ vs -+	131	1	119	1	1.1	NS	DRB1*0301 no asociado en DQB1*0201 positivos
+- vs --	0	53	0	457	8.7	NS	DRB1*0301 no asociado en DQB1*0201 negativos
++ vs +-	130	0	119	0	1.1	NS	DQB1*0201 no asociado en DRB1*0301 positivos
-+ vs --	1	53	1	457	8.8	NS	DQB1*0201 no asociado en DRB1*0301 negativos
+- vs -+	0	1	0	1	1	NS	No difieren las asociaciones entre DRB1*0301 y DQB1*0201
++ vs --	131	52	119	457	9.6	0.001	Existe una acción combinada de ambos

Tabla 26. Test de independencia entre DQB1*0201 y DQA1*0501

DQB1*0201	DQA1*0501	Pacientes	Controles
+	+	132	119
+	-	0	2
-	+	1	2
-	-	52	454
total		185	577

	a	b	c	d	RR	Fisher (p)	comentarios
++ vs --	132	1	119	2	2.2	NS	DQB1*0201 no asociado en DQA1*0501 +
+- vs - -	0	52	2	45 2	1.7	NS	DQB1*0201 no asociado en DQA1*0501 -
++ vs +-	132	0	119	2	5.5	NS	DQA1*0501 no asociado en DQB1*0201 +
- + vs - -	1	52	2	45 4	4.3	NS	DQA1*0501 no asociado en DQB1*0201 -
+- vs - +	0	1	2	2	0.3 3	NS	asociaciones entre DQB1*0201 y DQA1*0501 no difieren
++ vs - -	132	52	119	45 4	9.6	0.000 1	acción combinada de ambos

Tabla 27. Test de independencia entre DRB1*07 y DQB1*0202

DRB1*07	DQB1*0202	Pacientes	Controles
+	+	91	146
+	-	1	76
-	+	1	0
-	-	92	355
total		185	185

	a	b	c	d	RR	Fisher (p)	comentarios
++ vs -+	91	1	146	0	0.2	NS	DRB1*07 no asociado en DQB1*0202 positivos
+ - vs - -	1	92	76	355	0.05	<0.0001	DRB1*07 asociado en DQB1*0202 negativos
++ vs +-	91	1	146	76	47	<0.0001	DQB1*0202 asociado en DRB1*07 positivos
- - vs - -	1	92	0	355	3	0.02 pc (6)=0.12	DQB1*0202 no asociado en DRB1*07 negativos
+ - vs - +	1	1	76	0	0.05	0.02 pc (6)=0.12	Las asociaciones entre DRB1*07 y DQB1*0202 no difieren
++ vs - -	91	92	146	355	2.4	<0.0001	Existe una acción combinada de ambos

Tabla 28. Test de independencia entre DQB1*0202 y DQA1*0201

DQB1*0202	DQA1*0201	Pacientes	Controles
+	+	91	146
+	-	1	1
-	+	2	12
-	-	91	418
total		185	577

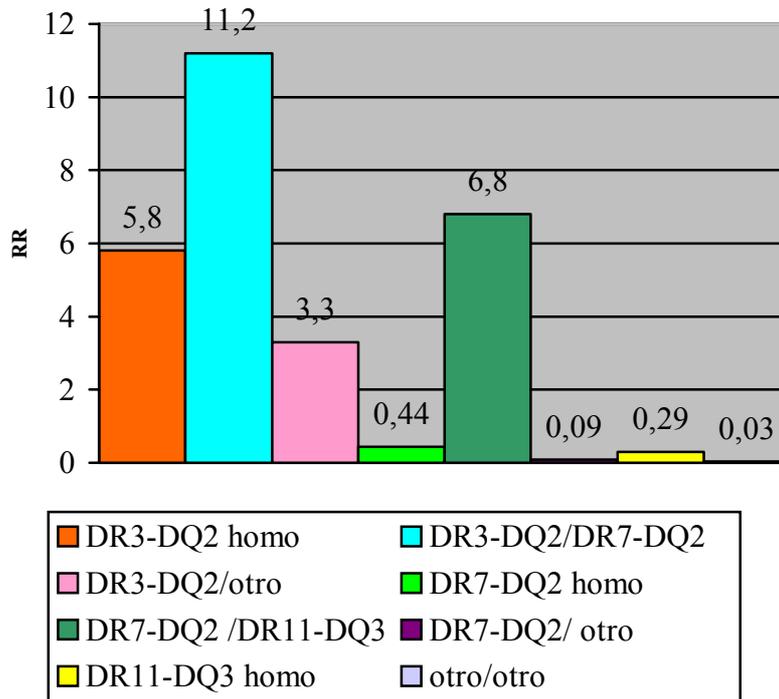
	a	b	c	d	RR	Fisher (p)	comentarios
++ vs -+	91	2	146	12	0.01	NS	DQB1*0202 no asociado en DQA1*0201 positivos
+- vs --	1	91	1	418	0.21	NS	DQB1*0202 no asociado en DQA1*0201 negativos
++ vs +-	91	1	146	1	0.6	NS	DQB1*0202 no asociado en DQA1*0201 positivos
-+ vs --	2	91	12	418	0.76	NS	DQB1*0202 no asociado en DQA1*0201 negativos
+- vs -+	1	2	1	12	6	NS	Las asociaciones entre DQB1*0202 y DQA1*0201 no difieren
++ vs --	91	91	146	418	2.8	0.001	Existe una acción combinada de ambos

7.3.6.- EFECTO SINÉRGICO DE LAS ASOCIACIONES DE LOS HAPLOTIPOS:

Los diferentes haplotipos asociados a la enfermedad se combinan entre si otorgando una asociación con EC mayor, es decir el riesgo de la combinación es mucho mayor que el del doble de la dosis de cada haplotipo. Este hecho destaca en la combinación entre DRB1*03- DQB1*0201-DQA1*0501 y DRB1*07-DQB1*0202- DQA1*0201 ya que el RR del haplotipo DR3-DQ2 en homocigosis es de 5.8 ($p < 10^{-4}$) aumentando hasta alcanzar el valor de 11.2 ($p < 10^{-4}$) cuando se combina con DR7-DQ2, siendo el RR de este ultimo en homocigosis 0.4.

Por otro lado el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202 DQA1*0201 únicamente confiere susceptibilidad para la EC si se combina con DR3-DQ2 o con DRB1*11- DQB1*0301-DQA1*0505, siendo el RR de esta combinación de 6.8 ($p < 10^{-4}$). Grafico 3.

Gráfico 3. Riesgo relativo de las combinaciones de haplotipos.



7.3.7.- HOMOCIGOTOS:

Existe un riesgo aumentado de EC ($p < 0.001$) entre aquellos sujetos portadores del haplotipo DRB1* 0301- DQB1*0201- DQA1*0501 cuando comparamos casos y controles.

Para averiguar si el factor es recesivo comparamos los valores esperados, considerando las frecuencias génicas, con el número de pacientes homocigotos para los alelos DRB1*03, DQB1* 0201 y DQA1*0501. Son homocigotos para este haplotipo 22 de 185 pacientes (11.8%), siendo 39.1 (21.1%) el número de pacientes esperados por su frecuencia genotípica y este resultado

es significativamente menor ($p < 0.001$). En el grupo control 13/577 (2.2%) son homocigotos y el número esperado por su frecuencia genotípica es de 5.7 (1%).

Si comparamos la frecuencia de este haplotipo en casos y en controles observamos que es significativamente mayor en los casos, aunque inferior de lo esperado por su frecuencia génica por lo que no es de carácter recesivo y no se precisa doble dosis para aumentar el riesgo de EC.

7.3.8.- VALOR DIAGNÓSTICO DEL TIPAJE HLA:

La EC presenta una fuerte asociación con determinados haplotipos. El realizar el tipaje HLA puede ser de utilidad para apoyar el diagnóstico en casos difíciles y sobretodo para seleccionar a aquellos sujetos de los grupos de riesgo (familiares de primer grado, patología autoinmune, etc) que requieren un seguimiento. En la tabla 29 se puede ver la probabilidad de padecer la EC tras el tipaje HLA, la damos asumiendo una probabilidad previa a padecer la EC de 0.5, es decir tras la sospecha clínica hay una probabilidad del 50% de desarrollar la enfermedad.

Observamos que el tipaje de los alelos asociados a EC, tiene un alto valor predictivo negativo, especialmente el alelo DQB1*0201.

Tabla 29. Valor diagnóstico del tipaje HLA

	Probabilidad de EC en los sujetos con tipaje positivo (%)	Probabilidad de EC en los sujetos con tipaje negativo (%)
DRB1*03	78	26
DRB1*07	62	41
DRB1*11	56	54
DRB1*04	3	54
DQB1*0201	78	15
DQB1*0202	66	40
DQA1*0501	78	26
DQA1*0201	59	41
DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501	78	27
DR*07-DQB1*0202-DQA1*0201	66	40
DR*04-DQB1*0302-DQA1*03	15	53
DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501 DR*07/ DQB1*0202/ DQA1*0201	92	43
DR*07-DQB1*0202-DQA1*0201 DR*11-DQB1*0301-DQA1*0505	91	44

7.4.-ANÁLISIS DETALLADO DE LOS HAPLOTIPOS EN LA ENFERMEDAD CELIACA. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

7.4.1- HAPLOTIPOS Y PACIENTES

En nuestra serie se puede dividir a los pacientes en 3 grupos en función del haplotipo que poseen, así están los que portan el haplotipo equivalente al serológico DQ2, DQ8 y aquellos que no poseen ninguno de estos.

7.4.1.1.- **DQ2**

- DR*03-DQB1*0201- DQA1*0501 HOMOCIGOTOS:

21 pacientes DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501

DR B1*03- DQB1*0201-DQA1*0501

1 paciente DR B1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

DR B1*15-DQB1*0201-DQA1*0501

14 de los 22 pacientes presentan clínica clásica, y el resto atípica, de estos últimos 8 casos: 3 con talla corta, 2 con anemia refractaria, 1 con Diabetes Mellitus, 1 hipertransaminasemia y el último con hipoparatiroidismo era hija de una paciente con EC. La edad de diagnóstico presenta un intervalo entre 11 m y 13 años, con una media de 48,6m (4,05 años). Todos ellos presentan atrofia vellositaria subtotal como hallazgo histológico, salvo 2 con APL. Los dos casos con menor grado de lesión poseían los marcadores serológicos positivos y la forma de manifestación en uno de ellos era clásica mientras el otro era aquel con hipoparatiroidismo previamente comentado. Todos presentaban valor de anticuerpos antigliadina y antitransglutaminasa positivos, exceptuando a un paciente de 10 años de edad que era remitido para estudio por hipertransaminasemia, y sólo era positivo para los anticuerpos antitransglutaminasa.

- DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501 CON DR*07-DQB1*0202-DQA1*0201

De un total de 45 pacientes, 34 presentaban síntomas digestivos con afectación nutricional, los otros 11 con clínica atípica, consultaron por dolor abdominal 1, Dermatitis herpetiforme 2, anemia refractaria 2, distensión abdominal 3, estreñimiento 1 y Diabetes mellitus 2.

Se les realizó la biopsia intestinal, con una edad comprendida entre los 12m y 12 años, con una media de 37.7 meses (3,1 años). A nivel histológico 8 pacientes presentaban lesión Marsh 3a, el resto 3b. De estos pacientes uno afecto de Diabetes mellitus, fue diagnosticado de EC al realizar el despistaje serológico según el protocolo de seguimiento que se realiza en los grupos de riesgo de padecer esta enfermedad. Los marcadores serológicos en todos eran positivos salvo en una niña con déficit de IgA y en un paciente de 6 años con malabsorción intestinal y Marsh 3b que presentaba los anticuerpos antigliadina positivos y los antitransglutaminasa negativos.

- DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501 COMBINADO CON OTRO GRUPO DE ALELOS:

-3 pacientes:

DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

DRB1*07-DQB1*0303-DQA1*0201

Los tres presentaban clínica clásica, Marsh 3b, marcadores serológicos positivos y la edad de diagnóstico fue de 14, 18 y 19 meses.

- 15 pacientes:

DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

DRB1*15-DQB1*06-DQA1*01

La clínica de malabsorción intestinal fue el motivo de consulta en 9, la anemia refractaria en 3, 2 se diagnosticaron al realizar el despistaje de EC en familiares, y 1 presentaba dolor abdominal. Todos ellos con Marsh 3b salvo los 2 pacientes familiares de EC y el paciente con dolor abdominal que presentaron Marsh 3ª, en estos tres últimos ambos marcadores presentaban un resultado claramente por encima del rango de referencia.

-15 pacientes:

DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0501

La clínica atípica la presentaban 4 pacientes en forma de Diabetes Mellitus, Artritis Reumatoide, hipertransaminasemia y Dermatitis herpetiforme; en estos 3 últimos encontramos una lesión gado 3a de Marsh con ambos marcadores serológicos con un valor por encima del rango de referencia. De los restantes tan solo 1 niño presentaba Marsh 3a.

- 8 pacientes

DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

DRB1*01-DQB1*05- DQA1*0101

1 de estos pacientes fue diagnosticado en el estudio familiar (madre con EC), el resto con clínica clásica. Todos presentaban Marsh 3b, salvo tres niños.

- 9 pacientes:

DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

DRB1*13-DQB1*06 -DQA1*0102

El motivo de consulta fue el estreñimiento en uno de estos pacientes y otro con diagnóstico de DMID estaba asintomático. El resto presentaba una clínica clásica. El hallazgo histológico fue Marsh 3b en 6 y Marsh 3a en 3.

- 12 pacientes presentaban el haplotipo DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501 junto con otro distinto:

De ellos 9 presentaban clínica clásica, 2 DMID y 1 talla corta. En cuanto a la biopsia intestinal: 4 Marsh 3a y el resto Marsh 3b. Los marcadores serológicos fueron positivos en todos ellos.

- DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 COMBINADO CON DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505.

Estos dos haplotipos en TRANS formarían la molécula heterodímera DQ2.

Lo poseen un total de 40 sujetos de nuestra muestra, de ellos todos salvo 6 presentaban al diagnóstico sintomatología digestiva y nutricional; de los otros, 2 consultaron por talla corta, 2 por anemia ferropénica refractaria, 1 por distensión abdominal y el último fue diagnosticado al realizarse el despistaje en el grupo de pacientes con patología reumatoidea (Artritis reumatoide), de estos 6 pacientes en 3 se halló lesión

grado 3a de Marsh; el resto de pacientes exceptuando a 2 tenían un grado Marsh 3b. La edad media de diagnóstico fue 35,3m (8-141meses).

7.4.1.2 -DQ8 (DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03)

El grupo de alelos DQB1*0302-DQA1*03 codifica para la proteína heterodímera DQ8.

Aparece asociado a

- DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201: 3, los tres con malabsorción intestinal, marcadores positivos y Marsh 3b. Uno de ellos asociaba además una hipogammaglobulinemia a expensas de IgM.

- DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501: 3, con clínica atípica 2 (alopecia y anemia) que además presentaron marcadores positivos y Marsh 3b. El tercero con clínica típica tenía Marsh 3a.

- Homocigosis: 1, con clínica digestiva, Marsh 3b y diagnóstico al año de vida. Ambos marcadores serológicos positivos.

- Otro: 3, 1 con clínica clásica, y otro con anemia ferropénica. Los dos con Marsh 3b. El tercero fue un niño con Sd. De Down y su abuela con EC, en el que únicamente los los AAG eran positivos y a nivel histológico presentaba una lesión Marsh 3a.

7.4.1.3-OTROS:

- DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 en homocigosis: 1 paciente remitida por talla corta, presentaba marcadores serológicos positivos y a nivel histológico Marsh 3b.

- DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 con otro grupo de alelos: 2 pacientes con clínica clásica, uno con diagnóstico a los 18m y otro a los 29m, ambos presentaban marcadores serológicos positivos y a nivel histológico Marsh 3a y Marsh 3b.

- OTROS:

- DRB1*08-DQB1*04-DQA1*0401 / DRB1*11- DQB1*0301-DQA1*0505. Un varón con un síndrome de malabsorción intestinal, sobrino de un paciente con EC que presentó a los 13 meses de vida marcadores serológicos para EC positivos y Marsh 3b.

- DRB1*04-DQB1*04-DQA1*0301 / DRB1*11- DQB1*0301-DQA1*0505. Una niña con Síndrome de Down, con malabsorción intestinal que a los 11 meses presentó a nivel histológico una lesión Marsh 3b. Los anticuerpos antitransglutaminasa en esta paciente fueron negativos. Tras la retirada del gluten mejoró la clínica presentando aumento pondo-estatural y desaparición de la diarrea, así como normalización de los valores de los anticuerpos antigliadina. Esta paciente, durante los primeros años, presentó recaída clínica y serológica tras realizar pequeñas transgresiones dietéticas.

- DRB1*01-DQB1*05-DQA1*0101 / DRB1*15-DQB1*06-DQA1*0102:

Niña que a los 20 meses por presentar diarrea y estancamiento ponderal se le realizó biopsia intestinal hallando una lesión Marsh 3a. Los AAG eran claramente positivos (1,2 UA) y los ATGt se encontraban muy ligeramente por encima del valor de referencia (7 UI/ml). Presentó una buena evolución tras la instauración de una dieta exenta de gluten. Posteriormente su padre fue diagnosticado de EC.

7.4.2- HAPLOTIPOS Y DATOS CLÍNICO-BIOLÓGICOS

Se ha relacionado las distintas combinaciones de haplotipos presentes en nuestra muestra con la forma clínica de presentación, la edad de debut o el grado de atrofia (tablas 30, 31 y 32) de modo que la presencia o ausencia de las distintas combinaciones de haplotipos influya en alguna de estas características clínicas, para ello se ha realizado una comparación mediante la prueba de chi-cuadrado o F de Fisher. Únicamente observamos que existen diferencias estadísticamente significativas para el grado de lesión histológica en aquellos pacientes no portadores del haplotipo DR3-DQ2/OTRO, es decir, que resulta significativamente superior el porcentaje de pacientes con este haplotipo y lesión histológica Marsh 3b

Tabla 30. Relación forma de presentación y combinación de haplotipos.

	T (%)	A (%)	P
DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501	72.7	27.3	NS
OTRO			
Resto	73.6	26.4	
DRB1*03- DQB1*0201-DQA1*0501	60.9	39.1	NS
DRB1*03- DQB1*0201-DQA1*0501			
Resto	75.2	24.8	
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501	75	25	NS
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201			
Resto	72.8	27.2	
DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505	82.1	17.9	NS
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201			
Resto	71	29	
DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03	61.5	38.5	NS
Resto	74.3	25.7	

T: típica; A: atípica; NS: no significativo

Tabla 31. Relación edad de diagnóstico (< o >3 años) y combinación de haplotipos.

	<3a (%)	>3a (%)	P
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501	75.5	24.5	NS
OTRO			
Resto	69.1	30.9	
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501	54.5	45.5	0.06
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501			
Resto	73.4	26.6	
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501	66.7	33.3	NS
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201			
Resto	72.5	27.5	
DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505	76.3	23.7	NS
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201			
Resto	69.6	30.4	
DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03	75	25	NS
Resto	70.7	29.3	

<3a: menor de 3 años; >3a: mayor de 3 años; NS: no significativo

Tabla 32: Relación grado de atrofia intestinal en la biopsia intestinal Marsh 3a/3b y combinación de haplotipos.

	3a (%)	3b (%)	P
DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501	30.9	69.1	0.04
OTRO			
Resto	17.8	82.2	
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501	8.7	91.3	NS
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501			
Resto	23.6	76.4	
DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501	20.8	79.2	NS
DRB1*07-DQB1*0202- DQA1*0201			
Resto	22.1	77.9	
DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505	17.9	82.1	NS
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201			
Resto	22.8	77.2	
DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03	7.7	92.3	NS
Resto	22.8	77.2	

3a: lesión grado 3a de Marsh; 3b: lesión grado 3b de Marsh; NS: no significativo

Por otro lado observamos una tendencia la significación estadística en cuanto a la edad de debut en aquellos pacientes no portadores del haplotipo DQ2 en homocigosis, siendo más prevalente el diagnóstico en edades precoces en este grupo.

Si agrupamos a los pacientes en aquellos que contenga DQB1*02 en doble carga (DQ2), es decir si unimos en un solo grupo aquellos pacientes DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501 / DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 y DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 / DRB1*07- DQB1*0202-DQA1*0201 (tabla 33), observamos que tener doble carga DQ2 no predispone a debut en edades precoces, ya que existe una tendencia a la significación estadística en cuanto al porcentaje de pacientes no DQ2 en doble carga que debutan en edades tempranas.

Tabla 33. Relación, grado de atrofia intestinal, edad al diagnóstico y forma clínica de presentación con pacientes con doble carga DQ2 (DR3-DQ2 homo y DR3-DQ2/DR7-DQ2)

	Marsh 3a (%)	Marsh 3b (%)	p
DQ2 doble carga	16.9	83.1	NS
Resto	24.8	75.2	

	Típicas (%)	Atípicas (%)	p
DQ2 doble carga	70.4	29.6	NS
Resto	75.2	24.8	

	< 3 a (%)	> 3 a (%)	p
DQ2 doble carga	62.7	37.3	0.056
Resto	76.1	23.9	

En la Tabla 34 podemos observar la distribución más detallada de cada una de las distintas combinaciones de haplotipos según características clínicas y biológicas (forma clínica, grado de lesión histológica, marcadores serológicos, edad de diagnóstico).

Tabla 34. Distribución de las diversas características clínicas y biológicas por haplotipos.

HAPLOTIPO	N	CLÍNICA CLÁSICA	CLÍNICA ATÍPICA	Marsh 3a	Marsh 3b	ATG t-	AAG -	<3a (%)
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 HOMO	22	14	8	2	20	0	2	54.4
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201	45	34	11	8	37	2	2	66.7
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 OTRO	62	49	13	19	43	4	0	75.5
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505	40	34	6	5	35	0	0	76.3
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 HOMO	1	0	1	0	1	0	0	100
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 OTRO	2	2	0	1	1	1	0	100

HAPLOTIPO	N	CLÍNICA CLÁSICA	CLÍNICA ATÍPICA	Marsh 3a	Marsh 3b	ATGt-	AAG-	<3a (%)
DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03 DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201	3	3	0	0	3	0	0	100
DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03 DRB1*03-QB1*0201-DQA1*0501	3	1	2	1	2	0	0	25
DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03 HOMO	1	1	0	0	1	0	0	100
DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03 OTRO	3	1	2	1	2	1	0	75
OTRO/OTRO	3	3	0	1	2	1	0	100

7.5.-ESTUDIO HLA EN FAMILIARES

7.5.1- HAPLOTIPOS EN FAMILIARES AFECTOS. CONCORDANCIA / DISCORDANCIA CLINICA

De los 185 pacientes con diagnóstico de EC, 27 tenían uno o varios familiares afectados por la enfermedad, de estos 18 eran familiares en primer grado afectados, siendo 8 hermanos del caso probando.

El Riego de Recurrencia en Familiares, que se define por el riesgo de que un hermano de un caso índice pueda desarrollar EC en nuestra muestra fue de un 7.5%.

Analizando las familias por separado, se pudo observar que en cuatro de ellas existía una discordancia entre los componentes de las mismas en cuanto al haplotipo que portaban y la forma clínica de presentación. De estas familias destacan la número 2 compuesta por 4 individuos con mismo genotipo, en la que las mujeres presentaron una forma clínica clásica, mientras los varones fueron diagnosticados dentro del estudio de despistaje familiar. Curiosamente una prima hermana de esta familia fue diagnosticada de EC por presentar clínica clásica siendo el haplotipo marcador distinto al de sus primos afectados.

En la familia 3 dos hermanos con haplotipos distintos presentaban clínica diferente, uno clásica y el otro asintomático. En la familia 4, una niña con DMID se diagnosticó por despistaje, siendo el haplotipo distinto al de su hermana que con sintomatología digestiva, presentaba un haplotipo en principio no asociado a la EC. En la familia 12 dos gemelos con idéntico

HLA presentaron formas clínicas distintas, uno clásica y el otro únicamente cambios en el carácter. En la familia 16, el padre que se diagnosticó de forma secundaria tras el despistaje familiar, presentaba el haplotipo DQ8, mientras que la niña con sintomatología clásica es uno de los tres casos referidos previamente con haplotipo HLA no asociados a EC.

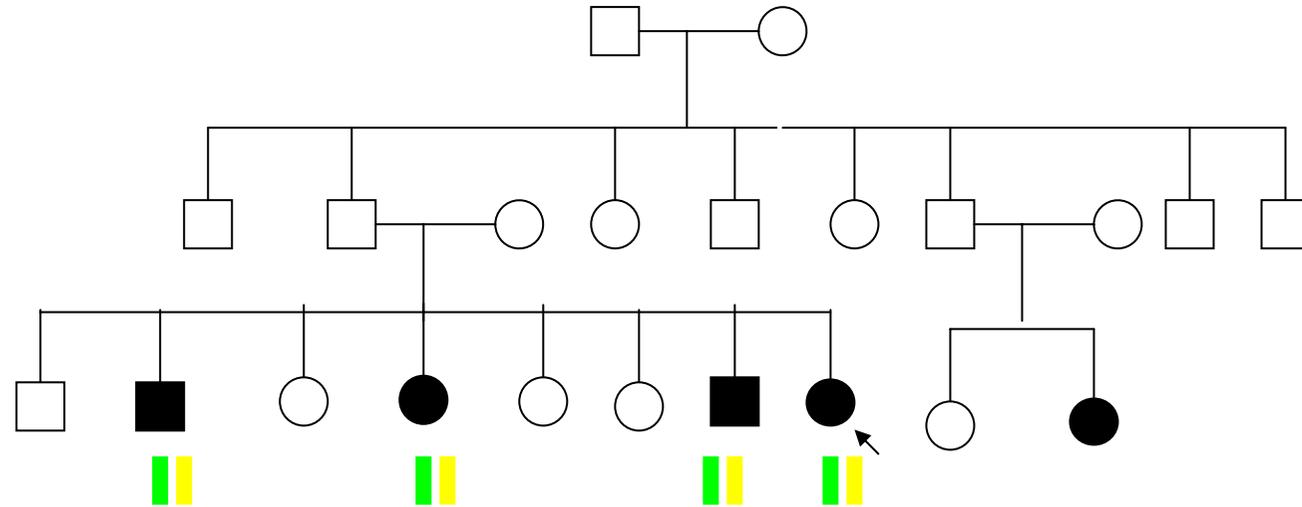
▪ **Familia 1:**

La niña se diagnosticó primero, por clínica de dolor abdominal, y la madre posteriormente durante un embarazo con sintomatología digestivo-nutricional.

Ambas presentan el haplotipo HLA DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 2:** Esta familia compuesta por 4 niños afectados de EC, presentó la siguiente asociación de haplotipos DR*07-DQB1*0202-DQA1*0201 / DR*11- DQB1*0301-DQA1*0505. De ellos las dos niñas, una de ellas fue el caso índice, presentaron clínica de desnutrición y diarrea, mientras que los dos niños estaban asintomáticos. Todos ellos presentaban ambos marcadores serológicos positivos y una lesión intestinal grado Marsh 3. Una prima hermana de estos niños se diagnosticó a los 2 años de vida por clínica digestivo-nutricional, ella presentaba el haplotipo DR*03- DQB1*0201-DQA1*0501.

“Análisis Genético de la Enfermedad Celiaca”. E.Donat

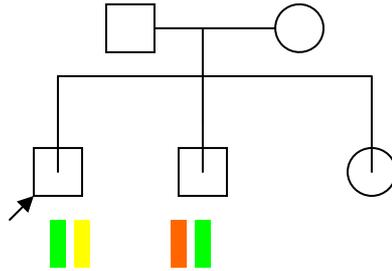


DR*07- DQB1*0202-DQA1*0201 

DR*11-DQB1*0301-DQA1*0505 

▪ **Familia 3:**

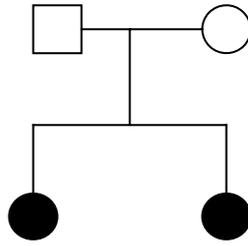
Dos hermanos afectados, uno de ellos con clínica clásica y el siguiente tipaje HLA DR*07-DQB1*0202-DQA1*0201 / DR*11-DQB1*0301-DQA1*0505. El otro se diagnóstico durante el despistaje familiar, presentando el haplotipo DR*03- DQB1*0201-DQA1*0501.



DR*03-DQB1*0201- DQA1*0501 █
DR*07- DQB1*0202- DQA1*0201 █
DR*11- DQB1*0301-DQA1*0505 █

▪ **Familia 4**

Dos hermanas con clínica y genética diferente, la primera se diagnosticó durante el despistaje de la EC que se realiza a los pacientes con Diabetes Mellitus y presenta la siguiente combinación de haplotipos: DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501 / DR*04-DQB1*0202-DQA1*0303. Su hermana se diagnosticó posteriormente por clínica digestivo-nutricional, DR*04-DQB1*0202-DQA1*0303 / DR*11-DQB1*0301-DQA1*0505



DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501

DR*04-DQB1*0202-DQA1*0303

DR*11-DQB1*0301-DQA1*0505

▪ **Familia 5:**

Una niña con hipoparatiroidismo y su madre afecta por la EC (clínica clásica), presentaron ambas el haplotipo DR*03-DQB1*0201- DQA1*0501.

▪ **Familia 6:**

El niño con clínica clásica se diagnosticó inicialmente. La madre presentaba osteoporosis y abortos de repetición. Ambos compartían el haplotipo DR*03-DQB1*0201- DQA1*0501.

▪ **Familia 7:**

Madre y niña afectas, la primera fue el caso índice y la niña se diagnosticó posteriormente por rectorragias. Ambas: DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 8:**

La madre se diagnosticó por clínica de diarrea y pérdida de peso, en el estudio familiar se detectaron los marcadores serológicos en el niño positivos y en la biopsia intestinal una atrofia subtotal vellositaria. Ambos compartieron el haplotipo DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 9:**

El niño con clínica digestivo nutricional fue el caso índice, posteriormente se diagnosticó a la madre. Ambos compartieron el haplotipo DR*03- DQB1*0201- DQA1*0501.

▪ **Familia 10:**

El caso índice fue una niña con talla corta, posteriormente se diagnosticó a su hermano. Ambos compartían el haplotipo DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 11:**

Padre e hija afectos, el segundo se diagnosticó gracias al despistaje en familiares. La niña presentaba clínica digestivo nutricional. Ambos compartían el haplotipo DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 12:**

Dos hermanos gemelos con idéntico tipaje HLA: DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501 / DR*07-DQB1*0202-DQA1*0201. El primero presentaba sintomatología digestiva y el segundo cambios en el carácter.

▪ **Familia 13:**

Madre e hijo afectos, el niño se diagnosticó en el estudio familiar. Haplotipo DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 14:**

Abuela con EC, su nieto con Sd. de Down se diagnosticó posteriormente. Haplotipo DR*04-DQB1*0302/-DQA1*0301.

▪ **Familia 15:**

Una niña con sintomatología clásica, el padre asintomático se diagnosticó en el estudio familiar. Haplotipo DR*03- DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 16:**

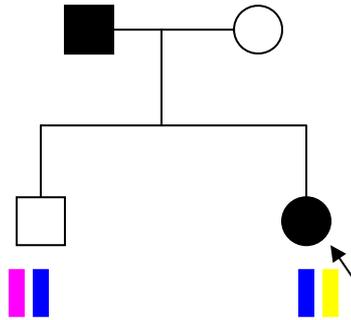
Dos hermanas gemelas con idéntico tipaje HLA: DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501 / DR*07-DQB1*0202-DQA1*0201. Ambas con la misma sintomatología digestiva, se diagnosticaron en un intervalo de 7 meses de diferencia.

▪ **Familia 17:**

Hijo y madre afectados, el caso índice fue la madre, el 2º con sintomatología digestiva. Haplotipo DR*03-DQB1*0201-DQA1*0501.

▪ **Familia 18:**

Niña con sintomatología clásica, el padre asintomático se diagnosticó en el estudio familiar. El haplotipo del padre fue DR*04-DQB1*0302-DQA1*0301 / DRB1*15-DQB1*06-DQA1*0102, sin embargo la niña poseía el haplotipo DRB1*01-DQB1*05-DQA1*0101 / DRB1*15-DQB1*06-DQA1*0102



DR*04-DQB1*0302-DQA1*0301 ■

DRB1*15 -DQB1*06-DQA1*0102 ■

DRB1*01-DQB1*05-DQA1*0101 ■

7.5.2.- FRECUENCIAS ALELICAS EN FAMILIARES.

COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CELIACA.

Tras realizar el tipaje de los alelos, tanto en los pacientes como en sus familiares de primer grado, se calcularon las frecuencias fenotípicas de los alelos DRB, DQB1 y DQA1 y se compararon estadísticamente mediante la prueba de chi-cuadrado o F de Fisher. Tablas 35 y36. Se aplicó el método de desigualdad de Bonferroni a los valores p obtenidos en el análisis χ^2 . Se calculó el riesgo relativo de cada alelo con un intervalo de confianza del 95%. Observamos que los alelos asociados a la EC (DRB1*03, DRB1*07, DQB1*0201, DQB1*0202, DQA1*0201, DQA1*0501) previamente descritos presentan en los casos una mayor prevalencia que en los familiares, siendo esta estadísticamente significativa. Aunque también están aumentados de forma significativa los alelos DRB1*11, DRB1*15, DQB1* 06 y DQA1*0601.

Tabla 35: Frecuencia fenotípica de los loci DRB1, DRB3, DRB4 en DRB5 en pacientes con EC comparado con familiares de los mismos. Riesgo relativo.

DRB	Familiares (% N=368)	Pacientes (% N=185)	p	RIESGO RELATIVO (IC 95%)
DRB1*01	14.4	5.4	NS	2.9 (1.4-5.9)
DRB1*0103	1.9	0	NS	0.661(0.623-0.702)
DRB1*03	18.8	71.4	0,000	0.093 (0.061-0.140)
DRB1*0302	3	0	NS	0.659 (0.620-0.700)
DRB1*04	44.6	7.6	0.000	9.819(5.485-17.579)
DRB1*07	0.8	49.7	0.000	0.008 (0.003-0.027)
DRB1*08	14.9	2.2	0.000	7.951 (2.835-2.302)
DRB1*09	23.4	0.5	0.000	56.113(7.74-406.43)
DRB1*10	4	0	NS	0.6 (0.625-0.704)
DRB1*11	12.2	28.6	0.000	0.347 (0.222-0.542)
DRB1*12	4.1	0.5	NS	7.819 (1.025-59.65)
DRB1*13	36.4	10.3	0.000	5 (2.974-8.415)
DRB1*14	3.3	1.6	NS	2.045 (0.570-7.338)
DRB1*15	1.4	8.6	0.000	0.145 (0.052-0.404)
DRB1*16	1.9	1.1	NS	1.774(0.365-8.627)
DRB3* (52)	73.4	95.1	0.000	0.141(0.069-0.286)
DRB4* (53)	47.8	56.2	NS	0.714 (0.5-1.018)
DRB5* (51)	20.9	9.2	0.015	2.615(1.4-1.5)

Pc: valor de p corregido, NS: no significativo, RR: riesgo Relativo

Tabla 36: Frecuencia fenotípica de los loci DQB1 y DQA1 en pacientes con EC vs familiares de los mismos. Riesgo relativo.

DQ	Familiares (% N= 368)	Pacientes (%) N=185)	Pc	RIESGO RELATIVO (IC)
DQB1* 0201	23.8	71.4	0.000	0.124 (0.83-0.185)
DQB1* 0202	28.5	50.3	0.000	0.395 (0.274-0.570)
DQB1* 0301	43.8	34.6	NS	1.470 (1.019-2.121)
DQB1* 0302	35.1	6.5	0.000	7.781 (4.173-4.509)
DQB1* 0303	30.2	1.1	0.000	39.519(9.638-2.052)
DQB1* 04	10.9	2.2	0.000	5.518 (1.943-5.671)
DQB1* 05	4.1	9.2	NS	0.420 (0.205-0.861)
DQB1* 06	3.5	12.4	0.000	0.258 (0.127-0.522)
DQA1* 0101	14.4	5.4	0.03	2.944 (1.461-5.933)
DQA1* 0102	22.3	9.7	0.000	2.660 (1.543-4.586)
DQA1* 0103	10.1	4.3	NS	2.578 (0.737-9.020)
DQA1* 0104	4.1	1.6	NS	2.578 (0.737-9.020)
DQA1* 0105	2.7	0.5	NS	5.140(0.653-40.459)
DQA1* 0201	36.1	50.8	0.000	0.548 (0.383-0.784)
DQA1* 0301	9.8	4.9	NS	2.120 (0.999-4.502)
DQA1* 0302	1.6	1.6	NS	1.006 (0.249-4.067)
DQA1* 0303	5.2	2.7	NS	01.960(0.720-5.335)
DQA1* 0401	3.0	1.6	NS	1.869 (0.515-6.784)
DQA1* 0501	47.6	71.9	0.000	0.355 (0.242-0.519)
DQA1* 0505	21.5	30.3	NS	0.630 (0.422- 0.940)
DQA1* 0601	0	0.5	NS	0.333 (0.296-0.375)

Pc: valor de p corregido, NS: no significativo, RR: riesgo Relativo

7.5.3.- FRECUENCIAS ALELICAS EN FAMILIARES.
COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN CONTROL.

Tras realizar el tipaje de los alelos, se calcularon las frecuencias fenotípicas de los alelos DRB, DQB1 y DQA1 y se compararon estadísticamente mediante la prueba de chi-cuadrado o F de Fisher. Se aplicó el método de desigualdad de Bonferroni a los valores p obtenidos en el análisis χ^2 . Se calculó el riesgo relativo de cada alelo con un intervalo de confianza del 95%. Tablas 37y 38.

Observamos una mayor asociación de los alelos DRB1*04, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*13, DQB1* 0301, DQB1*0302, DQB1* 0303 y DQA1*0501, en los familiares frente a los controles.

Tabla 37: Frecuencia fenotípica de los loci DRB1, DRB3, DRB4 en DRB5 en familiares de pacientes con EC comparado con controles sanos. Riesgo relativo.

DRB	Familia Res (% N= 368)	Control es (N= 577)	pc	RIESGO RELATIVO (IC 95%)
DRB1*01	14.4	20.6	NS	0.648(0.454- 0.923)
DRB1*0103	1.9	2.8	NS	0.397 (0.277-1.669)
DRB1*03	18.8	20.8	NS	0.879 (0.632-1.223)
DRB1*0302	3	0.3	0.015	8.859(1.952-40.197)
DRB1*04	44.6	23.2	0.000	2.658 (2.004-3.524)
DRB1*07	0.8	29.5	0.000	0.020 (0.006-0.062)
DRB1*08	14.9	7.1	0.000	2.297 (1.498-3.523)
DRB1*09	23.4	2.1	0.000	14.359 (7.719-26.709)
DRB1*10	4	2.4	NS	0.442 (0.144-1.353)
DRB1*11	12.2	24.1	0.000	0.439 (0.305-633)
DRB1*12	4.1	1.9	NS	2.186 (0.993-4.814)
DRB1*13	36.4	24.1	0.000	1.804 (1.356-2.401)
DRB1*14	3.3	5.2	NS	0.615 (0.311-1.216)
DRB1*15	1.4	20.8	0.000	0.052 (0.021-0.130)
DRB1*16	1.9	3.5	NS	0.540 (0.226-1.290)
DRB3* (52)	73.4	63.8	0.03	1.565 (1.175-2.084)
DRB4* (53)	47.8	48.9	NS	0.959 (0.738-1.246)
DRB5* (51)	20.9	23.9	NS	0.842 (0.614-1.154)

Tabla 38. Frecuencia fenotípica de los loci DQB1 y DQA1 en familiares de pacientes con EC comparado con controles sanos. Riesgo relativo.

DQ	Familiares (%) N=368)	Control es(%) N=577)	Pc	RIESGO RELATIVO (IC)
DQB1* 0201	23.8	20.8	NS	1.179(0.862-1.613)
DQB1* 0202	28.5	25.5	NS	1.168 (0.871-1.567)
DQB1* 0301	43.8	34.8	0.04	1.455 (1.113-1.902)
DQB1* 0302	35.1	18	0.000	2.455 (1.816-3.319)
DQB1* 0303	30.2	6.8	0.000	5.958 (4.018-8.835)
DQB1* 04	10.9	6.1	0.06	1.889 (1.176-3.033)
DQB1* 05	4.1	33.3	0.000	0.085 (0.049-0.147)
DQB1* 06	3.5	36.2	0.000	0.064 (0.036-0.115)
DQA1* 0101	14.4	22.7	0.03	0.573 (0.404-0.813)
DQA1* 0102	22.3	28.4	NS	0.722 (0.532-0.979)
DQA1* 0103	10.1	13.3	NS	0.726 (0.479-1.100)
DQA1* 0104	4.1	4.5	NS	0.901 (0.470-1.724)
DQA1* 0105	2.7	2.3	NS	1.212 (0.526-2.793)
DQA1* 0201	36.1	27.6	NS	1.488 (1.124-1.969)
DQA1* 0301	9.8	15.9	NS	0.572 (0.379-0.861)
DQA1* 0302	1.6	2.6	NS	0.621 (0.239-1.615)
DQA1* 0303	5.2	8.1	NS	0.614 (0.354-1.064)
DQA1* 0401	3.0	6.2	NS	0.463 (0.233-0.922)
DQA1* 0501	47.6	20.8	0.000	3.453 (2.592-4.600)
DQA1* 0505	21.5	28.1	NS	0.700 (0.515-0.953)
DQA1* 0601	0	1.2	NS	0.608 (0.577-0.640)

7.5.4.- HAPLOTIPOS EN FAMILIARES.

Se han distribuido los haplotipos del tipaje HLA de los familiares en primer grado de los sujetos afectados de EC de nuestra muestra en 2 grupos: padres y hermanos.

De un total de 255 padres y madres y 106 hermanos/as, un 77.2 % de los familiares presentaron alguno de los haplotipos asociados a la enfermedad (padres 80.7%, hermanos 68.8%), siendo el más prevalente el haplotipo DRB1*03- DQB1*0201-DQA1*0501 como se puede observar en las tablas 39, 40 y 41.

No presentan ninguno de los haplotipos asociados a EC 49 de los 255 padres y 33 de los 106 hermanos tipados.

Tabla 39. Familiares con haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501

	Padres 255	Hermanos 106
Total	127	34
Homocigosis	11	0
Combinado con DRB1*07/DQB1*0202/DQA1*0201	22	10
Combinado con DRB1*04/ DQB1*0302/ DQA1	7	0
Combinado con otros alelos	87	24

Tabla 40. Familiares con haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201

	Padres	Hermanos
	255	106
Total	86	45
Homocigosis	13	6
Combinado con DRB1*11/DQB1*0301/DQA1*0505	12	12
Combinado con DRB1*04/ DQB1*0302/ DQA1	7	9
Combinado con otros alelos	32	8
Combinado con DRB1*03/DQB1*0201/DQA1*0501	22	10

Tabla 41. Familiares con haplotipo DRB1*04-DQB1*0302-DQA1*03

	Padres	Hermanos
	255	106
Total	29	9
Homocigosis	0	0
Combinado con DRB1*03/DQB1*00201/DQA1*0501	7	0
Combinado con DRB1*07/ DQB1*0202/ DQA1*0201	7	5
Combinado con otros alelos	15	4

7.6.- LOCUS CTLA 4

Se ha realizado el estudio en un total de 150 individuos afectados de Enfermedad Celiaca y a sus familiares en primer grado. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el Transmission Disequilibrium Test (TDT) y el estudio caso-control. Se estimaron las frecuencias alélicas y los resultados mostraron que nuestra población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos marcadores. Tabla 42.

Tabla 42. Estudio casos-control para el locus CTLA-4

SNP	Nº de transmisiones en pacientes(%)	Nº de transmisiones en controles (%)	χ^2 (p)
+49			
A	151 (76.2%)	146 (73.78%)	0.0059
G	47 (23.7%)	52 (26.21%)	
CT60			
A	101 (50.5%)	108 (54.47%)	0.022
G	99 (49.5%)	92 (43.68%)	

Considerando sólo aquellas familias con al menos uno de los padres informativo para cada marcador, aplicamos el TDT en 58 y 48 tríos (padres e hijo afecto) para CT60 y +49A/G, respectivamente.

Hemos observado una pequeña pero significativa asociación para el marcador +49 A/G ($\chi^2 = 4,571$; $p < 0,05$), sin embargo no existe ningún indicio de que el marcador CT60 pudiera estar asociado con

la enfermedad ($\chi^2 = 1,704$; n.s.). El estudio de familias completas (probando, padres y hermanos) ha dado idénticos resultados, es decir asociación significativa para +49A/G ($z' = 2,193$; $p = 0,015$; 55 familias) y no significativa para CT60 ($z' = 1,019$; n.s.; 70 familias). Los resultados muestran que el marcador +49*A/G presenta asociación significativa con la enfermedad celíaca.

En la valoración de estos marcadores en aquellos pacientes que no poseían los alelos HLA clase II característicos observamos que no existía asociación. Aunque el número de familias era insuficiente para validar este test.

8.- DISCUSIÓN

No se han considerado en este estudio los factores ambientales (lactancia materna, edad de introducción del gluten, infecciones, vacunas,...) porque al ser un estudio retrospectivo se produce un gran sesgo, ya que depende de la memoria de los padres al realizar anamnesis de la historia clínica.

8.1.-CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN CELIACA ESTUDIADA

En cuanto a las características clínicas de la población celiaca estudiada pudimos observar que la prevalencia era mayor en mujeres, con una relación 1/1.8. Este hecho común en las enfermedades de origen autoinmune, concuerda con los datos de otras series publicadas previamente.

La edad media de inicio de los síntomas fue de 27 meses, siendo la edad media al diagnóstico de 37 meses. Al considerar por separado las formas clásicas y las atípicas se observó que existía una diferencia significativa, tanto de presentación como de diagnóstico, en la media de edad, con las reservas que suscita el establecer con rigor la edad de inicio de la enfermedad en las formas oligosintomáticas.

Aun así resulta llamativo que en ambos grupos el tiempo medio de

retraso en el diagnóstico fuese similar, lo que hablaría a favor de un alto índice de sospecha de la enfermedad por parte de los pediatras de nuestro entorno, pero por otro lado, de retrasos en el diagnóstico inaceptables, en lactantes con diarrea crónica y afectación nutricional.

Estas formas de presentación atípica, oligosintomáticas o silentes suponen un tercio de los casos (26.6%) y dentro de este grupo la causa más frecuente de consulta fue la anemia ferropénica, seguida de talla corta y de diabetes mellitus.

La mayoría de los pacientes, sin embargo, consultaron por la sintomatología clásica de pérdida de peso y diarrea. Esto es una constante en nuestro medio a diferencia de lo que ocurre en otros países (Olsson C, 2008), destacando así la implicación de factores ambientales o genéticos no conocidos.

En general y como se ha referido anteriormente, la edad de diagnóstico de las formas clásicas fue más precoz que en las formas oligosintomáticas, atípicas o silentes.

En cuanto a los resultados obtenidos en la analítica básica (hemograma, bioquímica sanguínea, hemostasia, niveles de vitamina B12 y ácido fólico e inmunoglobulinas) podemos destacar que las medias resultantes de estos parámetros, prácticamente permanecieron dentro de los rangos de referencia para cada una de las determinaciones. Por lo que parece que ninguna de estas pruebas complementarias resultaría útil en la aproximación diagnóstica de la EC.

Llama la atención la escasa expresividad biológica del síndrome de

malabsorción intestinal presentado por un número significativo de pacientes, siendo infrecuente la afectación de parámetros como niveles de hemoglobina, de albúmina, de vitamina B12 o ácido fólico. Ello podría estar en relación con el diagnóstico precoz en la mayoría de casos. La hemoglobina media permaneció dentro del rango; si bien el valor medio del VCM mostró una microcitosis, que a priori nos podría hacer sospechar una ferropenia, el valor medio de la sideremia fue normal. La anemia ferropénica refractaria al tratamiento fue el segundo motivo en frecuencia de sospecha de EC. Estos casos, como se comenta en los resultados, fueron un total de 11, con unos valores de hemoglobina que no llegaron a provocar anemias severas, por lo cual, tanto por número de casos, como por valores de la hemoglobina no llegarían a desviar el valor de hemoglobina del rango en el conjunto total de pacientes estudiados en nuestra muestra. Los valores medios de transaminasas también permanecieron dentro del rango. Esto iría en contra de lo referido en otras series, de que en casi todos los casos de EC estas se elevan ligeramente por encima de los valores normales. Si bien si valoramos los casos de pacientes con aumento de ALT o GPT, el porcentaje es de un 20,5%, siendo la única manifestación en un 0,5%. Son porcentajes algo inferiores a los referidos en otros estudios que hablan de hasta un 32% de casos de hipertransaminasemia prolongada y de un 4,3% como motivo de diagnóstico (Farré C, 2002). Lo que parece claro es que la EC debe ser valorada como uno de los primeros escalones en el estudio de los casos de hipertransaminasemia prolongada, ya que puede

suponer hasta un 4% de casos (Lo Iacono O, 2005).

Es llamativa la presencia de únicamente un paciente con déficit de IgA, ya que la asociación con la EC parece claramente demostrada y se habla de aproximadamente un 2% de casos de EC con déficit de IgA frente al 0,5% de nuestra serie (Dickey W, 1997).

Destaca también que aquellos pacientes con alteraciones en la coagulación eran en su mayoría diagnosticados en edades precoces, siendo la causa del déficit de Vitamina K atribuible a un problema malabsortivo severo más que a una evolución de la enfermedad sin diagnosticar prolongada.

Los marcadores serológicos han sido fundamentales para establecer el diagnóstico de sospecha de EC, al estar nuestra serie compuesta por pacientes de una serie histórica, alguno de ellos no tiene la determinación de ambos marcadores serológicos, ya que no fue hasta el año 1999 cuando se inició la determinación de ATGt en nuestro laboratorio.

Así observamos que el valor medio para ambos marcadores estaba por encima del rango de referencia establecido por edad y únicamente 11 pacientes presentaron alguno de los 2 marcadores negativo, y tan solo una paciente con déficit de IgA presentó ambos negativos. No se pudo valorar la existencia de ninguna característica ni clínica ni biológica en los pacientes con algún marcador serológico negativo diferente a la de aquellos pacientes con ambos marcadores positivos.

No pudimos establecer la especificidad en este estudio dado que carecemos de población control en el que se haya realizado

serología y estudio histológico. Aunque en nuestra unidad si se han realizado estudios de sensibilidad y especificidad para ambos marcadores estableciéndose para los AAG una sensibilidad entorno al 75% con una especificidad del 80%, mientras que para los ATGt la sensibilidad es de un 99% y especificidad de un 90% (Blesa L, 2008, Calzado M, 2008).

En nuestra serie observamos que el número de pacientes que presentaron los AAG negativos fue muy pequeño, tan solo 3 si descartamos el paciente con déficit de IgA, con una sensibilidad del 98%, frente al 93% de sensibilidad para los ATGt. Desde el punto de vista clínico estos 3 pacientes eran portadores del haplotipo DQ2 en homo o heterocigosis, 1 de 3 años con forma digestiva-nutricional y los otros 2 mayores de 10 años con formas oligosintomáticas.

Por el contrario encontramos una mayor proporción de niños que presentaron un resultado negativo para los ATGt al diagnóstico y si bien la mayoría, 6 de 8, eran menores de 3 años, destacan 2 casos en niños mayores. Los haplotipos HLA en esta subpoblación, excepto en un único paciente DQ2/DQ8 negativo, fueron DQ2 en homo o en heterocigosis.

Un estudio de nuestro grupo (Calzado M, 2008) demostró que en aproximadamente un 10% de los niños menores de 3 años existe una respuesta inmunológica peculiar en la que no se detecta producción de anticuerpos frente a TGt a nivel de sangre periférica; este fenómeno ha sido igualmente detectado por otro grupo de colegas suecos en una proporción similar (Lagerqvist C, 2008). Esta

observación tiene importantes implicaciones fisiopatológicas, puesto que a pesar de ser la TGt el autoantígeno de la EC, la producción de autoanticuerpos específicos no sería indispensable para el desarrollo de la enfermedad. Se ha especulado sin embargo con la posibilidad de una producción de autoanticuerpos a nivel de la mucosa intestinal, que quedarían atrapados in situ, no siendo detectables a nivel serológico (Kaukinen K, 2005; Tosco A, 2008).

Cuando comparamos la presencia de los distintos marcadores serológicos en función de la edad del paciente si que observamos diferencias discretamente significativas para los AAG frente a los ATGt en el grupo de menores de 3 años, esto significaría que este marcador presentaba un valor medio mayor en este grupo de edad. Al valorar estos dos marcadores en función de la forma de presentación de la enfermedad, encontramos que en las formas de presentación típicas la diferencia fue estadísticamente significativa en cuanto a la presencia de AAG, por el contrario no existían diferencias en las formas atípicas. Esto puede ser debido a dos motivos, por un lado a que el número de pacientes a los que se les determinó los ATGt fue inferior y por lo tanto existe un error en el tamaño de la muestra, y por otro lado a que dado que aquellos pacientes con clínica clásica, en general, son de menor edad, y ya hemos comentado previamente que los AAG destacan de forma estadísticamente significativa en este grupo, la diferencia fuese secundaria a la edad.

En todos los pacientes existía un lesión histológica grado 3 de Marsh, siendo más frecuente la presencia de un grado 3b. No hemos

podido demostrar diferencias en cuanto al grado de lesión histológica y la forma clínica de presentación, aunque a priori cabría pensar que a mayor manifestación clínica correspondería mayor lesión. Si pudimos observar, tanto para los AAG como para los ATGt, que a mayor grado de lesión la media de los resultados para ambos marcadores era mayor, aunque únicamente resultó estadísticamente significativa para los AAG. Esto no apoya los resultados de otros estudios donde a mayor ATGt mayor lesión histológica, aunque probablemente nuestros resultados se deban al menor tamaño de la muestra (Donaldson MR, 2008).

8.2.-ESTUDIO HLA

La enfermedad celiaca es una enfermedad compleja. Clásicamente se ha asociado a los antígenos del sistema HLA DQ2 (haplotipo extendido DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201) y DQ8 (DRB1*04-DQA1*03-DQB1*0302), siendo el riesgo atribuido al sistema HLA de un 40-50% del riesgo genético (Spurkland A, 1997). Sin embargo, al no ser la distribución geográfica de estos antígenos homogénea, se ha buscado la asociación de la EC con otros loci, aunque la implicación global de estos últimos probablemente se haya sobreestimado. En cuanto a los antígenos de sistema HLA estudiados, en nuestra población hemos encontrado asociación individual entre la EC y los alelos de riesgo DRB1*03, DRB1*07, DRB3*, DQB1*0201, DQB1*0202 y DQA1*0501 descritos en otras poblaciones (Tighe MR, 1992; Congia M, 1992; Michalski JP, 1996; Herrera M, 1994; Tighe MR, 1993). Sin

embargo no encontramos asociación con los alelos DRB1* 04, DQB1*0302 ni DQA1*0301-03, que codificarían para la molécula heterodimera DQ8, porque aunque un 5.4% de los pacientes poseen el haplotipo DR*04-DQB1*0302-DQA1*03 la distribución es inferior a la de la población control (15.5%). En otras poblaciones españolas como la de Gran Canaria tampoco encuentran asociación de EC con DQ8, ya que ninguno de sus pacientes era portador de dicho haplotipo frente a un 14% de portadores en el grupo control (Peña-Quintana L, 2003). Este bajo número de pacientes DQ8 puede deberse a la distinta distribución geográfica, ya que se ha publicado que en poblaciones como la norte-americana (Johnson TC, 2004) o la chilena existe un gran número de pacientes con EC y que son portadores de DQ8, de hecho en esta última la EC está asociada de forma primaria con este haplotipo (Perez-Bravo F, 1999).

Por otro lado en nuestra muestra tan solo un 3.2% de los pacientes está afecto de DMT1 (Diabetes mellitus tipo1), grupo en el que clásicamente se ha asociado este haplotipo (Undlien DE, 1999). Además en nuestra población de pacientes celíacos estudiada, ningún paciente diabético presenta el haplotipo DRB1*04/DQB1*0302/DQA1*03. A pesar de que el despistaje de la EC forma parte de los controles habituales de los diabéticos en nuestro centro.

No hemos encontrado asociación significativamente estadística con los alelos DQA1*0505, DRB1*01, DRB1*04, DRB1*13, DRB1*15, DQB1*0302, DQB1*0303, DQB1*05, DQB1*06, DQA1*0101, DQA1* 0102, DQA1*0103, DQA1* 0301. No esta

claro si esto es debido a un efecto protector o bien como compensación por un aumento de los otros alelos. Es llamativa la no asociación individual del alelo DQA1*0505 por si mismo.

Los distintos alelos se agrupan en haplotipos. En nuestra población la distribución de los mismos difiere ligeramente de lo referido en otras muestras poblacionales, porque, aunque el 92.9% son portadores de DQ2 y el 69.7% de los pacientes presentan el haplotipo DR3-DQ2, existe un número importante de pacientes con el haplotipo DR7-DQ2 (47.5%). Este último está asociado en la mayoría de los casos (excepto en tres) con los haplotipos DR3-DQ2 o DRB1*11 (DR5 serológico), DQB1*0301-DQA1*0505 (35/185-18.9%), aunque estos últimos alelos no presentan por si mismos asociación estadísticamente significativa con la EC. Esta distribución alélica en pacientes que portan el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 asociado con DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505 ha sido descrita previamente en otras poblaciones del área Mediterránea, en países como Italia, Francia o Túnez, frente a las poblaciones del norte de Europa en las que la prevalencia del haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 es mayor (Mearin ML, 1985 Jan) (Mearin ML, 1983) (Margaritte- Jeanning, P, 2004). Aunque de forma aislada los alelos no presentan asociación con EC, el haplotipo DR4-DQ8 se detecta en un 5.4% de los pacientes (en un 60% de estos casos junto con DQ2) y es el más frecuente de los DQ2 negativos.

De acuerdo con nuestros resultados, en aquellos pacientes que no son portadores de los alelos asociados a la enfermedad, el

diagnóstico de la misma difícilmente se puede sustentar dado que únicamente 1.6% de todos los pacientes no portan alguno de los mismos. Aunque si miramos en detalle a estos sujetos, como se ha referido en otras series (Karell K, 2003) 2 de los tres portan el alelo DQA1*0505 (que codifica la mitad de la molécula heterodímera DQ2). En uno de estos pacientes además el otro haplotipo es DR*04-DQB1*04-DQA1*03, muy similar al que codifica para la molécula DQ8 (DR*04-DQB1*0302-DQA1*03). Este porcentaje aumenta a 3,2% si consideramos también 3 sujetos que únicamente portan el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201. Estos porcentajes son inferiores a los reflejados en un estudio Europeo multicéntrico en el que los DQ2/DQ8 negativos alcanzaban hasta un 6%, siendo los países con mayor número de casos los del sur de Europa. En este mismo estudio se comenta la posibilidad de que en estos pacientes exista un papel fundamental del gen DRB4 que codifica la molécula DR53 y esta sería capaz de ligar péptidos de gliadina; de nuestros pacientes DQ2/DQ8 negativos solamente 1 es portador de este gen, aumentando a 4 si consideramos a los que portan el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201, esto se debe probablemente al desequilibrio de ligamiento que existe entre DRB1*04 y DRB1*07 y este gen DRB4 (Karell K, 2003) (Polvi A, 1998).

En nuestra población control el 35% es portadora del haplotipo DQ2 o DQ8, porcentaje ligeramente superior al referido en la literatura (Sollid LM, 2000).

El desequilibrio de ligamiento valora la asociación entre marcadores

no debida al azar. Si valoramos los haplotipos con mayor asociación con la EC que son el DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 y el DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201, observamos que presentan un fuerte desequilibrio de ligamiento en ambos grupos tanto en casos como en controles, pero las frecuencias genotípicas de los haplotipos son mayores en los casos que en los controles. De hecho encontrar estos alelos en haplotipos distintos a los referidos es muy raro. En el caso del haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 la frecuencia de asociaciones “raras” es de un 1.08% para los casos y de un 8.7% en los controles, mientras que para el haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 la frecuencia en casos es de 1.08% y en controles de 2.5%.

Para saber si la asociación implica a un factor HLA mientras los otros están asociados de forma secundaria, o si bien se requiere la presencia simultanea de dos factores o al haplotipo completo se ha realizado un test de independencia según el método descrito por Svejaard and Ryder (Svejaard A, 1994). Mostramos por primera vez que la susceptibilidad para la EC en el caso del haplotipo DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501 no se asocia de forma primaria con ninguno de los loci estudiados sino que encontramos asociación con el haplotipo completo, siendo imposible encontrar que alelo posee una asociación mayor. Aunque el riesgo relativo para DQB1* 0201 es mayor. Por el contrario en el caso del test de independencia para el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201, no encontramos diferencias entre DQB1*0202 y DQA1*0201, sin embargo la asociación con DRB1*07 es

secundaria a DQB1/DQA1.

Se observa un efecto sinérgico en la combinación genotípica de los distintos haplotipos, puesto que el riesgo conferido es muy superior al esperado de doble dosis de cada haplotipo marcador. Así los haplotipos DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 y DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505 por si mismos tienen un riesgo relativo negativo, pero cuando se combinan este aumenta hasta 6.8. Esto se explica porque codificarían la molécula heterodímera en trans.

Por otro lado el haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 y el DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 cuando se combinan el RR aumenta hasta casi el doble si lo comparamos al RR de cada alelo en homocigosis, este efecto sinérgico se ha referido en otra poblaciones como la tunecina (Bouguerra F, 1997).

Esto podría explicar la presentación de mayor número y mayor diversidad de epítomos de gliadina por distintas moléculas DQ2. Ya que se combinarían formando distintos heterodímeros DQ2, la cadena α^*0501 con la $\beta^* 0201$ y con la $\beta^* 0202$, la cadena α^*0505 se puede combinar con las cadenas $\beta^* 0201$ y $\beta^* 0202$ y la cadena α^*0201 se puede combinar con la cadena $\beta^* 0202$ (Koning F, 2005). Aunque DQA1*0501 y DQA1*0505 difieren únicamente en un péptido y, DQB1*0201 y DQB1*0201 codifican una cadena beta que es idéntica salvo por un residuo en la membrana proximal, es poco probable que estas diferencias muestren funciones distintas (Louka AS, 2003).

En muchos estudios se ha observado un incremento en el riesgo de EC en aquellos sujetos homocigotos para DR3-DQ2 (Ploski R,

1993; Arranz E, 1997).

Nosotros encontramos un riesgo más elevado para aquellos pacientes portadores DR3-DQ2 junto con DR7-DQ2 probablemente esto se deba a que en la valoración de los homocigotos se ha considerado a aquellos sujetos portadores del alelo DQB1*02, independientemente del haplotipo en el que este alelo se encontraba, es decir, independientemente de si el alelo era DQB1*0201 o DQB1*0202 y por tanto portado en haplotipos distintos, DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 o DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0505. De hecho, en estudios recientes realizados en población escandinava (Louka AS, 2002) y mediterránea (Hernandez-Charro B, 2008), fue investigado el riesgo de EC para cualquier portador del haplotipo DRB1*03-DQB1*0201- DQA1*0501. Encontrando mayor riesgo si el segundo haplotipo era DR7-DQ2 y DR3-DQ2 y comprobando que cualquier otro haplotipo no modificaba el riesgo.

El estudio de homocigotos para el haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 proporcionó una cifra ligeramente inferior a la que cabría esperar según sus frecuencias génicas. Esto significa que independientemente del alelo responsable de la asociación con la enfermedad el factor de susceptibilidad no parece recesivo, ya que solo es necesaria la presencia de un haplotipo para el desarrollo de la enfermedad, aunque la combinación de haplotipos pueda aumentar el riesgo.

El tipaje de los alelos HLA en la EC nos reporta un alto valor predictivo negativo, como ocurre en otras enfermedades ligadas al

sistema HLA como la narcolepsia (Planelles, 1997), por lo que puede servir como guía para el despistaje de la EC en familiares y grupos de riesgo o en aquellos casos con dudas diagnósticas (Kaukinen K, 2002; Sollid LM, 2005), pero valorando de forma cautelosa los resultados en aquellos grupos de riesgo en los que los también existe predisposición genética mediada a través de los alelos de riesgo HLA, como es el caso de la DMID o la enfermedad de Graves por ejemplo (Contreas G, 2004).

8.3.-HAPLOTIPOS HLA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Aunque ya fue descrita en 1984 la posible influencia del genotipo con los factores clínicos e inmunológicos (Mearin ML, 1984) los estudios al respecto son discordantes, mientras algunos autores encuentran una clara influencia entre genotipo, doble dosis del gen DQB1*02 y formas clásicas (Zubillaga P, 2002; Marinen H, 2006), otros (Greco L, 1998; Vermeulen B, 2009) no pueden demostrar ninguna relación. En nuestra serie no podemos establecer diferencias entre las manifestaciones clínicas (edad, forma de presentación, histología) y la combinación de haplotipos de los sujetos estudiados. Observamos que sorprendentemente aquellos pacientes con doble carga DQ2 no presentan formas de debut precoz, no relacionándose esta doble carga genética tampoco con un mayor grado lesión histológica, como se observa en otras series (Jore RD, 2007) si bien en nuestros pacientes por ser un estudio retrospectivo no se han registrado casos de lesión grado 3c de

Marsh. Tampoco podemos relacionar la forma clínica o la severidad del cuadro con el haplotipo.

8.4.-ESTUDIO HLA EN FAMILIARES

Hemos observado que la frecuencia en nuestra población de celíacos de tener un familiar afecto en primer grado es de un 9,7% y de que este sea en 2º grado es de 4,8%, siendo en global de un 14.5%, que resulta aproximadamente lo que se refiere en otras series (Karinen H, 2006). Si calculamos el riesgo de recurrencia en familiares este es de un 7.5%, algo inferior a lo descrito en otras series (Bourgey M, 2007).

Sin embargo destaca de forma llamativa la diferencia fenotipo-genotipo que presentan algunas familias, así si bien es habitual que la forma de presentación entre un niño y su progenitor difiera, presentando el niño una sintomatología clásica y el adulto atípica, no es tan común que entre hermanos en edad pediátrica existan diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas y menos en cuanto al tipaje HLA. Tal como hemos valorado en alguna de nuestras familias en las que a igual genotipo la forma de debut era diferente y viceversa con clínica similar el genotipo no era coincidente. Con esto se pone de manifiesto la implicación de otros factores genéticos en la patogénesis de la EC y no tanto de factores ambientales puesto se supone que en una misma familia estos últimos deben ser similares. En cuanto a los antígenos HLA estudiados, observamos al comparar casos y familiares, resultados similares a los obtenidos cuando comparamos casos y controles, ya

que observamos que existe asociación de los enfermos con los alelos DRB1*03, DRB1*07, DRB3*, DQB1*0201, DQB1*0202 y DQA1*0501. Aunque también con DRB1*11 y con DQA1* 0201. También observamos como es significativa la presencia de los alelos DRB1*04 y DQB1*0302. Si, por el contrario, comparamos los antígenos HLA en los familiares y en los controles, únicamente destaca la mayor asociación de los alelos DRB1*04, DQB1*0302 y DQA1*0501, en los familiares.

Un 77.2 % de los familiares presentan alguno de los haplotipos asociados a la enfermedad (padres 80.7%, hermanos 68.8%), siendo el más prevalente el haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501. Si realizamos el estudio HLA en los familiares como despistaje de EC en un 22,7% se excluiría la enfermedad no precisando seguimiento clínico ni serológico.

Igualmente la disponibilidad de métodos con alto grado de eficacia, automatizados y bajo coste económico, supone un ahorro económico importante en aquellos casos en los que se desestima la posibilidad de un seguimiento posterior. Por otro lado, la determinación de marcadores serológicos como método de despistaje en grupos de riesgo tiene el inconveniente tanto de la posibilidad, aunque reducida, de falsos negativos, como el que un resultado negativo solo tiene un valor puntual no descartando la posibilidad de desarrollo de la enfermedad tanto a corto como a largo plazo.

En un estudio reciente (Bourgey M, 2007), se establece el riesgo de recurrencia de EC en hermanos de pacientes afectados en función del

genotipo de padres y hermanos, este riesgo no supera en ningún caso el 30% y serviría, más que para un consejo genético que en esta enfermedad no estaría indicado, si para establecer medidas “preventivas” como la lactancia materna y para seleccionar aquellos sujetos que precisaran seguimiento serológico.

8.4.-LOCUS CTLA 4

En los resultados que hemos obtenido con nuestro estudio hemos visto que, en el caso del marcador +49*A/G, existe una transmisión mayor estadísticamente significativa del alelo A frente al alelo G a los individuos afectados de enfermedad celiaca. Aún así, esto no implica que aquellos individuos que fueran portadores de este alelo sean, a su vez, enfermos. Además el alelo +49*A no está ligado a la enfermedad, como ocurre con el genotipo DQ2, por tanto no podemos utilizarlo como un marcador predictivo.

El gen CTLA-4 codifica una molécula de superficie de linfocitos T implicada en la inhibición de la respuesta inmunológica, de ahí su interés de estudio en enfermedades de carácter autoinmune. Nuestros resultados preliminares con una muestra pequeña sugieren un posible papel del locus CTLA-4 en la patogénesis de la EC en la población valenciana, en el que profundizaremos en futuros estudios. La muestra será ampliada en la tesis de Amalia Capilla así como la implicación de otros marcadores del locus CTLA4.

9.- CONCLUSIONES

1. La enfermedad celiaca en nuestra muestra presenta una mayor prevalencia en mujeres, la forma de presentación más frecuente es la clásica y la edad media de inicio de los síntomas de 27 meses. Todos los pacientes presentaron una lesión histológica grado 3 de Marsh.
2. La analítica básica complementaria no resultó útil en la aproximación diagnóstica de la EC.
3. Todos los pacientes presentaron alguno de los marcadores serológicos positivos, excepto un caso con déficit de IgA. En los pacientes con algún marcador serológico negativo no existe ninguna característica ni clínica ni biológica que los diferencie del resto. Todos los pacientes con AAG negativos eran niños mayores de 3 años. Observamos que a mayor grado de lesión histológica la media de los resultados tanto para los AAG como para ATGt fue mayor, aunque únicamente estadísticamente significativa para los AAG.
4. En nuestra población hemos encontrado asociación individual entre la EC y los antígenos de sistema HLA DRB1*03, DRB1*07, DRB3*, DQB1*0201, DQB1*0202 y DQA1*0501, sin embargo, no encontramos asociación con los alelos DRB1*04, DQB1*0302 ni DQA1*0301-03, que codificarían para la molécula heterodímera DQ8.
5. El 92.9% de los sujetos son portadores de DQ2 y el 69.7% de los pacientes presentan el haplotipo DR3-DQ2, existiendo un

número importante de pacientes con el haplotipo DR7-DQ2/DR5-DQ7 que codificarían para la molécula heterodímera DQ2 en trans (18.9%). El 3.7% son positivos para DQ8 y negativos para DQ2. Únicamente 1.6% de todos los pacientes no porta alguno de haplotipos asociados clásicamente a la EC.

6. Los haplotipos DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 y DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 presentan un fuerte desequilibrio de ligamiento (estadísticamente significativo) tanto en casos como en controles.

7. La susceptibilidad para la EC en el caso del haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 no se asocia de forma primaria con ninguno de los loci estudiados sino con el haplotipo completo. Por el contrario en el caso del haplotipo DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201, la asociación con DRB1*07 es secundaria a DQB1/DQA1.

8. Existe un fuerte efecto sinérgico en la combinación de haplotipos, siendo especialmente llamativa la combinación de los haplotipos DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 con DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 y de DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 con DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505. Presentando estas combinaciones un riesgo relativo muy superior al de cada haplotipo en homocigosis.

9. El tipaje de los alelos HLA en la EC nos reporta un alto valor predictivo negativo siendo útil como guía para el despistaje de la EC en familiares y grupos de riesgo o en aquellos casos con dudas diagnósticas.

10. El factor HLA de susceptibilidad para la enfermedad no parece recesivo ya que solo es necesaria la presencia de un haplotipo para el desarrollo de la misma.
11. No encontramos asociación entre las diversas combinaciones de haplotipos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Sorprendentemente aquellos pacientes con doble carga DQ2 no presentan formas de debut precoz.
12. La frecuencia en nuestra población de tener un familiar afecto en primer o segundo grado es de un 14.5%, siendo el riesgo de recurrencia en familiares de un 7.5%.
13. Es posible que miembros afectados de EC dentro de una misma familia presenten diferencias de fenotipo y genotipo.
14. Un 77.2 % de los familiares de pacientes con EC presentan alguno de los haplotipos asociados a la enfermedad (padres 80.7%, hermanos 68.8%), siendo el más prevalente el haplotipo DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501. Si realizamos el estudio HLA en los familiares como despistaje de EC en un 22,7% se excluiría la enfermedad no precisando seguimiento clínico ni serológico.
15. En el estudio del locus CTLA-4, existe una transmisión estadísticamente significativa mayor del alelo A frente al alelo G a los individuos afectados de enfermedad celíaca en el caso del marcador +49*A/G.

10.- BLIBIOGRAFÍA

1. Alexander EL, Bias WB, Arnett FC. The coexistence of rheumatoid arthritis with Reiter's syndrome and/or ankylosing spondylitis: a model of dual HLA-associated disease susceptibility and expression. *J Rheumatol.* 1981 May-Jun;8(3):398-404.
2. Amundsen SS, Naluai AT, Ascher H, Ek J, Gudjonsdottir AH, Wahlstrom J, Lie BA, Sollid LM. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens.* 2004 Nov;64(5):593-9.
3. Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of coeliac disease: Association with gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential coeliac disease. *Gut* 1994; 35: 476-482.
4. Arranz E, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: Occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterology* 1993; 104: 1263-1272.
5. Arranz E, Ferguson A. Jejunal fluid antibodies and mucosal gamma/delta IEL in latent and potential coeliac disease. *Adv Exp Med Biol* 1995; 371B: 1345-1348.
6. Arranz E, Telleria JJ, Sanz A, Martin JF, Alonso M, Calvo C, et al. HLA-DQA1*0501 and DQB1*02 homozygosity and disease susceptibility in Spanish coeliac patients. *Exp Clin Immunogenet.* 1997;14(4):286-90.
7. Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen TS, Ekstrom K,

- Ekbom A. Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology*. 2002 Nov; 123(5):1428-35.
8. Barbato M, Viola F, Miglietta MR. Value of AGA in latent coeliac disease. Nápoles: Eighth International Symposium on Coeliac disease, 1999; 207.
 9. Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, et al. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J. Med Genet* 1999; 36: 687-90.
 10. Blesa Baviera LC, Donat Aliaga ED, Ortigosa L, Litwin N, Peña-Quintana L, Méndez V, González MV, López-Manzanares JM, Méndez E, Ribes Koninckx CR. Celiac disease screening by immunochromatographic visual assays: results of a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 Nov;45(5):546-50.
 11. Bossu M, Bartoli A, Orsini G, Luppino E, Polimeni A. Enamel hypoplasia in coeliac children: a potential clinical marker of early diagnosis. *Eur J Paediatr Dent*. 2007 Mar; 8(1):31-7.
 12. Bouguerra F, Babron MC, Eliaou JF, Debbabi A, Clot J, Khaldi F, Greco L, Clerget-Darpoux F. Synergistic effect of two HLA heterodimers in the susceptibility to celiac disease in Tunisia. *Genet Epidemiol*. 1997;14(4):413-22.
 13. Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C,

- Troncone R, Spampinato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L. HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*. 2007 Aug; 56(8):1054-9.
14. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*. 1973 Apr 28; 1(7809):904-7.
 15. Brousse N, Meijer JW. Malignant complications of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005 Jun;19(3):401-12.
 16. Buyse I, Decorte R, Baens M, Cuppens H, Semana G, Emonds MP, Marynen P, Cassiman JJ. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens*. 1993 Jan; 41(1):1-14.
 17. Calero P, Ribes-Koninckx C, Albiach V, Carles C, Ferrer J. IgA antigliadin antibodies as a screening method for nonovert coeliac disease in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996 Jul;23(1):29-33.
 18. Calzado M, Donat E, Polo B, Baena B, Ribes C. Immunological response in coeliac disease is age related. *Proc Nutr Soc*. 2008 May;67(OCE):E30.
 19. Castaño L, Blarduni E, Ortiz L, Núñez J, Bilbao JR, Rica I, Martul P, Vitoria JC. Prospective population screening for coeliac disease: high prevalence in the first 3 years of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004 Jul;39(1):80-4.
 20. Catassi C, Bearzi I, Holmes GK. Association of coeliac disease

- and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology*. 2005 Apr; 128(4 Suppl 1):S79-86.
21. Catassi C, Fabiani E, Rátsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, Alessandrini S, Iwanejko G, Domenici R, Mei E, Miano A, Marani M, Bottaro G, Spina M, Dotti M, Montanelli A, Barbato M, Viola F, Lazzari R, Vallini M, Guariso G, Plebani M, Cataldo F, Traverso G, Ventura A, et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl*. 1996 May; 412:29-35.
 22. Catassi C, Ratsch IM., Fabiani E., Rossini M., Bordicchia F., Candela F., Giorgi PL. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 343: 200.2. 2.
 23. Ceppellini R, van Rood JJ. The HLA system. I. Genetics and molecular biology. *Semin Hematol*. 1974 Jul; 11(3):233-51
 24. Cilleruelo Pascual ML, Roman Riechmann E, Jimenez Jimenez J, Rivero Martin MJ, Barrio Torres J, Castaño Pascual A, Campelo Moreno O, Fernandez Rincon. Silent celiac disease: exploring the iceberg in the school-aged population. *An Esp Pediatr*. 2002 Oct; 57(4):321-6.
 25. Clerget-Darpoux F. Synergistic effect of two HLA heterodimers in the susceptibility to celiac disease in Tunisia. *Genet Epidemiol*. 1997; 14(4):413-22.9.
 26. Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Renoux C, Percopo S, Bouguerra F, Babron MC, Djilali-Saiah I, Caillat-Zucman S, Clerget-Darpoux F, Greco L, Serre JL. Linkage and

- association study of the CTLA-4 region in coeliac disease for Italian and Tunisian populations. *Tissue Antigens*. 1999 Nov;54(5):527-30.
27. Collin P, Helin H, Mäki M, Hallstrom O, Karvonen AL. Follow-up of patients positive in reticulin and gliadin antibody tests with normal small-bowel biopsy findings. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 595-598.
28. Collin P, Kaukinen K, Valimäki M, Salmi J. Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocr Rev*. 2002 Aug;23(4):464-83.
29. Congia M, Frau F, Lampis R, Frau R, Mele R, Cucca F, Muntoni F, Porcu S, Boi F, Contu L. A high frequency of the A30, B18, DR3, DRw52, DQw2 extended haplotype in Sardinian celiac disease patients: further evidence that disease susceptibility is conferred by DQ A1*0501, B1*0201. *Tissue Antigens*. 1992 Feb; 39(2):78-83.
30. Contreas G, Valletta E, Ulmi D, Cantoni S, Pinelli L. Screening of coeliac disease in north Italian children with type 1 diabetes: limited usefulness of HLA-DQ typing. *Acta Paediatr*. 2004 May;93(5):628-32.
31. Corazza GR, Di Stefano M, Maurino E, Bai JC. Bones in coeliac disease: diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005 Jun; 19(3):453-65.
32. Csizmadia CG, Mearin ML, von Blomberg BM, Brand R, Verloove-Vanhorick SP. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *Lancet*. 1999 Mar 6;

353(9155):813-4.

33. Dickey W, McMillan SA, McCrum EE, Evans AE. Association between serum levels of total IgA and IgA class endomysial and antigliadin antibodies: implications for celiac disease screening. *Eur. J. Gastroenterol. & Hepatol.* 1997; 9: 559-62
34. Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R. Coeliac disease: an update for pathologists. *J Clin Pathol.* 2006 Oct;59(10):1008-16.
35. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801.
36. Diosdado B, Wapenaar MC, Franke L, Duran KJ, Goerres MJ, Hadithi M, Crusius JB, Meijer JW, Duggan DJ, Mulder CJ, Holstege FC, Wijmenga C. A microarray screen for novel candidate genes in coeliac disease pathogenesis. *Gut.* 2004 Jul; 53(7):944-51.
37. Donaldson MR, Book LS, Leiferman KM, Zone JJ, Neuhausen SL. Strongly positive tissue transglutaminase antibodies are associated with Marsh 3 histopathology in adult and pediatric celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2008 Mar;42(3):256-60.
38. Dong RP, Kimura A, Okubo R, Shinagawa H, Tamai H, Nishimura Y, Sasazuki T. HLA-A and DPB1 loci confer susceptibility to Graves' disease. *Hum Immunol.* 1992 Nov;35(3):165-72.

39. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Sapone ATA, Thakar M, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2006; 41(4): 408-19.
40. Duquesnoy, R.J & Tranetzki , M.S (1983) Determination of the probability of exclusion by the HLA system in cases of disputed parentage. In: *Inclusion probabilities in Parentage testing* (ed. By R.H. Walker), p. 305. American Association of Blood Banks, VA.
41. Eliakim R, Sherer DM. Celiac disease: fertility and pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 2001; 51(1):3-7.
42. Farmakis E, Puntis JW, Toumba KJ. Enamel defects in children with coeliac disease. *Eur J Paediatr Dent.* 2005 Sep;6(3):129-32.
43. Farre C, Esteve M, Curcoy A, Cabre E, Arranz E, Amat LL, Garcia-Tornel S. Hypertransaminasemia in pediatric celiac disease patients and its prevalence as a diagnostic clue. *Am J Gastroenterol.* 2002 Dec; 97(12):3176-81
44. Farrell RJ, Ciarán PK. Current Concepts: Celiac Sprue. *N Engl J Med* 2002; 346(3): 180-8.
45. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000; 355: 1518-19.
46. Fasano A. European and North American populations should

- be screened for coeliac disease. *Gut*. 2003 Feb;52(2):168-9.
47. Fasano A. Modulation of intestinal permeability: an innovative method of oral drug delivery for the treatment of inherited and acquired human diseases. *Mol Genet Metab* 1998; 64(1): 12-8.
 48. Ferguson A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 1977; 18(11): 921-37.
 49. Ferguson A., Arranz E., O'Magibú S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut* 1993; 34:150-51.
 50. Galeazzi M, Sebastiani GD, Passiu G, Angelini G, Delfino L, Asherson RA, Khamashta MA, Hughes GR. HLA-DP genotyping in patients with systemic lupus erythematosus: correlations with autoantibody subsets. *J Rheumatol*. 1992 Jan;19(1):42-6.
 51. Garcia-Urkiá N, Vitoria JC. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002 May; 34(5):548-54.
 52. Giphart MJ, van der Poel JJ. Molecular biology of the HLA system and its relevance for immunohaematology. *Baillieres Clin Haematol*. 1991 Dec; 4(4):975-1010.
 53. Gobbi G, Bouqut F, Greco L, Lambertini A, Tassinari CA, Ventura A, et al. The Italian Working group on Coeliac Disease and Epilepsy. *Lancet* 1992; 340: 439-443.
 54. Goggins MMB., Dermot D. Celiac disease and other nutrient related injuries to the gastrointestinal tract. *AJG* 1994: Vol.

89: S2-S9.

55. Greco L, Percopo S, Clot F, Bouguerra F, Babron MC, Eliaou JF, Franzese C, Troncone R, Clerget-Darpoux F. Lack of correlation between genotype and phenotype in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998 Mar; 26(3):286-90.
56. Greco L., Babron MC., Corazza GR., Percopo S., Sica R., Clot F., Fulchignoni Lataud MC., Zavattari P., Momigliano-Richiardi P., Casari G., Gasparini P., Tosi R., Mantovani V., De Virgiliis S., Iacono G., D'Alfonso A., Selinger-Leneman H., Lemainque A., Serre JL., Clerget-Darpoux F. Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families. *Ann Hum Genet* 2001; 65: 35-41.
57. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Oct; 283(4):G996-G1003.
58. Hernandez-Charro B, Donat E, Miner I, Aranburu E, Sanchez Valverde F, Ramos-Arroyo M. Modifying effect of HLA haplotypes located trans to DQB1*02-DRB1*03 in celiac patients of Southern Europe. *Tissue Antigens* 2008 ; 71 : 213-8.
59. Herrera M, Theiler G, Augustovski F, Chertkoff L, Fainboim L, DeRosa S, Cowan EP, Satz ML. Molecular characterization of HLA class II genes in celiac disease patients of Latin American Caucasian origin *Tissue Antigens* 1994 Feb;43(2):83-7.

60. Hervonen K., Karell K., Holopainen P., Collin P., Partanen J., Reunala T. Concordance of dermatitis herpetiformis and celiac disease in monozygous twins. *J. Invest Dermatol* 2002; 115: 990-993.
61. Hjadjivassiliou M, Davis-Jones GA, Sanders DS, Grunewald RA. Dietary treatment of gluten ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:1221-4
62. Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D, Allan RN. Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet. *Gut*. 1989 Mar;30 (3):333-8.
63. Holmes GKT. Non-malignant complications of coeliac disease. *Acta Paediatr Supplement* 1996; 412:54.
64. Holopainen P, Arvas M, Sistonen P, Mustalahti K, Collin P, Maki M, Partanen J. CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens*. 1999 May; 53(5):470-5.
65. Holopainen P, Mustalahti K., Uimari P., Collin P., Maki M., Partanen J. candidate gene regions and genetic heterogeneity in gluten sensitivity. *Gut* 2001; 48: 696-701.
66. Hu CHY, Allen M, Chuang LM, Lin BJ, Gyllensten U. Association of insulin-dependent diabetes mellitus in Taiwan with HLA class II DQB1 and DRB1 alleles. *Hum Immunol* 1993; 38: 105-14.
67. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous

- atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004;21(3): 367-77.
68. Ivarsson A, Hernell O, Nystrom L, Persson LA. Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *J Epidemiol Community Health*. 2003 Jan;57(1):36-9.
69. Ivarsson A, Hernell O, Stendlund H., Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 914-21.
70. Janatuinen EK., Kempainen TA., Julkunen RJ., et al. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 332-5act. *AJG* 1994: Vol. 89: S2-S9.
71. Johnson TC, Diamond B, Memeo L, Negulescu H, Hovhanissyan Z, Verkarre V, et al. Relationship of HLA-DQ8 and severity of celiac disease: comparison of New York and Parisian cohorts. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004 Oct;2(10):888-94.
72. Jores RD, Frau F, Cucca F, Grazia Clemente M, Orrù S, Rais M, De Virgiliis S, Congia M. HLA-DQB1*0201 homozygosis predisposes to severe intestinal damage in celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2007 Jan;42(1):48-53.
73. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003 Apr; 64(4):469-77.
74. Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, Kosma VM, Naukkarinen A,

- Laakso M. Gene dose effect of the DQB1*0201 allele contributes to severity of celiac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Feb;41(2):191-9.
75. Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, Kosma VM, Naukkarinen A, Laakso M. HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for coeliac disease in the 1st-degree relatives of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Nov;41(11):1299-304.
76. Kaukinen K, Partanen J, Maki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2002 Mar;97(3):695-9.
77. Kaukinen K, Peräaho M, Collin P, Partanen J, Woolley N, Kaartinen T, Nuutinen T, Halttunen T, Mäki M, Korponay-Szabo I. Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scand J Gastroenterol.* 2005 May;40(5):564-72.
78. Kawasaki, E.S. (1990) Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (ed. By M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White) p. 146. Academic Press, New York.
79. Kilmartin C, Lynch S, Abuzakouk M, Wieser H, Feighery C. Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following in vitro culture. *Gut* 2003; 52: 47-52.
80. King AL, Moodie SJ, Fraser JS, Curtis D, Reid E, Dearlove

- AM, Ciclitira PJ. Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA4 gene region. *Eur J Immunogenet.* 2003 Dec; 30(6):427-32.
81. King AL., Yiannakou JY., Brett PM., Curtis D., Morris MA., Dearlove AM., Rhodes M., Rosen.Bronson S., Mathew C., Ellis HJ., Ciclitira PJ. A genome-wide family-based linkage study of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 2000; 64: 479-490.
82. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005 Jun; 19(3):373-87.
83. Koning F. Celiac disease: caught between a rock and a hard place. *Gastroenterology.* 2005 Oct; 129(4):1294-301.
84. Kumar PJ. European and North American populations should be screened for coeliac disease. *Gut.* 2003 Feb;52(2):170-1.
85. Kutlu T, Brousse N, Rambaud C, Le Deist F, Schmitz J and Cerf-Bensussan N. Numbers of T cell receptor (TCR) alpha beta+ but not of TcR gamma delta+ intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut* 1993;34(2): 208-14.
86. Lagerqvist C, Dahlbom I, Hansson T, Jidell E, Juto P, Olcén P, Stenlund H, Hernell O, Ivarsson A. Antigliadin immunoglobulin A best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Oct;47(4):428-35.
87. Lie BA., Sollid LM., Ascher H., Ek J., Akselen HE.,

- Ronningen KS., Thorsby E., Undlien DE. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* 1999; 54: 162-168.
88. Lionetti P. The enteropathy of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34 Suppl 1: S18-21.
89. Liu J, Juo SH, Holopainen P, Terwilliger J, Tong X, Grunn A, Brito M, Green P, Mustalahti K, Maki M, Gilliam TC, Partanen J. Genomewide linkage analysis of celiac disease in Finnish families. *Am J Hum Genet.* 2002 Jan; 70(1):51-9. Epub 2001 Nov 19.
90. Lo Iacono O, Petta S, Venezia G, Di Marco V, Tarantino G, Barbaria F, Mineo C, De Lisi S, Almasio PL, Craxi A. Anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with abnormal liver tests: is it always coeliac disease? *Am J Gastroenterol.* 2005 Nov; 100(11):2472-7.
91. Louka AS, Nilsson S, Olsson M, Talseth B, Lie BA, Ek J, Gudjónsdóttir AH, Ascher H, Sollid LM. HLA in coeliac disease families: a novel test of risk modification by the 'other' haplotype when at least one DQA1*05-DQB1*02 haplotype is carried. *Tissue Antigens.* 2002 Aug;60(2):147-54.
92. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens.* 2003 Feb; 61(2):105-17.
93. Lulli P, Cappellacci S, Morellini M, Galeazzi M, Schiavetti L, Tuzi T. HLA antigens and rheumatoid arthritis. *Arthritis*

- Rheum. 1983 Aug; 26(8):1053-4.
94. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S and Londei M. Interleukin 15 mediate epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 2000; 119(4): 996- 1006.
 95. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Maki M., Holm K., Lipsanen V., Hallstrom O., Viander M., Collin P., Savilahti E., Koskimies S. Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives of patients with coeliac disease. *Lancet* 1991; 338: 1350-1353.
 96. Margaritte- Jeanning, P, Brabon MC, Bourgey M, et al. HLA-DQ relative risks for celiac disease in European populations: a study of the European genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004; 63: 562-7.
 97. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and Immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (“Celiac Sprue”). *Gastroenterology* 1992; 102:330-54.
 98. Martín-Pagola A, Pérez de Nanclares G, Vitoria JC, Bilbao JR, Ortiz L, Zubillaga P, Castaño L.No association of CTLA4 gene with celiac disease in the Basque population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003 Aug;37(2):142-5.
 99. McCluskey, Au Peh C. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenetics* 1999;1:3-20.
 100. Mearin ML, Biemond I, Pena AS, Polanco I, Vazquez C, Schreuder GT, et al. HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac

- children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut*. 1983 Jun;24(6):532-7.
101. Mearin ML, Bouquet J, Mourad N, Schoorel E, Sinaasappel M, Biemond I, et al. HLA-DR antigens and phenotypes in Dutch coeliac children and their families. *Clin Genet*. 1985 Jan; 27(1):45-50.
102. Mearin ML, Catassi C, Brousse N, Brand R, Collin P, Fabiani E, Schweizer JJ, Abuzakouk M, Szajewska H, Hallert C, Farre Masip C, Holmes GK; Biomed Study Group on Coeliac Disease and Non-Hodgkin Lymphoma. European multi-centre study on coeliac disease and non-Hodgkin lymphoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Feb;18(2):187-94.
103. Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Biemond I, Polanco I, Pena AS. Influence of genetic factors on the serum levels of antigliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1984 Jun; 3(3):373-7.
104. Mearin ML., Biemond I., Pena AS., Polanco I., Vazquez C, Schreuder GT., de Vries RR., van Rood JJ. HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut* 1983; 24: 532-537.
105. Meyer D, Stavropolous S, Diamond B, Shane E, Green PH. Osteoporosis in a north american adult population with celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2001 Jan;96(1):112-9.
106. Michalski JP, McCombs CC, Arai T, Elston RC, Cao T,

- McCarthy CF, Stevens FM HLA-DR, DQ genotypes of celiac disease patients and healthy subjects from the West of Ireland. *Tissue Antigens* 1996 Feb;47(2):127-33.
107. Molberg O, McAdam S, Lundin KE, Kristiansen C, Arentz-Hansen H, Kett K, Sollid LM. T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol.* 2001 May; 31(5):1317-23.
108. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjöström H, Sollid LM. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998 Aug;4(8):974
109. Monrós E, Smeyers P, Rodius F, cañizares J, Moltó MD, Vilchez JJ, et al. Mapping of Friedreich's ataxialocus by identification of recombination events in patients homozygous by descent. *Eur J Hum Genet* 1994; 2:291-9.
110. Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zernakova A, Bevova MR, Strengman E, Franke L, van't Slot R, van Belzen MJ, Lavrijsen IC, Diosdado B, Daly MJ, Mulder CJ, Mearin ML, Meijer JW, Meijer GA, van Oort E, Wapenaar MC, Koeleman BP, Wijmenga C. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet.* 2005 Dec;37(12):1341-4.
111. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.

- Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 1992;24:17-27.
112. Nalvai AT, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjonsdottir AH, Ascher H, Ek J, Hallberg B, Kristiansson B, Martinsson T, Nerman O, Sollid LM, Wahlstrom J. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens*. 2000 Oct;56(4):350-5.
113. Nilsen EM, Jahnsen F, Lundin KEA, Johansen F, Fausa O, Sollid LM, et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115(3): 551-63.
114. Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM and Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut* 1995; 37(6): 766-76.
115. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Oct;11(10):1185-94
116. Olerup O & Zetterquist, H. (1992) HLA Dr typing by PCR amplification with sequence –specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical

- practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39, 225.
117. Olerup O, Aldener, A. & Fogdell, A. (1993) HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 41, 119.
 118. Olsson C, Hernell O, Hörnell A, Lönnberg G, Ivarsson A. Difference in celiac disease risk between Swedish birth cohorts suggests an opportunity for primary prevention. *Pediatrics*. 2008;122: 528-34.
 119. Osman M, Quaratino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003 Jul 5;362(9377):30-7.
 120. Pena-Quintana L, Torres-Galvan MJ, Deniz-Naranjo MC, Ortigosa-Castillo L, Peña A., Crusius J. Malignancy, autoimmune disease, survival and quality of life in coeliac disease. *Pediatrics* 1996; 16: 399.
 121. Peña AS. Systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, and purpura in a patient with coeliac disease. *Neth J Med*. 1987 Dec;31(5-6):305-7.
 122. Perez-Bravo F, Araya M, Mondragon A, Rios G, Alarcon T, Roessler JL, et al. Genetic differences in HLA-DQA1* and DQB1* allelic distributions between celiac and control children in Santiago, Chile. *Hum Immunol*. 1999 Mar;60(3):262-7.
 123. Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B,

- Mariani P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 1997; 61: 307-17.
124. Planelles D, Puig N, Beneto A, Gomez E, Rubio P, Mirabet V, Bonanad S, Blasco I, Montoro JA. HLA-DQA, -DQB and -DRB allele contribution to narcolepsy susceptibility. *Eur J Immunogenet.* 1997 Dec;24(6):409-21.
125. Ploski R, Ek J, Thorsby E, Sollid LM. On the HLA-DQ(alpha 1*0501, beta 1*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens.* 1993 Apr;41(4):173-7.
126. Polanco I., Biemond I., van Leeuwen A., Schreuder I., Kahn PM., Guerrero J., D'Amato J., Vasquez C., van Rood JJ., Pena AS. (1981). Gluten sensitive enteropathy in Spain: genetic and environmental factors. In: McConnel RB, Lancaster RB (eds). *The genetics of coeliac disease.* MTP, pp 211-231.
127. Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Maki M, Sanz A, Calvo C, Maluenda C, Westman P, de la Concha EG, Partanen J. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol.* 1998 Mar;59(3):169-75.
128. Ramos-Varela JC, Calvo-Hernandez F, Fiuza-Perez MD, Rodriguez-Gallego JC, Sanchez-Garcia F. Assessment of the DQ heterodimer test in the diagnosis of celiac disease in the Canary Islands (Spain). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003 Nov; 37(5):604-8.
129. Ribes- Koninckx C, M. Calabuig, M^a J. Belenguer et al.

- Epidemiology of Celiac disease at the Comunidad Valenciana (Spain). In: Common food Intolerances 12: Epidemiology of coeliac disease. S Auricchio, JK Visakorpi eds. Karger Basel, 1992:43.
130. Ribes-Koninckx C, Giliams JP, Polanco I et al. IgA antigliadin antibodies in celiac and inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3:676-82.
131. Riestra S, Fernandez 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 Apr; 35(4):398-402.
132. Rostami K, Steegers EA, Wong WY, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. Coeliac disease and reproductive disorders: a neglected association. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001 Jun;96(2):146-9.
133. Rostom A, Dube C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, MacNeil J, Mack D, Patel D, Moher D. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005 Apr; 128(4 Suppl 1):S38-46.
134. Ruiz Díaz A, Polanco I. Exposición al gluten y aparición de enfermedades autoinmunes en la Enfermedad Celiaca. *Pediatrika* 2002; 22:311-9.
135. Ryan AW, Thornton JM, Brophy K, Daly JS, McLoughlin RM, O'Morain C, Abuzakouk M, Kennedy NP, Stevens FM, Feighery C, Kelleher D, McManus R. Chromosome 5q

- candidate genes in coeliac disease: genetic variation at IL4, IL5, IL9, IL13, IL17B and NR3C1. *Tissue Antigens*. 2005 Feb; 65(2):150-5.
136. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986 Nov 13-19; 324(6093):163-6.
137. Schreuder GM, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Fernandez-Vina M, Noreen HJ, et al. Working Groups; WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA system; 13th International Histocompatibility Workshop Serology Component; International Cell Exchange, UCLA; US National Marrow Donor Program. The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and-DQ antigens. *Tissue Antigens*. 2005 Jan; 65(1):1-55.
138. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002 Sep 27;297(5590):2275-9.
139. Sheiner E, Peleg R, Levy A. Pregnancy outcome of patients with known celiac disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006 Nov;129(1):41-5.
140. Sollid LM, Thosby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: Genetic mapping and Role in the pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105: 910-22.

141. Sollid L.M. Molecular basis of celiac disease. *Ann Rev Immunol* 2000; 18: 53-81.
142. Sollid LM. Coeliac Disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 647-55
143. Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005 Sep;3(9):843-51.
144. Spilman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test of linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum genet*; 1993 (53):506-16.
145. Spurkland A, Ingvarsson G, Falk E, Knutsen I, Sollid Lm, Thorsby E. Dermatitis herpetiformis and celiac disease are both primarily associated to the HLA-DQ ($\alpha 1^*0501, \beta 1^*02$) or the HLA-DQ ($\alpha 1^*03, \beta 1^*0302$) heterodimers. *Tissue Antigens* 1997; 49:29-31.
146. Spurkland A., Sollid LM., Polanco I., Vartdal F., Thorsby E. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. *Hum Immunol* 35; 1992: 188-192
147. Stazi AV, Mantovani A. A risk factor for female fertility and pregnancy: celiac disease. *Gynecol Endocrinol.* 2000 Dec; 14(6):454-63.
148. Stepniak D, Koning F. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol.* 2006 Jun; 67(6):460-8.

149. Svejgaard A.& Ryder L.P. HLA and diseases associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens*; 1994 (43): 18.
150. Tata LJ, Card TR, Logan RF, Hubbard RB, Smith CJ, West J. Fertility and pregnancy-related events in women with celiac disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 Apr; 128(4):849-55.
151. Thorsby E, Ronningen KS. Role of HLA genes in predisposition to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med*. 1992 Dec;24(6):523-31.
152. Tighe MR, Hall MA, Ashkenazi A, Siegler E, Lanchbury JS, Ciclitira PJ. Celiac disease among Ashkenazi Jews from Israel. A study of the HLA class II alleles and their associations with disease susceptibility. *Hum Immunol*. 1993 Dec; 38(4):270-6.
153. Tighe MR, Hall MA, Barbado M, Cardi E, Welsh KI, Ciclitira PJ. HLA class II alleles associated with celiac disease susceptibility in a southern European population. *Tissue Antigens*. 1992 Aug; 40(2):90-7.
154. Tiwari JL, Terasaki PI. The data and statistical analysis. In: Tiwari JL, Terasaki PI eds. *HLA and disease associations*. New York: Springer-Verlag, 1985: 18-27.
155. Torinsson Naluai A., Nilsson S., Samuelsson L., Gudjónsdóttir AH., Ascher H., Ek J., Hallberg B., Kirstiansson B., Martinsson T., Nerman O., Sollid LM., Wahlstrom J. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome

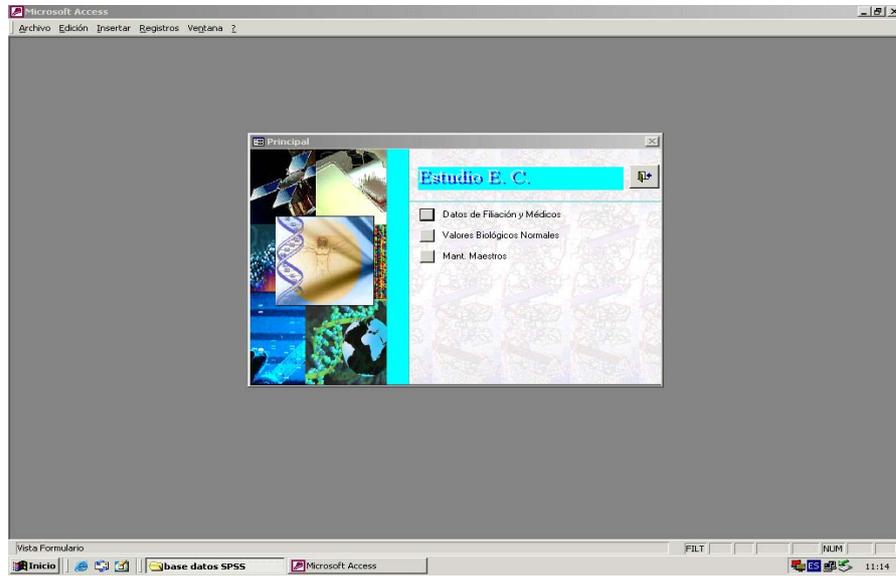
- 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens* 2000; 56: 350-355.
156. Tosco A, Maglio M, Paparo F, Rapacciuolo L, Sannino A, Miele E, Barone MV, Auricchio R, Troncone R. Immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody deposits in the small intestinal mucosa of children with no villous atrophy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Sep;47: 293-8.
157. Trier JS. Celiac sprue. *N Engl J Med* 1991; 325: 1709-19.
158. Troncone R., Greco L., Auricchio S. The controversial epidemiology of coeliac disease. *Acta paediatr* 2000: 140-1.
159. Troncone R., Greco L., Mayer M., Paparo F., Caputo N., Micillo M., Mugione P., and Auricchio S. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr* 1996; Suppl. 412: 10-4.
160. Troncone R. Latent coeliac disease in Italy. The SIGEP Working Group on Latent Coeliac Disease. Italian Society for Paediatric Gastroenterology and Hepatology. *Acta Paediatr* 1995; 84: 1252-1257.
161. Undlien DE, Kockum I, Ronningen KS, Lowe R, Saanjeevi CB, Graham J, et al. HLA associations in type 1 diabetes among patients not carrying high-risk DR3-DQ2 or DR4-DQ8 haplotypes. *Tissue Antigens.* 1999 Dec; 54(6):543-51.
162. Vader LW., de Ru A., van der Wal Y., Kooy YM., et al. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med* 2002; 195:643-9.

163. Van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, Bardoel AF, Mulder CJ, Pearson PL, Houwen RH, Wijmenga C. A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology*. 2003 Oct; 125(4):1032-41.
164. Van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol*. 1998 Aug 15; 161(4):1585-8.
165. Van de Wal Y, Kooy YM, Drijfhout JW, Amons R, Koning F. Peptide binding characteristics of the coeliac disease-associated DQ (alpha1*0501, beta1*0201) molecule. *Immunogenetics*. 1996; 44(4):246-53.
166. Van Leeuwen A, Schuit HR, van Rood JJ. Typing for MLC (LD). II. The selection of nonstimulator cells by MLC inhibition tests using SD-identical stimulator cells (MISIS) and fluorescence antibody studies. *Transplant Proc*. 1973 Dec; 5(4):1539-42.
167. Van Rood JJ, van Leeuwen A, Keuning JJ, van Oud Alblas AB. The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxicity technique. *Tissue Antigens*. 1975 Apr; 5(2):73-9
168. Vermeulen BA, Hogen Esch CE, Yuksel Z, Koning F, Verduijn W, Doxiadis II, Schreuder GM, Mearin ML. Phenotypic variance in childhood coeliac disease and the HLA-DQ/DR dose effect. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(1):40-5

169. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of working group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65:909-911.
170. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE and Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000; 113 Pt 24: 4435-40.
171. Westerholm-Ormio M, Garioch J, Ketola I and Savilahti E. Inflammatory cytokines in small intestinal mucosa of patients with potential coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2002; 128(1): 94-101.
172. Zhong F., McCombs CC., Olson JM., Elston RC.; Stevens FM., McCarthy CF., Michalski JP. An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western counties of Ireland. *Nat Genet* 1996; 14: 329-333.
173. Zubillaga P, Vidales MC, Zubillaga I, Ormaechea V, García-Urkía N, Vitoria JC. HLA-DQA1 and HLADQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002 May;34(5):548-54.

11.- ANEXOS

Anexo 1- Base de datos (Open Acces)



Microsoft Access
Archivo Edición Insertar Registros Ventana ?

Filiaction

C. Paciente Automa N° Historia 0 Centro Origen Sexo

Nombre Apellido 1 Apellido 2

Dirección Tel. 1 Tel. 2

Cód. Sero. 0 Cód. Gene. Cód. HLA 0 Cód. F.

Clinicos | Biológicos | Serológicos | HLA | HLA2

Clinicos	Año Inicio	Mes Inicio	Año Diag.	Mes Diag.	Síntoma enfermedad
	0	0	0	0	

Registro: 14 de 203

Vista Formulario

Inicio base datos SPSS anexos - Microsoft Word Principal Filiaction NUM 11:16

Microsoft Access
Archivo Edición Insertar Registros Ventana ?

Filiaction

C. Paciente numérico N° Historia 0 Centro Origen Sexo

Nombre Apellido 1 Apellido 2

Dirección Tel. 1 Tel. 2

Cód. Sero. 0 Cód. Gene. Cód. HLA 0 Cód. F.

Clinicos | Biológicos | Serológicos | HLA | HLA2

Hb	0	+ De dos datos	Fe	0
VCM	0	Patológico	B12	0
		No hay datos de comparación	Ac. Fólico	0
GOT	0		TP	0
GPT	0		IQ	0
GGT	0			
Prot	0			
Alb	0			
IgA	0			
IgG	0			

Registro: 14 de 203

Vista Formulario

Inicio base datos SPSS anexos - Microsoft Word Principal Filiaction NUM 11:16

The screenshot shows a Microsoft Access form titled "Filiación" (Affiliation) with the following fields and controls:

- C. Paciente**: numérico (numeric), N° Historia (number), Centro Origen (dropdown), Sexo (dropdown).
- Nombre**: Apellido 1 (text), Apellido 2 (text).
- Dirección**: Dirección (text), Tel. 1 (text), Tel. 2 (text).
- Cód. Sero.**: Cód. Gene. (text), Cód. HLA (text), Cód. F. (text).

Below the form fields, there are tabs for "Clínicos", "Biológicos", "Serológicos", "HLA", and "HLA2".

A table is displayed below the tabs with the following columns:

fecha	Cod. Serológ.	Dieta	M. D.	Años	Meses	AP	L	M	S	FA	AAG	AAE	TGT
				0	0			0	0	0	0	0	0

At the bottom of the form, there is a "Registros" (Records) section showing "1" record out of "205" total records.

The Windows taskbar at the bottom shows the following open applications: Inicio, base datos SP25, Jarecos - Microsoft Word, Principal, and Filiación. The system clock shows 11:17.

Microsoft Access
Archivo Edición Insertar Registros Vegaña 2

Filiación

C. Paciente (numérico) N° Historia Centro Origen Sexo

Nombre Apellido 1 Apellido 2

Dirección Tel. 1 Tel. 2

Cód. Sero. Cód. Gene. Cód. HLA Cód. F.

Clinicos | Biológicos | Serológicos | HLA | HLA2

paciente	Relación	DRB1.1	DRB1.2	DRB1.4.1	DRB1.4.2	DRB1.1	DRB1.2	DRB1.1	DRB1.2

Registros: 14 de 203

Vista Formulario

Inicio base datos SPSS anexos - Microsoft Word Principal Filiación 11:17

Microsoft Access
Archivo Edición Insertar Registros Vegaña 2

Filiación

C. Paciente (numérico) N° Historia Centro Origen Sexo

Nombre Apellido 1 Apellido 2

Dirección Tel. 1 Tel. 2

Cód. Sero. Cód. Gene. Cód. HLA Cód. F.

Clinicos | Biológicos | Serológicos | HLA | HLA2

paciente	Relación	DR1	DR103	DR15	DR16	DR3	DR302	DR4	DR11	DR12	DR13

Registros: 14 de 203

Vista Formulario

Inicio base datos SPSS anexos - Microsoft Word Principal Filiación 11:18

Anexo 2: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Yo.....,

He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....

Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:

Firma del participante:

CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE

(Menores e incapaces)

Yo.....

(Nombre y Apellidos), en calidad de (relación con el participante).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....

(Nombre investigador).

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a (nombre del participante)....., toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar. Y presto mi conformidad con que (nombre del participante).....colabore en dicho estudio.

part

Fecha:

Firma del representante:

.....

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

La enfermedad celiaca es una enteropatía sensible al gluten que padecen sujetos genéticamente predispuestos.

El objetivo del estudio genético propone la obtención de un mejor conocimiento de los genes implicados en la patogénesis de esta enfermedad para poder encontrar un marcador genético que indique que personas son de riesgo para dicha patología.

Para ello se analizará una muestra sanguínea (única extracción) para determinar el HLA DQ2 / DQ8 y otros posibles genes implicados, esta extracción se realizará coincidiendo con cualquier de los controles analíticos habituales en los pacientes celíacos. Para los familiares también se harán coincidiendo con la determinación analítica de marcadores serológicos, practica habitual para el despistaje de la enfermedad en familiares de primer grado.

Ello no supone un aumento del número de visitas ni el número de extracciones sanguíneas. Por lo que no genera ninguna incomodidad ni al paciente ni para el familiar.

La participación en este estudio es completamente voluntaria y el paciente puede retirarse del estudio o negarse al mismo sin que ello altere la relación medico-paciente ni produzca ningún perjuicio en el tratamiento.

Los datos del paciente se mantendrán en el anonimato y sólo tendrán uso de los mismos los médicos implicados en el seguimiento clínico del paciente y los responsables de las técnicas de laboratorio (genetistas), ley 15/99 de protección de datos de carácter personal. El genoma es un patrimonio de la humanidad y el

material genómico es entregado de forma desinteresada al investigador por las personas incluidas en el estudio, con el ánimo de contribuir a mejorar la salud pública a sabiendas de que ellos puedan no beneficiarse directamente de los conocimientos derivados del estudio. La entrega no tiene carácter de propiedad permanente y la donación debe estar limitada a unos objetivos claros y concretos y a un tiempo de estudio no superior a los 6 años, durante el cual el investigador tendrá la oportunidad y ventaja de realizar el estudio sobre dichas muestras con exclusividad (y sin competencias) así como de desarrollar tantas patentes como pueda y le sean autorizadas.

Transcurrido este tiempo:

- 1.- Los datos de la información genética derivados del estudio deben ser públicos y/o podrán ser fácilmente consultados.
- 2.- El material genómico dejará ser propiedad del investigador y el destino del mismo debe ser decidido y/o regulado por los Organismos Gubernamentales del país de procedencia de las muestras o bien destruido.
- 3.- Bajo ningún concepto y en ningún momento las muestras serán motivo de lucro directo, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

El investigador responsable Dra. Ribes y colaboradores, será el encargado de ofrecer la información necesaria y de contestar las dudas y preguntas que se generen. En caso de necesitar contactar de nuevo podrán hacerlo a través de las Consultas Externas de Gastroenterología del Hospital Infantil La Fe. Telf: 96-3987798.

