

VNIVERSITAT D VALÈNCIA



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Medicina

Programa de Medicina

**HLA-DQ DE LA ENFERMEDAD CELÍACA EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Marta Maia Boscá Watts

Dirigida por:

Dr. Miguel Mínguez Pérez

Dr. Samuel Navarro Fos

Dra. Dolores Planelles Silvestre

Valencia, 2015

D. MIGUEL MÍNGUEZ PÉREZ, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia, D. SAMUEL NAVARRO FOS, Catedrático de Patología de la Universidad de Valencia, y Dña. DOLORES PLANELLES SILVESTRE, Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia y Profesora Colaboradora de la Universidad de Valencia

Certifican que,

Dña. Marta Maia Boscá Watts, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia, y con título de Médico Especialista en Aparato Digestivo, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral titulada HLA-DQ DE LA ENFERMEDAD CELÍACA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL CRÓNICA, que, en el momento actual, está finalizada y en disposición de ser defendida públicamente para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos en Valencia a veintinueve de abril de dos mil quince.

Firmado:

Dr. Miguel Mínguez

Dr. Samuel Navarro

Dra. Dolores Planelles

Agradecimientos

Agradezco la ayuda de las numerosas personas que me han acompañado en el sumergir real de la vida de la investigación, con sus anhelos por descubrir, sus frustraciones por el tedio de las repeticiones y la necesidad de corrección continua, y sus sorpresas por los resultados, que le llevan a uno a nuevas ideas y a darse cuenta de que la tesis no es un fin, sino un inicio.

Esta tesis, quizás como otras, ha supuesto un ciclo de la vida, con el feliz nacimiento de mis hijas, que ya saben que mamá está escribiendo un libro que se llama "tesis", y el triste fallecimiento de mis mentores, Adolfo Benages, que era mi extraordinario Jefe, y Honorato Boscá, extraordinario también, y, sobre todo, mi padre, mi impulsor...mi apoyo. Ambos, fueron ambiciosos con mi aprendizaje y conscientes de que lo debía realizar sola, cada paso en mi momento.

Le estoy muy agradecida a mis tres directores de tesis: a Miguel Mínguez, por guiarme como médico y como investigadora, y, sobre todo, por trasladarme su ilusión por buscar respuestas; a Samuel Navarro, por su apoyo y consejos, y por ser mi trampolín para iniciar una nueva línea de investigación que sigue a esta tesis; y a Dolores Planelles, por su atención y admirable minuciosidad, que me ha permitido entender el HLA y su aplicación a la clínica, y por ser el impulso necesario para terminar la tesis.

Le doy las gracias también a su magnífico equipo que, no sólo realizaba la técnica, sino que además me acogió para enseñarme lo laboriosa que es la misma.

Agradecimiento también para Rafael Romero, otra pieza imprescindible del puzzle, que me ha enseñado los conceptos básicos de la estadística, y, sobre todo, que para que la investigación sea armónica, y luego extrapolable, las preguntas que se plantea el investigador han de ser concisas.

Muchas gracias a Esperanza Cuadrado, también, que realizaba las extracciones de sangre en Motilidad Digestiva, y, más importante aún, ha ido

asegurándose de que no perdiese ningún dato del HLA, y a los pacientes por su respaldo constante a la investigación.

Agradezco el apoyo y consejos de todos mis compañeros del Servicio, sobre todo de Joan Tosca, por resolver mis dudas estadísticas o de formato y por localizar candidatos para el estudio, así como de Francisco Mora, por alentarme a concluir la investigación.

Un agradecimiento también para el Instituto de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia-INCLIVA, que me ha servido de inestimable apoyo logístico. La escritura de esta tesis, la esboqué durante mi estancia en el Hospital Mount Sinaí de Nueva York, favorecida por el INCLIVA, con la valiosa ayuda y consejos de Thomas Ullman y David Sachar, ilusionados por mis resultados y por las ideas que surgían de este proyecto de investigación.

Y como una tesis no es un fin sino un inicio, en la nueva línea de investigación surgida de esta tesis y ya en marcha, cuento con la inestimable ayuda de Cristina Mongort, Jesús Santiago, Alejandro Rodríguez y Paz Laporta.

Last but not least, gracias a mi familia y amigos, que han confiado en mí, pese a todos los contratiempos e interrupciones, a todos, pero sobre todo a mi madre, marido e hijas. A mi madre, por apoyarme como madre y como doctora, a mis hijas, por aceptar mi dedicación, y a mi marido, por su confianza en mí, venir conmigo a Estados Unidos con la seguridad de que me formaba como investigadora y facilitar mi tiempo para escribir la tesis.

Esta tesis ha sido posible gracias a la obtención de una beca Bancaja y de un contrato Río Hortega del Instituto de Salud Carlos III, a través del Instituto de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El contrato Río Hortega forma parte del marco de las ayudas para contratos de formación en investigación para profesionales con formación sanitaria especializada del I+D+I y ha tenido una duración de tres años, permitiendo la realización del trabajo de campo de la tesis en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (31 meses), el Servicio de Anatomía Patológica de la Universidad de Valencia (1 mes) y el Mount Sinai School of Medicine, NY, USA (4 meses).

A mi padre, Honorato Boscá, mi luz, siempre

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
A) Enfermedad Celíaca	5
1. Definición	5
2. Epidemiología	6
3. Patogenia	6
3.1 Factores inmunológicos	7
3.2 Factores genéticos	8
3.3 Factores ambientales	12
4. Presentación Clínica	13
5. Diagnóstico	15
5.1 Análisis de autoanticuerpos plasmáticos	16
5.2 Genotipificación del HLA	17
5.3 Estudio anatomo-patológico	17
6. Tratamiento	20
B) Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica	21
1. Definición	21
2. Epidemiología	22
3. Patogenia	22
3.1 Factores inmunológicos	24
3.2 Factores genéticos	26
3.3 Factores ambientales	28
4. Presentación Clínica	30
4.1 Enfermedad de Crohn	31
4.2 Colitis Ulcerosa	32
4.3 Manifestaciones Extraintestinales	33
5. Diagnóstico	35
6. Tratamiento	37
C) Relación entre Enfermedad Celíaca y Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica	38

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
III. MATERIAL Y MÉTODO	47
A) Población y muestra del estudio	49
1. Casos	49
2. Grupo Control	49
B) Recogida de datos	50
C) Recogida de muestras de suero	50
D) Tipaje HLA	50
1. Muestras de estudio	50
2. Extracción de ADN	51
3. Amplificación por PCR-rSSO	51
4. Detección por rSSO y análisis por citometría de flujo	53
E) Variables estudiadas	55
1. Datos clínicos	55
2. Datos analíticos	58
F) Aspectos éticos	58
G) Métodos estadísticos	59
1. Tamaño muestral y precisión de las estimaciones	59
1.1 Consideraciones previas	59
1.2 Determinación del tamaño muestral mínimo para evaluar el HLA	59
2. Test Chi-2 de independencia entre variables cualitativas	60
3. Modelo de regresión logística	60
3.1 Fundamento	60
3.2 Estimación e inferencia en modelos de regresión logística	61
4. Estudio de aplicación de los resultados significativos a la clínica	61
5. Test de Holm-Bonferroni	63
6. Programas estadísticos	63
IV. RESULTADOS	65
A) Descripción de la muestra	67

1. Introducción	67
1.1 Global	67
1.2 Distribución por sexos	67
2. Pacientes con EIIC	68
2.1 Enfermedad de Crohn	69
2.2 Colitis Ulcerosa	70
2.3 Manifestaciones Extraintestinales	70
3. Grupo control	71
B) Análisis de genes HLA	72
1. Frecuencia de HLA-EC	72
2. Análisis conjunto de la relación de la frecuencia del HLA-EC con la presencia de EIIC y el sexo.	73
2.1 Introducción	73
2.2 Modelo de regresión logística propuesto	74
2.3 Resultados de la estimación del modelo	76
2.4 Interpretación de los resultados	77
3. Estudio del efecto del HLA-EC sobre el tipo de EIIC	79
4. Estudio de la frecuencia de HLA-EC, según el tipo de EII, en función del sexo	81
5. Estudio de la frecuencia de las distintas variantes de HLA-EC en la EIIC	84
5.1. Frecuencia de HLA-DQ2.5 <i>cis</i> en la EIIC	84
5.1.1 Análisis considerando conjuntamente los dos tipos de EII	84
5.1.2 Análisis diferenciando los dos tipos de EII	87
5.2. Frecuencia de HLA-DQ2.5 <i>cis</i> + HLA-DQ2.5 <i>trans</i> , en función de la presencia de EII y del sexo	90
5.2.1 Análisis considerando conjuntamente los dos tipos de EII	90
5.2.2 Análisis diferenciando los dos tipos de EII	92
5.3. Frecuencia de HLA-DQ8 en la EII	95

5.3.1	Análisis considerando conjuntamente los dos tipos de EII	95
5.3.2	Análisis diferenciando los dos tipos de EII	97
6.	Relación de la EIIC y el sexo con la frecuencia de HLA-DQ2.2	99
6.1	Análisis global	99
6.2	Relación con el tipo de EIIC	100
7.	Estudio de la relación entre los alelos y la EIIC	105
7.1.	Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la EIIC	105
7.1.1	Relación entre DQA1 y EIIC	105
7.1.2	Relación entre DQB1 Y EIIC	112
7.2.	Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la extensión de la CU	117
7.2.1	Relación entre DQA1 y la extensión de la colitis	118
7.2.2	Relación entre DQB1 y la extensión de la colitis	120
7.3.	Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y el patrón y la extensión de la ECr	122
7.3.1	Relación entre DQA1 y el patrón de Crohn	122
7.3.2	Relación entre DQB1 y el patrón de Crohn	124
7.3.3	Relación entre DQA1 y la extensión de Crohn	126
7.3.4	Relación entre DQB1 y la extensión de Crohn	128
7.4.	Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la presencia de complicaciones en la EIIC	130
7.4.1	Relación entre DQA1 y la presencia de complicaciones	130
7.4.2	Relación entre DQB1 y la presencia de complicaciones	131
7.5.	Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la presencia de manifestaciones extraintestinales en la EIIC	131
7.5.1	Relación entre DQA1 y las MEIs	132
7.5.2	Relación entre DQB1 y las MEIs	132

7.5.3	Relación entre DQA1 y la artropatía periférica	133
7.5.4	Relación entre DQB1 y la artropatía periférica	134
7.5.5	Relación entre DQA1 y la artropatía t1	135
7.5.6	Relación entre DQB1 y la artropatía t1	135
7.5.7	Relación entre DQA1 y la artropatía t2	136
7.5.8	Relación entre DQB1 y la artropatía t2	137
7.5.9	Relación entre DQA1 y la espondilitis	137
7.5.10	Relación entre DQB1 y la espondilitis	138
7.5.11	Relación entre DQA1 y la sacroileitis	139
7.5.12	Relación entre DQB1 y la sacroileitis	139
7.5.13	Relación entre DQA1 y las MEIs cutáneas	140
7.5.14	Relación entre DQB1 y las MEIs cutáneas	141
7.5.15	Relación entre DQA1 y las MEIs oculares	141
7.5.16	Relación entre DQB1 y las MEIs oculares	142
V.	DISCUSIÓN	145
A)	Descripción de la muestra	149
B)	Análisis de genes HLA	154
1.	Frecuencia de HLA-EC	154
2.	Frecuencia de HLA-EC según el tipo de EIIC y el sexo	156
3.	Expresión de diferentes alelos según se trate de enfermos con ECr, con CU o controles sanos	163
4.	Relación entre los alelos y la expresión fenotípica de la EIIC	168
VI.	CONCLUSIONES	173
1.	Frecuencia de HLA-EC	175
2.	Frecuencia de HLA-EC según el tipo de EIIC y el sexo	175
3.	Expresión de diferentes alelos según se trate de enfermos con ECr, con CU o controles sanos	177
4.	Relación entre los alelos y la expresión fenotípica de la EIIC	177
VII.	INVESTIGACIÓN FUTURA	179
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	187
IX.	ANEXOS	205

1. Fenotipo de EIIC. Definiciones	207
2. Desarrollo de los métodos estadísticos utilizados en esta tesis	208
3. Técnica de tinción inmunohistoquímica	221

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

- EC: Enfermedad Celíaca
- EIIC: Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica
- ECr: Enfermedad de Crohn
- CU: Colitis Ulcerosa
- tTG: Transglutaminasa tisular
- AAtTG: Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular
- HLA: Human Leucocyte Antigen, Antígeno Leucocitario Humano
- HLA-EC: HLA de riesgo de celiaquía → HLA-DQ2.5*cis*, HLA-DQ2.5*trans* y HLA-DQ8
- HLA-DQ2.5*cis*: molécula codificada por el haplotipo en *cis* HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01.
- HLA-DQ2.5*trans*: molécula codificada por el haplotipo en *trans* DQA1*05:05-DQB1*03:01 de un cromosoma y DQA1*02:01-DQB1*02:02 del cromosoma homólogo (HLA-DQ7.5/DQ2.2).
- HLA-DQ8: molécula codificada en *cis* por el haplotipo DQA1*03:01/03:03-DQB1*0302
- HLA-DQ2.2: molécula codificada en *cis* por el haplotipo HLA-DQA1*02:01-DQB1*02:02
- LIEs: linfocitos intraepiteliales
- MEIs: Manifestaciones Extraintestinales

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC) y la Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica (EIIC) son enfermedades emergentes, de elevada prevalencia e incidencia, que tienen un pico de aparición en población joven y que suponen una merma en la calidad de vida de los pacientes y una importante carga socio-económica. Su etiología se postula similar: una combinación de factores ambientales (gluten, gérmenes, etc.), sobre una predisposición genética (polimorfismos IL18RAP, por ejemplo), y una respuesta inmunitaria alterada, fundamentalmente a nivel linfocitario. Ambas son enfermedades crónicas y sistémicas, con afectación prioritaria del tracto digestivo, cuya sintomatología puede ser similar, pero cuyos tratamientos difieren. En la EC, la retirada del gluten de la dieta puede ser curativa, mientras que, actualmente, no existe ningún tratamiento curativo de la EIIC. Sin embargo, los tratamientos de la EIIC, que buscan bloquear algún punto de la cascada inflamatoria, mejoran la clínica e histología de la EC, siendo utilizados en EC refractarias a la dieta exenta de gluten.

Algunos autores consideran que los pacientes con los dos tipos de EIIC, enfermedad de Crohn (1) -ECr- y colitis ulcerosa -CU- (2), son un grupo de riesgo de presentar EC(3). Esta hipótesis se sustenta en la elevada prevalencia tanto de la EC (1/300, según series (4-7)) como de la EIIC (1-3 por 1000 (8,9)), y porque tienen, en teoría, un mecanismo patogénico similar: interacción de factores genéticos (NOD2-CARD15, cromosoma 6, IL23R, elevada concordancia en gemelos monocigotos y agrupación familiar, etc.), inmunológicos (se postula también una alteración de la inmunidad adquirida e innata, con un aumento de la permeabilidad intestinal (10,11)) y ambientales (flora comensal (9), gastroenteritis, etc.). Al igual que en la enfermedad celíaca, en la EIIC hay una alteración de la vía de los linfocitos T y de la apoptosis, y un aumento de factores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (12).

Inicialmente se describieron casos aislados de EIIC y EC en un mismo paciente(13,14), pero recientemente se han realizado estudios epidemiológicos más amplios que relacionan ambas enfermedades. Casi todos los estudios previos al 2010, han observado una mayor frecuencia de desarrollo de EIIC en pacientes celíacos y sus familiares (15-17), y de celiaquía en EIIC (12,18,19). Se ha observado que la EIIC es de 5 a 10 veces más frecuente en los pacientes celíacos que en la población general (20-22), aunque al revés (la celiaquía en pacientes con EIIC) no está tan claro el aumento de riesgo. Algún estudio ha observado que, aunque en su población sí que es más frecuente la EIIC en pacientes celíacos, no ocurre lo mismo al investigar la prevalencia de celiaquía en pacientes con EIIC (22), siendo la prevalencia de EC similar a la de la población general.

El diagnóstico de EC en pacientes con EIIC es especialmente importante porque, a parte de que se trata de pacientes jóvenes con una patología crónica, con brotes frecuentes y tratamientos agresivos, es posible que un diagnóstico inadecuado conlleve la confusión de síntomas (que se consideren únicamente debidos a la EIIC) y motive una intensificación innecesaria del tratamiento. A ello se asociaría el riesgo de complicaciones a largo plazo de una EC sin diagnosticar. Además, determinadas complicaciones de la EC podrían verse agravadas por la EIIC (por ejemplo, una ferropenia por pérdidas sumada a la malabsorción) y/o sus tratamientos (Ej. los corticoides favorecen la osteoporosis y los inmunosupresores la aparición de linfomas en pacientes predispuestos).

En el proceso diagnóstico de la EC se utilizan estudios serológicos, histológicos y marcadores de predisposición genética a la enfermedad. Estos últimos, fundamentalmente los genes del sistema HLA (Human Leucocyte Antigen), y las moléculas por estos codificadas, tienen la característica de su elevado valor predictivo negativo, de manera que la negatividad de determinados genes o moléculas (fundamentalmente HLA-DQ2 y -DQ8) en un individuo significa que la posibilidad de no expresar a lo largo de su vida una EC es del 95-99%.

Este dato, es trascendente en el estudio de pacientes con enfermedad celíaca dado que confiere a ésta enfermedad una predisposición génica tan

importante como que es excepcional que se exprese la enfermedad en ausencia de determinadas combinaciones alélicas de HLA-DQ. En éste sentido, y dado que la enfermedad celíaca se puede expresar en cualquier momento de la vida, únicamente podríamos esperar su presencia en el grupo de individuos con haplotipos de susceptibilidad, por lo que la presencia simultánea de EC y EII debería únicamente observarse en pacientes con EII con predisposición HLA-DQ de enfermedad celíaca. Por ello, el estudio de de haplotipos HLA en pacientes con EII podría ser importante para evaluar si los pacientes con EII tienen mayor susceptibilidad genética a expresar la EC, y si algún subtipo de expresión de HLA podría incluso estar mas presente en la EIIC o cualquiera de sus formas de presentación (ECr o CU).

Cuando se diseñó la tesis, ningún estudio había determinado la prevalencia de los haplotipos HLA DQ2/DQ8 en pacientes con EIIC. Recientemente, se ha publicado un estudio de la frecuencia aumentada de HLA de riesgo de celiaquía en diferentes enfermedades digestivas, en la que se estudia el HLA en 36 pacientes con EIIC (23) y, aunque se intuye una ausencia de diferencias en la frecuencia del HLA de riesgo de celiaquía con respecto a la observada en la población general, el bajo tamaño muestral no permite extrapolar las conclusiones.

A) Enfermedad Celíaca:

1. Definición

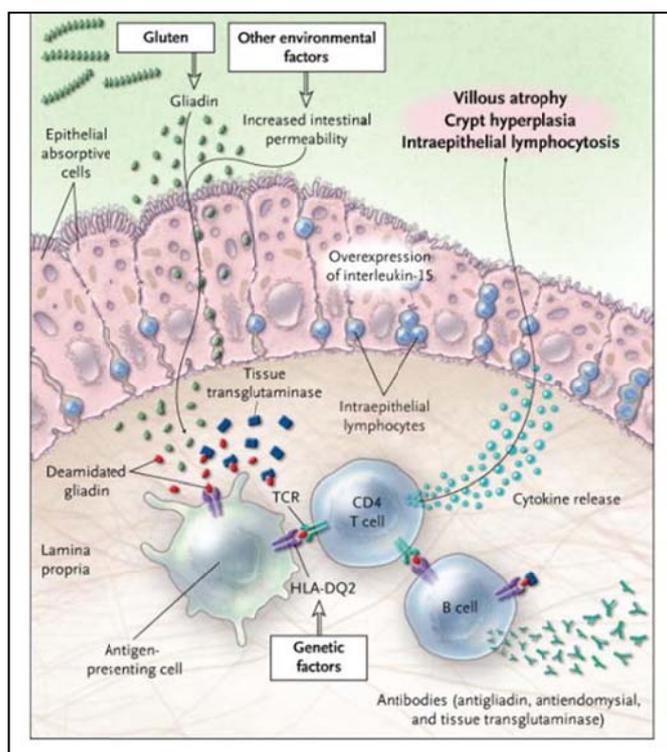
La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía en la que individuos genéticamente predispuestos desarrollan una intolerancia permanente a las proteínas del gluten (24). El contacto con el gluten determina la aparición de una lesión histológica característica (no patognomónica), que en sus formas más graves provoca atrofia vellositaria, que conlleva una malabsorción de nutrientes, y que es reversible retirando el gluten de la dieta, en el 95% de los casos (11).

2. *Epidemiología*

La EC afecta tanto a niños como adultos, aunque la clínica es más florida en niños, y tiene una relación mujer/hombre de 2:1 (8). Es una enfermedad inmunitaria mediada por células T que aparece sobre todo en personas con antepasados caucásicos (25). La EC es una de las intolerancias a alimentos más frecuente (4,26). Su prevalencia oscila entre 1/100 y 1/300, según series (4-7). En España, se han observado diferentes prevalencias en función de la edad: 1/118 en población infantil y 1/389 en la población adulta (27). Actualmente, se considera que la prevalencia de EC es aún mayor (modelo iceberg), existiendo numerosos casos sin diagnosticar (8,28,29).

3. *Patogenia*

La EC es el resultado de la interacción de factores inmunológicos (inmunidad adquirida e innata), genéticos (HLA DQ2 y DQ8, entre otros) y ambientales (gluten) -ver **figura A.1**-.



New England Journal of Medicine. 357(17):1731-1743, 2007.

Figura A.1. Interacción de factores ambientales (diversos factores aumentan la permeabilidad intestinal y favorecen la entrada del gluten), genéticos (HLA de las células presentadoras de antígeno y carga genética no-HLA) e inmunológicos (células presentadoras de antígeno, linfocitos, anticuerpos, etc.).

3.1 Factores inmunológicos:

La transglutaminasa tisular 2 (tTG 2), es una enzima calcio-dependiente (30) con múltiples funciones (Pro y antiinflamatorias) y localizaciones en el organismo (células endoteliales, de músculo liso, mesangiales, etc.) que se relaciona con los procesos de apoptosis y curación de heridas. (31) y se expresa mucho más en condiciones de inflamación o daño tisular (32).

En el intestino delgado, con el pH levemente ácido(26), la tTG2 deamida la glutamina a ácido glutámico, confiriéndole cargas negativas que posibilitan su unión a las moléculas HLA de las células presentadoras de antígeno (APC), con una alta afinidad.

En pacientes genéticamente predispuestos y, al parecer, en el contexto de un aumento de permeabilidad intestinal (10) y de liberación de sustancias pro-inflamatorias (Ej. una gastroenteritis por rotavirus o adenovirus), de medicación inductora de la cascada inflamatoria (Ej. Interferón α), en el embarazo o puerperio (17), o de un aumento de permeabilidad intestinal de origen genético (gen de miosina IXB -MYO9B(33)), el gluten se une a la tTG 2 de la mucosa, ésta lo deamida, facilitando su unión con el antígeno HLA-DQ (DQ2 generalmente, aunque también DQ8) de la APC, generalmente una célula dendrítica (CD), que se lo presenta al linfocito T CD4+. El linfocito T CD4+ libera citoquinas, destacando el IFN- γ , que a su vez estimulan la célula dendrítica favoreciendo la mayor expresión de HLA-DQ, y estimula linfocitos B que producen anticuerpos (inmunidad adquirida: respuesta específica al gluten de linfocitos T CD4+). La estimulación de la CD provoca un aumento de la producción de IL-15, que estimula los linfocitos intraepiteliales (LIE), CD8+, produciendo receptores NKG2D en las células epiteliales, que expresan moléculas MICA, lo que permite la unión del receptor NK del linfocito CD8+ con el ligando MICA, y la consecuente destrucción de la célula epitelial. Esta destrucción tisular puede aparecer también como consecuencia de la estimulación directa de la CD por fragmentos de gliadina (Ej. GliA p31-43) (inmunidad innata mediada por LIEs) (30,33).

Los autoanticuerpos contra la transglutaminasa aparecen en respuesta al complejo tTG 2 - gliadina y, pese a lo que previamente se creía, se postula que no son el origen de las lesiones vellositarias del intestino delgado, sino que pretenden la inhibición de la tTG 2 (30). In vitro, bloquean hasta el 90% de la actividad tTG 2.

3.2 Factores genéticos:

La influencia de la genética en la EC es considerable, habiéndose observado un marcado componente familiar (5-15%; 15-30% si los familiares son HLA DQ2 positivos) (8) y una elevada concordancia entre gemelos monocigotos (75-86%) (5,33).

El HLA es responsable del 40-50% de la carga genética de la EC (33-35). El 95-99% de los pacientes con EC expresan el HLA-DQ2 o -DQ8 (36): 90-95% son HLA-DQ2 positivos (8,33) y 5-10% son HLA-DQ8 (8,35). El estudio genético de haplotipos tiene un alto valor predictivo negativo, permitiendo excluir la EC prácticamente con un 99% de certeza (8,24).

El número de loci HLA clásicos en una persona es de tres para los de clase I (HLA-A, B, C) y otros tres para los de clase II (HLA-DR, DQ, DP), siendo el locus relacionado con la susceptibilidad a la EC el HLA-DQ.

Las moléculas HLA codificadas por los genes de clase II se expresan en la membrana de células inmunocompetentes (células B, monocito-macrófago-dendríticas, y linfocitos T activados). En patologías con componente inmunológico, las moléculas HLA se encuentran de forma ectópica sobre las membranas de las células del tejido diana dañado.

Las moléculas HLA se unen a los linfocitos T y les presentan diferentes tipos de proteínas en forma de pequeños péptidos. La unión y presentación de unos u otros péptidos dependerá de los alelos HLA que posea un determinado individuo, de forma que, la capacidad de unión o afinidad de estos péptidos al HLA determinará la inmunogenicidad de un antígeno y la inmuno dominancia de la respuesta (37).

La molécula HLA-DQ está formada por dos cadenas polipeptídicas, alfa y beta. Cada una de estas cadenas está constituida por dos dominios, alfa 1 y alfa 2, para la cadena alfa, y beta 1 y beta 2, para la cadena beta. Los dominios alfa 1 y beta 1 de la molécula DQ son los que entran en contacto con el antígeno (Ej. Gluten deamidado, con cargas negativas) y, por lo tanto, son los más variables y los que determinan que una molécula DQ sea DQ2 o DQ3, por ejemplo. La cadena alfa 1 está codificada por el gen DQA1 y la cadena beta 1 está codificada por el gen DQB1.

Los alelos del sistema HLA se heredan en bloque, como una unidad, denominada haplotipo. El genotipo HLA está formado por la suma del haplotipo del padre y de la madre. Ambos haplotipos son codominantes; cada progenitor

expresa los productos codificados por ambos haplotipos y transmite, de forma mendeliana uno u otro al hijo (38).

Como hemos comentado, la susceptibilidad a la EC reside en el HLA-DQ, siendo la molécula DQ2 la que confiere mayor riesgo para el desarrollo de la EC. El DQ2 puede estar formado por las cadenas alfa y beta codificadas por los alelos DQA1*05:01 y DQB1*02:01, respectivamente, de un mismo cromosoma (HLA DQ2.5*cis*), que conforman el haplotipo de mayor riesgo de celiaquía y que va asociado al gen DRB1*03 (DR3), o por la cadena α codificada por el alelo DQA1*05:05 de un cromosoma y la cadena β , codificada por el alelo DQB1*0202 del cromosoma homólogo, constituyendo la molécula DQ2.5*trans*. El alelo DQA1*05:05 forma parte del haplotipo DQA1*05:05+DQB1*03:01, ligado al gen DRB1*11/12 (DR5) o a algunos grupos de DRB1*13, que codifica la molécula *cis* DQ7.5, mientras que el alelo DQB1*02:02 forma parte del haplotipo DQB1*02:02 + DQA1*02:01, ligado al gen DRB1*07 (DR7), que codifica la molécula *cis* DQ2.2.

El HLA-DQ8, codificado por los alelos DQA1*03:01 o *03:03 + DQB1*03:02, ligado al gen DRB1*04 (DR4), también se encuentra en una pequeña proporción de pacientes celíacos. La **figura A.2** muestra la estructura esquemática del HLA-DQ2 y -DQ8.

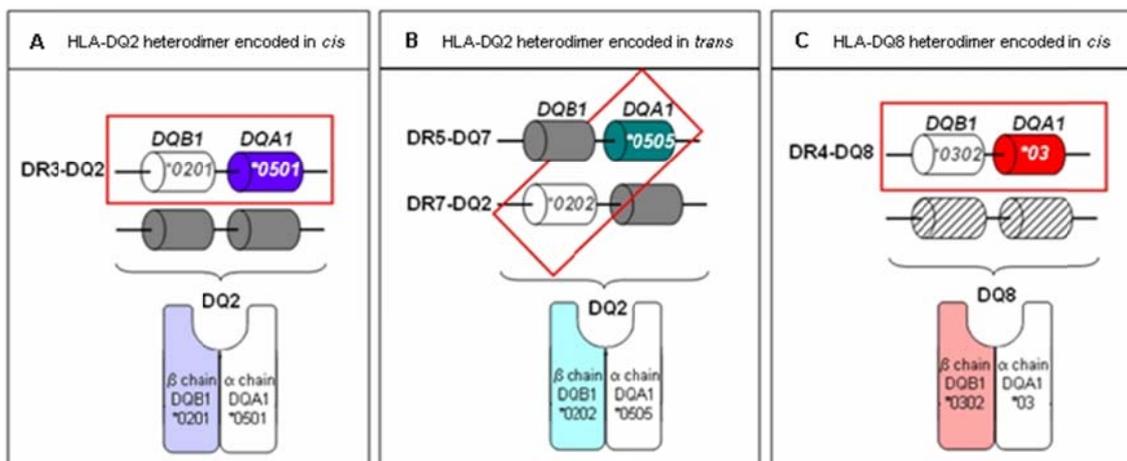


Figura A.2. Esquema del HLA-DQ2 y DQ8 (39)

El HLA-DQ 2.2 (codificado en cis por los alelos DQA1*02:01+DQB1*02:02) es un heterodímero controvertido en lo referente a su papel de predisposición a la celiaquía. La mayor parte de los autores sostiene que, de forma aislada, no confiere susceptibilidad, predisponiendo únicamente si se presenta con el HLA-DQ2.5 (para lo que hay consenso) (40) o con el HLA-DQ7 (41). Sin embargo, en un estudio realizado en población pediátrica del norte de España, se observó que el DQ2.2 predispone a la celiaquía casi tanto como el DQ2.5 (42). Por el contrario, algún autor incluso apunta que la homocigosis del DQ2.2 tal vez confiera protección frente a la EC (37).

Algunos estudios han puesto de manifiesto el impacto del “HLA-DQ2 Gene Dose Effect” (efecto dosis-gen del HLA-DQ2), es decir, el mayor riesgo de EC y de EC refractaria, en personas con homocigosis del HLA-DQB1*02. Los pacientes HLA-DQ2 homocigotos tienen 5 veces más riesgo de desarrollar EC que los heterocigotos (26,33,43), porque los dímeros de HLA que expresen sus APC serán siempre DQ2 y, por tanto, con alta afinidad para el ácido glutámico y el inicio de la reacción inmunitaria alterada. La homocigosis del HLA-DQB1*02 se ha relacionado con niveles de autoanticuerpos significativamente más altos (44), lo que a su vez se asocia a grados superiores de lesión histológica (mayor atrofia; Marsh 3) (45,46).

Como se comentó previamente, la relación mujer: hombre en la celiaquía es de 2:1. Megiorni et al (47), observaron que las pacientes eran más frecuentemente portadoras de las moléculas HLA-DQ2/DQ8, que los pacientes, hasta el punto de que tan sólo el 0.9% de las mujeres celíacas eran DQ2/DQ8 negativas, frente al 9.5% de los hombres celíacos de su estudio. Sugirieron una “impronta paterna” porque la herencia paterna del DQ2 era responsable del predominio femenino. (47) En algunos estudios, se ha observado que existe una correlación entre la homocigosis DQ2, la precocidad en el diagnóstico, la aparición de la sintomatología clásica (ver en el siguiente apartado) de la EC, y el sexo femenino (42).

Recientemente, se han encontrado numerosos genes implicados en la patogenia de la celiacía. Intervienen en la permeabilidad de barrera celular del intestino, la función de linfocitos T, la apoptosis y la cascada inflamatoria: ICOSLG, IL18RAP, IL2/IL21, PTPN2, etc. (28,48). Muchos de ellos, también se relacionan con otras enfermedades de origen inmunitario, como la EIIC.

3.3 Factores ambientales:

Las proteínas del gluten (gliadinas y glutininas (49)) presentes en el trigo, el centeno y la cebada (la avena no contaminada por harina de trigo podría no inducir lesión(8)) son altamente resistentes a la proteólisis en el tracto digestivo alto(33). Estas proteínas se denominan prolaminas: gliadina (trigo), secalina (centeno), hordeína (cebada) y avenina (avena). Las proteínas del gluten constituyen el factor ambiental fundamental para producir la lesión intestinal característica de la EC. Por ello, en el 95% de los casos de EC, retirando el gluten de la dieta, se regenera la mucosa intestinal, desaparece la clínica, y se normalizan los niveles de autoanticuerpos.

En relación con el necesario aumento de la permeabilidad intestinal para el desarrollo de una EC, se ha relacionado la celiacía con numerosas infecciones: adenovirus, candidiasis, rotavirus..., entre otros, o una disbiosis. En la actualidad, ha cobrado mayor interés el rotavirus, que es una causa habitual de enteritis en niños, y la disbiosis. El primero porque se han hallado anticuerpos IgG frente al rotavirus en el 100% de los celíacos frente al 32% de los controles sanos (50) y la disbiosis por numerosos estudios que muestran diferencias en la flora intestinal entre la población general y los pacientes celíacos. En el estudio de De Palma et al, se observó que las bacterias cubiertas de IgA eran menos abundantes en pacientes que en controles, mientras que los bacteroides aparecían en mayor proporción en los celíacos sin tratar (10).

4. Presentación clínica

La EC tiene múltiples formas clínicas: sintomática (clásica, pauci o monosintomática, y refractaria), silente, latente y potencial (Ver figura A.3 y tabla A.1).



Figura A.3. Formas clínicas de presentación, organizadas piramidalmente en relación con la menor frecuencia de la forma clásica y la mayor frecuencia de la potencial.

La EC sintomática tiene tres formas de presentación: la de sintomatología clásica o atípica, y la refractaria.

La forma **clásica** se caracteriza por síntomas graves de malabsorción, anticuerpos séricos positivos y atrofia total de las vellosidades. Este patrón es hoy en día poco frecuente en la edad adulta (8), apareciendo sobre todo en la primera infancia (38).

La EC **pauci** o **monosintomática** (sintomatología atípica) es actualmente la forma de presentación más frecuente, tanto en edad adulta como pediátrica. El espectro histológico es variable, desde enteritis linfocítica a la atrofia total, y el porcentaje de positividad de anticuerpos séricos oscila entre el 15 - 100%, dependiendo de la gravedad histológica.

En cuanto a la EC **refractaria**, hace referencia a pacientes con lesión histológica documentada (generalmente atrofia vellositaria) cuyos síntomas no desaparecen con una correcta cumplimentación de la dieta exenta de gluten

durante al menos seis meses y en los que se ha excluido otras patologías. En estos pacientes es más frecuente la aparición de linfomas intestinales.

Los pacientes con enfermedad celíaca **silente** no tienen manifestaciones clínicas pero sí lesiones histológicas características y, generalmente, también serología positiva. Pese a la escasez o ausencia de síntomas, los pacientes pueden presentar complicaciones secundarias a la malabsorción como ferropenia, osteoporosis, neuropatía periférica, etc.

La EC **latente** se caracteriza por una mucosa duodeno-yeyunal normal en individuos que toman gluten, con o sin anticuerpos positivos, pero que en algún momento de su vida, han presentado o van a presentar características propias de la EC.

Por último, existe la forma de EC **potencial**, generalmente asintomática, con antitransglutaminasa en sangre en rango de normalidad (aunque ocasionalmente pueden encontrarse anticuerpos en la *mucosa* de intestino delgado), y con biopsia negativa (a veces, con aumento de linfocitos epiteliales), pero con genética positiva (HLA-DQ2 o -DQ8).

TIPO DE ENFERMEDAD	SÍNTOMAS	ANTICUERPOS	ENTEROPATÍA	GENÉTICA
Sintomática	+	+	+	+
Silente	-	+	+	+
Potencial	-	-	-	+
Latente	+	+	Anterior (-)	+
	-	-	Actual (+)	+

Tabla. A.1. Tipos de enfermedad celíaca.

La forma de presentación clínica de la EC es muy variable(17), como se observa a continuación, en la **tabla A.2.**

Astenia	Hipoesplenismo
Pérdida de peso	Osteoporosis
Flatulencia	Hipoproteinemia
Dolor abdominal	Diátesis hemorrágica
Diarrea	Aftas y glositis
Esteatorrea	Eczema
Estreñimiento	Dermatitis herpetiforme
Anorexia	Vitíligo
Anemia	Alopecia
Hipocalcemia	Infertilidad
Déficit de IgA	Depresión o neurosis
Pericarditis recurrente	Neuropatía periférica
Linfoma intestinal	Crisis epilépticas

Tabla A.2. Síntomas y signos de la enfermedad celíaca.

Los familiares de enfermos celíacos, tal y como se apuntaba antes, tienen un mayor riesgo de celiaquía, sobre todo los familiares de primer grado (prevalencia 5-15%, 30% si son DQ2 +), aunque también los de segundo grado (2.6-5.5% de EC). (24) Los familiares son frecuentemente pauci o asintomáticos. También tienen mayor riesgo de EC pacientes con enfermedades autoinmunes (DM, tiroiditis autoinmune (51), déficit de IgA, EIIC, etc. (8)), trastornos neurológicos o psiquiátricos (Ej. síndromes cerebelosos, epilepsia o esquizofrenia), síndrome de Down, colitis microscópica, etc.

La predisposición de los pacientes con EIIC a la celiaquía es controvertida, como se verá más adelante. Algunos autores consideran a los pacientes con EIIC como grupo de riesgo, mientras que otros consideran que los pacientes celíacos tienen mayor riesgo de EIIC, pero no al revés (1,8,22).

5. Diagnóstico

El diagnóstico de la EC se basa en: la sospecha clínica (síntomas o grupo de riesgo, detallados en el epígrafe anterior), analítica (autoanticuerpos y

determinación de IgA), estudio genético (HLA) y, fundamentalmente, la biopsia duodeno-yeyunal, siendo los cambios anatomo patológicos en pacientes tomando gluten necesarios, aunque no específicos, para dicho diagnóstico (52).

5.1 Análisis de autoanticuerpos plasmáticos:

Los marcadores séricos (auto-anticuerpos) ayudan a seleccionar personas con mayor probabilidad de presentar la EC, siendo particularmente útiles en aquellos pacientes con síntomas gastrointestinales (síntomas o signos de malabsorción, pérdida de peso, elevación de transaminasas origen no filiado, etc. (52)), enfermedades asociadas a la EC o familiares de enfermos celíacos.

Se detectan en sangre mediante extracción venosa y análisis y, según estudios publicados los últimos años, también mediante “prick test” en los dedos (28,29,53), aunque éste método todavía no se considera un método de cribado estandarizado (54). Los anticuerpos antitransglutaminasa también se obtienen en saliva, pero los estudios sobre su validez diagnóstica actualmente obtienen resultados muy variables (52).

Los autoanticuerpos relacionados con la celiaquía tienen una alta sensibilidad y parecen relacionarse con el grado de lesión intestinal. Títulos de autoanticuerpos 10 veces por encima de los valores de normalidad, tienen un valor predictivo positivo de celiaquía de casi el 100% (28). El 10% de los pacientes con anticuerpos antiendomiso positivos, sin lesión histológica intestinal, o con un grado I de Marsh, desarrollará una atrofia vellositaria si no se trata (17). Sin embargo, existen múltiples estudios que han observado anticuerpos antitransglutaminasa positivos, sin celiaquía subyacente, en pacientes con diabetes mellitus tipo I, hepatopatía crónica, artritis psoriásica y reumatoide, y fallo cardiaco, aunque no se han obtenido biopsias duodenales en casi ningún caso (52).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que una serología negativa ocasionalmente no permite excluir la enfermedad, sobre todo en pacientes con lesión histológica poco avanzada (Marsh 1 y 2, ver después) (8), con tratamiento

inmunosupresor, mayores de 35 años o fumadores (28,55). Se ha observado hasta un 10% de falsos negativos (17).

5.2 Genotipificación del HLA:

El estudio genético de haplotipos, como hemos visto, tiene un alto valor predictivo negativo (cerca del 100%) (24). Aunque en el cribado habitual de EC no es necesario, tiene utilidad clínica en pacientes con sospecha clínica y serología negativa, pacientes con anticuerpos positivos que rechazan la biopsia intestinal, pacientes dudosos que siguen la dieta sin gluten en los que se plantea la reintroducción del gluten, y para seleccionar individuos de alto riesgo entre familiares de celíacos y pacientes con enfermedades asociadas.

5.3 Estudio anatómico-patológico:

La prueba de oro para establecer el diagnóstico definitivo consiste en la práctica de una biopsia del duodeno o yeyuno (esta última más habitual en niños, aunque ya casi en desuso), debiendo realizarse antes de la retirada del gluten de la dieta. Conviene realizar un estudio de coagulación previo a la exploración endoscópica para la obtención de biopsias, porque algunos pacientes pueden tener un déficit de protrombina secundario a la malabsorción de vitamina K (8). Dado que la lesión puede ser parcheada (8,52,56,57), se aconseja la toma de 4-6 muestras de duodeno distal y 1-2 de bulbo duodenal (3,24,28,58).

El estudio anatomopatológico permite confirmar la existencia de lesiones compatibles (atrofia vellositaria, hiperplasia de las criptas, engrosamiento de la membrana basal, aumento de linfocitos intraepiteliales -LIEs-, vacuolas citoplásmicas y morfología cuboidal del enterocito) y establecer el estadio de la lesión (clasificación de Marsh-Oberhuber). El recuento de linfocitos de muestras duodenales es fundamental para excluir las formas iniciales de EC. Actualmente, el límite superior de normalidad está en 20-25 linfocitos por cada 100 células epiteliales (8,56,59), siendo el límite de 20 LIEs el propuesto para tinciones de

hematoxilina-eosina y de 25 con tinciones de CD3. El límite previo de 40 linfocitos/100 células epiteliales se refería a biopsias yeyunales (59).

Teniendo en cuenta estos criterios, se clasifican las lesiones en Marsh 0 (mucosa preinfiltrativa), 1 (aumento de LIEs), 2 (hiperplasia de criptas), 3 (atrofia vellositaria: a) parcial, b) subtotal, c) total), y 4 (hipoplasia). **Figura A.4.**

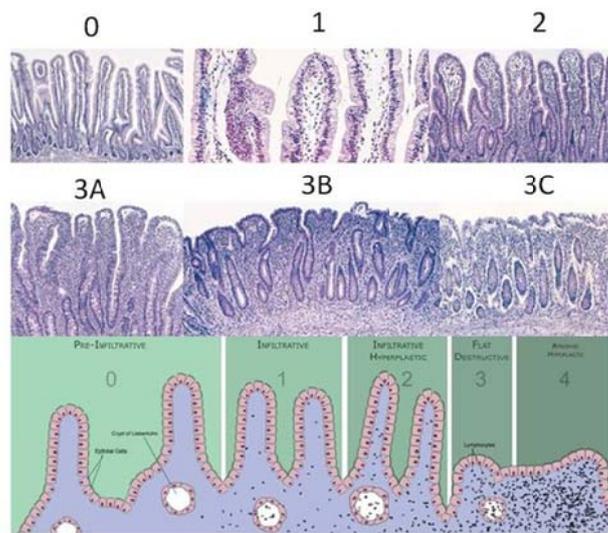


Figura A.4. Clasificación histológica de Marsh-Oberhuber.

Cualquiera de estas formas histológicas es compatible con EC pero no específica, pudiendo aparecer en otras intolerancias alimenticias, enfermedad de Whipple, lesión por AINEs, sprue tropical, infección por *Helicobacter Pylori*, giardiasis, enfermedad de Crohn (60), sobrecrecimiento bacteriano o incluso linfomas (ver tabla A.3) (8,52,59). Si la sospecha de EC es alta, pero la biopsia es negativa o dudosa, la muestra deberá ser revisada por un patólogo experto, y el clínico deberá valorar si el paciente ingiere una dieta pobre en gluten (por ejemplo por tener familiares celíacos) o si toma inmunosupresores, circunstancias ambas que pueden conllevar menores cambios en la mucosa (52).

Table 4. Histologic Differential Diagnosis of Celiac Disease.*
Conditions that can cause a flat duodenal mucosa
Peptic injury
Tropical sprue
Infectious gastroenteritis
Eosinophilic gastroenteritis
Collagenous sprue
Giardiasis
Autoimmune enteritis
Radiation enteritis
AIDS enteritis
Zollinger–Ellison syndrome
Ischemic enteritis
Crohn’s disease
Microvillous inclusion disease
Common variable hypogammaglobulinemia
Graft-versus-host disease
Food sensitivities (cow’s milk, soy)
Drug effects
Lymphoma

* Modified from Fenoglio-Preiser.²⁰

New England Journal of Medicine. 352(4):393-403, 2005.

Tabla A. 3. Diagnóstico diferencial de atrofia de la mucosa de intestino delgado.

El 50-60% de los pacientes diagnosticados de celiaquía tienen un grado 3 de Marsh en la biopsia de intestino delgado (52). Un aumento de LIEs, sin otros cambios en la mucosa, puede suponer una enfermedad celíaca latente, inicial o una parte del espectro de la enteropatía sensible al gluten, pero no puede ser considerado diagnóstico certero de celiaquía (24). Ludvigsson et al, observaron que la inflamación inespecífica con aumento de LIEs se relacionaba en primer lugar con la celiaquía en fases iniciales y, en segundo lugar, con la EIIC. Observaron que la inflamación histológica se relacionaba con un aumento de mortalidad en los primeros cinco años de seguimiento, que postulaban como secundaria a que, al no poderse considerar como EC, no se retiraba el gluten de la dieta a los pacientes con dichas lesiones (61).

Otras técnicas que intentan mejorar la precisión diagnóstica de EC son la endomicroscopia (62), la determinación de subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales (63) y la detección de anticuerpos en el sobrenadante de la biopsia de intestino delgado (64-66), o incluso de la mucosa oral (67), pero únicamente están disponibles en escasos centros y sus indicaciones no están plenamente establecidas.

En la última década, se han buscado otros métodos anatómo-patológicos para afinar el diagnóstico de la celiaquía. Entre ellos, está la detección de transglutaminasa en la biopsia duodenal, que es menos compleja que la detección de anticuerpos en el sobrenadante. Tuncer y Villanacci concluyeron que no había diferencias en la distribución ni en el grado de tinción de las muestras, aplicando la anti-tTG para detectar la tTG en la biopsia duodenal, mediante técnicas inmunohistoquímicas (68,69). Sin embargo, problemas metodológicos, en relación fundamentalmente con el grupo control, hacen que los resultados no puedan considerarse del todo fiables.

Otros estudios, apuntan a que sí hay diferencias en la localización de la tTG de los celíacos respecto de la población general, aunque todos son estudios reducidos, algunos incluso sin grupo control. Kaukinen objetiva depósitos de IgA anti-tTG en la mucosa de pacientes con EC (70). Mediante inmunohistoquímica, Sakly localiza la tTG en la membrana basal (71). Ciccocioppo, con inmunofluorescencia, la sitúa en el epitelio y subepitelial (72). Y Esposito profundiza, utilizando PCR y técnicas inmunohistoquímicas, para afirmar que hay mayor expresión de tTG activa en la matriz extracelular y en el enterocito de biopsias de EC. En concreto, observa tTG en la lámina propia, a nivel subepitelial, justo por debajo de la membrana basal, y apunta que también hay tinción compatible con tTG en el borde en cepillo y el citoplasma de los enterocitos. Esta misma distribución, la ven en las biopsias duodenales de una paciente con enfermedad de Crohn duodenal (73). Finalmente, Biagi, afirma que la distribución epitelial de la tTG es específica de la EC y gluten-dependiente (74).

6. Tratamiento

El único tratamiento eficaz de la EC es la dieta sin gluten toda la vida. Si se sigue adecuadamente, los síntomas van cediendo tras dos semanas de dieta sin gluten, la serología se normaliza a los 6-12 meses y las vellosidades se recuperan completamente unos dos años después. En niños, la mejoría histológica es rápida,

pero en adultos puede ser lenta e incompleta. (24) La retirada precoz del gluten parece proteger a los pacientes de la aparición de complicaciones malignas (29).

Se están barajando múltiples tratamientos (33) que reducen la permeabilidad del epitelio intestinal, bloquean la tTG, mejoran la disbiosis o bacterias que digieren parcialmente el gluten, pero, de momento, no desbancan a la dieta sin gluten. Algunos pacientes con celiaquía refractaria responden a tratamientos con corticoides, inmunosupresores o terapias biológicas, como el anti-factor de necrosis tumoral alfa (60).

B) Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica (EIIC)

1. Definición

La EIIC es una inflamación crónica del intestino que engloba dos enfermedades idiopáticas, la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (ECr). La ECr generalmente aparece en el íleon, colon y/o región perianal, aunque puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo, habitualmente de forma discontinua, con una afectación transmural y aparición de fístulas, abscesos y estenosis. En la CU característicamente se lesiona únicamente la mucosa y submucosa del recto y cualquier parte del colon, normalmente con un patrón de continuidad. (75). La lesión histológica más representativa de la ECr es el granuloma no caseificante y de la CU el absceso críptico (76).

Se considera que la EIIC aparece al interaccionar factores del huésped y el ambiente. Actualmente, se cree que la EIIC es un continuo de enfermedades que abarcan desde formas mono u oligogénicas de herencia familiar, a presentaciones poligénicas con importante influencia ambiental, fundamentalmente de origen infeccioso. La patogenia de la enfermedad guarda relación con varias vías funcionales que incluyen la autofagia, detección bacteriana intracelular y la respuesta a proteínas desplegadas ("Unfolded protein response", UPR), que juegan un papel crucial en la interacción del huésped con la flora comensal

intestinal. Los factores ambientales y genéticos que influyen en la aparición de la EIIC parecen actuar sobre la relación homeostática que mantiene la flora y el sistema inmunitario intestinal (77).

2. *Epidemiología*

La CU y la ECr son enfermedades de la sociedad moderna, con un aumento progresivo de la incidencia desde mediados del siglo XX. La incidencia anual y prevalencia de CU es de 1.2 a 20.3 y de 7.6 a 246.0 casos por 100 000 personas, respectivamente. La ECr es algo menos frecuente, con una incidencia de 0.3 a 15.6 casos y una prevalencia de 3.6 a 214.0 casos por 100 000 personas (78). La EIIC se diagnostica generalmente en personas de 15 a 30 años de edad (75).

Cambios dietéticos, y en el uso de antibióticos y en los gérmenes que colonizan el intestino, como la erradicación de helmintos intestinales, probablemente hayan contribuido a aumentar la prevalencia de EIIC el último siglo (79).

3. *Patogenia*

La EIIC, al igual que la EC, es el resultado de la interacción de factores inmunológicos (inmunidad adquirida e innata), genéticos (NOD2, *IL18RAP*, etc.) y ambientales (flora comensal, agentes infecciosos externos, fármacos, etc.). Ver **Figura B.1.**

Hoy en día, se considera que la EIIC es el resultado de la combinación de varios factores(80): cambios globales del ambiente, múltiples variaciones genéticas, alteraciones de la microbiota intestinal y respuestas inmunitarias aberrantes, tanto innatas como adaptativas. Es necesaria una combinación de estos factores (probablemente los cuatro) para que se dispare y mantenga una inflamación que conlleve una EIIC. Cada paciente parece tener una combinación

de factores diferente, y, por tanto, un conjunto de manifestaciones y respuestas al tratamiento algo distintas, que obliga a un manejo individualizado (81).

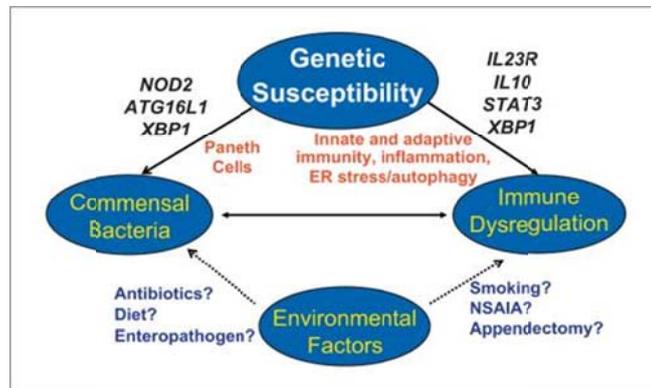


Figura B.1. Representación de la interacción entre la genética, la inmunidad y el ambiente (77).

Al igual que en la enfermedad celíaca, la afectación de la integridad de la barrera intestinal es fundamental en la aparición de una EIIC. Para el desarrollo de una EIIC, es necesario un aumento de la carga bacteriana en la pared intestinal, favorecido por alteraciones genéticas relacionadas con la barrera intestinal, una respuesta deficitaria del sistema inmune innato, con un menor aclaramiento de bacterias, una autofagia deficiente, y una activación de la inmunidad adaptativa, con el reclutamiento continuo de células inflamatorias (82) (Representación esquemática en **figuras B.1 y 2**).

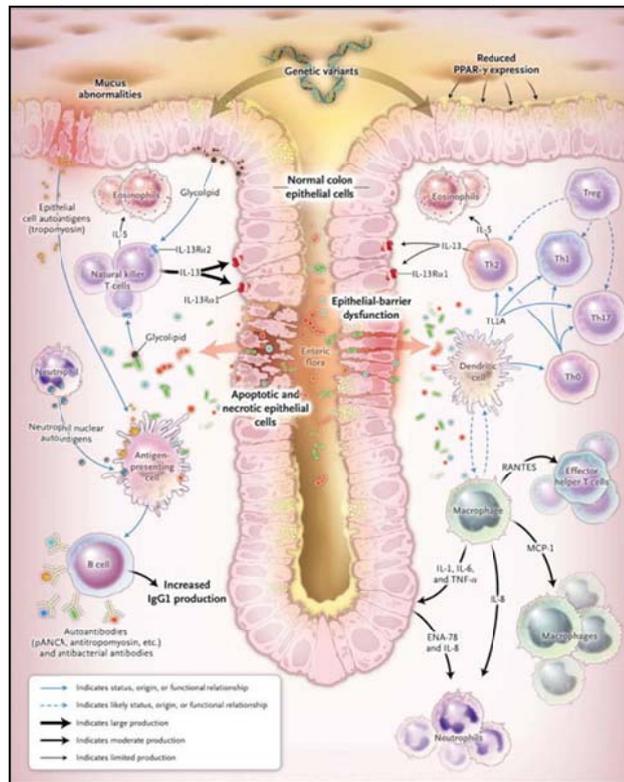


Figura B.2. Dibujo que representa la patogenia de la EIIC, con la interacción de factores y la puesta en marcha de la cascada inflamatoria (78).

3.1 Factores inmunológicos

El intestino es el órgano linfático más grande del organismo, por la enorme carga antigénica a la que es expuesto diariamente. El tejido linfático de la mucosa tiene mecanismos de regulación únicos, como refleja la tolerancia oral, la inflamación fisiológica y los linfocitos intraepiteliales, que responden a diferentes vías de activación. La presencia de células presentadoras de antígeno novedas es responsable de respuestas inmunitarias exclusivas.

Una respuesta inmunitaria alterada se considera un elemento crucial en la patogenia de la EIIC (ver **figura B.2**). El sistema inmunitario innato reconoce los productos bacterianos y las señales celulares; una señalización inadecuada puede acarrear una respuesta inflamatoria descontrolada. Dicha señalización e

inflamación aberrante conlleva una activación de la inmunidad adquirida y, por tanto, un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias derivadas de los linfocitos T CD4+. Esta cascada inflamatoria excesiva supera los niveles de tolerancia e inmuno-regulación.

Además de una respuesta exagerada, existe una exposición excesiva a los antígenos. Se considera que la función de la barrera epitelial intestinal de los pacientes con EIIC está alterada, lo que supone un acceso inapropiado de los antígenos al sistema inmunitario de la mucosa (83).

Las células de Paneth son foco de la patogenia de la EIIC. Las células de Paneth liberan productos antimicrobianos, entre las que se encuentran las α -defensinas. La flora bacteriana comensal regula la producción de defensinas mediante la señalización de los receptores "toll-like", controlando así la composición de las bacterias en el intestino. En los pacientes con alelos NOD2 (ver apartado siguiente, factores genéticos), se observa una menor liberación de defensinas de las células de Paneth. Así mismo, en pacientes con pérdida de la función ATG16L1, se observan alteraciones estructurales de los gránulos de las células de Paneth. Según estudios recientes, estas alteraciones estructurales en pacientes predispuestos se dan cuando hay norovirus (77).

Las células con elevada capacidad secretora, como las células de Paneth, tienen un nivel de estrés del retículo endoplásmico elevado, que activa la respuesta UPR, controlando la apoptosis y asegurando la homeostasis.

Se cree que en un paciente genéticamente predispuesto, un factor precipitante como agentes microbianos, fármacos, factores inflamatorios per-se, hipoxia, etc., pueden conllevar un estrés del retículo endoplásmico con acúmulo de proteínas no desdobladas (UPR), que inicia la EIIC (76,84).

Al profundizar en la inmunología aberrante de la EIIC, se observa que existen numerosos puntos de la cascada inflamatoria que se pueden ver afectados en los pacientes, siendo la mayor o menor afectación de unos u otros (probablemente por la interacción de los distintos genes y factores ambientales) determinante para el fenotipo de la enfermedad.

3.2 Factores genéticos

Alrededor de un 10% de los pacientes con EIIC, tienen algún familiar afecto. La agregación familiar parece jugar un papel más importante en la ECr que en la CU (75), con una concordancia entre gemelos del 10-15% en la CU y 30-35% en la ECr (76). Como se mencionaba al definir previamente la enfermedad, la raíz de la EIIC incluye desde formas monogénicas que cumplen las leyes de Mendel hasta formas poligénicas en las que el factor infeccioso ambiental es definitivo (ver **figura B.3**). La inmunobiología de las EIIC familiares (como las mutaciones del gen que codifica el receptor de la interleuquina 10, regulador de la inflamación intestinal (85)), que suponen en torno al 10% de las EIIC, puede ser distinta de la encontrada en las formas esporádicas, en la que los factores ambientales, con el eje puesto en un microorganismo, influyen considerablemente (77).

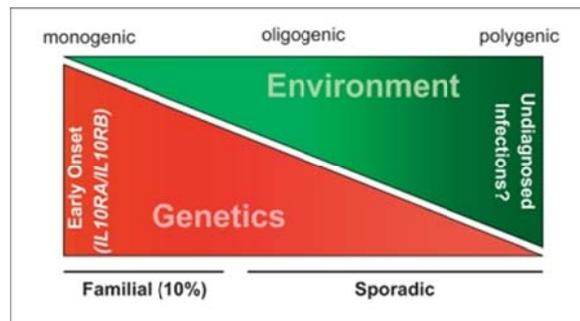


Figura B.3. Esquema de la influencia de la genética y el ambiente, teniendo en cuenta que se trate de una EIIC familiar o esporádica, siendo las primeras más frecuentemente monogénicas y las esporádicas habitualmente poligénicas (77).

Salvo que los factores ambientales actúen en abundancia y precozmente y precipiten una EIIC antes de lo “genéticamente” previsto, según la carga genética que predisponga a la EIIC, la enfermedad aparece más o menos precozmente, como se observa en la representación de Tommasini (ver **figura B.4**).

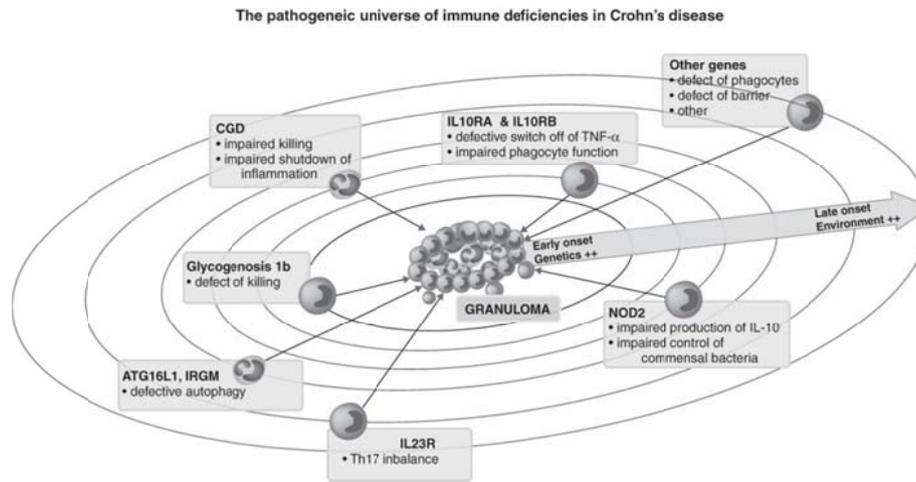


Figura B.4. Universo de alteraciones inmunitarias de Tommasini, con la representación del efecto ambiental y genético (82).

Los estudios de asociación de genoma completo (genome-wide association Studies –GWAS–) han encontrado 99 loci genéticos de riesgo para la EIIC, de los cuales 28 se encuentran tanto en la ECr como en la CU. De momento, los GWAS tan sólo han puesto de manifiesto el 23% y el 16% de la carga “heredable” de la ECr y la CU respectivamente. Más del 50% de los loci de susceptibilidad de la EIIC se han asociado a otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como la diabetes, la artritis reumatoide (76) o la celiaquía (48). Curiosamente, los mismos genes pueden tener efectos contrarios en distintas enfermedades. Por ejemplo, la variante PTPN22 (R620W) es un potente factor de riesgo para la diabetes tipo 1 y la artritis reumatoide, pero protege frente a la ECr (76).

Aunque es difícil precisar la importancia de la región del HLA (6p21.1-23) en la determinación de la susceptibilidad genética, las estimaciones de estudios de alelos de HLA en las familias con miembros con EIIC, sugieren que dicha región supone el 10-33% del riesgo genético de la ECr y hasta el 64-100% del riesgo de CU (86).

El manejo de bacterias intracelulares en la ECr parece defectuoso. Algunos de los genes relacionados con el Crohn son el *NOD2*, *ATG16L1* e *IRGM*, implicados en el reconocimiento bacteriano y la autofagia de la inmunidad innata (48). El *NOD2* es una proteína intracelular que actúa de sensor de péptidoglicanos

(de la pared celular bacteriana), de dipéptidos de micobacterias o de ARN de virus, para activar las vías del factor nuclear kappa B y de la MAP quinasa (mitogen-activated protein kinase), con la consiguiente liberación de citoquinas (Ej. TNF e IL-1) y péptidos antimicrobianos. En condiciones normales, se consigue la destrucción de las bacterias con mínima inflamación, y el NOD2 regula la liberación de citoquinas, con reducción de las mismas, en inflamaciones crónicas. En pacientes con ECr y NOD2 alterado (30% de los pacientes de origen europeo), se mantiene la liberación de citoquinas sin un aclaramiento adecuado de bacterias(75,77). La homocigosis de dicho gen aumenta el riesgo de ECr hasta en 11 a 27 veces (75).

Los estudios del genoma han puesto de manifiesto múltiples genes afectos en la EIIC, gran parte de los cuales se describen en la **figura B.5**.

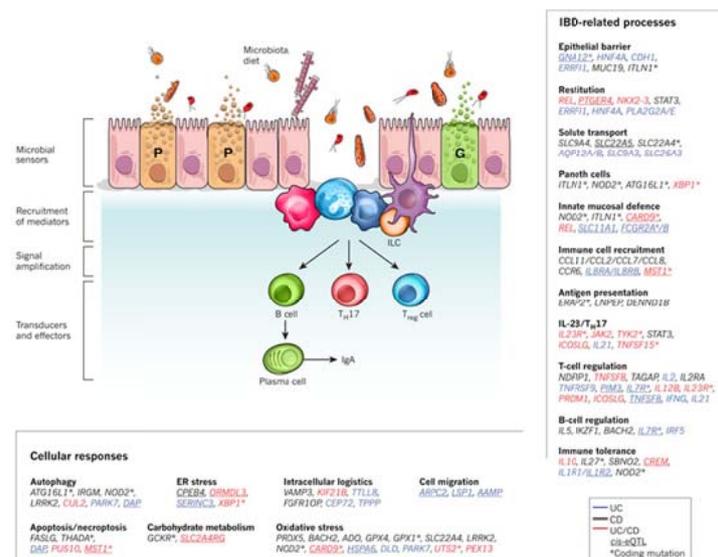


Figura B.5. Esquema de los niveles de defensa intestinal implicados en la patogenia de la EIIC, con la anotación de casi todos los genes implicados en cada proceso, conocidos actualmente (76).

3.3 Factores ambientales

Ya en la primera descripción de la ECr (realizada por el Dr. Crohn y sus colegas en los años 30 del siglo XX), se apreciaba que la EIIC podía tener una base

genética y ambiental (87), por la agregación familiar y por la similitud anatomo-patológica de la ECr con la tuberculosis (77). Así mismo, las similitudes genéticas entre la ECr y la infección por las micobacterias de la lepra son tan llamativas (76,88) que actualmente plantean la posibilidad de que un porcentaje de pacientes tenga la enfermedad como consecuencia de la infección o que la respuesta de los pacientes con EIIC a la flora comensal corresponda a una respuesta inmunológica alterada en la misma vía (la autofagia y la regulación llevada a cabo por el receptor NOD2) que la empleada al enfrentarse al *Mycobacterium leprae* (77).

Se han relacionado con la EIIC muchos gérmenes: *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), (89-91), *Helicobacter no-pylori* (92,93)), *E. coli* adherente-invasivo (94-104), citomegalovirus, parvovirus, virus de Epstein-Barr y norovirus, etc. (92) La mayor parte de ellos podrían ser causa o consecuencia, no pudiéndose discernir, de momento, si precipitan la enfermedad o aparecen porque las características de la EIIC favorecen la sobreinfección por diversos microorganismos. Lo que sí que se ha comprobado es que, tras una gastroenteritis de origen infeccioso, aumenta por 4 el riesgo de ECr (105).

La estrecha interacción huésped-microbiota facilita el control de la inflamación intestinal y la homeostasis. Numerosos estudios en animales o pacientes con EIIC van a favor de que el mayor estímulo antigénico de la EIIC es la propia flora comensal (77). Los pacientes con EIIC tienen una composición de la flora intestinal distinta a la de la población general, con mayor número de enterobacterias y menor número de Firmicutes y Bacteroidetes(75), lo que se denomina “disbiosis” (77,94) (también presente en la EC).

A favor de la disbiosis como factor crucial en la patogenia de la EIIC se encuentra el hecho de que se observa fundamentalmente en las zonas del tracto digestivo con mayor concentración de microbiota, que los animales sin flora intestinal (“libres de gérmenes”) no desarrollan inflamación intestinal y que los antibióticos son útiles en determinadas circunstancias, sobre todo en la ECr (77). La disbiosis aparece como consecuencia de la interacción de la genética (alteración genética de los macrófagos, de las células de Paneth, de las secretinas, de la IgA y

del moco) y del fenotipo de la EIIC, con cambios más acusados en pacientes con Crohn ileal.

Hay diversos factores ambientales que influyen en la evolución de la EIIC. El tabaco es uno de ellos, exacerbando la ECr y protegiendo frente a la CU. El tabaco favorece la producción de linfocitos TH1 y dificulta la autofagia, alterados en la ECr (76,77). Los antiinflamatorios no esteroideos y la apendicectomía, junto con el tabaco, actúan sobre la regulación del sistema inmunitario de la mucosa (77). De hecho, la apendicectomía en la infancia se asocia a una disminución de la incidencia de CU (106), mientras que ocurre lo contrario con la ECr (78).

4. Presentación clínica

La enfermedad Inflamatoria Intestinal crónica (EIIC) incluye una amplia variedad de presentaciones y manifestaciones clínicas cuya característica principal es la inflamación crónica del tubo digestivo. La EIIC engloba dos entidades principales: la enfermedad de Crohn (ECr) y la colitis ulcerosa (CU), pudiéndose incluir también una tercera, la colitis indeterminada. La cronicidad en el curso clínico de la EIIC consiste en alternar periodos de inactividad o quiescencia (fases de remisión) con periodos de actividad clínica de diferente intensidad (brotes o recidivas) (107).

Los síntomas y la gravedad de cada una de las EIIC dependerán de la extensión, la localización, el comportamiento, el grado de actividad inflamatoria y de las manifestaciones extraintestinales que asocien, todo ello siendo responsable de la heterogeneidad fenotípica. Actualmente, las clasificaciones de la EIIC se basan en aspectos epidemiológicos y clínicos, pero se pretende utilizar marcadores serológicos y genéticos para subclasificar la enfermedad de forma más precisa (107).

4.1 Enfermedad de crohn

La ECr es un tipo de EIIC crónica que puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano. Las áreas que presentan la enfermedad con mayor frecuencia son el íleon y ciego (40% de los pacientes tienen una afectación ileocólica). La ausencia de afectación rectal, se utiliza como marcador diferencial con la CU, en la que es característica la inflamación de la mucosa del mismo, pero el 60% de los pacientes con afectación colónica presenta enfermedad rectal, sobre todo si hay enfermedad perianal.

La ECr se caracteriza por una lesión transmural y segmentaria del intestino, alternando zonas sanas y enfermas. La afectación transmural conlleva complicaciones como las fístulas, los abscesos y las estenosis, que determinan el patrón de la enfermedad (inflamatorio, estenosante o fistulizante), según predomine unas u otros. Ver **definiciones en anexo 1**.

La clínica es variable: desde formas subclínicas con anemia, osteoporosis,

Clasificación de Montreal de la Enfermedad de Crohn			
EDAD AL DIAGNÓSTICO (A)	A1 ≤ 16 años A2 17-40 años A3 > 40 años		
LOCALIZACIÓN (L)	L1	Íleon terminal	L1+L4 (íleon terminal+tracto digestivo alto)
	L2	Colon	L2+L4 (colon+tracto digestivo alto)
	L3	Ileocólica	L3+L4 (ileocólica+tracto digestivo alto)
	L4	Tracto digestivo alto	
PATRÓN CLÍNICO (B)	B1	No estenosante, no fistulizante(**), o inflamatorio	B1p (inflamatorio con afección perianal asociada)
B2	Estenosante		B2p (estenosante con afección perianal asociada)
B3	Fistulizante		B3p (fistulizante con afección perianal asociada)

Tabla B.1. Clasificación de Montreal de la ECr, por edad, localización y patrón clínico.

etc., pasando por la diarrea, estreñimiento, dolor abdominal, etc., hasta cuadros sépticos, oclusivos, perforaciones o hemorragias, que requieren intervención urgente.

Dada la variabilidad de la clínica y de la respuesta al tratamiento, se utilizan clasificaciones internacionales (establecidas por consenso) para concretar el fenotipo, siendo la clasificación de Montreal la más empleada en la actualidad (ver **tabla B.1**).

4.2 Colitis ulcerosa

La CU afecta a la mucosa colónica de forma difusa y continua, habitualmente comenzando en recto y extendiéndose de forma proximal hasta el ciego. La inflamación rectal es característica, pudiendo ser menor en pacientes con tratamiento local (supositorios, espuma o enemas). La extensión de la CU se divide en tres grupos: proctitis (30-40%), colitis izquierda (30-40%) y colitis extensa (20%) (Ver **definiciones** en **anexo 1**). Esta división permite individualizar el tratamiento y tener una idea del pronóstico. Los pacientes con colitis extensa sufren más hospitalizaciones y tienen un mayor riesgo de colectomía o de cáncer colorrectal (107).

Los síntomas típicos son la rectorragia, la diarrea, el tenesmo (deseo de defecar que no alivia al defecar, por inflamación mucosa), urgencia defecatoria, dolor abdominal y, en casos graves, sepsis, megacolon, hemorragia franca, etc.

Extensión (E)

- E1) Proctitis ulcerosa:** afección limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea)
- E2) Colitis izquierda** (o colitis distal): afección limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico)
- E3) Colitis extensa** (pancolitis): afección que se extiende más allá del ángulo esplénico.

Gravedad (S)

- S0) Colitis en remisión** (Colitis silente): no hay síntomas de la enfermedad.
- S1) Colitis leve:** cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de la VSG (ver Índice de Truelove-Witts, Tabla II).
- S2) Colitis moderada:** criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves (ver Índice de Truelove-Witts, Tabla II).
- S3) Colitis grave:** seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afección ("toxicidad") sistémica grave.

Obtenida del comentario del Grupo Español de Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica sobre el artículo (108), que se puede ver en la página web de la Asociación Española de Gastroenterología.

Tabla B.2. Clasificación de Montreal de la CU, tomando en consideración la extensión y gravedad.

4.3 Manifestaciones extraintestinales

Tanto la colitis ulcerosa como la enfermedad de Crohn deben considerarse como trastornos sistémicos, ya que con frecuencia aparecen síntomas extraintestinales que no siempre coinciden con la actividad de la enfermedad intestinal de base.

La prevalencia de las manifestaciones extraintestinales (MEI) en la EIIC oscila entre el 10 y 50%, según series (109,110). Los órganos afectados con mayor frecuencia son las articulaciones, la piel, los ojos y la vía biliar.

Algunas MEIs (por ejemplo, la colangitis esclerosante primaria, o la espondilitis anquilosante) tienen un curso independiente de la enfermedad intestinal, pero, en general, las MEIs siguen el curso de la enfermedad de base y pueden tener un impacto importante en la calidad de vida, la morbilidad y la mortalidad de estos pacientes.

El desarrollo de una MEI parece incrementar la susceptibilidad a padecer otras. Enfermedades como la artritis periférica, el eritema nodoso, la colangitis esclerosante primaria y la uveítis muestran una especial propensión a solaparse, lo cual hace pensar en un mecanismo patogénico común (Ej. tropomiosina) (109).

MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES DE LA EIIC
<p>Articulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Artritis centrales: <ul style="list-style-type: none"> o Espondilitis anquilosante: anquilosis ósea progresiva desde la región lumbar a la cervical, similar a la idiopática pero sin predominio de género y de aparición a cualquier edad. o Sacroileítis: inflamación en la articulación sacroiliaca, que puede ser asintomática y evolucionar a anquilosis. - Artritis periféricas: <p>Tipo I: pauciarticular (<5 articulaciones), asimétrica, de grandes articulaciones, se asocia a la enfermedad, no destrucción articular</p> <p>Tipo II: poliarticular (≥5 articulaciones), simétrica, de pequeñas articulaciones, no se asocia a la actividad. Puede aparecer destrucción articular.</p>
<p>Oculares:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uveítis (sobre todo iridociclitis, uveítis anterior): dolor ocular, visión borrosa y fotofobia, que puede conllevar la creación de adherencias y, por tanto, un glaucoma secundario o cataratas. - Epiescleritis: enrojecimiento ocular agudo que no produce pérdida de visión.
<p>Cutáneas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eritema Nodoso: nódulos subcutáneos múltiples que no dejan úlcera o cicatriz. - Pioderma Gangrenoso: dermatosis ulcerativa no infecciosa. - Estomatitis aftosa: úlceras excavadas, redondeadas, con un centro fibrinoso, rodeadas de un halo eritematoso.
<p>Hepatobiliares:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Colangitis (Colangitis esclerosante primaria): hepatopatía crónica colostásica que desemboca en cirrosis.
<p>Trombosis</p>

Tabla B.3. Manifestaciones extraintestinales de la EIIC.

Los principales tipos de MEIs se exponen en la tabla anterior (**Tabla B.3**).

5. Diagnóstico

El diagnóstico de la EIIC se basa en la sospecha clínica y los hallazgos endoscópicos e histológicos, pudiendo ser determinantes los estudios radiológicos en la ECr. Los estudios analíticos de sangre (hemograma, PCR, etc.) y heces (calprotectina fecal fundamentalmente) orientan sobre la actividad inflamatoria en el momento de la determinación.

La historia clínica detallada debe incluir: los síntomas (vistos en el apartado previo), los antecedentes familiares de ECr, CU o enfermedades autoinmunes, viajes recientes, intolerancias alimenticias, toma reciente de antibióticos o antiinflamatorios, hábito tabáquico, historia de apendicectomía, e infecciones gastrointestinales (105,111).

Se deben tomar múltiples biopsias durante la ileocolonoscopia, incluso de zonas macroscópicamente normales. El aspecto endoscópico de la CU es de eritema, congestión y friabilidad mucosa, pérdida del patrón vascular, (**ver Imagen B.1**) y en enfermedad de larga evolución, atrofia mucosa con pérdida de la haustración, estenosis de la luz y pseudopólipos.

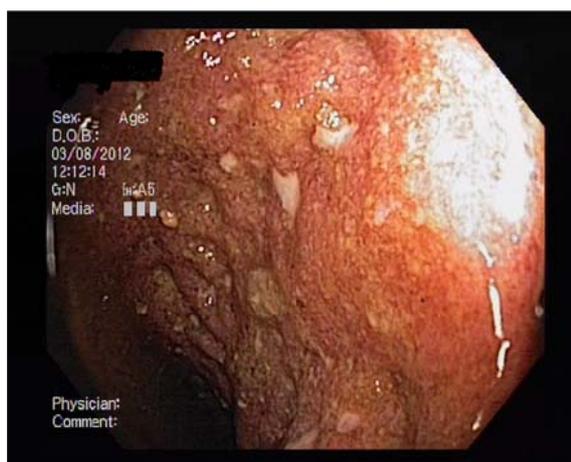


Imagen B.1. Visión endoscópica de CU. La foto corresponde a la luz colónica de un paciente con CU moderada-grave, de larga evolución. Unidad de Endoscopias del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

La luz intestinal de un enfermo de Crohn se caracteriza por presentar lesiones discontinuas, con ulceraciones profundas y aspecto en empedrado, como se puede observar a continuación (**Imágenes B.2 y B.3**).



Imagen B.2 y B.3. Visión endoscópica de la ECr. La B.2 muestra el típico aspecto en empedrado y, la B.3, la estenosis con úlceras profundas. Unidad de Endoscopias del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

En los pacientes con ECr, se recomienda completar el diagnóstico con un estudio de intestino delgado, generalmente mediante entero-TC (tomografía computarizada) o entero-resonancia, o cápsula endoscópica (105).

La característica histológica de la colitis ulcerosa es que el proceso se limita a la mucosa. La lámina propia se encuentra congestiva, edematosa y con aumento del número de células. Hay una distorsión de las criptas con acúmulo de neutrófilos: criptitis, si están en su pared, o microabscesos crípticos (**Figura B.4**), si están en su interior. En los casos de larga evolución, se observa una deformación arquitectónica, atrofia de las criptas, infiltrado inflamatorio crónico y disminución de moco.

El hallazgo histológico clave para el diagnóstico de Crohn es el granuloma no caseificante (**Figura B.5**), característico, no patognomónico, y que no está presente en todas las muestras estudiadas. La distorsión de las criptas de forma discontinua también es frecuente en el estudio anatómico patológico de la ECr (107).

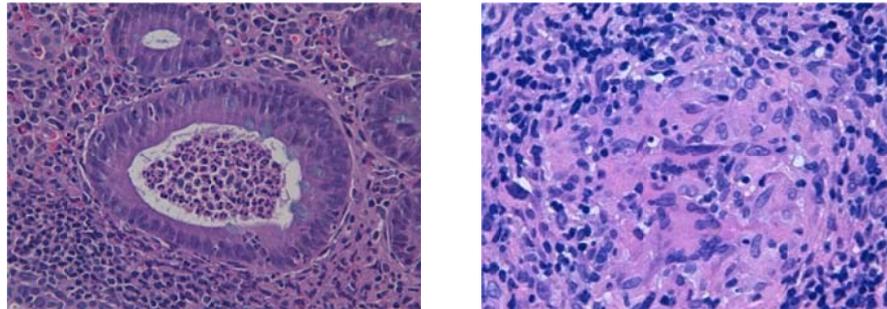


Imagen B.4 y B.5. Lesiones anatómico-patológicas características de la EIIC. A la izquierda (B.4.), un absceso críptico en la CU, y, a la derecha (B.5.) un granuloma no caseificante de la ECr. Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

6. Tratamiento

No existe un tratamiento etiológico de la EIIC. Hay una batería de fármacos (aminosalicilatos, antibióticos, probióticos, corticoides, inmunosupresores y agentes biológicos) que, actuando sobre la cascada inflamatoria, tienen el objeto de reducir la inflamación y mantener la enfermedad en remisión. El tratamiento se ha de individualizar en función del fenotipo de la enfermedad y la respuesta particular a la medicación. En ocasiones, será necesario asociar un tratamiento endoscópico y/o quirúrgico, al farmacológico.

C) Relación entre EC y EIIC

Tanto la EC como la EIIC son enfermedades sistémicas que afectan principalmente al intestino, con una etiología multifactorial en la que interacciona el ambiente, con la genética, dando una respuesta inmune aberrante. La epidemiología de ambas es llamativa, siendo, las dos, enfermedades frecuentes, sobre todo en países desarrollados, con el pico de aparición en población joven (antes de los 20 en la EC y antes de los 30 en la EIIC). Diversos estudios han evaluado tanto la prevalencia de EIIC en pacientes con EC, como la de EC en pacientes con EIIC con el fin de demostrar una asociación entre ambas enfermedades.

Ante la constatación de que hay mayor número de pacientes con EIIC en celíacos y familiares de celíacos (15,19,22,112), lo lógico sería pensar que la EC es más frecuente en pacientes con EIIC, pero publicaciones recientes parecen indicar que no es así (22,113).

Masachs y colaboradores, evaluaron, mediante la realización de encuestas, la prevalencia de enfermos de Crohn entre los pacientes con EC y sus familiares, observándose que la ECr es hasta 8 veces más frecuente en pacientes celíacos que en la población general (19).

Leeds *et al* también observaron un mayor riesgo de EIIC en pacientes con EC, pero no al revés. Analizaron la prevalencia de EIIC en controles y pacientes con EC, y de EC en EIIC (354 pacientes con EIIC, 305 con EC y 601 controles), utilizando los autoanticuerpos antigliadina, antitransglutaminasa y antiendomiso para el cribado de celiaquía, y el estudio endoscópico alto, para la EC, y bajo (ileocolonoscopía), para la EIIC. Obtuvieron un riesgo relativo de EIIC en el grupo de celíacos de 9.98 (y de 4.99 tras excluir las colitis microscópicas), y una prevalencia de EC en pacientes con EIIC similar al del grupo control (0.85% vs 0.83%). No encontraron ningún enfermo de Crohn entre sus pacientes celíacos, correspondiendo el alto riesgo a la colitis ulcerosa. Leeds justifica estos hallazgos

sugiriendo que, dado que es necesario tener el HLA-DQ2 o -DQ8 para presentar la EC, si los pacientes con EIIC carecen de dicho HLA, el aumento de la permeabilidad en la EIIC, con la mayor presentación de gliadina, puede no ser suficiente para desencadenar una EC (22).

El grupo de trabajo italiano de EIIC, estudió la prevalencia de celiacía en 1711 pacientes con EIIC utilizando, como método diagnóstico, la serología de la enfermedad celíaca y el estudio endoscópico e histológico en los que presentaban anticuerpos elevados en sangre. En este estudio, Casella obtiene una prevalencia de EC del 0.5%, correspondiendo a seis pacientes con CU y 3 con ECr. Concluye que la prevalencia de EC en EIIC es baja, menor que la dada para la población general (113).

Los estudios genéticos amplios (wide genome studies) también ofrecen resultados contradictorios, habiéndose observado que la EC y la EIIC comparten genes alterados (48,114,115), como se observa en la siguiente figura (figura C.1), aunque cabe la posibilidad de que lo que confiere riesgo en una enfermedad proteja en otra.

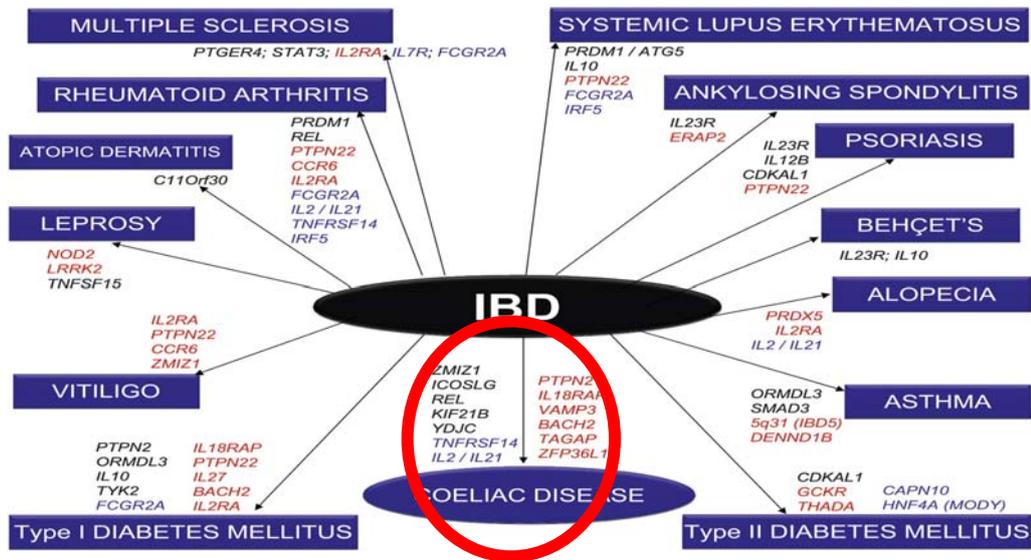


Figura C.1. Genes relacionados con la EIIC que comparten otras enfermedades. El círculo rojo resalta las alteraciones genéticas relacionadas tanto con la EIIC como con la EC.

Los estudios genómicos han apuntado hacia una alteración de la integridad de la barrera intestinal, de las respuestas inmunitarias innatas y de la autofagia, en ambas entidades (116). En esta línea, Fumagalli observó que tanto la celiaquía como la enfermedad de Crohn, que se habían relacionado previamente con el polimorfismo rs917997 (gen *IL18RAP*), presentaban, a dicho nivel, una elevada riqueza patogénica asociada a micropatógenos(117), a diferencia de las observaciones generales que encontraban que los que habían dejado más huella en los genes de las interleuquinas eran los macropatógenos. A su vez, detectó similitudes genéticas en puntos relacionados con la adaptación a infecciones, sugiriendo que en determinadas personas, los agentes patógenos habían ido variando la base genética de la respuesta inflamatoria (117) que da pie a inflamaciones intestinales como la EC o la enfermedad de Crohn.

Otro ejemplo de variante genética que se asocia con formas graves y precoces de ambas enfermedades es la de la *IL 10* (85,114). Barisani observa que el polimorfismo del TNF (factor de necrosis tumoral alfa) es más frecuente en los pacientes con EC (al igual que en la EIIC) que en los controles, pero, al estratificar por HLA II, desaparecen las diferencias. Esto hace pensar que efectivamente hay un núcleo común entre los pacientes con EC, EIIC y las personas sanas con las mismas variantes genéticas, pero que determinados factores (la coexistencia de otros genes alterados, la carga antigénica ambiental, etc.) hacen que se presente una u otra enfermedad, o ninguna.

Festen *et al*, en una revisión sobre las similitudes entre la EIIC y la EC, consideran que el aumento de permeabilidad y la reacción inflamatoria exagerada en dichas enfermedades, está relacionado con los polimorfismos del gen *IL18RAP*. Festen comenta que dicha alteración de la permeabilidad, facilita el flujo de bacterias, en la EIIC, y de gluten, en la EC (11,115).

Como hemos visto previamente, la EC muestra una de las asociaciones más fuertes con la región HLA-clase II (118): HLA-DRB1*03-DQB1*02:01 (sobre todo), HLA-DRB1*11/12/13-DQB1*03:01 + DRB1*07-DQB1*02:02, y HLA-DRB1*04-

DQB1*03:02, variando las proporciones de pacientes con unos u otros haplotipos según poblaciones. En celíacos caucásicos europeos el HLA-DRB1*03-DQB1*02:01 es el más frecuente, siendo también frecuente el HLA-DRB1*11/12/13-DQB1*03:01 + DRB1*07-DQB1*02:02 en países mediterráneos (aunque mucho menos que el HLA-DRB1*03-DQB1*02:01), y el HLA-DRB1*04-DQB1*03:02 que tan sólo aparece en torno al 5% de los pacientes con EC de Europa, es mayoritario en América de Sur (119).

En los 90, hay un auge en el estudio del HLA y, en 1999, Stokkers publica un metanálisis de los HLAs que se habían relacionado con la EIIC hasta el momento. Con la CU, observa una asociación positiva de los antígenos DR2, DR9 y DR103, y negativa con el DR4, mientras que con la ECr, obtiene una asociación positiva con el DR7, DRB3*03:01 y DQ4, y negativa con el DR2 y DR3. Destaca la variabilidad entre poblaciones y que los DQ habían sido estudiados menos frecuentemente que los DR (120).

De estos estudios, cabría deducir que los haplotipos fundamentales de la celiarquía son menos frecuentes en la EIIC: el DR4-DQ8 en la CU y el DR3-DQ2 en la ECr, pero no hay prevalencias de los mismos ni comparaciones con poblaciones control locales. Con estos datos, nos encontramos ante un solapamiento de genes no-HLA entre la EIIC y la EC y la duda de si hay una ausencia de relación de la EIIC con los genes HLA asociados a la EC, y si ésta podría justificar que la prevalencia de EC no sea mayor en pacientes con EIIC en algunos estudios. Para responder a la duda planteada, será necesario calcular la prevalencia de haplotipos relacionados con la EC en población sana y pacientes con EIIC de una población homogénea.

El diagnóstico de una EC en un paciente con EIIC puede resultar complejo (20) puesto que la clínica puede ser parecida, los anticuerpos pueden estar alterados y las lesiones anatomopatológicas pueden ser similares (60).

La lesión anatomopatológica sugestiva de celiarquía es característica pero no patognomónica. Como hemos comentado, puede aparecer en otras patologías, entre las que cabe destacar la ECr. En la enfermedad de Crohn de intestino delgado puede aparecer una atrofia vellositaria y un aumento de linfocitos

intraepiteliales, que puede ser difícil de distinguir de una EC. Si ya existe controversia sobre si tratar o no lesiones leves de mucosa (Marsh 1 y 2), más aún si hay dudas de si las lesiones son achacables a la ECr. Además, puesto que la medicación para la EIIC tiene como objetivo reducir la inflamación (corticoides, 5-ASA, inmunosupresores y anti-TNF), la lesión mucosa de la EC también puede mejorar, sin llegar a curarse, salvo que se diagnostique y se retire el gluten de la dieta, y, por tanto ser aún más inespecífica. Todo ello sin tener en cuenta la distribución parcheada intrínseca a la celiaquía, que puede dar falsos negativos sino hay suficientes muestras de tejido duodenal o yeyunal (28).

Dada la inespecificidad de los anticuerpos y la biopsia para el diagnóstico de la enfermedad celíaca en la EII, quizás sea necesaria la determinación del HLA de riesgo de celiaquía para apoyar o excluir el diagnóstico.

Así pues, y repasando la literatura sobre ambas enfermedades (EC y EIIC), se plantean varias dudas. En primer y primordial lugar, surgen las dudas sobre la epidemiología de los genes HLA relacionados con la EC en la EIIC: ¿cuál es la prevalencia de genes HLA relacionados con la EC en la EIIC? ¿Es similar o menor a la de la población general, como cabría suponer por los estudios fenotípicos de Leeds y Casellas, o mayor, teniendo en cuenta la alta prevalencia de EII en la EC? ¿Hay diferencias entre la CU y la ECr en términos de asociación con HLA-DQs? ¿Los HLAs relacionados con la EC se asocian a determinados fenotipos de la EIIC? ¿Cómo la proporción de mujeres es algo mayor entre pacientes celíacos, el HLA de riesgo de la celiaquía es también más frecuente en mujeres con EIIC?

Con el objetivo de contestar a estas cuestiones, y, sobre todo, de averiguar la prevalencia real de HLA-DQ2 y -DQ8 en nuestros pacientes con EIIC, comparándola con la de un grupo control también de nuestra zona, se diseña esta tesis.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La pregunta que motiva esta tesis es si existe una relación entre enfermedades intestinales crónicas cuya patogenia parece tener similitudes, pero que, en la clínica, tenemos la impresión subjetiva de no ver unidas. Puesto que la genética no varía en el tiempo, a diferencia de la expresión fenotípica clínica, se decide abordar la cuestión desde la base, el HLA, cuya relación con la EC está muy establecida. Así, surge la hipótesis del estudio, expuesta a continuación.

Las moléculas HLA-DQ2 y -DQ8, asociadas a la enfermedad celíaca, no son más frecuentes en la EIIC que en la población general.

Para poder aceptar o rechazar la hipótesis será necesario determinar la frecuencia del HLA-DQ2 y DQ8 en la población con EIIC y en población sana, que es el primer y principal objetivo de la tesis. Entre los objetivos secundarios, se encuentra el observar si hay diferencias entre tipos de EIIC, según el sexo, e incluso si el HLA permite diferenciar entre tipos de EIIC y fenotipos. A continuación, quedan resumidos los cuatro objetivos de esta tesis.

1. Determinar la frecuencia de HLA-DQ2 / -DQ8 en pacientes con EIIC y compararla con el grupo control (sujetos sanos).
2. Comprobar si hay diferencias en la aparición de HLA-DQ2 o -DQ8 según tipo de EIIC (CU/ECr) o del sexo, y, en caso de diferencias significativas, analizar su aplicación a la clínica (HLA como riesgo/protección).
3. Valorar si los alelos HLA permiten diferenciar a los pacientes con EIIC de la población control, y entre sí (CU vs ECr).
4. Analizar si existen diferencias en la frecuencia de alelos, en función de la expresión fenotípica de la EIIC.

III. MATERIAL Y MÉTODO

III. MATERIAL Y MÉTODO

Se diseña un estudio prospectivo, descriptivo y longitudinal, que se lleva a cabo en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (pacientes con EIIC) y en el Centro de Transfusiones de Valencia (población control).

A) Población y muestra del estudio

1. Casos

Se incluyen prospectiva y consecutivamente pacientes adultos, de origen caucásico, con enfermedad de Crohn o Colitis ulcerosa, controlados en Consultas Externas o en la Unidad de EIIC del Servicio de Medicina Digestiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Todos los pacientes están diagnosticados de EIIC según los criterios clínicos, endoscópicos, radiológicos e histológicos, sugeridos por la ECCO (European Crohn's and Colitis Organization) (121) y la WGO (World Gastroenterology Organization) (122).

Los criterios de exclusión para participar en el estudio son: pacientes con otros diagnósticos como colitis indeterminada, linfocítica, etc., edad menor de 18 años, origen no caucásico, no nacidos en España y negativa del paciente a participar en el estudio.

2. Controles

La población control para los resultados de la determinación de HLA la conforman donantes de órganos sanos, adultos, cuyo tipaje se ha realizado en el Centro de Transfusiones de Valencia, con consentimiento informado de autorización familiar, siguiendo las órdenes de Consellería respecto de la "Extracción de órganos y tejidos de donantes fallecidos".

B) Recogida de datos

Se incluyen los pacientes de forma prospectiva, consecutiva, y sistemática, ofreciéndoles la posibilidad de formar parte del estudio analítico para la determinación de HLA.

Todos los datos clínicos y demográficos de los pacientes se recogen, una vez se ha obtenido el consentimiento informado, de la revisión del historial clínico hospitalario, de la base de datos específica de la consulta de EIIC (ENEIDA) y de la entrevista personal.

Los resultados de todas las variables se incluyen en la base de datos del sistema SPSS, utilizado para llevar a cabo el estudio.

Teniendo en cuenta el carácter evolutivo y dinámico de la enfermedad, se recoge el fenotipo, complicaciones y manifestaciones extraintestinales que el paciente haya tenido hasta el momento de ser incluido en el estudio.

C) Recogida de muestras

La extracción de sangre se realiza en la Unidad de EIIC y se remite al Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana (CTCV), para el tipaje de HLA.

D) Tipaje HLA.

El tipaje genómico del sistema HLA se realiza en el laboratorio de Histocompatibilidad del CTCV (*EFI Accreditation number: 09-ES-014.986*) siguiendo el protocolo habitual, que se describe a continuación:

1. Muestras de estudio:

Muestras de sangre recogidas en tubos de extracción tratados con EDTA.

2. Extracción de ADN:

La extracción de ADN a partir de las muestras de sangre se lleva a cabo mediante procedimiento automatizado en el equipo *Maxwell® 16 Instrument* (Promega Corporation, Madison, EE.UU), utilizando los reactivos específicos suministrados con el kit *Maxwell® 16 Blood DNA Purification System* (Promega Corporation) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, que aparece a continuación:

2.1. Transferir 300 µl de sangre total o capa leucoplaquetar al pocillo n° 1 de cada cartucho de reactivos *Maxwell® 16 Blood DNA*, en el cual hay tampón de lisis, y colocar los diferentes cartuchos sobre la plataforma del equipo *Maxwell® 16*.

2.2. Posteriormente, *Maxwell® 16 System* realiza de forma automatizada el siguiente proceso:

- Lisis de la muestra en presencia de un agente caotrópico y detergente.
- Unión del ADN de las muestras a partículas de sílice magnetizadas *MagneSil®*.
- Lavado de las partículas unidas para separarlas del resto de componentes celulares.
- Elución del ADN aislado en 300 µl de tampón de elución MD142D (Promega Corporation) listo para su uso en PCR.

Este punto tarda unos 35 minutos.

3. Amplificación por PCR-rSSO

El tipaje de los genes HLA-DQA1 y -DQB1 se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de detección mediante hibridación reversa con sondas específicas de secuencia (rSSO; PCR-rSSO es Polymerase Chain Reaction - reverse Sequence Specific Oligoprobes), según la técnica descrita por

Ng et al. (1993) y Bodmer et al. (1999), utilizando los reactivos LABType® SSO (One Lambda, CA, USA) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, resumido a continuación(123-126):

- 3.1. Ajustar la concentración del ADN genómico extraído a 20-30 ng/μl con agua destilada.
- 3.2. Preparar la mezcla de amplificación con la D-mix LABType®, los cebadores LABType® (One Lambda) y la Taq DNA polimerasa (Applied Biosystems, 5u/μl) según una relación de volúmenes por muestra de (en μl): 6.9 de primer D-mix, 2 de cebador de amplificación (primer set DQA1/B1) y 0.1 de Taq polimerasa.

Los D-mix primers y los cebadores primer set se guardan en un congelador a unos -20°C.

- 3.3. Preparar un tubo de amplificación por cada muestra y añadir 9 μl de la mezcla de amplificación y 1 μl del ADN muestra (a 20-30 ng/μl) (para un volumen final de 10 μl por reacción de PCR).
- 3.4. Colocar la placa de 96 pocillos, con 1μl de DNA en cada pocillo, tapada con un adhesivo, en el termociclador y ejecutar un programa de PCR de amplificación de Luminex, que se ajuste al siguiente perfil térmico para un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (**tabla D.1.**):

Paso	Temperatura y tiempo de incubación	N.º de ciclos
Paso 1:	96°C 03:00	1
Paso 2:	98°C 00:20:00	5
	60°C 00:20:00	
	72°C 00:20:00	
Paso 3:	98°C 00:10:00	30
	60°C 00:15:00	
	72°C 00:20:00	
Paso 4:	72°C 10:00:00	1
Paso 5:	4°C para siempre	1

Tabla D.1. Programa para PCR de LABType® SSO. Esquema de tiempo y temperatura, en función de los pasos y número de ciclos del LABType® SSO.

3.5. Comprobar la existencia de producto amplificado en un gel de electroforesis.

4. *Detección por rSSO y análisis por citometría de flujo:*

La detección del producto amplificado se realiza siguiendo la tecnología Luminex® (Luminex Corporation) de hibridación reversa del ADN amplificado (mediante cebadores específicos de grupo) con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) unidas a microesferas marcadas de forma fluorescente para identificar los alelos. El producto de PCR está biotinilado, lo que permite su detección con estreptavidina conjugada con r-ficoeritrina (SAPE)(127). Un analizador de flujo, LABScan™ 100™ (One Lambda), identifica la intensidad de fluorescencia de la PE (ficoeritrina) en cada microesfera.

Se prepara el Labscan primero con los primers, luego mediante lavados con alcohol al 70%, luego con agua destilada, y, por último, con líquido del sistema de Luminex.

El procedimiento seguido es el recomendado por el fabricante (One Lambda), que, en resumen se muestra a continuación:

Desnaturalización/Neutralización

- a) Colocar una placa de 96 pocillos en un soporte.
- b) Transferir 5 µl de cada muestra de ADN amplificado en un pocillo de una placa de 96 pocillos, utilizando una pipeta multicanal. Asegurarse de anotar la ubicación y el ID de la muestra.
- c) Añadir 2,5 µl de tampón de desnaturalización por muestra; se coloca el tampón en una bañera para transefrirlo. Mezclar e incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 10 minutos.
- d) Añadir 5 µl de tampón de neutralización (ácido acético) con la pipeta y mezclar bien (preferentemente pipeteando arriba y abajo). Observar el cambio de color de rosado brillante a amarillo pálido o transparente.

Precaución: Evitar la contaminación del producto de PCR con agua.

Hibridación

Nota: Asegurarse de que el termociclador se haya puesto en marcha y que se haya iniciado el programa a 60 °C para calentar el bloque térmico.

- a) Combinar los volúmenes adecuados de mezcla de microesferas (n° de muestras \times 2) y el tampón de hibridación (17 \times n° de muestras) para preparar la mezcla de hibridación.
- b) Añadir 19 μ l de mezcla de hibridación a cada pocillo.
- c) Cubrir la placa con el cierre adhesivo y agitar en el vórtex a baja velocidad.
- d) Extraer del soporte de placa y colocar la placa para PCR en el termociclador precalentado (60 °C).
- e) Sellar la placa de PCR. Cerrar el termociclador e incubar durante 15 minutos.
- f) Colocar la placa en el soporte y quitar el adhesivo. Añadir rápidamente 75 μ l de tampón de lavado a cada pocillo. Cubrir la placa y centrifugar la bandeja durante 5 minutos a 2500 rpm en tres ocasiones. Separar el sobrenadante agitando bruscamente (flick) y secar.
- g) Repetir el paso 2.f anterior dos veces más para completar tres pasos de lavado en total. Recordar preparar la solución de SAPE 1X durante la tercera centrifugación.

Etiquetado

- a) Colocar la bandeja en el soporte. Añadir 25 μ l de solución de tampón SAPE 1X a cada pocillo. Cubrir la placa y agitar en el vórtex a velocidad baja. Colocar la placa en el termociclador precalentado (60 °C). Sellar e incubar durante 5 minutos.
- b) Extraer la placa y añadir rápidamente 75 μ l de tampón de lavado a cada pocillo.
- c) Cubrir y centrifugar la placa durante 5 minutos a 2500rpm. Retirar el sobrenadante.
- d) Añadir 70 μ l de líquido de sistema a cada pocillo. Mezclar pipeteando y transvasar a la placa de lectura (microplatte) con una pipeta de 8 o 12 canales.

Nota: El volumen final debe ser 80 μ l como mínimo.

e) Para obtener los mejores resultados, leer las muestras tan pronto como sea posible. Almacenar las muestras a 4 °C en la oscuridad sino se pueden leer inmediatamente. Asegurarse de mezclar las muestras inmediatamente antes de su lectura.

La reacción positiva se define como el porcentaje de valores positivos para la sonda superiores al valor umbral preestablecido para la sonda. La reacción negativa se define como el porcentaje de valores positivos inferiores al valor umbral. La intensidad media de fluorescencia (MFI) del control positivo debe encontrarse entre 1200 y 7000 MFI. La asignación de los alelos HLA se basa en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas en las bases de datos internacionales (IMGT-HLA, versiones 2.19.0 a 3.1.0), utilizando el paquete informático de análisis de Luminex, HLA Fusion.

E. Variables estudiadas

Los datos recogidos se dividen en dos grandes grupos: clínicos y analíticos (HLA). Se recoge un número de identificación, datos demográficos, el fenotipo de la enfermedad, y el HLA del sujeto.

1. Datos clínicos

- ID: número de identificación.

Como ID del paciente se usa el recibido automáticamente al incluir al paciente en la base de datos ENEIDA, mientras que a los controles se les da un número a partir de 1000.

- Datos demográficos:
 - teléfono de contacto,
 - sexo,
 - edad

- Diagnóstico:
 - Colitis ulcerosa (CU)
 - Enfermedad de Crohn (ECr)
 - Control sano
 - Enfermedad celíaca (EC)

- Fenotipo de EIIC:
 - Localización: esófago, estómago, yeyuno, íleon (proximal o terminal), colon (ciego, colon ascendente, transverso, descendente, sigma y recto), ano/perianal y anastomosis, si el paciente ha sido intervenido.

 - Localización, según la clasificación de Montreal(108):
 - a) ECr:
 - ▶ L1: íleon
 - ▶ L2: colon
 - ▶ L3: ileocólica
 - ▶ L4: tracto digestivo alto
 - ▶ L1+L4: íleon y tracto digestivo alto
 - ▶ L2+L4: colon y tracto digestivo alto
 - ▶ L3+L4: íleon, colon y tracto digestivo alto
 - b) CU:
 - ▶ Proctitis ulcerosa: afectación limitada al recto
 - ▶ Colitis izquierda: afectación limitada al colon izquierdo
 - ▶ Colitis extensa: afección que se extiende más allá del ángulo esplénico.

 - Patrón de la ECr, según la clasificación de Montreal(108):
 - ▶ Inflamatorio: úlceras superficiales que se pueden convertir en más profundas e inflamación, y que suele cursar con

dolor abdominal y diarrea.

- ▶ Estenosante: estenosis con dilatación preestenótica, que cursa con cuadros oclusivos/suboclusivos.
 - ▶ Fistulizante: perforación libre, perforación con formación de abscesos y masas intraabdominales, y fístulas internas o externas, excluidas las correspondientes a enfermedad perianal.
- Complicaciones: megacolon, hemorragia, perforación o absceso.
- Manifestaciones extraintestinales: manifestaciones no intestinales que guardan relación con la existencia de la EIIC y que pueden mantener un patrón de aparición parejo o independiente de los brotes de la ECr o la CU.
- ▶ Sí/No
 - ▶ Artropatía periférica:
 - Sí/No
 - Artropatía T1 (pauciarticular): afecta a menos de 5 articulaciones.
 - Artropatía T2 (poliarticular): afecta a 5 o más articulaciones.
 - ▶ Artropatía axial:
 - Espondilitis enteropática
 - Sacroileitis
 - ▶ Cutáneas: eritema nodoso, pioderma gangrenoso u otras.
 - ▶ Estomatitis: aftas bucales.
 - ▶ Oculares: Iridociclitis, Epiescleritis
 - ▶ Colangitis (Colangitis esclerosante primaria): hepatopatía crónica colostásica que desemboca en cirrosis.
 - ▶ Trombosis
 - ▶ Otros

2. Datos analíticos

- HLA marcador de la celiaquía (HLA-EC) positivo o negativo, siendo considerado positivo si presenta cualquiera de los siguientes haplotipos:

- ▶ HLA-DQ2.5*cis*: DQA1*05:01+DQB1*02:01 en el mismo cromosoma
- ▶ HLA-DQ8: DQA1*03:01 ó *03:03 + DQB1*03:02
- ▶ HLA-DQ2.5*trans*: haplotipo DQA1*05:05+ DQB1*03:01 en un cromosoma y DQA1*02:01+DQB1*02:02 en el cromosoma homólogo (heterodímero DQ7-DQ2.2):

Y negativo, si tiene cualquier otra combinación de alelos de HLA que no confiera riesgo de celiaquía por sí solos.

- Tipo de HLA positivo (HLA-EC):

- ▶ HLA-DQ2
- ▶ HLA-DQ8
- ▶ HLA-DQ7 + HLA-DQ2.2

- Haplotipo: descripción del conjunto de genes HLA heredados en bloque de uno de los progenitores en cada paciente.

- Presencia de HLA-DQ2.2: DQA1*02:01+DQB1*02:02. Haplotipo de riesgo controvertido, considerado de mayor riesgo para la celiaquía en combinación con HLA-DQ2.5, fundamentalmente, o -DQ8.

F. Aspectos éticos

El protocolo de estudio ha sido aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se ha garantizado la

confidencialidad de la información recogida según la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y en todo el proceso se han seguido las normas de Helsinki.

G. Métodos estadísticos

1. Tamaño muestral y precisión de las estimaciones:

1.1 Consideraciones previas

Para estudiar la prevalencia de HLA-EC en individuos con EII, se determina la población diana como la constituida por todos los individuos adultos de origen caucásico con EIIC.

Ante la imposibilidad de analizar la totalidad de los individuos que la constituyen, deben obtenerse a partir de la observación de una muestra, que es un subconjunto de individuos “representativo” de dicha población.

Es fundamental que los conocimientos previos existentes sobre el tema investigado, permitan suponer que la muestra estudiada es realmente “representativa” de la población objeto del estudio, lo que permite tratarla estadísticamente como si fuera una muestra aleatoria. Así, en nuestro caso, no hay ningún motivo para suponer que la posible relación entre la EII y HLA sea diferente en los individuos que han formado parte de nuestra muestra que en la totalidad de la población.

1.2 Determinación del tamaño muestral mínimo para evaluar el HLA

Para determinar el tamaño muestral mínimo para conseguir una determinada precisión es necesario, en primer lugar, definir la precisión deseada. Ello se hace a partir de dos valores:

- El error máximo $\varepsilon = |P^* - P|$ que se está dispuesto a admitir
- la probabilidad α de que el error finalmente cometido resulte mayor que ε

(Ver desarrollo de la metodología estadística en **Anexo 2**)

En nuestro caso, si el objetivo perseguido es determinar la prevalencia de HLA-EC en individuos con EIIC, de forma que la probabilidad de cometer un error mayor que $\varepsilon = 0.05$ sea inferior a $\alpha = 0.05$, el tamaño muestral mínimo de acuerdo con:

$$N = \frac{1.96^2 P(1-P)}{0.05^2}$$

que, suponiendo para P un valor 0.30 (30% de prevalencia de HLA-EC), que es el recogido en la literatura para la población en general española(8), resulta un N mínimo de 323 individuos.

2. Test Chi-2 de independencia entre variables cualitativas

A lo largo de esta tesis se plantea frecuentemente la necesidad de estudiar la posible relación entre dos variables de naturaleza cualitativa. Por ejemplo, ¿la presencia o no de HLA-EC en un individuo depende de alguna forma de que el individuo tenga la EII? O, dicho de otra forma, ¿la prevalencia de HLA-EC es diferente en los individuos controles que en los individuos que sufren la EII?

La forma más sencilla, y de uso generalizado en la literatura médica, de estudiar estadísticamente la posible dependencia entre dos variables cualitativas es mediante el test X^2 , explicado en el **anexo 2**.

3. Modelo de regresión logística

3.1 Fundamento

Los Modelos de Regresión Logística (MRL) constituyen una técnica estadística muy poderosa para analizar las relaciones existentes entre dos o más variables de tipo cualitativo, lo que los hace de gran utilidad para el análisis de los

datos de esta tesis. La interpretación de los parámetros en el MRL se basa en el concepto de Odds-ratio (OR)¹.

3.2 Estimación e inferencia en modelos de regresión logística

En el **Anexo 2**, se exponen los fundamentos de los procedimientos estadísticos que se utilizan para estimar, a partir de los datos disponibles, los parámetros de un Modelo de Regresión Logística y para realizar inferencias respecto a los mismos.

En particular, el procedimiento basado en el test de la Razón de Verosimilitudes Generalizada que se expone en dicho Anexo será utilizado de forma general en esta tesis para analizar los resultados de los modelos propuestos.

4. Estudio de aplicación de los resultados significativos a la clínica

Para calcular la protección o riesgo que confiere un haplotipo para el desarrollo de la EIIC, se ha utilizado la fracción preventiva (FP) y la fracción etiológica (FE) respectivamente, que se describen en porcentajes de contribución a la enfermedad.

Para el cálculo de las mismas es necesario conocer la frecuencia fenotípica (FF) y el “riesgo relativo” (RR); a continuación, se describe cómo obtenerlos(38,128,129).

- Frecuencia Fenotípica (FF) =
$$\frac{S_a}{N}$$

Donde S_a es la suma de alelos y N el n° de individuos.

¹ Como no existe un consenso generalizado sobre la traducción al castellano de los términos “odd” y “odds-ratio”, y dado que dichos términos se utilizan ampliamente en la literatura técnica, hemos decidido mantenerlos sin traducir.

Se estudia la FF en sujetos control cuando la FE o FP a evaluación es la de desarrollar una enfermedad, y se va a utilizar el RR de presentar dicha enfermedad.

- La “incidencia relativa” de enfermedad se calcula mediante la fórmula de Woolf. En la literatura de HLA, la “incidencia relativa” se ha descrito como “riesgo relativo”, y, por tanto, es el término utilizado en esta tesis. Para determinar el RR, calculado con la fórmula de Woolf, es necesario plasmar los datos en una tabla de 2x2, que incluya el grupo de pacientes y el de controles en las filas, y los sujetos positivos o negativos para el gen a estudio, en las columnas (ver siguiente tabla).

Nº de individuos

Gen a estudio	Positivos	Negativos
Pacientes	a	b
Controles	c	d

Así, la fórmula de Woolf para determinar el RR es:

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

- Para los alelos con frecuencias significativamente disminuidas del grupo control (con un RR < 1), se ha calculado la FP:

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

- Para los alelos con frecuencias significativamente aumentadas respecto del grupo control (con un RR > 1), se ha utilizado la FE:

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

5. *Test de Holm-Bonferroni:*

El test de Holm-Bonferroni es una corrección para garantizar que la probabilidad de al menos un error de primera especie en un conjunto de n tests (múltiples alelos), no supera 0.05.(130) El uso de la corrección de comparaciones múltiples, permite identificar la presencia de una verdadera asociación de la enfermedad con un alelo concreto, y diferenciable de la simple asociación al azar.(38) El test de Holm-Bonferroni, o test de “Bonferroni de rechazo secuencial”, se realiza multiplicando la menor p significativa por el número de alelos estudiados. Si la p sigue siendo significativa, se multiplica la siguiente p más pequeña por el número de alelos total-1, y así secuencialmente, mientras los resultados sean significativos. Cuando una p resulte no significativa, se considera que los demás resultados con p mayores, aunque salgan inicialmente significativas, dejarán de serlo con la corrección de Holm-Bonferroni.

6. *Programas estadísticos*

Para la realización del estudio (base de datos y análisis de resultados) se ha utilizado el programa SPSS (PASW Statistics 17.0), Microsoft Office Excel 2003 y Statsgraphics Plus (versión 5.1).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A) Descripción de la Muestra:

1. Introducción

1.1 Global

Desde enero de 2007 hasta marzo de 2011, se incluyen 457 pacientes con EIIC, y se obtienen los datos de 577 sujetos sanos como control de la prevalencia de haplotipos HLA de riesgo de celiarquía. En la figura 1.1. se detalla la distribución de la muestra (1034 sujetos)

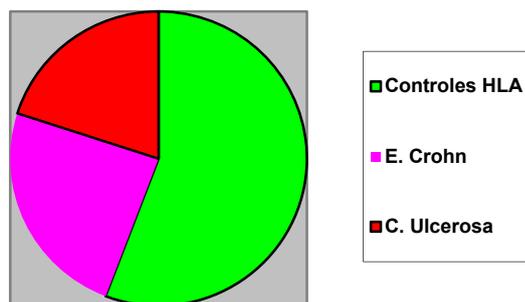


Figura 1.1 Distribución de la muestra en casos (Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa) y controles.

1.2 Distribución por sexos

En la base de datos anonimizada de los sujetos sanos control, se observó la ausencia de datos para sexo en 10 individuos, por lo que en el análisis estadístico en el que se hacen estudios comparativos en relación al sexo, se excluyen los datos de estos individuos.

De los 1034 sujetos a los que se analizó el HLA, 417 son mujeres (40.3%): 215 de los controles (37.9%, de 567) y 202 de los casos (44.2%; 122 con ECr y 80 con CU).

	E. Crohn	C. Ulcerosa	Controles	Total columnas
Hombres	128 (12.50)	127 (12.40)	352 (34.38)	607 (59.28)
Mujeres	122 (11.91)	80 (7.81)	215 (21.00)	417 (40.72)
Total filas	250 (24.41)	207 (20.21)	567 (55.38)	1024 (100)

Tabla 1.1. Distribución de la muestra entre casos y control, diferenciando por sexos, n (%).

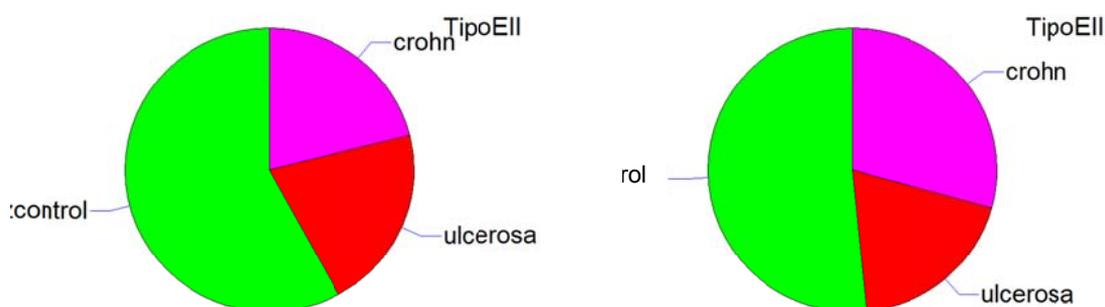


Figura 1.2 Distribución de la muestra por hombres y mujeres. El 58% de los hombres y el 52% de las mujeres de la muestra son controles.

Aunque hay más mujeres en el grupo control (215) que en el grupo de pacientes (202), la proporción de mujeres es mayor en los casos (44%) que en los controles (38%), sobre todo a expensas de las pacientes con Crohn (49% de los pacientes con enfermedad de Crohn son mujeres *versus* 39% de los que tienen CU).

2. Pacientes con EIIC

457 pacientes (202 mujeres, 44.2%), con una edad media de 42.4 años (mediana 40 años), consienten participar en el estudio. 207 pacientes tienen Colitis Ulcerosa y 250 Enfermedad de Crohn. En ambos casos, la enfermedad extensa es más frecuente: 51.6% de los pacientes con ECr presentan una localización íleo-

colónica de la enfermedad y el 61.8% de los casos con CU una colitis extensa. El comportamiento más frecuente de nuestra muestra de enfermos de Crohn es estenosante (41%), la enfermedad perianal aparece en 93 pacientes (37.2%), el 19.7% ha presentado complicaciones (frente al 4.1% de los pacientes con CU) y el 59.3% ha requerido cirugía (incluyendo cirugía de la región perianal en esta variable).

La distribución fenotípica de los pacientes con enfermedad inflamatoria, según los criterios de la clasificación de Montreal, se detalla en las **tablas 2.1 y 2.2**:

2.1 Enfermedad de Crohn (ECr)

Extensión ECr	Frecuencia	%
Íleon	60	24,0
Colon	30	12,0
Íleon y colon	128	51,2
Íleon y alto	11	4,4
Colon y alto	1	,4
Íleon, colon y alto	20	8,0
Total	250	100,0

Patrón ECr	Frecuencia	%
Inflamatorio	88	35.2
Estenosante	102	40.8
Fistulizante	60	24.0
Total	250	100.0

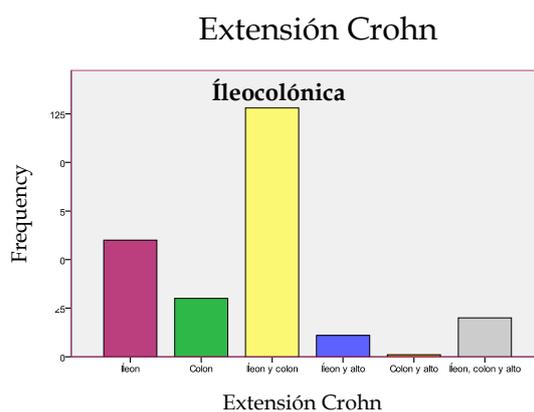


Tabla y figura 2.1. Distribución fenotípica de los ECr, por localización y por patrón.

El 52% de los enfermos de Crohn tienen una afectación íleo-colónica (L3 de la clasificación de Montreal), el 24% ileal (L1) y el 11% colónica (L2). No hay ningún paciente con afectación exclusiva de tracto digestivo alto.

2.2 Colitis ulcerosa (CU)

Extensión CU	Frecuencia	Porcentaje
Proctitis	19	9,2
Colitis Izquierda	60	29,0
Colitis Extensa	128	61,8
Total	207	100,0

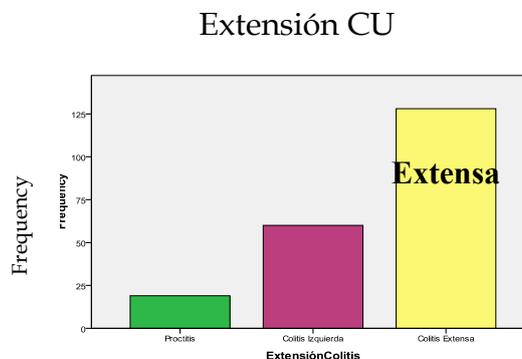


Tabla y figura 2.2. Localización de la CU en la muestra.

La colitis extensa es la localización más prevalente (62%) en los pacientes con CU, suponiendo la colitis izquierda y la proctitis un 29 y un 9% respectivamente.

2.3 Manifestaciones extraintestinales (MEIs)

El 36.2% de los pacientes con EIIC tienen (o han tenido en algún momento de su enfermedad) manifestaciones extraintestinales (MEIs). El 30.4% de las CUs y el 40% de los ECr han padecido MEIs.

Como se observa en la tabla a continuación, la MEI más frecuente, es la artropatía periférica, sobre todo la tipo 1 (afectación de menos de 5 articulaciones), con altralgias de ritmo inflamatorio y sin destrucción tisular, y, en segundo lugar, la estomatitis.

<i>Manifestaciones Extraintestinales</i>	<i>C. Ulcerosa</i> N	<i>E. de Crohn</i> N	<i>Pacientes con EIIC</i> N (%)
<i>MEIs</i>	63	100	163 (36.2)
<i>Artropatía periférica</i>	35	66	101 (22.1)
Artropatía T1	25	47	72 (15.8)
Artropatía T2	9	20	29 (6.3)
<i>Artropatía central</i>			
Espondilitis	3	5	8
Sacroileitis	2	4	6 (1.3)
<i>Cutáneas</i>	7	19	26 (5.7)
Eritema Nodoso	4	12	16 (3.5)
Pioderma gangrenoso	0	3	3 (0.7)
Otras	3	4	7 (1.5)
<i>Estomatitis</i>	21	29	50 (10.9)
<i>Oculares</i>	5	12	17 (3.7)
Iridociclitis	3	6	9 (2.0)
Epiescleritis	2	6	8 (1.7)
<i>Colangitis</i>	0	1	1 (0.2)
<i>Trombosis</i>	7	3	10 (2.2)

Tabla 2.3. Se expone el número de pacientes afectos del total y de cada manifestación extraintestinal evaluada en pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, y de todos los pacientes con EIIC, incluyendo el porcentaje total que supone.

3. Grupo control

La población control para el estudio de HLA la conforman 577 sujetos, de entre 18 y 65 años, de los que únicamente se conoce su sexo, en 567 (215 mujeres y 352 hombres), y que se trata de población aparentemente sana, de etnia caucásica, donante de órganos.

B) Análisis de genes HLA:

1. Frecuencia de HLA positivo (HLA-EC):

En primer lugar, analizamos la prevalencia de HLA-EC para celiacía, considerando positivo, como se vio previamente, los haplotipos expuestos:

- i. HLA-DQ2.5*cis*: DQA1*05:01+DQB1*02:01
- ii. HLA-DQ8: DQA1*03:01 ó 03:03 + DQB1*03:02
- iii. HLA-DQ2.5*trans*: haplotipo DQA1*05:05+DQB1*03:01 en un cromosoma y DQA1*02:01+DQB1*02:02 en el cromosoma homólogo.

Observamos que la prevalencia del HLA-EC es ligeramente más elevada en el grupo control (227/577=39.34%) que en los pacientes con EIIC (156/457=34.14%), sin ser una diferencia significativa ($p=0.0852$).

La siguiente tabla refleja la relación entre la presencia de EII y la de HLA-EC

EIIC Y HLA	HLA-EC	HLA-EC negativo	Total
Controles	227 (21.95)	350 (33.85)	577 (55.80)
Casos (EIIC)	156 (15.09)	301 (29.11)	457 (44.20)
Total	383 (37.04)	651 (62.96)	1034 (100.00)

Tabla 1.1. Relación entre EII y HLA-EC, n (%), $p=0.0852$.

Esta diferencia de prevalencia de HLA-EC entre controles y casos, lleva asociada un valor **P de 0.0852** que resulta significativo trabajando con un riesgo de 1ª especie α del 10%, o no significativo si se opera con α del 5%. Utilizando el rango de “p” habitual en Medicina ($p<0.05$), se puede decir que existe una

tendencia a que el HLA de riesgo de celiaquía sea menor en pacientes con EIIC que en controles, sin llegar a presentar diferencias significativas.

Por otra parte, en la Tabla 1.2 se recoge la relación entre el Sexo y la presencia o no de HLA-EC en global; es decir, incluyendo casos y controles.

<i>HLA por sexo</i>	<i>HLA-EC</i>	<i>HLA-EC negativo</i>	<i>Total</i>
<i>Mujer</i>	162 - 38.85%	255 - 61.15%	417 - 40.72%
<i>Hombre</i>	217 - 35.75%	390 - 64.25%	607 - 59.28%
<i>Total</i>	379 - 37.01%	645 - 62.99%	1024 - 100.00%

Tabla 1.2. Relación entre Sexo y HLA-EC. P= 0.3129

La tabla anterior pone de manifiesto que la prevalencia de HLA-EC en el conjunto de los sujetos, incluyendo casos y controles, es ligeramente más elevada en mujeres que en hombres, pero que la diferencia no es significativa (P-value = 0.3129). El siguiente punto desgana el porcentaje de HLA-EC en mujeres *vs* hombres, en función de si son casos o controles.

2. *Análisis conjunto de la relación de la prevalencia del HLA-EC con la presencia de EIIC y el sexo. Modelo de regresión logística.*

2.1 Introducción

Dada la relación 2:1 de mujeres y hombres en los pacientes celíacos de la población general, además de buscar diferencias entre el grupo de mujeres con EIIC *versus* control, se analiza si la prevalencia de HLA-EC es diferente en hombres y en mujeres con EII.

Para ello, se plantea un modelo de Regresión Logística en el que la prevalencia de HLA-EC se relaciona con la presencia, o no, de EIIC, con el sexo y

con una posible interacción entre ambos factores. Con dicho modelo, se observa una tendencia a una menor prevalencia de HLA-EC en mujeres con EIIC respecto de las controles.

A continuación se expone el modelo de regresión y el resultado pormenorizado.

2.2 Modelo de regresión logística propuesto

Para analizar si la prevalencia del HLA-EC es distinta en función de la presencia de EII y según el Sexo, se propone el siguiente modelo (1), que asume la posible existencia de una interacción entre ambos factores:

$$\text{"riesgo" de HLA-EC} = \frac{P(\text{HLA+})}{1 + P(\text{HLA+})} = e^{\beta_0 + \beta_1 x_{\text{EII}} + \beta_2 x_{\text{SEXO}} + \beta_3 x_{\text{EII}} x_{\text{SEXO}}} \quad (1)$$

donde x_{EII} y x_{SEXO} son las variables binarias (con únicos valores 0 ó 1, **ver anexo 2, punto 3**).

La interpretación de los 4 parámetros β_i que aparecen en (1) se puede deducir particularizando dicha ecuación para las 4 posibles situaciones relativas a EII y Sexo:

a) Mujeres sin EII ($x_{\text{EII}}=0$ y $x_{\text{SEXO}}=0$)

$$\text{riesgo de HLA-EC} = e^{\beta_0 + \beta_1 \times 0 + \beta_2 \times 0 + \beta_3 \times 0 \times 0} = e^{\beta_0}$$

(a)

por lo tanto e^{β_0} es el riesgo de HLA-EC en mujeres del grupo control

b) Mujeres con EII ($x_{\text{EII}}=1$ y $x_{\text{SEXO}}=0$)

$$\text{riesgo de HLA-EC} = e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_0 + \beta_3 x_0 x_0} = e^{\beta_0 + \beta_1} = e^{\beta_0} e^{\beta_1} \quad (\text{b})$$

Comparando las mujeres con EII (b) con las mujeres control (a) se deduce que e^{β_1} indica por cuanto se multiplica en las mujeres el riesgo de EII por el hecho de tener HLA-EC (si β_1 resulta negativo e^{β_1} será menor que 1, por lo que el riesgo de desarrollar EII se reducirá en presencia de HLA-EC).

c) Hombres sin EII ($x_{\text{EII}}=0$ y $x_{\text{SEXOI}}=1$)

$$\text{riesgo de HLA-EC} = e^{\beta_0 + \beta_1 x_0 + \beta_2 x_1 + \beta_3 x_0 x_0} = e^{\beta_0 + \beta_2} = e^{\beta_0} e^{\beta_2} \quad (\text{c})$$

Comparando los hombres sin EII (c) con las mujeres sin EII (a) se deduce que e^{β_2} indica por cuanto se multiplican en las personas sin EII las posibilidades de tener HLA-EC por el hecho de ser hombre en vez de mujer.

d) Hombres con EII ($x_{\text{EII}}=1$ y $x_{\text{SEXOI}}=1$)

$$\text{riesgo de HLA-EC} = e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_1 + \beta_3 x_1 x_1} = e^{\beta_0 + \beta_1 + \beta_2 + \beta_3} = e^{\beta_0} e^{\beta_1} e^{\beta_2} e^{\beta_3} \quad (\text{d})$$

En cuanto a la interpretación del parámetro β_3 , comparando las mujeres, (b) con (a) se deduce, como ya se ha indicado, que en las mujeres el efecto de la HLA-EC sobre el riesgo de presentar EII se obtiene multiplicando por e^{β_1} ; por otra parte, comparando los hombres, (d) con (c) se deduce que en los varones el riesgo de tener EII si tienen HLA-EC se obtiene multiplicando por $e^{\beta_1} e^{\beta_3}$; en consecuencia e^{β_3} indica hasta qué punto el efecto sobre el riesgo de la presencia de EII es más marcado (si $\beta_3 > 0$), menos marcado (si $\beta_3 < 0$) o similar (si $\beta_3 = 0$) en varones que en mujeres. En definitiva, el parámetro β_3 está asociado a la existencia de una posible interacción entre el efecto de tener el HLA-EC sobre

el los dos factores estudiados, presencia de EII y Sexo. Se evalúa si el HLA-EC es más o menos prevalente en función del sexo y de tener EII, y el riesgo que supone tener dicho HLA para el desarrollo de una EII, en función del sexo del individuo.

2.3 Resultados de la estimación del modelo

El Modelo (1) propuesto se ha estimado mediante Statgraphics, obteniéndose los valores que se recogen a continuación para los parámetros β_i .

Dependent variable: X_{ij}/N_{ij}

Sample sizes: N_{ij}

Factors:

X_{EII}

X_{SEXO}

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Estimated odds Ratio
β_0	-0.271422	
$\beta_1 (X_{EII})$	-0.384821	0.68057
$\beta_2 (X_{SEXO})$	-0.263721	0.76819
$\beta_3 (X_{EII} * X_{SEXO})$	0.261908	1.29941

Deviance del modelo: $-2\ln V = 5.1655$ con 3 grados de libertad

La significación estadística de los parámetros β_1 , β_2 y β_3 se analiza, tal como se expone en el apartado A.2 del Anexo, calculando el valor de la Chi-cuadrado asociada al incremento de $-2\ln(rv)$ que se produce cuando se elimina el parámetro correspondiente del modelo (lo que es equivalente a imponer al Modelo (1) la restricción de que dicha β_i es igual a cero). Los valores de dichas Chi-cuadrados, junto con sus correspondientes p-values, se recogen a continuación:

Likelihood Ratio Tests

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
--------	------------	----	---------

X _{EII}	3.63799	1	0.0565
X _{SEXO}	2.22904	1	0.1354
X _{EII} *X _{SEXO}	0.97212	1	0.3242

2.4 Interpretación de los resultados

$\beta_0 = -0.2714$: Del valor estimado para β_0 se deduce el valor de la prevalencia del HLA-EC en las mujeres del grupo control:

$$\text{riesgo HLA-EC}/(\text{mujeres control}) = e^{-0.2714} = 0.762$$

↓

$$\text{frecuencia HLA-EC}/(\text{mujeres control}) = \frac{0.762}{1+0.762} \times 100 = 43\%$$

$\beta_1 = -0.3848$: La presencia de EII en este grupo reduce el riesgo de HLA-EC, multiplicándolo por $e^{-0.3848} = 0.681$. **Por tanto, el riesgo de HLA-EC en mujeres con EII es sólo un 68% del constatado para las mujeres del grupo control.**

$$\text{riesgo HLA-EC}/(\text{mujeres con EII}) = e^{-0.2714} e^{-0.3848} = 0.519$$

↓

$$\text{frecuencia HLA-EC}/(\text{mujeres con EII}) = \frac{0.519}{1+0.519} \times 100 = 34\%$$

El valor constatado del p-value para este parámetro (**p=0.0565**) indica que hay una *tendencia* a la reducción de la prevalencia de HLA-EC en las mujeres con EII.

$\beta_2 = -0.2637$: El valor negativo obtenido para β_2 indica que la prevalencia de HLA-EC dentro del grupo control es algo inferior en hombres que en mujeres. En efecto:

$$\text{riesgo HLA-EC}/(\text{hombres control}) = e^{-0.2714} e^{-0.2637} = 0.585$$

⇓

$$\text{prevalencia HLA-EC}/(\text{hombres control}) = \frac{0.585}{1+0.585} \times 100 = 37\%$$

El p-value asociado a β_2 es 0.1354, lo que indica que no hay evidencia estadística de que esta diferencia de prevalencia del HLA-EC entre mujeres y hombres controles sea significativa, tomando como referencia una $p < 0.05$.

$\beta_3 = 0.2619$: El signo positivo de este parámetro indica que la reducción de la prevalencia del HLA-EC en pacientes con EII es menos marcada en hombres que en mujeres.

$$\text{riesgo HLA-EC}/(\text{hombres con EII}) = e^{-0.2714} e^{-0.3848} e^{-0.2637} e^{-0.2619} = 0.518$$

⇓

$$\text{prevalencia HLA-EC}/(\text{hombres con EII}) = \frac{0.518}{1+0.518} \times 100 = 34\%$$

Esto mismo se puede observar en las tablas expuestas a continuación, utilizando el χ^2 .

<i>Hombres</i>	<i>HLA-EC</i>	<i>HLA-EC negativo</i>	<i>Total filas</i>
<i>Casos-EIIC</i>	87 (14.33)	168 (27.68)	255 (42.01)
<i>Controles</i>	130 (21.42)	222 (36.57)	352 (57.99)
<i>Total columnas</i>	217 (35.75)	390 (64.25)	607 (42.01)

Tabla 2.1 Tabla de frecuencias EII x HLA considerando sólo casos y controles hombres, n (%), ($p = 0.4752$).

Mujeres	HLA-EC	HLA-EC negativo	Total filas
Casos- EIIC	69 (16.55)	133 (31.89)	202 (48.44)
Controles	93 (22.30)	122 (29.26)	215 (51.56)
Total Columnas	162 (38.85)	255 (61.15)	417 (100.00)

Tabla 2.2. Tabla de frecuencias EII x HLA considerando sólo casos y controles mujeres, n (%), ($p = 0.0565$).

Si tenemos en cuenta este parámetro como relevante, y calculamos la fracción preventiva considerando la frecuencia fenotípica de HLA-EC en mujeres control ($FF=93/215=0.432558$) y el RR de 0.6805724, obtendremos una **fracción preventiva** de 0.138, lo que supone que la contribución del HLA-EC a la prevención del desarrollo de una EIIC es del **14%**, en mujeres.

Así pues, este apartado del estudio muestra que **la prevalencia de HLA-EC en mujeres con EII es 9 puntos porcentuales menor que en las mujeres sin EIIC (reduciéndose del 43% al 34%)** pero tan sólo 3 puntos porcentuales en hombres, al pasarla del 37% en el grupo control al 34% en el grupo de pacientes. Dicha diferencia es objetivable al estudiar mujeres y hombres por separado, de hecho, al considerar exclusivamente mujeres, las diferencias son más llamativas (dando una $p=0.0565$ y una FP del 14%). No obstante, aunque la diferencia sea importante al analizar los sexos por separado, la diferencia entre mujeres y hombres en la prevalencia del HLA-EC, en función de tener o no EII debe ser considerada con prudencia, dado que el p-value asociado a β_3 ha resultado 0.3242, que no es significativo.

3. Estudio del efecto del HLA-EC sobre el tipo de EIIC

En el Apartado 2 se ha observado que la prevalencia de HLA-EC es algo inferior en individuos con EII que en los controles, siendo esta tendencia más marcada en el caso de mujeres que en el de hombres.

En el presente apartado se analiza si existen diferencias en el fenómeno anterior según que el tipo de EII sea Crohn o Ulcerosa, observándose una tendencia a una menor prevalencia de HLA-EC en pacientes con CU.

La siguiente tabla recoge las prevalencias de HLA-EC y negativo, considerando conjuntamente ambos sexos, en pacientes con ECr, CU y controles, mostrando que la prevalencia de HLA-EC es algo inferior en los casos de CU (66 de 207 pacientes con CU, lo que supone un 31.88%) que en los de ECr (36.00% - 90/250).

EIIC y HLA por tipo de EIIC	HLA-EC	HLA-EC negativo	Total filas
<i>Control</i>	227 (21.95)	350 (33.85)	577 (55.80)
<i>E. Crohn</i>	90 (8.71)	160 (15.47)	250 (24.18)
<i>C. Ulcerosa</i>	66 (6.38)	141 (13.64)	207 (20.02)
<i>Total columnas</i>	383 (37.04)	651 (62.96)	1034 (100.00)

Tabla 3.1 Relación entre tipo de EII y HLA, n (%).

Analizando mediante el test Chi-2 la significación de la diferencia entre ambas prevalencias se obtiene un valor del estadístico de 0.85 con un p-value asociado de 0.3556, que indica que la misma no llega a ser significativa. Sin embargo, si comparamos la prevalencia del HLA-EC de la población control con la de los pacientes con CU, con un 39.34% (227/577) vs 31.88% respectivamente, las diferencias llevan asociadas una **p** de **0.0571**.

Si valoramos este dato como relevante, y analizamos la fracción preventiva del HLA-EC en la colitis ulcerosa, observamos que, teniendo en cuenta una frecuencia fenotípica en controles de 0.39341, y un riesgo relativo de 0.7217, la **FP** es del **11%**, lo que implica que la presencia de HLA de riesgo de la celiaquía confiere un 11% de protección frente al desarrollo de la CU.

En resumen, la prevalencia de HLA-EC es mayor en el grupo control (39.34%), que en la ECr (36%) y en la CU (31.88%), sin diferencias significativas,

aunque mostrando una tendencia a la significación al comparar controles y CU, con una FP frente a desarrollar una CU del 11% en sujetos con HLA-EC.

4. Estudio de la frecuencia de HLA-EC, según el tipo de EII, en función del sexo

La siguiente tabla recoge la prevalencia del HLA-EC en función del tipo del EII y del sexo.

HLA-EC, según tipo de EII y sexo	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total columnas</i>
<i>Control</i>	130 (34.30)	93 (24.54)	223 (58.84)
<i>E. Crohn</i>	46 (12.14)	44 (11.61)	90 (23.75)
<i>C. Ulcerosa</i>	41 (10.81)	25 (6.60)	66 (17.41)
<i>Total Filas</i>	217 (57.25)	162 (42.75)	379 (100)

Tabla 4.1. Prevalencia de HLA-EC (n y %) en función del tipo de EII y del sexo. El % se refiere a la prevalencia de HLA-EC en cada grupo, en función del sexo.

Al comparar la prevalencia del HLA-EC en mujeres control (43.26%) con la de las pacientes con CU, en el modelo Chi² se obtienen un valor **p** de **0.0613**. No hay diferencias significativas al analizar las prevalencias de HLA-EC en función del sexo y la EII, aunque existe una tendencia a que la prevalencia sea menor en la CU.

Con el fin de comprobar los resultados previos, se ha construido un nuevo modelo de regresión logística, incluyendo en el mismo, variables binarias que diferencian entre la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa, en función del sexo.

El modelo estadístico utilizado, se muestra a continuación:

$$\text{"riesgo" de HLA-EC} = \frac{P(\text{HLA+})}{1 + P(\text{HLA+})} = e^{\beta_0 + \beta_{11}x_{\text{CR}} + \beta_{12}x_{\text{UL}} + \beta_2x_{\text{SEXO}} + \beta_{31}x_{\text{CR}}x_{\text{SEXO}} + \beta_{32}x_{\text{UL}}x_{\text{SEXO}}} \quad (2)$$

donde x_{SEXO} es la variable binaria, mientras que

x_{CR} : valdrá 1 en los individuos con enfermedad de Crohn y valdrá 0 en el resto

x_{UL} : valdrá 1 en los individuos con EII ulcerosa y valdrá 0 en el resto

El Modelo (2) propuesto se ha estimado mediante Statgraphics, obteniéndose los valores que se recogen a continuación para los parámetros β_i .

Dependent variable: HLA_positivo

Factors:

TipoEII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Standard Error	Estimated Odds Ratio
β_0	-0.271422	0.137657	
β_{12} (x_{CR})	-0.301098	0.233446	0.740006
β_{13} (x_{UL})	-0.517036	0.277723	0.596285
β_2 (x_{SEXO})	-0.263721	0.176483	0.768188
β_{31} ($x_{\text{CR}}*x_{\text{SEXO}}$)	0.258163	0.317219	1.29455
β_{32} ($x_{\text{UL}}*x_{\text{SEXO}}$)	0.311404	0.35404	1.36534

Deviance del modelo: $-2\ln V = 6.0452$ con 5 grados de libertad

Se comprueba que el valor de β_{13} (CU) ha resultado más negativo que β_{12} (ECr), indicando que la reducción de la prevalencia del HLA-EC en mujeres es algo más marcada en presencia de colitis ulcerosa que en la de enfermedad de Crohn.

Por otra parte, el valor positivo algo más elevado de β_{32} respecto a β_{31} , sugiere el fenómeno de que la prevalencia del HLA-EC es menor en la EII, disminuyendo de forma menos marcada en hombres que en mujeres sobre todo en la CU.

Ambos resultados concuerdan, como era de esperar, con lo que puede observarse en la **Tabla 4.1**.

Para estudiar si son significativas estas diferencias entre el efecto del HLA-EC y los dos tipos de EII y la posible interacción de dichos efectos con el sexo, hay que seguir el procedimiento general que se expone en el **Anexo 2**.

En efecto, se puede comprobar que el Modelo (1) no es más que un caso particular del Modelo (2) imponiéndole las restricciones $\beta_{11} = \beta_{12}$ y $\beta_{31} = \beta_{32}$. Para analizar si estas restricciones son ciertas, o sea si realmente existen a nivel poblacional diferencias en el efecto del HLA-EC sobre las dos variantes de la EII, el aumento de la “deviance” al pasar del Modelo (2) al Modelo (1) se compara con los valores asociados a una Chi-2 con 2 grados de libertad, dado que 2 es el incremento en el número de parámetros al pasar del Modelo (1) al (2).

$$2(L_{\max/\text{modelo (2)}} - L_{\max/\text{modelo (1)}}) = 6.0452 - 5.1655 = 0.8797 \quad (\text{p-value} = 0.644)$$

El elevado valor obtenido para el p-value indica que no hay evidencia estadística respecto a la existencia real de diferencias en la prevalencia de HLA según se trate de una ECr o de una CU, al analizar la muestra en su conjunto, teniendo en cuenta el sexo.

Analizando exclusivamente mujeres, con un Chi², se observa que la prevalencia del HLA-EC en mujeres control (43.26%) es mayor que la de las pacientes con enfermedad de Crohn (36.07%) y CU (31.25%). Se obtiene una p baja, pero no menor de 0.05, al comparar mujeres control y CU (**p de 0.0613**).

En resumen, el análisis aislado de mujeres ECr-control y CU-control, muestra una tendencia a menor prevalencia en mujeres con CU respecto de las mujeres control ($p=0.0613$), pero teniendo en cuenta la muestra global, y teniendo en cuenta el sexo para ver si existen diferencias entre ECr y CU en la reducción del riesgo del HLA-EC, no hay diferencias ($p=0.644$).

5. Estudio de la frecuencia de las distintas variantes de HLA-EC en la EIIC

Se estudia por separado el efecto sobre la prevalencia del tipo DQ2 y del tipo DQ8.

5.1 Frecuencia de HLA-DQ2.5cis en la EIIC

5.1.1 Análisis considerando conjuntamente los dos tipos de EII

En la **Tabla 5.1** se recogen los valores de la prevalencia del HLA-DQ2.5cis en función de la presencia, o no, de la EII y del sexo de los individuos.

HLA-DQ2.5cis	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total columnas</i>
<i>Control</i>	63 (32.31)	51 (26.15)	114 (58.46)
<i>EIIC</i>	48 (24.62)	33 (16.92)	81 (41.54)
<i>Total filas</i>	111 (56.92)	84 (43.08)	195 (100)

Tabla 5.1. Prevalencia del genotipo DQ2.5cis expresado en n y (%).

Al realizar el estudio básico del Chi2 del HLA-DQ2.5cis, se observa que no hay diferencias significativas globales al comparar casos y controles, en función

del sexo, ($p=0.579$). Sin embargo, como la tabla refleja una mayor prevalencia de HLA-EC en mujeres control, respecto de todos los grupos, y una menor prevalencia del mismo en mujeres con EII, se realiza el estudio para comprobar si hay diferencias significativas en el grupo de mujeres.

Para estudiar la significación estadística de las diferencias constatadas en la tabla anterior se ha construido y estimado un Modelo de Regresión Logística completamente análogo al Modelo (1) pero referido a la prevalencia de DQ2.5cis, en vez de a la prevalencia global de HLA-EC.

$$\text{"riesgo" de DQ2} = \frac{P(DQ2)}{1 + P(DQ2)} = e^{\beta_0 + \beta_1 x_{EII} + \beta_2 x_{SEXO} + \beta_3 x_{EII} x_{SEXO}} \quad (3)$$

donde x_{EII} y x_{SEXO} son las variables binarias.

Los resultados de la estimación de ese Modelo (3) se recogen a continuación:

Dependent variable: TipoHLA=DQ2.5cis

Factors:

EII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimated	
	Estimate	Odds Ratio
β_0	-1.16804	
β_1 (x_{EII})	-0.46535	0.62791
β_2 (x_{SEXO})	-0.355251	0.70099
β_3 ($x_{EII} * x_{SEXO}$)	0.527125	1.69405

Deviance del modelo: $-2\ln V = 4.1923$ con 3 grados de libertad

Likelihood Ratio Tests

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
X _{EII}	3.55695	1	0.0593
X _{SEXO}	2.77724	1	0.0956
X _{EII} *X _{SEXO}	2.60866	1	0.1063

Comparando estos resultados con los obtenidos en la estimación del Modelo (1) se constata que son muy similares, tanto en el signo de las β_i como en su orden de magnitud y en sus niveles de significación estadística.

En efecto, del valor de β_1 se deduce que **el riesgo de HLA-DQ2.5cis en mujeres con EIIC es sólo un 63% del constatado para las mujeres del grupo control (p-value = 0.0593)**. Del valor de β_2 se deduce que el riesgo de -DQ2.5cis en los hombres del grupo control es un 70% el de las mujeres control (p-value = 0.0956). El valor obtenido para β_3 indica que en presencia de EII, la menor prevalencia de -DQ2.5cis es más marcada en mujeres que en hombres; esta conclusión es similar a la obtenida con el Modelo (1) para el global de HLA-EC, no existiendo diferencias significativas al estudiar la muestra en global (p=0.1063).

En definitiva, las conclusiones generales obtenidas en el Apartado 2 respecto al efecto de la EIIC y el Sexo en la prevalencia de HLA-EC se mantienen, e incluso se refuerzan, cuando el análisis se centra exclusivamente en la prevalencia del tipo DQ2.5cis, observándose una tendencia a que exista una menor prevalencia de HLA-DQ2.5cis en mujeres con EIIC al compararlas con las controles. Si analizamos exclusivamente las mujeres, observamos que, con una FF de 0.2372 y un RR de 0.6279, se obtiene una **FP del 9%**, lo que significa que el 9% de los factores que pueden contribuir a proteger frente al desarrollo de una EIIC, los confiere el HLA-DQ2.5cis.

5.1.2 Análisis diferenciando los dos tipos de EIIC

En la **Tabla 5.2** se recogen los valores de la prevalencia del haplotipo DQ2.5*cis* en función del tipo de la EIIC y del sexo de los individuos.

HLA- DQ2.5<i>cis</i>	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total filas</i>
<i>Control</i>	63 (32.31)	51 (26.15)	114 (58.46)
<i>Crohn</i>	30 (15.38)	23 (11.79)	53 (27.17)
<i>C. Ulcerosa</i>	18 (9.23)	10 (5.13)	28 (14.36)
<i>Total columnas</i>	111 (56.92)	84 (43.08)	195 (100)

Tabla 5.2. Prevalencia del haplotipo DQ2.5*cis*, n (%)

Considerando conjuntamente ambos sexos, en la CU se reduce la prevalencia de -DQ2.5*cis* de forma más llamativa, pasando de un 20.11% (114 HLA-EC de 557 individuos) en los controles a un 13.53% (28/207), siendo la reducción significativa (p-value = **0.0319**), mientras que en los individuos con la enfermedad de Crohn la prevalencia 21.20% (53/250) es muy similar a la observada en los controles (p-value = 0.7630), debido a que en el caso de las mujeres la disminuye y en el de los hombres la aumenta.

Se realiza el cálculo de la FP del -DQ2.5*cis* en pacientes con CU, puesto que hay diferencias significativas en la prevalencia de dicho haplotipo al comparar con los controles, y se obtiene una FP del 7% (FF=0.19757 y RR=0.6353).

Puesto que parece existir una diferencia en la prevalencia de -DQ2.5*cis*, en función del tipo de EII, se realiza el estudio mediante regresión logística para confirmarlo, y para determinar si hay diferencias, también, al diferenciar por

sexos. Los resultados del ajuste del modelo de regresión logística en el que se han diferenciado las dos alternativas para la EIIC se recogen a continuación.

Dependent variable: TipoHLA=DQ2.5cis

Factors:

TipoEII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Standard Error	Estimated Odds Ratio
CONSTANT	-1.16804	0.160329	
TipoEII=crohn	-0.291585	0.281575	0.747079
TipoEII=ulcerosa	-0.777869	0.374128	0.459384
Xsexo	-0.355251	0.212223	0.700997
(TipoEII=crohn)*Xsexo	0.631107	0.377035	1.87969
(TipoEII=ulcer.)*Xsexo	0.500185	0.473319	1.64903

Analysis of Deviance

Source	Deviance	Df	P-Value
Model	9,27224	5	0,0987
Residual	987,787	1018	0,7459
Total (corr.)	997,059	1023	

Percentage of deviance explained by model = 0,929959

Adjusted percentage = 0,0

Likelihood Ratio Tests

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
TipoEII	5,02394	2	0,0811
Sexo	2,77724	1	0,0956
TipoEII*Sexo	3,2416	2	0,1977

El incremento de la deviance, respecto al modelo que no diferenciaba los dos tipos de EIIC es $9.272 - 4.192 = 5.08$, lleva asociada un valor $p = 0.079$ (mirando la tabla de la Chi-2 con 2 grados de libertad).

El bajo valor del p-value parece indicar que el efecto del HLA-DQ2.5*cis* sobre la EIIC es diferente según el tipo de la enfermedad. En concreto, de los valores obtenidos en el modelo de regresión logística se deduce que la presencia de **DQ2.5*cis* en mujeres reduce en más del 50% el riesgo de presentar Colitis ulcerosa, dado que multiplica dicho riesgo por 0.459 (p-value asociado = 0.0344)**, mientras que dicha reducción en el caso de la enfermedad de Crohn es sólo del 25%, ya que multiplica dicho riesgo por 0.747 (p-value asociado = 0.2994).

De esta forma, teniendo en cuenta una frecuencia fenotípica de 0.2372 y un riesgo relativo de 0.459, estadísticamente significativo, la fracción preventiva correspondiente es de 0.128, lo que significa que **la contribución conferida por el HLA-DQ2.5*cis* en mujeres, como protección al desarrollo de CU, es aún mayor que si tenemos en cuenta ambos sexos, ya que para mujeres con CU la FP es del 13%.**

Los valores obtenidos para los términos asociados a la interacción entre TipoEII y Sexo implican que el efecto de la reducción de la prevalencia de DQ2.5*cis* en la colitis ulcerosa es menos marcado en hombres que en mujeres, mientras que en el caso de la enfermedad de Crohn su presencia en hombres se traduce en un incremento de la prevalencia de DQ2.5*cis*, aunque dicho incremento no es estadísticamente significativo (p-value = 0.1745).

En conclusión, el HLA-DQ2.5*cis* es menos prevalente en la colitis ulcerosa respecto a la población control (p=0.0319), sobre todo en mujeres (p=0.0344), encontrándose un Odds Ratio que puede suponer que se trate incluso de un factor protector (OR=0.459), con una fracción preventiva para la CU del 7% considerando ambos sexos, y del 13% teniendo en cuenta sólo mujeres.

5.2 Frecuencia de HLA-DQ2.5cis + HLA-DQ2.5trans, en función de la presencia de EII y del sexo

Hay 38 casos (3.63%) de HLA-DQ2.5trans en la muestra completa (muestra completa: 1047 sujetos). De estos, 20 son controles (3.47% de los controles, 12 hombres y 8 mujeres) y 18 casos (3.94% positivos en pacientes con EII, 9 hombres y 9 mujeres). Dado que en la muestra (incluyendo casos y controles) sólo hay 38 casos de HLA-DQ2.5trans (sin diferencias significativas entre casos y controles, $p=0.77$), no se ha considerado adecuado realizar un análisis individualizado para esta alternativa, analizándose a continuación un análisis para el total de casos con DQ2, incluyendo tanto el *cis* como el *trans*.

5.2.1 Análisis considerando conjuntamente los dos tipos de EII

En la **Tabla 5.3** se recogen los valores de la prevalencia del fenotipo DQ2.5 total en función de la presencia de la EII y del sexo de los individuos.

HLA-DQ2.5	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total</i>
<i>Control</i>	75 (32.19)	59 (25.32)	134 (57.51)
<i>EIIC</i>	57 (24.46)	42 (18.03)	99 (42.49)
<i>Total columnas</i>	132 (56.65)	101 (43.35)	233 (100)

Tabla 5.3. Prevalencia del genotipo DQ2.5, n (%)

El Chi2 nos muestra que no hay diferencias significativas en la prevalencia de HLA-DQ2.5 total en función de que el sujeto tenga EII o su sexo ($p=0.965$), pero, para estudiar si hay significación estadística al analizar los sexos por separado o confirmar la ausencia de diferencias, se ha construido y estimado un

Modelo de Regresión Logística completamente análogo al Modelo (3) referido a la prevalencia de DQ2.5 total.

Los resultados de la estimación de ese modelo se recogen a continuación:

Dependent variable: TipoHLA=DQ2.5cis+ DQ2.5trans

Factors:

EII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Standard Error	Estimated Odds Ratio
CONSTANT	-0.972319	0.152838	
XEII	-0.365186	0.231125	0.694068
XSexo	-0.334211	0.200756	0.715903
XEII*XSexo	0.426499	0.304888	1.53189

Analysis of Deviance

Source	Deviance	Df	P-Value
Model	3.47256	3	0.3243
Residual	1094.84	1020	0.0513
Total (corr.)	1098.31	1023	

Percentage of deviance explained by model = 0.316172

Adjusted percentage = 0.0

Likelihood Ratio Tests

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
XEII	2.52035	1	0.1124
XSexo	2.75022	1	0.0972
XEII*XSexo	1.96018	1	0.1615

Del valor de β_1 se deduce que el riesgo de HLA-DQ2.5 total en mujeres con EII es sólo un 69% del constatado para las mujeres del grupo control, pero sin diferencias significativas ($p\text{-value} = 0.1124$). Del valor de β_2 , se deduce que el

riesgo de -DQ2.5 total en los hombres del grupo control es un 72% el de las mujeres control (p-value = 0.0972). El valor obtenido para β_3 indica que, en pacientes con EII se reduce la prevalencia de -DQ2.5 total de forma más marcada en mujeres que en hombres; esta conclusión es similar a la obtenida con el Modelo (1) para el global de HLA-EC, también observando que no es una diferencia significativa al analizar la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn conjuntamente (p-value = 0.1615).

5.2.2 Análisis diferenciando los dos tipos de EIIC

En la **Tabla 5.4** se recogen los valores de la prevalencia del fenotipo DQ2.5 total en función del tipo de la EIIC y del sexo de los individuos.

HLA-DQ2.5 total	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total</i>
<i>Control</i>	75 (32.19)	59 (25.32)	134 (57.51)
<i>Crohn</i>	36 (15.45)	29 (12.45)	65 (27.90)
<i>C. Ulcerosa</i>	21 (9.01)	13 (5.58)	34 (14.59)
<i>Total columnas</i>	132 (56.65)	101 (43.35)	233 (100)

Tabla 5.4. Prevalencia del genotipo DQ2.5 total (%)

Considerando conjuntamente ambos sexos, el HLA-DQ2.5 total es significativamente menos prevalente en CU que en controles (16.43% de las CU vs 23.63% de los controles; p-value = **0.0287**). La FP del HLA-DQ2.5 total en relación con la CU es del 8% (FF=0.2322 y RR=0.6497). Para confirmar esto y observar si se

debe a una menor prevalencia de HLA-DQ2.5 en mujeres, como en apartados previos, se realiza el estudio mediante regresión logística.

Los resultados del ajuste del modelo de regresión logística en el que se han diferenciado las dos alternativas para la EIIC se recogen a continuación.

Dependent variable: TipoHLA=DQ2.5cis+ DQ2.5trans

Factors:

TipoEII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Standard Error	Estimated Odds Ratio
CONSTANT	-0.972319	0.152838	
TipoEII=crohn	-0.192985	0.261906	0.824494
TipoEII=ulcerosa	-0.667425	0.339421	0.513028
XSexo	-0.334211	0.200756	0.715903
(TipoEII=crohn)*XSexo	0.561245	0.3524	1.75285
(TipoEII=ulcerosa)*XSexo	0.355037	0.434974	1.42623

Analysis of Deviance

Source	Deviance	Df	P-Value
Model	10.1526	5	0.0710
Residual	1088.16	1018	0.0624
Total (corr.)	1098.31	1023	

Percentage of deviance explained by model = 0.924386

Adjusted percentage = 0.0

Likelihood Ratio Tests

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
TipoEII	4.21939	2	0.1213
Sexo	2.75022	1	0.0972
TipoEII*Sexo	2.70962	2	0.2580

El incremento de la deviance, respecto al modelo que no diferenciaba los dos tipos de EIIC (punto anterior, datos de análisis de deviance) es $10.1526 - 3.4725 = 6.68$, lleva asociada un valor $p = 0.035$ (mirando la tabla de la Chi-2 con 2 grados de libertad).

El bajo valor del p-value parece indicar que el efecto de la prevalencia de HLA-DQ2.5*cis* y *trans* es diferente según el tipo de la enfermedad. En concreto, de los valores obtenidos en el modelo de regresión logística se deduce que la presencia de **de presencia de HLA-DQ2.5 total en mujeres reduce casi en un 50% el riesgo de Colitis ulcerosa, dado que multiplica dicho riesgo por 0.513 (p-value asociado = 0.0466)**, mientras que dicha reducción en el caso de la enfermedad de Crohn es menor que un 18%, dado que multiplica dicho riesgo por 0.824 (p-value asociado = 0.4609).

Los valores obtenidos para los términos asociados a la interacción entre TipoEII y Sexo implican que el efecto de la reducción de la prevalencia de DQ2.5 total es menos marcado en hombres con CU que en mujeres con CU, mientras que en el caso de la enfermedad de Crohn hay incremento de la prevalencia de DQ2.5 total en hombres, aunque dicho incremento no es estadísticamente significativo (p-value = 0.1172).

Ante el hallazgo significativo de una menor prevalencia de HLA-DQ2.5 en mujeres con CU, con un riesgo relativo que sugiere que el HLA-DQ2.5 es un factor de protección frente a la aparición de CU, se procede a determinar la fracción preventiva. Se obtiene que el HLA-DQ2.5 total confiere una FP de 0.1336, lo que significa que la contribución conferida por el HLA-DQ2.5 a la protección del desarrollo de una CU en mujeres es del 13% (usando una FF de 0.2744186 y un RR de 0.513028).

Así pues, considerando conjuntamente ambos sexos, la prevalencia de DQ2.5 total en pacientes con CU se reduce de un 23.64% en los controles a un 16.43%, siendo la reducción estadísticamente significativa (p-value = 0.0287), mientras que en los individuos con la enfermedad de Crohn la prevalencia de

26.00% es algo superior a la observada en los controles, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (p-value = 0.4879). Este aumento de prevalencia en enfermos de Crohn puede guardar relación con la mayor presencia de HLA-DQ2.2 en la enfermedad de Crohn, como se observa más adelante.

Y, estudiando exclusivamente mujeres con CU, se observa que el HLA-DQ2.5, tanto cis como trans, actúa como factor de protección frente a la aparición de una CU.

5.3 Frecuencia de HLA-DQ8 en la EII

5.3.1 Análisis considerando conjuntamente los dos tipos de EII

En la **Tabla 5.5** se recogen los valores de la prevalencia del heterodímero -DQ8 en función de la presencia, o no, de la EII y del sexo de los individuos.

HLA-DQ8	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total</i>
<i>Control</i>	59 (36.88)	41 (25.62)	100 (62.50)
<i>EII</i>	33 (20.62)	27 (16.88)	60 (37.50)
<i>Total columnas</i>	92 (57.50)	68 (42.5)	160 (100)

Tabla 5.5. Prevalencia del heterodímero DQ8, n(%).

Considerando conjuntamente ambos sexos, la prevalencia de HLA-DQ8 es inferior en los individuos con EII ($60/457 = 13.13\%$) que en los controles ($101/577 = 17.50\%$), teniendo dicha diferencia un **p-value** asociado igual a **0.054**. Uno de los controles con HLA-DQ8 no tiene el sexo registrado, por lo que se prescinde de él para el análisis que tiene en cuenta el sexo (se cuenta con 100 -DQ8 controles positivos en lugar de 101). La reducción del riesgo no es significativamente diferente al comparar hombres *versus* mujeres ($p=0.620$).

La FP del HLA-DQ8 en la EII es de 0.048, lo que implica que tener HLA-DQ8 confiere un 5% de protección frente al desarrollo de EIIC.

Para estudiar la significación estadística de las diferencias constatadas en la tabla anterior se ha construido y estimado un Modelo de Regresión Logística completamente análogo al manejado en el apartado anterior, pero referido a la prevalencia de HLA-DQ8.

$$\text{"riesgo" de DQ8} = \frac{P(\text{DQ8})}{1 + P(\text{DQ8})} = e^{\beta_0 + \beta_1 x_{\text{EII}} + \beta_2 x_{\text{SEXO}} + \beta_3 x_{\text{EII}} x_{\text{SEXO}}} \quad (4)$$

donde x_{EII} y x_{SEXO} son las variables binarias.

Los resultados de la estimación de ese Modelo (4) se recogen a continuación:

Dependent variable: TipoHLA=DQ8

Factors:

EII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Standard Error	Estimated Odds Ratio
CONSTANT	-1.44548	0.173601	
XEII	-0.423466	0.269971	0.654774
XSexo	-0.157152	0.22472	0.85457
XEII*XSexo	0.119931	0.35784	1.12742

Deviance del modelo: $-2\ln V = 4.4489$ con 3 grados de libertad

Likelihood Ratio Tests

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
XEII	2.50059	1	0.1138
Sexo	0.485908	1	0.4858
XEII*Sexo	0.11235	1	0.7375

Del valor de β_1 se deduce que el riesgo de -DQ8 en mujeres con EII es un 65% del constatado para las mujeres del grupo control (p-value = 0.1138). Por otra parte, de los valores de β_2 y de β_3 se deduce que el riesgo de -DQ8 en hombres con EII es un 74% del obtenido para los hombres del grupo control. Con la regresión logística se comprueba lo mismo que apuntaban los resultados del Chi2, que no hay diferencias en la prevalencia de DQ8 entre mujeres y hombres, teniendo en cuenta si tienen EII o no (p-value de la interacción = 0.7375).

5.3.2 Análisis diferenciando los dos tipos de EIIC

En la Tabla 5.6 se recogen los valores de la prevalencia del fenotipo DQ8 en función del tipo de la EIIC y del sexo de los individuos.

HLA- DQ8	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total</i>
<i>Control</i>	59 (36.88)	41 (25.62)	100 (62.50)
<i>Crohn</i>	12 (7.50)	16 (10.00)	28 (17.50)
<i>C. Ulcerosa</i>	21 (13.13)	11 (6.87)	32 (20.00)
<i>Total columnas</i>	92 (57.61)	68 (42.49)	160 (100)

Tabla 5.6 Prevalencia del heterodímero DQ8, n (%).

Analizando la prevalencia de HLA-DQ8 en todos los pacientes con ECr (ambos sexos), se observa, como queda reflejado en la tabla previa, que tan sólo el 11.20% (28 pacientes) de los enfermos de Crohn presentan el HLA-DQ8, a diferencia del 17.50% (101 personas) de los controles (**p=0.0217**). Esta diferencia significativa no se observa al comparar la CU con los controles (p=0.501). Esta menor prevalencia se traduce en una reducción del riesgo de HLA-DQ8 tanto en

hombres como en mujeres con ECr, y en mujeres con CU (efecto menos marcado que en la ECr).

La FP del HLA-DQ8 en la ECr es del 7% (FF=0.1733 y RR=0.3984). Así pues, **la contribución conferida por el HLA-DQ8 como protección al desarrollo de la enfermedad de Crohn es del 7%.**

Los resultados del ajuste del modelo de regresión logística, en el que se han diferenciado las dos alternativas, para la EIIC se recogen a continuación.

Logistic Regression

Dependent variable: TipoHLA=DQ8

Factors:

TipoEII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Standard Error	Estimated Odds Ratio
CONSTANT	-1.44548	0.173601	
TipoEII=crohn	-0.445367	0.319473	0.640589
TipoEII=ulcerosa	-0.390728	0.368145	0.676564
Sexo=hombres	-0.157152	0.22472	0.854574
TipoEII=crohn*Sex	-0.22068	0.462893	0.801973
TipoEII=ulcerosa*	0.374447	0.46146	1.45419

Deviance del modelo: $-2\ln V = 7.398$ con 5 grados de libertad

Likelihood Ratio Tests

Factor	Chi-Square	Df	P-Value
TipoEII	2.51739	2	0.2840
Sexo	0.485908	1	0.4858
TipoEII*Sexo	1.15118	2	0.5624

El incremento de la deviance, respecto al modelo que no diferenciaba los dos tipos de EIIC es $7.398 - 4.4489 = 2.949$, no es significativo (p-value = 0.2289)

El análisis de los resultados expuestos más arriba indica que hay un 64% menos de posibilidades de que una mujer con ECr tenga el HLA-DQ8 positivo y un 68% en el caso de las mujeres con CU. En el caso de hombres la reducción del riesgo asociado a la prevalencia de DQ8 es más acusada en presencia de ECr, 51%, pero resulta casi inexistente en la de EII ulcerosa. Así pues, la prevalencia de HLA-DQ8 es menor en mujeres tanto con ECr como con CU y en hombres con ECr.

6. Relación de la EIIC y el sexo con la frecuencia de HLA-DQ2.2
(DQA1*02:01+DQB1*02:02)

6.1 Análisis global

En la tabla siguiente se recoge, en función del sexo, la frecuencia relativa con la que aparecen en la muestra (incluyendo casos y controles) las tres alternativas consideradas para el -DQ2.2 (negativo, heterocigoto u homocigoto):

HLA-DQ2.2	<i>Heterocigoto</i>	<i>Homocigoto</i>	<i>Negativo</i> <i>(no HLA DQ2.2)</i>	<i>Total filas</i>
<i>Mujeres</i>	98 (9.57%)	8 (0.78%)	311 (30.37%)	417 (40.72%)
<i>Hombres</i>	147 (14.36%)	12 (1.17%)	448 (43.75%)	607 (59.28%)
<i>Total columnas</i>	245 (23.93%)	20 (1.95%)	759 (74.12%)	1024 (100.00%)

Tabla 6.1. Prevalencia de HLA-DQ2.2 en hombres y mujeres, en función de si son homocigotos o heterocigotos, n (%).

Se constata que el HLA-DQ2.2 está presente en aproximadamente la cuarta parte de los individuos de la muestra (23.93% como heterocigoto y 1.95% como homocigoto). De los 145 heterocigotos, 125 corresponden a controles y 120 a casos, y de los homocigotos, 6 son controles y 14 casos. Proporcionalmente, la prevalencia de HLA-DQ2.2 es algo mayor en los casos, con un RR de 1.41, de tal forma que, utilizando la FF de HLA-DQ2.2 en controles (FF=0.2270), la **fracción**

etiológica (FE) del HLA-DQ2.2 es del 9% para desarrollar una EIIC. Es decir, el 9% de los factores que pueden favorecer la aparición de una EIIC en un individuo, los confiere el tener el haplotipo -DQ2.2.

6.2 Relación con el tipo de EIIC

Las dos tablas siguientes muestran la relación entre el tipo de EII y la presencia de -DQ2.2 (sea en heterocigosis o en homocigosis) en el caso de hombres y en el de mujeres.

DQ2.2 en hombres según EIIC	No DQ2.2	Sí DQ2.2	Total
<i>ECr</i>	88 (68.75%)	40 (31.25%)	128 (21.09%)
<i>CU</i>	94 (74.02%)	33 (25.98%)	127 (20.92%)
<i>Control</i>	266 (75.57%)	86 (24.43%)	352 (57.99%)
Total	448 (73.81%)	159 (26.19%)	607 (100.00%)

Tabla 6.2. Relación entre DQ2.2 y tipo de EIIC en hombres, n (%).

DQ2.2 en mujeres según EIIC	No DQ2.2	Sí DQ2.2	Total
<i>ECr</i>	77 (63.11%)	45 (36.89%)	122 (29.26%)
<i>CU</i>	64 (80.00%)	16 (20.00%)	80 (19.18%)
<i>Control</i>	170 (79.07%)	45 (20.93%)	215 (51.56%)
Total	311 (74.58%)	106 (25.42%)	417 (100.00%)

Tabla 6.3. Relación entre DQ2.2 y tipo de EIIC en mujeres, n (%).

La prevalencia de HLA-DQ2.2 en la CU es similar a la población control, no ocurriendo así en la ECr, en la que la prevalencia aumenta sensiblemente en

comparación al grupo control y el grupo de pacientes con CU, lo que es discretamente más evidente en mujeres que en hombres.

Se realiza un estudio estadístico para determinar la significación de la mayor frecuencia de HLA-DQ2.2 en enfermos de Crohn, construyendo nuevamente un modelo de regresión logística que relaciona la prevalencia de -DQ2.2 con la presencia de las dos variantes de EII y con el sexo. En este modelo se ha supuesto que no existe interacción entre los efectos de ambos factores.

El modelo es el siguiente:

$$\text{"riesgo" de HLA-DQ2.2} = \frac{P(\text{DQ22})}{1 + P(\text{DQ22})} = e^{\beta_0 + \beta_{11}x_{\text{CR}} + \beta_{12}x_{\text{UL}} + \beta_2x_{\text{SEXO}}} \quad (5)$$

donde x_{SEXO} es la variable binaria tal como se definió en 2.2, mientras que

x_{CR} : valdrá 1 en los individuos con enfermedad de Crohn y valdrá 0 en el resto

x_{UL} : valdrá 1 en los individuos con EII ulcerosa y valdrá 0 en el resto

La interpretación de los parámetros del Modelo (5), que puede obtenerse de forma similar a la expuesta para los modelos anteriores es:

e^{β_0} es el riesgo de DQ2.2 en mujeres del grupo control

$e^{\beta_{11}}$ indica por cuánto se multiplica el riesgo de enfermedad de Crohn por el hecho de tener el DQ2.2 (se asume que este factor no depende del sexo)

$e^{\beta_{12}}$ indica por cuánto se multiplica el riesgo de colitis ulcerosa por el hecho de tener el DQ2.2 (se asume que este factor no depende del sexo)

e^{β_2} indica por cuánto se multiplica el riesgo de DQ2.2 por el hecho de ser hombre en vez de mujer (se asume que este factor no depende de la presencia de EII)

El Modelo (5) propuesto se ha estimado mediante Statgraphics, obteniéndose los valores que se recogen a continuación para los parámetros β_i .

```

Logistic Regression

Dependent variable: DQ22_positivo
Factors:
  TipoEII
  Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)
-----
Parameter                Estimate          Standard Error    Estimated Odds Ratio
-----
 $\beta_0$                 -1.25767         0.136302
 $\beta_{11}$  (Crohn)        0.54892         0.16745          1.73139
 $\beta_{12}$  (ulcerosa)     0.03231         0.191514         1.03285
Sexo=hombres              0.08816         0.147144         1.09217
-----

```

```

Analysis of Deviance
-----
Source          Deviance      Df      P-Value
-----
Model           11.3323       3       0.0101
Residual        1159.69      1020    0.0015
-----
Total (corr.)  1171.02      1023

```

El modelo resulta muy significativo (**p-value = 0.0101**).

La significación individual de cada parámetro del modelo puede estudiarse analizando la modificación de la “deviance” al eliminar el término correspondiente del modelo². La interpretación de los resultados obtenidos es la siguiente:

² Alternativamente, y como un método aproximado, puede utilizarse el test de Wals consistente en dividir la estimación obtenida (“Estimate” para el parámetro por su desviación típica (“Standard Error”) y comparar el resultado con percentiles de una Normal tipificada

$e^{\beta_{11}}$: $e^{0.5489} = 1.73139$ **La presencia de HLA-DQ2.2 incrementa en un 73% el riesgo de presentar enfermedad de Crohn.** Este efecto es muy significativo estadísticamente ($0.5489/0.1674=3.28$ **p-value = 0.001**)

$e^{\beta_{12}}$: $e^{0.0323} = 1.0328$ La presencia de -DQ2.2 incrementa en un 3% el riesgo de colitis ulcerosa. Este efecto, no es significativo ($0.0323/0.1915=0.168$ p-value = 0.930)

e^{β_2} : $e^{0.0881} = 1.0921$ El riesgo de -DQ2.2 se incrementa en un 9% por ser hombre en vez de mujer. Este pequeño efecto tampoco es significativo ($0.00881/0.1471=0.599$ p-value = 0.548)

Dado el RR significativo de mayor prevalencia de **HLA-DQ2.2 en enfermos de Crohn**, se analiza la fracción etiológica de dicho haplotipo como factor de riesgo de desarrollo de Crohn. Se obtiene una **fracción etiológica de 15% (0.1461)**, considerando una FF de 0.2270 y un RR de 1.7538, lo que significa que la contribución conferida por el HLA-DQ2.2 como factor de riesgo al desarrollo de ECr es del 15%.

Para analizar si el efecto de la mayor prevalencia de HLA-DQ2.2 en la enfermedad de Crohn es significativamente más marcado en mujeres que en hombres, se ha estimado un nuevo modelo añadiendo al Modelo (5) los dos términos correspondientes a la posible interacción.

El nuevo modelo es:

$$\text{"riesgo" de HLA-DQ2.2} = \frac{P(\text{DQ22})}{1 + P(\text{DQ22})} = e^{\beta_0 + \beta_{11}x_{\text{CR}} + \beta_{12}x_{\text{UL}} + \beta_2x_{\text{SEXO}} + \beta_{31}x_{\text{CR}}x_{\text{SEXO}} + \beta_{32}x_{\text{UL}}x_{\text{SEXO}}} \quad (6)$$

Los resultados del ajuste de este modelo han sido los siguientes:

Logistic Regression

Dependent variable: DQ2.2_positivo

Factors:

TipoEII

Sexo

Estimated Regression Model (Maximum Likelihood)

Parameter	Estimate	Standard Error	Estimated Odds Ratio
CONSTANT	-1.32914	0.167644	
TipoEII=crohn	0.791993	0.251622	2.20779
TipoEII=ulcerosa	-0.0571584	0.325929	0.944444
Sexo=hombres	0.199987	0.208547	1.22139
TipoEII=crohn*Sex	-0.451301	0.339212	0.636799
TipoEII=ulcerosa*	0.13952	0.403185	1.14972

Analysis of Deviance

Source	Deviance	Df	P-Value
Model	13.7743	5	0.0171
Residual	1157.24	1018	0.0015
Total (corr.)	1171.02	1023	

Los valores obtenidos para los diferentes parámetros confirman, como es obvio los resultados expuestos en las tablas del Apartado 1 relativos a que el efecto de la mayor prevalencia de HLA-DQ2.2 en la enfermedad de Crohn es más marcado en mujeres que en hombres.

Para analizar si esta diferencia es significativa, hay que comparar el incremento en la “deviance” al pasar del Modelo (5) al (6) con los valores asociados a una Chi-2 con 2 grados de libertad:

$$2(L_{\max/\text{modelo}(10)} - L_{\max/\text{modelo}(9)}) = 13.774 - 11.332 = 2.332 \quad (\text{p-value} = 0.312)$$

El valor obtenido para el p-value indica que no hay evidencia estadística respecto a la existencia real de diferencias entre los efectos de la prevalencia de HLA-DQ2.2 en la enfermedad de Crohn, entre mujeres y hombres.

De esta forma, este apartado nos demuestra una mayor frecuencia de HLA-DQ2.2 en enfermos de Crohn, sin existir diferencias entre sexos, y una FE del HLA-DQ2.2 del 15% en el desarrollo de una ECR.

7. Estudio de la relación entre los alelos y la EIIC

7.1. Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la EIIC

Como se explica a continuación, se realiza un ajuste de datos para permitir la comparación de la prevalencia de alelos DQA1 en la ECr, CU y controles, comprobando que existen diferencias significativas. Al igual que para los alelos de DQA1, se realiza un ajuste de datos para comparar las prevalencias de los diferentes alelos DQB1, observando también diferencias que resultan gráficamente muy llamativas en el análisis de correspondencias, por factores.

7.1.1 Relación entre DQA1 y EII

- Ajuste de los datos:

La siguiente tabla (tabla 7.1) recoge las frecuencias observadas para los diferentes alelos de DQA1* en función del tipo de EIIC.

DQA1*	Crohn	ulcerosa	control	Total
01	19	15	0	34
01:01	53	43	143	239
01:02	66	55	184	305
01:03	35	41	81	157
01:04	7	19	26	52
01:05	4	1	13	18
02:01	109	71	167	347
03	7	4	0	11
03:01	27	32	95	154
03:02	2	0	15	17
03:03	17	11	44	72
04:01	13	11	36	60
04:02	1	2	0	3
05	0	1	0	1
05:01	56	29	134	219
05:03	0	0	6	6
05:05	82	74	174	330
06	0	0	1	1
06:01	1	1	3	5
Total	499 (24.57%)	410 (20.19%)	1122 (55.24%)	2031 (100.00%)

Tabla 7.1. Prevalencias de los distintos alelos DQA1.

En los casos en los que DQA1 figura sólo con 2 dígitos no se pudieron determinar los 2 dígitos adicionales. A la vista de los valores anteriores se ha decidido prescindir del caso DQA1*05 y del caso DQA1*06.

Sin embargo, no se ha considerado conveniente prescindir de los 34 casos de 01 y los 11 de 03, dado que todos ellos corresponden a pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, y el no tenerlos en cuenta podría

subestimar las frecuencias relativas de los alelos DQA1*02 o 03 para estas condiciones. En consecuencia, se ha considerado preferible la siguiente solución:

- repartir los 19 casos de DQA1*01 Crohn y los 15 casos de DQA1*01 ulcerosa entre los niveles 01:01 a 01:05 proporcionalmente a las frecuencias observadas de estos alelos en cada tipo

- operar de forma similar con los 7 casos de DQA1*03 Crohn y los 4 casos de DQA1*03 ulcerosa

De esta forma la tabla quedaría con todos los casos a nivel de 4 dígitos.

La siguiente tabla (tabla 7.2) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos de DQA1*, tras los ajustes mencionados, en función del tipo de la EII. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1 y el tipo de la EII. Valores bajos de dicho p-value indican que debe rechazarse la hipótesis de que las frecuencias relativas poblacionales de dicha variante son iguales en los dos tipos de EII.

DQA1*	frecuencias absolutas				frecuencias relativas (%)				p-value
	Crohn	ulcerosa	Control	total	Crohn	Ulcerosa	control	total	
01:01	59	47	143	249	11.82	11.49	12.76	12.27	0.7524
01:02	74	60	184	318	14.83	14.67	16.41	15.67	0.5929
01:03	39	45	81	165	7.82	11.00	7.23	8.13	0.0547
01:04	8	21	26	55	1.60	5.13	2.32	2.71	0.0024
01:05	4	1	13	18	0.80	0.24	1.16	0.89	0.2335
02:01	109	71	167	347	21.84	17.36	14.90	17.10	0.0028
03:01	31	35	95	161	6.21	8.56	8.47	7.93	0.2605
03:02	2	0	15	17	0.40	0.00	1.34	0.84	0.0185
03:03	20	12	44	76	4.01	2.93	3.93	3.75	0.6242
04:01	13	11	36	60	2.61	2.69	3.21	2.96	0.7520
04:02	1	2	0	3	0.20	0.49	0.00	0.15	*
05:01	56	29	134	219	11.22	7.09	11.95	10.79	0.0237
05:03	0	0	6	6	0.00	0.00	0.54	0.30	*
05:05	82	74	174	330	16.43	18.09	15.52	16.26	0.4799
06:01	1	1	3	5	0.20	0.24	0.27	0.25	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.2. Relación entre DQA1 y la EII

Como se expone al principio del apartado, se constata que, para varios casos, la relación entre el alelo DQA1* y el tipo de la EII es significativa:

- En la CU, se observa una mayor prevalencia de DQA1*01:03 y 01:04 (**p=0.0547** y **p=0.0024**, respectivamente) y menor del DQA1*05:01 (**p=0.0237**).
- El DQA1*02:01 es más frecuente en la ECr (**p=0.0028**)
- Y el DQA1*03:02 es menos frecuente en la EII que en controles (**p=0.0185**).

Sin embargo, si se aplica la corrección de Holm-Bonferroni, tan sólo resulta significativo el alelo DQA1*01:04 (más frecuente en la CU), con una p corregida de **0.036**, y el DQA1*02:01 (proporcionalmente más prevalente en la ECr), con una p corregida de **0.0392**.

Para visualizar de una forma sintética estas relaciones se ha realizado un Análisis Factorial de Correspondencias (ANACOR) aplicado a la matriz de frecuencias anterior.

El gráfico de las columnas en el espacio de los dos factores, pone de manifiesto que el primer factor opone a la colitis ulcerosa frente al grupo control, situándose la ECr en una posición intermedia, mientras que el segundo factor diferencia fundamentalmente la enfermedad de Crohn de los otros dos grupos.

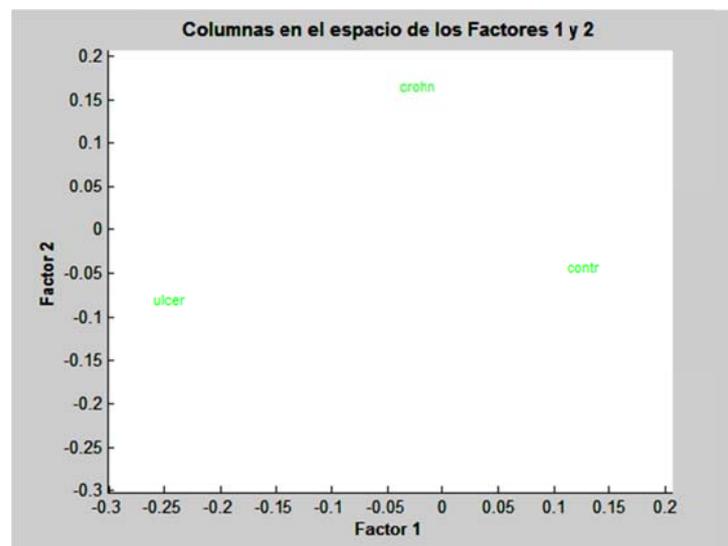


Figura 7.1. Representación de la distribución de los grupos (ECr, CU y controles) según los alelos DQA1* más frecuentemente hallados en cada grupo.

El gráfico correspondiente al Factor 1 y, especialmente, las contribuciones absolutas de los diferentes alelos a la variabilidad explicada por este factor, indican que la diferencia de CU respecto de los controles, se debe a una mayor frecuencia relativa de DQA1*04:02, 01:04 y 01:03 y una menor frecuencia relativa de DQA1*03:02, 05:01, 05:03 y 01:05 (la menor frecuencia de DQA1*05:03 y *01:05 no era estadísticamente significativa, pero en la distribución de los factores sí que contribuye por la menor o ausencia de expresión de dicho alelo en la CU).

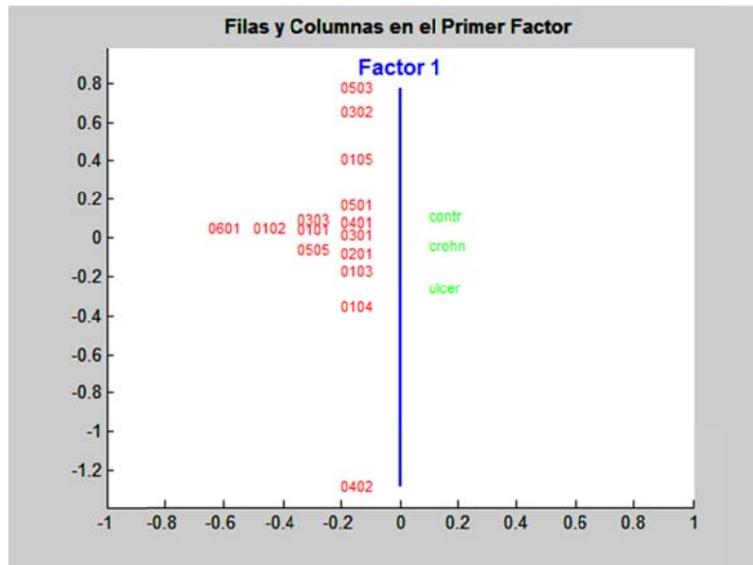


Figura 7.2. Agrupación alélica que diferencia la ECr de la CU y los controles.

Por su parte, el gráfico correspondiente al Factor 2, junto con las contribuciones absolutas de los diferentes alelos a la variabilidad explicada por este factor, indican que la diferencia de los enfermos de Crohn respecto a controles y CU se debe fundamentalmente a una mayor frecuencia relativa de DQA1*02:01 y a una menor frecuencia relativa de DQA1*01:04 y 05:03.

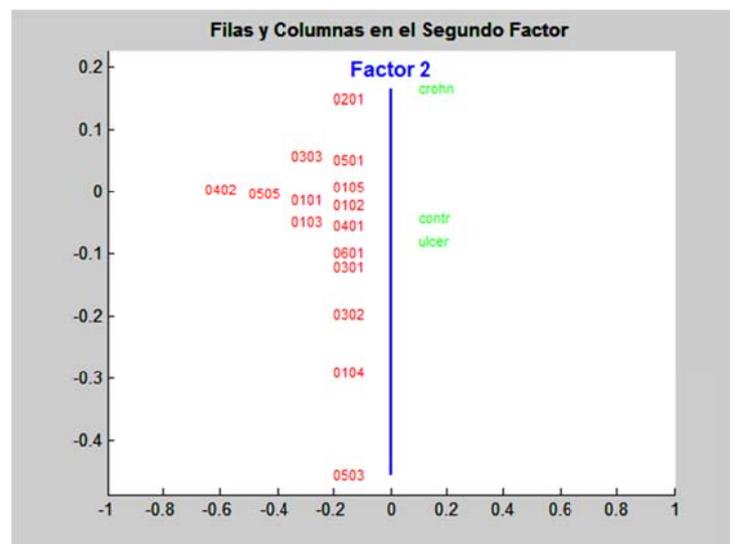


Figura 7.3. Agrupación alélica que diferencia la CU de la ECr y los controles.

- Contribuciones absolutas de los diferentes alelos a la variabilidad explicada por cada factor

ALELO DQA1*	MASA	Factor 1	Factor 2
01:01	0.1227	1.05	-0.28
01:02	0.1567	1.66	-0.98
01:03	0.0813	-11.61	-2.23
01:04	0.0271	-16.60	-25.72
01:05	0.0089	6.79	0.01
02:01	0.1710	-5.13	41.44
03:01	0.0793	0.09	-13.33
03:02	0.0084	17.05	-3.68
03:03	0.0375	1.59	1.27
04:01	0.0296	0.85	-1.05
04:02	0.0015	-11.70	0.00
05:01	0.1079	14.47	2.91
05:03	0.0030	8.50	-6.82
05:05	0.1626	-2.88	-0.02
06:01	0.0025	0.03	-0.27

7.1.2 Relación entre DQB1 y EIIC

- Ajuste de los datos

La siguiente tabla recoge las frecuencias observadas para los diferentes alelos de DQB1* en función del tipo de EII.

DQB1*	Crohn	ulcerosa	control	Total
02:01	56	30	134	220
02:02	95	58	153	306
03	4	1	2	7
03:01	89	83	220	392
03:02	33	37	109	179
03:03	22	11	40	73
03:04	0	1	0	1
04	14	10	36	60
04:02	2	5	0	7
05	65	63	209	337
05:01	26	17	1	44
05:02	1	2	0	3
05:03	2	2	0	4
06	79	75	247	401
06:01	2	3	0	5
06:02	7	11	0	18
06:03	1	3	0	4
06:04	1	0	0	1

Tabla 7.3. Prevalencias de los distintos alelos DQB1*.

En los casos en los que DQB1* figura sólo con 2 dígitos no se pudieron determinar los 2 dígitos adicionales. A la vista de los valores anteriores se ha decidido realizar los siguientes ajustes en la tabla:

- repartir los 7 casos de DQB1* 03 entre *03:01 a *03:04 proporcionalmente a las frecuencias observadas para cada alelo (dentro de cada tipo)
- con DQB1*04, *05 y *06 considerar sólo el nivel de 2 dígitos (dado que los casos para los que sólo se conoce 2 dígitos son más numerosos que aquéllos para los que se tienen los 4 dígitos, por lo que no parece lógico repartir los primeros entre los segundos)

Por lo tanto, para DQB1* se considerará DQB1* 02 y *03 a nivel de 4 dígitos y DQB1* 04 a *06 a nivel de 2 dígitos.

La siguiente tabla (tabla 7.4) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos DQB1*, tras los ajustes mencionados, en función del tipo de la EII. En la última columna se recoge el p-value asociado el test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y el tipo de la EII. Valores bajos de dicho p-value indican que debe rechazarse la hipótesis de que las frecuencias relativas poblacionales de dicha variante son iguales en los 2 tipos de EII.

DQB1*	frecuencias absolutas				frecuencias relativas (%)				p-value
	Crohn	ulcerosa	control	total	Crohn	ulcerosa	control	total	
02:01	56	30	134	220	11.22	7.28	11.64	10.67	0.0436
02:02	95	58	153	306	19.04	14.08	13.29	14.84	0.0094
03:01	91	84	222	397	18.24	20.39	19.29	19.25	0.7138
03:02	34	37	109	180	6.81	8.98	9.47	8.73	0.2097
03:03	23	11	40	74	4.61	2.67	3.48	3.59	0.2794
03:04	0	1	0	1	0	0.24	0	0.05	*
04	16	15	36	67	3.21	3.64	3.13	3.25	0.8790
05	94	84	210	388	18.84	20.39	18.25	18.82	0.6336
06	90	92	247	429	18.04	22.33	21.46	20.81	0.2016

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.4. Relación entre DQB1* y la EIIC.

Se observa una relación significativa para los alelos DQB1* 02:01 y DQB1* 02:02.

Para DQB1*02:01 (**p-value = 0.0436**) la frecuencia relativa en los casos de colitis ulcerosa (7.28%) es significativamente inferior a la constatada para la enfermedad de Crohn (11.22%) y los controles (11,64%).

Para DQB1*02:02 (**p-value = 0.0094**) la frecuencia relativa en los casos de Crohn (19.04%) es significativamente más elevada que la constatada para ulcerosa (14.08%) y controles (13.29%).

No obstante, con la corrección de Holm-Bonferroni, se pierde la significación estadística de los dos alelos DQB1*, no existiendo ninguna diferencia significativa en las prevalencias de los alelos DQB1* al comparar casos y controles. La p del DQB1*02:01 pasa a ser de 0.3488 y la del DQB1*02:02, a 0.0846.

- Análisis Factorial de Correspondencias

El gráfico de las columnas en el espacio de los dos factores (**figura 7.4**), pone de manifiesto que el primer factor diferencia fundamentalmente la enfermedad de Crohn de la colitis ulcerosa y, en menor grado, de los controles. El segundo factor, por su parte, diferencia sobre todo a los controles del Crohn y la colitis ulcerosa.

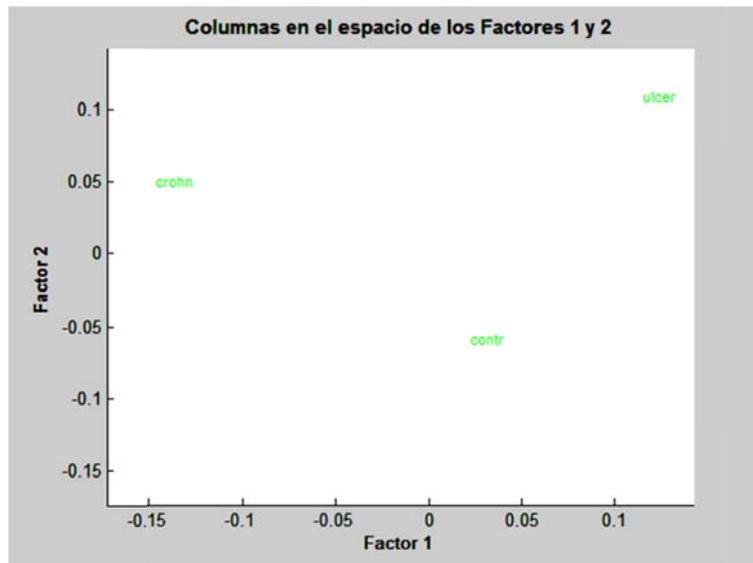


Figura 7.4. Agrupación alélica que diferencia la ECr, CU y los controles, según sus alelos DQB1*.

El gráfico correspondiente al Factor 1 (**figura 7.5**), junto con las contribuciones absolutas de los diferentes alelos a la variabilidad explicada por este factor, indican que la diferencia de los enfermos de Crohn respecto de los controles y pacientes con colitis ulcerosa, se debe fundamentalmente a una mayor frecuencia relativa de DQB1*02:02 y *03:03 (esta última, más frecuente pero sin diferencias significativas respecto de los otros grupos) y una menor frecuencia relativa de DQB1*03:02 (que tampoco resultó en diferencias estadísticamente significativas) y *06.

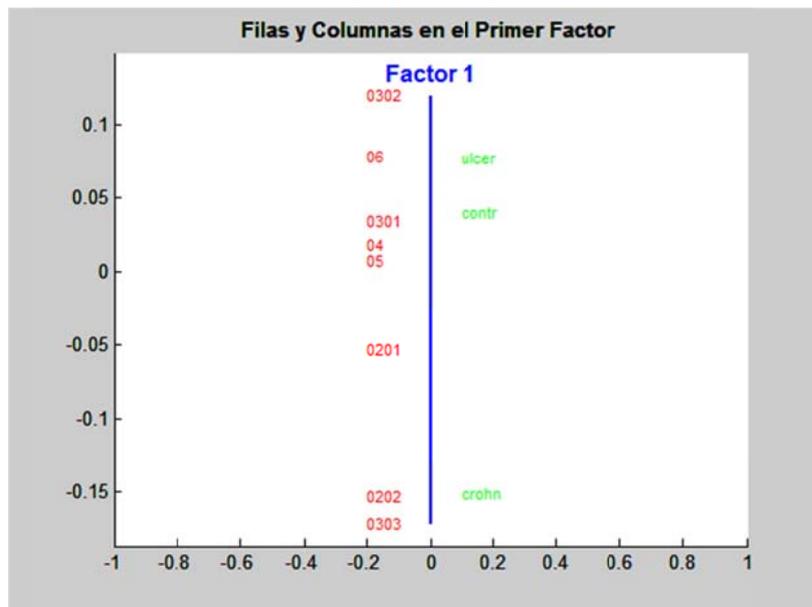


Figura 7.5. Alelos DQB1* que diferencian la ECr de la CU y los controles.

Por su parte, el gráfico correspondiente al Factor 2 (**figura 7.6**), junto con las contribuciones absolutas de los diferentes alelos a la variabilidad explicada por este factor, indican que la diferencia de colitis ulcerosa respecto a los controles y, en menor grado, respecto al Crohn, se debe fundamentalmente a una menor frecuencia relativa de DQB1*02:01 y, en menor grado, a que los pacientes con CU frecuentemente tengan HLA-DQB1*02:02 (no tanto como en la enfermedad de Crohn), *04 y *05 (sin diferencias significativas).

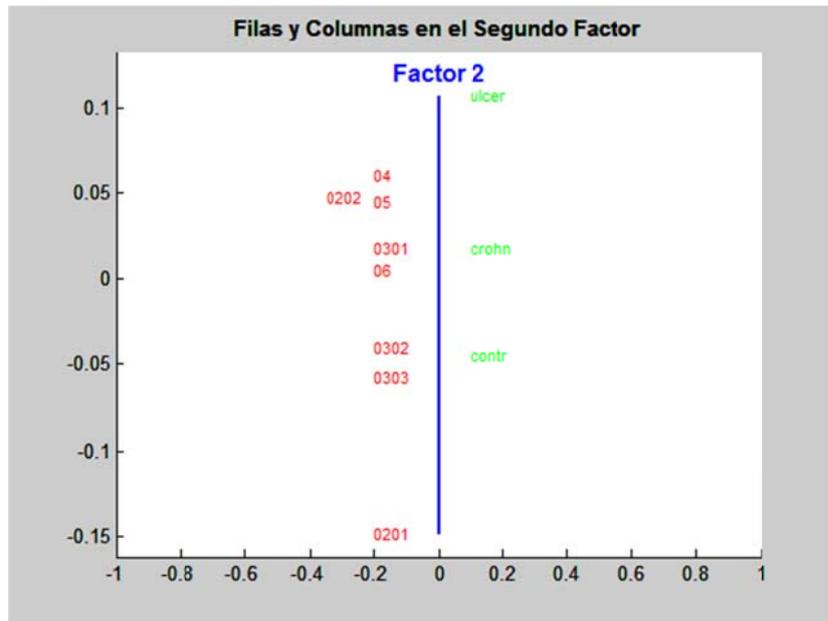


Figura 7.6. Alelos DQB1* que diferencian a la CU.

- Contribución absoluta de los diferentes alelos a la variabilidad explicada por cada factor

ALELOS DQB1*	MASA	Factor 1	Factor 2
02:01	0.1067	-4.12	-67.59
02:02	0.1485	-46.20	9.35
03:01	0.1926	2.83	1.71
03:02	0.0873	16.30	-4.10
03:03	0.0359	-13.98	-3.42
04	0.0325	0.13	3.27
05	0.1883	0.12	10.43
06	0.2082	16.31	0.12

7.2. Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la extensión de la CU

En este apartado, se analiza si existe relación entre la extensión de la colitis y los alelos DQA1* y DQB1*, siempre siendo prudente al interpretar los valores por el escaso tamaño muestral para determinar algunas de estas relaciones.

7.2.1 Relación entre DQA1 y la extensión de la colitis

■ Ajuste de los datos

La siguiente tabla (tabla 7.5) recoge las frecuencias observadas para los diferentes alelos de DQA1* en función de la extensión de la colitis.

DQA1*	col_ext	col_izq	proctitis	Total
01	4	5	3	12
01:01	27	9	3	39
01:02	26	13	5	44
01:03	16	8	3	27
01:04	10	3	0	13
01:05	1	0	0	1
02:01	15	14	1	30
03:01	8	6	2	16
03:03	0	1	0	1
04:01	1	0	0	1
04:02	1	0	0	1
05:01	7	0	1	8
05:05	11	1	1	13

Tabla 7.5. Frecuencia de alelos en función de la extensión de la CU.

En los casos en los que DQA1* figura sólo con 2 dígitos no se pudieron determinar los 2 dígitos adicionales. A la vista de los valores anteriores se ha decidido prescindir de los 12 casos de DQA1* en los que sólo se conocen 2 dígitos.

■ Estudio de las relaciones

La siguiente tabla (tabla 7.6) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos de DQA1*, tras los ajustes mencionados, en función de la extensión de la colitis. En la última columna se recoge el p-value asociado el test

Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1 y de la extensión de la colitis.

DQA1*	frecuencias absolutas				frecuencias relativas (%)				p-value
	col_ext	Col_izq	proctitis	total	col_ext	col_izq	Proctitis	total	
01:01	27	9	3	39	21.95	16.36	18.75	20.1	0.6843
01:02	26	13	5	44	21.14	23.64	31.25	22.68	0.6487
01:03	16	8	3	27	13.01	14.55	18.75	13.92	0.8127
01:04	10	3	0	13	8.13	5.45	0	6.7	0.4301
01:05	1	0	0	1	0.81	0	0	0.52	*
02:01	15	14	1	30	12.2	25.45	6.25	15.46	0.0441
03:01	8	6	2	16	6.5	10.91	12.5	8.25	0.4987
03:03	0	1	0	1	0	1.82	0	0.52	*
04:01	1	0	0	1	0.81	0	0	0.52	*
04:02	1	0	0	1	0.81	0	0	0.52	*
05:01	7	0	1	8	5.69	0	6.25	4.12	*
05:05	11	1	1	13	8.94	1.82	6.25	6.7	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.6. Relación entre DQA1 y la extensión de la colitis.

Se constata una relación significativa para el alelo DQA1*02:01 (**p-value = 0.0441**), cuya frecuencia relativa en los casos de colitis izquierda ($14/55=25.45\%$) es significativamente superior a la constatada para la colitis extensa ($15/124=12.2\%$) y la proctitis ($1/16=6.25\%$). Este resultado, sin embargo, debe considerarse con precaución, dado que la frecuencia total de DQA1*02:01 es relativamente baja, y porque al corregir mediante la fórmula de Holm-Bonferroni y multiplicarse por el número de alelos estudiados (12), deja de ser una diferencia significativa.

7.2.2 Relación entre DQB1 y la extensión de la CU

■ Ajuste de los datos

La siguiente tabla 7.7 recoge las frecuencias observadas para los alelos DQB1* en función de la extensión de la colitis.

DQB1*	col_ext	col_izq	proctitis	total
02:01	17	9	3	29
02:02	27	17	4	48
03:01	44	9	2	55
03:02	12	7	2	21
03:03	3	2	2	7
04	4	0	1	5
04:02	1	2	0	3
05	11	5	1	17
05:01	3	2	1	6
05:02	0	0	1	1
05:03	1	1	0	2
06	3	4	2	9
06:01	1	0	0	1
06:02	1	2	0	3

Tabla 7.7. Frecuencia de alelos DQB1* en función de la extensión de la CU.

En los casos en los que DQB1* figura sólo con 2 dígitos no se pudieron determinar los 2 dígitos adicionales. Al igual que en el apartado anterior, a la vista de los valores anteriores se ha decidido considerar únicamente DQB1* 04, 05 y 06 con el nivel de 2 dígitos (dado que los casos para los que sólo se conoce 2 dígitos son más numerosos que aquéllos para los que se tienen los 4 dígitos, por lo que no parece lógico repartir los primeros entre los segundos).

■ Estudio de las relaciones

La siguiente tabla recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos de HLA-DQB1*, tras los ajustes mencionados, en función de la extensión de la colitis. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y de la extensión de la colitis. Valores bajos de dicho p-value indican que debe rechazarse la hipótesis de que las frecuencias relativas poblacionales de dicha variante son iguales en los 3 tipos de extensión.

DQB1*	frecuencias absolutas				frecuencias relativas (%)				p-value
	col_ext	col_izq	proctitis	total	Col_ext	col_izq	proctitis	total	
02:01	17	9	3	29	13.28	15	15.79	14.01	0.9253
02:02	27	17	4	48	21.09	28.33	21.05	23.19	0.5337
03:01	44	9	2	55	34.38	15	10.53	26.57	0.0049
03:02	12	7	2	21	9.38	11.67	10.53	10.14	0.8875
03:03	3	2	2	7	2.34	3.33	10.53	3.38	*
04	5	2	1	8	3.91	3.33	5.26	3.86	*
05	15	8	3	26	11.72	13.33	15.79	12.56	0.8626
06	5	6	2	13	3.91	10	10.53	6.28	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.8. Relación entre DQB1 y la extensión de la colitis.

Se comprueba una relación estadísticamente significativa para el alelo DQB1*03:01 (**p-value = 0.0049**), cuya frecuencia relativa en los casos con colitis extensa (34.38%) es significativamente superior a la constatada para colitis izquierda (15%) y proctitis (10.53%), y esta relación se confirma tras la corrección de Holm-Bonferroni, que obtiene una **p de 0.0392**.

7.3. Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y el patrón y la extensión de la ECr

En el siguiente apartado se desarrolla el estudio del patrón o la extensión de la ECr en relación con los diferentes HLA-DQA1* y DQB1*.

7.3.1 Relación entre DQA1 y el patrón de ECr

- Ajuste de los datos

La siguiente tabla (tabla 7.9) recoge las frecuencias observadas para los diferentes alelos de DQA1* en función del patrón de Crohn.

DQA1*	inflamatorio	estenosante	fistulizante
01	9	1	9
01:01	23	10	14
01:02	33	11	21
01:03	11	11	13
01:04	2	1	3
01:05	1	1	2
02:01	43	25	38
03	3	0	4
03:01	17	3	6
03:02	0	1	1
03:03	8	4	4
04:01	7	0	6
04:02	1	0	0
05:01	16	17	22
05:05	23	22	29
06:01	1	0	0

Tabla 7.9. Frecuencia de alelos DQA1* en función del patrón de la ECr.

Para el análisis estadístico se ha decidido operar con HLA- DQA1*01 y 03 a nivel de 2 dígitos y con DQA1*02, 04, 05 y 06 a nivel de 4 dígitos.

■ Estudio de las relaciones

La siguiente tabla (tabla 7.10) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos de DQA1*, tras los ajustes mencionados, en función del patrón del Crohn. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y del patrón del Crohn.

DQA1*	frecuencias absolutas				frecuencias relativas				p-value
	inflam	esten	fistul	Total	inflam	esten	fistul	Total	
01	79	35	62	176	39.90	32.71	36.05	36.90	0.4437
02:01	43	25	38	106	21.72	23.36	22.09	22.22	0.9457
03	28	8	15	51	14.14	7.48	8.72	10.69	0.1150
04:01	7	0	6	13	3.54	0.00	3.49	2.73	*
04:02	1	0	0	1	0.51	0.00	0.00	0.21	*
05:01	16	17	22	55	8.08	15.89	12.79	11.53	0.1018
05:05	23	22	29	74	11.62	20.56	16.86	15.51	0.0996
06:01	1	0	0	1	0.51	0.00	0.00	0.21	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.10. Relación entre DQA1* y el patrón del Crohn.

Inflam: inflamatorio, esten: estenosante, fistula: fistulizante.

En los casos en los que las frecuencias permiten aplicar el test Chi-2, la relación con el patrón de la enfermedad de Crohn no ha resultado significativa.

7.3.2 Relación entre DQB1 y el patrón de CROHN

- Ajuste de los datos

La siguiente tabla (tabla 7.11) recoge las frecuencias observadas para los alelos de DQB1* en función del patrón de Crohn.

DQB1*	inflamatorio	estenosante	fistulizante
02:01	16	17	22
02:02	38	22	32
03	1	1	2
03:01	29	23	29
03:02	18	3	10
03:03	8	6	8
04	7	0	7
04:02	2	0	0
05	31	12	17
05:01	8	3	13
05:02	0	1	0
05:03	1	1	0
06	35	12	31
06:01	2	0	0
06:02	2	5	0
06:03	0	1	0
06:04	0	0	1

Tabla 7.11. Frecuencia de alelos DQB1* en función del patrón de la ECr.

Para el análisis estadístico se ha decidido operar con DQB1*02 y 03 a nivel de 4 dígitos y con DQB1*04, 05 y 06 a nivel de 2 dígitos.

■ Estudio de las relaciones

La siguiente tabla (tabla 7.12) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos de DQB1*, tras los ajustes mencionados, en función del patrón de la enfermedad de Crohn. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y del patrón del Crohn.

DQB1*	frecuencias absolutas				frecuencias relativas				p-value
	inflam	esten	fistul	Total	Inflam	esten	Fistul	Total	
02:01	16	17	22	55	8.12	16.04	12.94	11.63	0.0979
02:02	38	22	32	92	19.29	20.75	18.82	19.45	0.9227
03:01	29	23	29	81	14.72	21.70	17.06	17.12	0.3065
03:02	18	3	10	31	9.14	2.83	5.88	6.55	0.0967
03:03	8	6	8	22	4.06	5.66	4.71	4.65	0.8190
04	9	0	7	16	4.57	0.00	4.12	3.38	0.089*
05	40	17	30	87	20.30	16.04	17.65	18.39	0.6268
06	39	18	32	89	19.80	16.98	18.82	18.82	0.8362

* Número dudoso de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.12. Relación entre los alelos DQB1* y el patrón de la ECr.

Inflam: inflamatorio, esten: estenosante, fístula: fistulizante.

Operando con un riesgo de 1ª especie α del 10%, resultarían significativas las relaciones de HLA-DQB1*02:01, 03:02 y 04 con el patrón de Crohn, lo que implica una tendencia a que el DQB1*02:01 sea menos frecuente en la ECr con patrón inflamatorio, el DQB1*03:02 más frecuente en dicho patrón y el DQB1*04 mucho menos frecuente en pacientes con patrón estenosante, pero sin alcanzar diferencias significativas (con $p < 0.05$) con estos tamaños muestrales.

7.3.3 Relación entre DQA1 y la extensión de ECr

- Ajuste de los datos

La siguiente tabla (tabla 7.13) recoge las frecuencias observadas para los alelos de DQA1* en función de la extensión de la enfermedad de Crohn.

DQA1*	Colon+alto	Colon	Ileon+colon+alto	Ileon+alto	Íleon+colon	Ileon	Total
01	0	1	0	0	12	4	17
01:01	0	8	5	2	24	10	49
01:02	0	7	4	2	24	16	53
01:03	0	0	2	1	13	6	22
01:04	0	0	0	0	4	2	6
01:05	0	2	0	0	0	0	2
02:01	0	4	5	5	21	14	49
03	0	0	0	0	5	0	5
03:01	0	1	0	1	8	0	10
03:02	0	0	0	0	1	0	1
03:03	0	2	0	0	1	1	4
04:01	0	1	0	0	1	1	3
05:01	0	1	1	0	8	4	14
05:05	1	0	3	0	5	2	11

Tabla 7.13. Frecuencia de alelos DQA1* en función de la extensión de la ECr.

Para el análisis estadístico se ha prescindido del único caso de afectación de colon y tracto digestivo alto. También se ha prescindido de los 17 casos de DQA1*01 y los 5 de DQA1*03, para los que no se conocían los 4 dígitos del alelo.

■ Estudio de las relaciones

La siguiente tabla (tabla 7.14) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos de DQA1*, tras los ajustes mencionados, en función de la extensión del Crohn. En la última columna se recoge el p-value asociado el test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y de la extensión del Crohn.

Los reducidos valores de las frecuencias esperadas en las diferentes casillas no permiten aplicar el test Chi-2 en la mayoría de los alelos. En los tres casos (01:01, 01:02 y 02:01) en los que las frecuencias permiten aplicar el mencionado test, la relación con la extensión de Crohn no ha resultado significativa.

DQA1*	frecuencias absolutas						frecuencias relativas						
	co	íl+	Ile+	Ile+	Ile	Total	co	íl+	Ile+alt	Ile+co	Ile	Total	
		co+	alt	col				co+alt		1			
01:01	8	5	2	24	10	49	30.77	25.00	18.18	21.82	17.86	21.97	0.7491
01:02	7	4	2	24	16	53	26.92	20.00	18.18	21.82	28.57	23.77	0.8384
01:03	0	2	1	13	6	22	0.00	10.00	9.09	11.82	10.71	9.87	*
01:04	0	0	0	4	2	6	0.00	0.00	0.00	3.64	3.57	2.69	*
01:05	2	0	0	0	0	2	7.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.90	*
02:01	4	5	5	21	14	49	15.38	25.00	45.45	19.09	25.00	21.97	0.2737
03:01	1	0	1	8	0	10	3.85	0.00	9.09	7.27	0.00	4.48	*
03:02	0	0	0	1	0	1	0.00	0.00	0.00	0.91	0.00	0.45	*
03:03	2	0	0	1	1	4	7.69	0.00	0.00	0.91	1.79	1.79	*
04:01	1	0	0	1	1	3	3.85	0.00	0.00	0.91	1.79	1.35	*
05:01	1	1	0	8	4	14	3.85	5.00	0.00	7.27	7.14	6.28	*
05:05	0	3	0	5	2	10	0.00	15.00	0.00	4.55	3.57	4.48	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.14. Relación entre DQA1* y la extensión del Crohn.

Co: colon, íl: íleon, alt: tracto digestivo alto.

7.3.4 Relación entre DQB1 y la extensión de la enfermedad de Crohn

- Ajuste de los datos

La siguiente tabla (tabla 7.15) recoge las frecuencias observadas para los alelos de DQB1* en función de la extensión de la ECr.

DQB1*	Colon+alto	colon	Íleon+co+alto	Íleon+alto	Íleon+colon	íleon	Total
02:01	0	5	5	2	31	11	54
02:02	0	7	7	6	33	23	76
03	0	0	0	0	1	0	1
03:01	1	8	5	2	24	10	50
03:02	0	3	0	0	13	2	18
03:03	0	0	1	0	7	1	9
04	0	0	1	1	3	2	7
04:02	0	0	0	0	1	1	2
05	0	2	0	0	5	6	13
05:01	0	1	1	0	6	1	9
06	0	1	0	0	3	2	6
06:01	0	0	0	0	0	1	1

Tabla 7.15. Frecuencia de alelos DQB1* en función de la extensión de la ECr.

Para el análisis estadístico se ha prescindido del único caso de extensión de colon junto con tracto digestivo alto y del único caso DQB1*03. Por otra parte con los alelos DQB1*04, 05 y 06 se ha trabajado sólo a nivel de 2 dígitos.

- Estudio de las relaciones

La siguiente tabla recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos de DQB1*, tras los ajustes mencionados, en función de la extensión del Crohn. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la

posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y de la extensión del Crohn.

DQB1*	frecuencias absolutas						frecuencias relativas						p-value
	co	íl+	Ile+alt	Ile+col	Ile	Total	co	íl+	Ile+alt	Ile+col	Ile	Total	
	co+alt						co+alt						
02:01	5	5	2	31	11	54	18.52	25.00	18.18	24.41	18.33	22.04	0.8636
02:02	7	7	6	33	23	76	25.93	35.00	54.55	25.98	38.33	31.02	0.1761
03:01	8	5	2	24	10	49	29.63	25.00	18.18	18.90	16.67	20.00	0.6602
03:02	3	0	0	13	2	18	11.11	0.00	0.00	10.24	3.33	7.35	*
03:03	0	1	0	8	1	10	0.00	5.00	0.00	6.30	1.67	4.08	*
04	0	1	1	4	3	9	0.00	5.00	9.09	3.15	5.00	3.67	*
05	3	1	0	11	7	22	11.11	5.00	0.00	8.66	11.67	8.98	*
06	1	0	0	3	3	7	3.70	0.00	0.00	2.36	5.00	2.86	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.16. Relación entre los alelos DQB1* y la extensión de la ECr.

Co: colon, íl: íleon, alt: tracto digestivo alto.

Los reducidos valores de las frecuencias esperadas en las diferentes casillas no permiten aplicar el test Chi-2 en la mayoría de los alelos. En los tres casos (HLA-DQB1*02:01, 02:02 y 03:01) en los que las frecuencias permiten aplicar el mencionado test, la relación con la extensión de Crohn no ha resultado significativa.

7.4. Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la presencia de complicaciones en la EIIC

En el siguiente apartado se analiza la aparición de complicaciones (absceso intraabdominal, perforación, hemorragia o megacolon) en pacientes con EIIC en función de sus HLA-DQA1* y DQB1*.

7.4.1 Relación entre DQA1 y la presencia de complicaciones

La siguiente tabla (tabla 7.17) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos de DQA1*, en función de la existencia o no de complicaciones. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y la presencia de complicaciones.

DQA1*	Frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	303	34	337	40.45	31.78	39.37	0.0857
02:01	143	25	168	19.09	23.36	19.63	0.2979
03	84	11	95	11.21	10.28	11.10	0.7734
04:01	20	4	24	2.67	3.74	2.80	0.5313
04:02	3	0	3	0.40	0.00	0.35	*
05:01	68	14	82	9.08	13.08	9.58	0.1879
05:05	126	19	145	16.82	17.76	16.94	0.8095
06:01	2	0	2	0.27	0.00	0.23	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.17. Relación entre DQA1* y la presencia de complicaciones.

Pese a las diferencias numéricas observadas en casos como el de los pacientes con HLA-DQA1*01, en los que es menos frecuente la aparición de complicaciones, no alcanza significación estadística ninguno de los alelos DQA1* al relacionarlo con las complicaciones de la EIIC.

7.4.2 Relación entre DQB1 y la presencia de complicaciones

La siguiente tabla (tabla 7.18) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQB1*, en función de la existencia o no de complicaciones. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1 y la presencia de complicaciones.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	69	14	83	9.24	13.08	9.72	0.2089
02:02	119	25	144	15.93	23.36	16.86	0.0547
03:01	138	22	160	18.47	20.56	18.74	0.6049
03:02	60	7	67	8.03	6.54	7.85	0.5919
03:03	28	1	29	3.75	0.93	3.40	0.1329
03:04	1	0	1	0.13	0.00	0.12	*
04	27	4	31	3.61	3.74	3.63	0.9489
05	142	21	163	19.01	19.63	19.09	0.8793
06	163	13	176	21.82	12.15	20.61	0.0207

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.18. Relación entre DQB1* y la presencia de complicaciones.

Se observa que los pacientes con HLA-DQB1*06 tienen menos frecuentemente complicaciones (**p=0.0207**), que NO se confirma al corregir por el número de alelos estudiado (queda una p de 0.1863), y que en los portadores del DQB1*02:02 hay una tendencia a presentar complicaciones más a menudo (p=0.0547).

7.5. Relación entre los alelos DQA1 y DQB1 y la presencia de manifestaciones extraintestinales en la EIIC

A continuación, se desarrollan todos los análisis referentes a las manifestaciones extraintestinales (MEIs) en su conjunto y luego de forma individual. El resumen de los resultados de los siguientes apartados es que las MEIs, en general, son menos frecuentes en pacientes con HLA-DQB1*03:03

($p=0.0169$), que el DQB1*04 es menos frecuente en la artropatía T1 ($p=0.0392$) y que el DQA1*01 es más prevalente en la sacroileitis ($p=0.0504$).

Aparecen tendencias con determinadas MEIs y alelos, que no alcanzan valores de p menores a 0.05, como que el DQB1*05 es el alelo más frecuente en los pacientes con espondilitis ($p=0.0851$), o que el DQA1*05:01 ($p=0.0684$) y el DQB1*02:01 ($p=0.0765$) aparecen más a menudo en pacientes con MEIs oculares que sin ellas.

7.5.1 Relación entre DQA1 y las MEIs

La siguiente tabla (tabla 7.19) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQA1*, en función de la existencia o no de MEIs. En la última columna se recoge el p -value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y las MEIs.

DQA1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	209	139	348	38.35	42.77	40.00	0.1979
02:01	107	61	168	19.63	18.77	19.31	0.7549
03	63	32	95	11.56	9.85	10.92	0.4331
04:01	17	7	24	3.12	2.15	2.76	0.4003
04:02	1	1	2	0.18	0.31	0.23	*
05:01	51	31	82	9.36	9.54	9.43	0.9297
05:05	95	54	149	17.43	16.62	17.13	0.7573
06:01	2	0	2	0.37	0.00	0.23	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.19. Relación entre DQA1 y las manifestaciones extraintestinales

No se observa relación entre la aparición de MEIs y los alelos DQA1*.

7.5.2 Relación entre DQB1 y las MEIs

La siguiente tabla (7.20) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos de DQB1*, en función de la existencia o no de MEIs (de cualquier tipo). En la última columna se recoge el p -value asociado al test Chi-2 para

analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1 y las MEIs.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	52	31	83	9.56	9.54	9.55	0.9921
02:02	87	57	144	15.99	17.54	16.57	0.5532
03:01	103	61	164	18.93	18.77	18.87	0.9522
03:02	44	23	67	8.09	7.08	7.71	0.5887
03:03	25	5	30	4.60	1.54	3.45	0.0169
03:04	1	0	1	0.18	0.00	0.12	*
04	21	9	30	3.86	2.77	3.45	0.3940
05	102	70	172	18.75	21.54	19.79	0.3182
06	109	69	178	20.04	21.23	20.48	0.673

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.20. Relación entre DQB1 y las manifestaciones extraintestinales.

Los resultados iniciales apuntan que las MEIs son menos frecuentes en pacientes con HLA DQB1*03:03 (**p=0.0169**), pero, tras corrección por alelos, pierde significación estadística ($p=0.1521$), quizás por un tamaño muestral insuficiente. Tampoco se observan diferencias significativas en los demás alelos.

7.5.3 Relación entre DQA1 y la artropatía periférica

La siguiente tabla (tabla 7.21) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos de DQA1*, en función de la existencia o no de artropatía periférica. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y la artropatía periférica.

DQA1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	188	85	273	39.00	42.08	39.91	0.4538
02:01	93	44	137	19.29	21.78	20.03	0.4584
03	56	18	74	11.62	8.91	10.82	0.2984
04:01	15	2	17	3.11	0.99	2.49	0.1039
04:02	2	0	2	0.41	0.00	0.29	*
05:01	41	20	61	8.51	9.90	8.92	0.5593
05:05	85	33	118	17.63	16.34	17.25	0.6818
06:01	2	0	2	0.41	0.00	0.29	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.21. Relación entre DQA1* y la artropatía periférica.

No se observa una relación significativa entre la artropatía periférica y la presencia de los alelos DQA1*.

7.5.4 Relación entre DQB1 y la artropatía periférica

La siguiente tabla (tabla 7.22) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQB1*, en función de la existencia o no de artropatía periférica. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y la artropatía periférica.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	42	20	62	8.73	9.90	9.08	0.6274
02:02	78	41	119	16.22	20.30	17.42	0.1994
03:01	92	34	126	19.13	16.83	18.45	0.4803
03:02	39	15	54	8.11	7.43	7.91	0.7629
03:03	19	4	23	3.95	1.98	3.37	0.1928
03:04	1	0	1	0.21	0.00	0.15	*
04	20	3	23	4.16	1.49	3.37	0.0772
05	97	40	137	20.17	19.80	20.06	0.9136
06	93	45	138	19.33	22.28	20.20	0.3821

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.22. Relación entre DQB1* y la artropatía periférica.

La artropatía periférica se observa menos frecuentemente en pacientes con DQB1*04, sin llegar a tratarse de diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0772$).

7.5.5 Relación entre DQA1 y la artropatía T1

La siguiente tabla (tabla 7.23) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos de DQA1*, en función de la existencia o no de artropatía T1. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y la artropatía T1.

DQA1*	frecuencias absolutas			Frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	203	60	263	39.19	41.67	39.73	0.5910
02:01	103	31	134	19.88	21.53	20.24	0.6641
03	61	12	73	11.78	8.33	11.03	0.2433
04:01	16	1	17	3.09	0.69	2.57	0.1081
04:02	2	0	2	0.39	0.00	0.30	*
05:01	45	14	59	8.69	9.72	8.91	0.6998
05:05	86	26	112	16.60	18.06	16.92	0.6807
06:01	2	0	2	0.39	0.00	0.30	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.23. Relación entre DQA1* y la artropatía T1.

No hay ningún alelo DQA1* en el que se observe relación positiva o negativa con la artropatía T1.

7.5.6 Relación entre DQB1 y la artropatía T1

La siguiente tabla (tabla 7.24) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQB1*, en función de la existencia o no de artropatía T1. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y la artropatía T1.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	46	14	60	8.90	9.72	9.08	0.7606
02:02	88	28	116	17.02	19.44	17.55	0.4990
03:01	93	27	120	17.99	18.75	18.15	0.8339
03:02	43	10	53	8.32	6.94	8.02	0.5916
03:03	19	4	23	3.68	2.78	3.48	0.6033
03:04	1	0	1	0.19	0.00	0.15	*
04	22	1	23	4.26	0.69	3.48	0.0392
05	104	28	132	20.12	19.44	19.97	0.8585
06	101	32	133	19.54	22.22	20.12	0.4770

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.24. Relación entre DQB1 y la artropatía T1.

La tendencia a que los pacientes con DQB1*04 presenten menos frecuentemente artropatía periférica, se comprueba al estudiar exclusivamente la artropatía T1 (**p=0.0392**), perdiendo significación con el test de Holm-Bonferroni ($p=0.3528$), lo que podría deberse a un “n” insuficiente para determinar esa relación.

7.5.7 Relación entre DQA1 y la artropatía T2

La siguiente tabla (tabla 7.25) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos DQA1*, en función de la existencia o no de artropatía T2. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y la artropatía T2.

DQA1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	213	25	238	38.45	43.10	38.89	0.4889
02:01	108	13	121	19.49	22.41	19.77	0.5953
03	62	6	68	11.19	10.34	11.11	0.8453
04:01	16	1	17	2.89	1.72	2.78	0.6078
04:02	2	0	2	0.36	0.00	0.33	*
05:01	49	6	55	8.84	10.34	8.99	0.7039
05:05	102	7	109	18.41	12.07	17.81	0.2297
06:01	2	0	2	0.36	0.00	0.33	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.25. Relación entre DQA1 y la artropatía T2

No hay diferencias significativas al valorar la presencia o no de artropatía T2 con los alelos DQA1*.

7.5.8 Relación entre DQB1 y la artropatía T2

La siguiente tabla (tabla7.26) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQB1*, en función de la existencia o no de artropatía T2. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1 y la artropatía T2.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	50	6	56	9.04	10.34	9.17	0.7435
02:02	92	13	105	16.64	22.41	17.18	0.2672
03:01	110	7	117	19.89	12.07	19.15	0.1497
03:02	43	5	48	7.78	8.62	7.86	0.8200
03:03	21	0	21	3.80	0.00	3.44	0.1310
03:04	1	0	1	0.18	0.00	0.16	*
04	21	2	23	3.80	3.45	3.76	0.8943
05	110	12	122	19.89	20.69	19.97	0.8850
06	105	13	118	18.99	22.41	19.31	0.5294

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.26. Relación entre DQB1* y la artropatía T2

No hay diferencias significativas al valorar la presencia o no de artropatía T2 con los alelos DQB1*.

7.5.9 Relación entre DQA1 y la espondilitis

La siguiente tabla (tabla 7.27) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQA1*, en función de la existencia o no de espondilitis. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y la espondilitis.

DQA1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	241	8	249	39.00	50.00	39.27	0.3736
02:01	126	3	129	20.39	18.75	20.35	0.8723
03	66	2	68	10.68	12.50	10.73	0.8163
04:01	15	1	16	2.43	6.25	2.52	0.3358
04:02	2	0	2	0.32	0.00	0.32	*
05:01	56	1	57	9.06	6.25	8.99	0.6979
05:05	110	1	111	17.80	6.25	17.51	0.2301
06:01	2	0	2	0.32	0.00	0.32	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.27. Relación entre DQA1* y la espondilitis.

No hay diferencias significativas al valorar la presencia o no de espondilitis con los alelos DQA1.

7.5.10 Relación entre DQB1 y la espondilitis

La siguiente tabla (tabla 7.28) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQB1*, en función de la existencia o no de espondilitis. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y la espondilitis

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	57	1	58	9.24	6.25	9.16	0.6825
02:02	110	3	113	17.83	18.75	17.85	0.9243
03:01	118	1	119	19.12	6.25	18.80	0.1931
03:02	46	2	48	7.46	12.50	7.58	0.4517
03:03	21	0	21	3.40	0.00	3.32	0.4530
03:04	1	0	1	0.16	0.00	0.16	*
04	21	1	22	3.40	6.25	3.48	0.5394
05	123	6	129	19.94	37.50	20.38	0.0851
06	120	2	122	19.45	12.50	19.27	0.4866

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.28. Relación entre DQB1* y la espondilitis.

El DQB1*05 es el grupo alélico más frecuente en los pacientes con espondilitis, pero sin alcanzar significación al compararlo con los pacientes que no tienen espondilitis ($p=0.0851$).

7.5.11 Relación entre DQA1 y la sacroileitis

La siguiente tabla (tabla 7.29) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos DQA1*, en función de la existencia o no de sacroileitis. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1* y la sacroileitis.

DQA1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	103	8	111	38.43	66.67	39.64	0.0504
02:01	65	2	67	24.25	16.67	23.93	0.5467
03	27	2	29	10.07	16.67	10.36	0.4634
04:01	4	0	4	1.49	0.00	1.43	*
05:01	30	0	30	11.19	0.00	10.71	0.2200
05:05	39	0	39	14.55	0.00	13.93	0.1543

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.29. Relación entre DQA1 y la sacroileitis.

El grupo alélico DQA1* más prevalente en pacientes con sacroileitis es el DQA1*01, presentando diferencias significativas al compararlo con los pacientes sin sacroileitis ($p=0.0504$), que se pierde al aplicar la corrección de Holm-Bonferroni ($p=0.3$).

7.5.12 Relación entre DQB1 y la sacroileitis

La siguiente tabla (tabla 7.30) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos de DQB1, en función de la existencia o no de sacroileitis. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1* y la sacroileitis.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	30	0	30	11.11	0.00	10.64	0.2219
02:02	56	2	58	20.74	16.67	20.57	0.7326
03:01	43	0	43	15.93	0.00	15.25	0.1332
03:02	16	2	18	5.93	16.67	6.38	0.1364
03:03	13	0	13	4.81	0.00	4.61	0.4364
03:04	1	0	1	0.37	0.00	0.35	*
04	6	0	6	2.22	0.00	2.13	*
05	52	4	56	19.26	33.33	19.86	0.2318
06	53	4	57	19.63	33.33	20.21	0.2474

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.30. Relación entre DQB1* y la sacroileitis.

No hay diferencias significativas al analizar los alelos DQB1 de los pacientes con y sin sacroileitis.

7.5.13 Relación entre DQA1 y las MEIs cutáneas

La siguiente tabla (tabla 7.31) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos DQA1, en función de la existencia o no de MEIs cutáneas. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1 y las complicaciones cutáneas.

DQA1*	frecuencias absolutas			Frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	30	0	30	11.11	0.00	10.64	0.2219
02:01	56	2	58	20.74	16.67	20.57	0.7326
03	43	0	43	15.93	0.00	15.25	0.1332
04:01	16	2	18	5.93	16.67	6.38	0.1364
04:02	3	0	3	4.81	0.00	4.61	0.4364
05:01	1	0	1	0.37	0.00	0.35	*
05:05	6	0	6	2.22	0.00	2.13	*
06:01	52	4	56	19.26	33.33	19.86	0.2318

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.31. Relación entre DQA1* y las MEIs cutáneas.

Las MEIs cutáneas no se relacionan con ningún alelo HLA-DQA1.

7.5.14 Relación entre DQB1 y las MEIs cutáneas

La siguiente tabla (tabla 7.32) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los diferentes alelos de DQB1, en función de la existencia o no de MEIs cutáneas. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1 y las MEIs cutáneas.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	53	7	60	9.00	13.46	9.36	0.2895
02:02	104	10	114	17.66	19.23	17.78	0.7760
03:01	112	7	119	19.02	13.46	18.56	0.3235
03:02	48	1	49	8.15	1.92	7.64	0.1053
03:03	20	1	21	3.40	1.92	3.28	0.5675
03:04	1	0	1	0.17	0.00	0.16	*
04	21	1	22	3.57	1.92	3.43	0.5329
05	117	14	131	19.86	26.92	20.44	0.2263
06	113	11	124	19.19	21.15	19.34	0.7304

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.32. Relación entre DQB1* y las MEIs cutáneas.

Las MEIs cutáneas tampoco se relacionan con ningún alelo HLA-DQB1, en nuestra población de pacientes con EIIC.

7.5.15 Relación entre DQA1 y las MEIs oculares

La siguiente tabla (tabla 7.33) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos DQA1, en función de la existencia o no de MEIs oculares. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQA1 y las MEIs oculares.

DQA1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
01	237	12	249	39.37	35.29	39.15	0.6358
02:01	125	4	129	20.76	11.76	20.28	0.2042
03	64	6	70	10.63	17.65	11.01	0.2035
04:01	16	0	16	2.66	0.00	2.52	0.3357
04:02	1	1	2	0.17	2.94	0.31	*
05:01	51	6	57	8.47	17.65	8.96	0.0684
05:05	106	5	111	17.61	14.71	17.45	0.6645
06:01	2	0	2	0.33	0.00	0.31	*

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.33. Relación entre DQA1* y las MEIs oculares.

Se observa una tendencia a una mayor prevalencia relativa de DQA1*05:01 en pacientes con MEIs oculares respecto de los que carecen de ellas ($p=0.0684$), sin alcanzar significación estadística.

7.5.16 Relación entre DQB1 Y las MEIS oculares

La siguiente tabla (tabla 7.34) recoge las frecuencias absolutas y relativas de los alelos de DQB1, en función de la existencia o no de MEIs oculares. En la última columna se recoge el p-value asociado al test Chi-2 para analizar la posible independencia entre la variante considerada de DQB1 y las complicaciones oculares.

DQB1*	frecuencias absolutas			frecuencias relativas			p-value
	NO	SI	Total	NO	SI	Total	
02:01	52	6	58	8.65	17.65	9.13	0.0765
02:02	109	4	113	18.14	11.76	17.80	0.3446
03:01	112	7	119	18.64	20.59	18.74	0.7765
03:02	47	3	50	7.82	8.82	7.87	0.8327
03:03	21	0	21	3.49	0.00	3.31	0.2677
03:04	1	0	1	0.17	0.00	0.16	*
04	20	2	22	3.33	5.88	3.46	0.4281
05	121	7	128	20.13	20.59	20.16	0.9487
06	118	5	123	19.63	14.71	19.37	0.4793

* Número insuficiente de valores para realizar el test Chi-2

Tabla 7.34. Relación entre DQB1* y las MEIs oculares.

El alelo DQB1*02:01 también es proporcionalmente más frecuente en pacientes con MEIs oculares que sin ellas, aunque sin ser significativa la diferencia ($p=0.0765$).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La enfermedad celíaca (EC) y la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EIIC) son enfermedades frecuentes, inflamatorias, sistémicas y crónicas, con el intestino como órgano diana, que aparecen sobre todo en gente joven. Su etiología multifactorial se caracteriza por la interacción del ambiente y de la genética, con una respuesta inmune aberrante.

Como hemos visto previamente, algunos autores consideran que los pacientes con EIIC, enfermedad de Crohn (1) -ECr- y colitis ulcerosa -CU- (2), son un grupo de riesgo de presentar EC. Casi todos los estudios previos al 2010, han observado una mayor frecuencia de desarrollo de EIIC en pacientes celíacos y sus familiares (15-17), y de celiaquía en EIIC (12,18,19). Se ha observado que la EIIC es de 5 a 10 veces más frecuente en los pacientes celíacos que en la población general (20-22), aunque al revés (la celiaquía en pacientes con EIIC) no está tan claro el aumento de riesgo. Algún estudio ha observado que, aunque en su población sí que es más frecuente la EIIC en pacientes celíacos, no ocurre lo mismo al investigar la prevalencia de celiaquía en pacientes con EIIC (22), siendo la prevalencia de EC similar a la de la población general.

Los estudios que analizan la relación epidemiológica entre la EC y la EIIC, y que incluyen mayor número de sujetos, son los de Masachs, Leeds y Casella (19,22,113). No obstante, ninguno de ellos ha determinado la prevalencia de HLA DQ2/DQ8 en pacientes con EIIC, aunque en el artículo de Leeds apuntan que puede no ser más frecuente que en la población general (22). Tan sólo un artículo reciente calcula el HLA-EC en pacientes con EIIC, siendo el "n" demasiado bajo (36 pacientes) para sacar conclusiones a nivel poblacional (23).

Como vimos en la introducción de esta tesis, en el estudio de Masachs y colaboradores, se investiga, mediante la realización de encuestas, si hay mayor número de enfermos de Crohn entre los pacientes con EC y sus familiares,

observándose que la ECr es hasta 8 veces más frecuente en pacientes celíacos que en la población general (19).

Leeds y cols también obtienen un mayor riesgo de EIIC en pacientes con EC, pero no al revés. Utilizando los autoanticuerpos antigliadina, antitransglutaminasa y antiendomiso, y el estudio endoscópico alto, para la EC, y bajo (íleocolonoscopia), para la EIIC (354 pacientes con EIIC, 305 con EC y 601 controles), obtuvieron un riesgo relativo de EIIC en el grupo de celíacos de 9.98 (y de 4.99 tras excluir las colitis microscópicas), pero una prevalencia de EC en pacientes con EIIC similar al del grupo control (0.85% vs 0.83%). No encontraron ningún enfermo de Crohn entre sus pacientes celíacos, correspondiendo el alto riesgo a la colitis ulcerosa. En la discusión del artículo, Leeds busca una explicación a dicha diferencia sugiriendo que, dado que es necesario tener el HLA-DQ2 o -DQ8 para presentar la EC, el aumento de la permeabilidad en la EIIC, con la mayor presentación de gliadina, puede no ser suficiente para desencadenar una EC, dejando entrever que los pacientes con EIIC pueden no tener HLA-DQ2 o -DQ8 (22).

Casella y cols, con el grupo de trabajo italiano de EIIC, estudian la prevalencia de celiaquía en 1711 pacientes con EIIC, utilizando la serología celíaca y el estudio endoscópico e histológico en los que presentan autoanticuerpos en sangre. Obtienen una prevalencia de EC de tan sólo el 0.5%, correspondiendo a seis pacientes con CU y 3 con ECr. Concluyen que, aunque hay estudios genéticos a favor de una relación entre la EIIC y la EC, la prevalencia de EC en EIIC es baja, menor que la dada para la población general (113).

Los estudios genéticos amplios también ofrecen resultados contradictorios, habiéndose observado que la EC y la EIIC comparten genes alterados (48,114,115).

De los estudios sobre los alelos relacionados con la EIIC (120), cabría deducir que los haplotipos fundamentales de la celiaquía son menos frecuentes en la EIIC: el DR4-DQ8 en la CU y el DR3-DQ2 en la ECr, pero no hay prevalencias de los mismos. Con esto, nos encontramos ante un solapamiento de genes no-HLA entre la EIIC y la EC y la duda de si hay una ausencia de relación de la EIIC con

los genes HLA asociados a la EC, y si ésta podría justificar que la prevalencia de EC no sea mayor en pacientes con EIIC en algunos estudios.

En nuestro estudio, no se objetivan diferencias significativas, aunque se observa una tendencia a que el HLA-EC -relacionado con la celiaquía- sea menos frecuente en pacientes con EIIC (34% *versus* el 39% de la población control), sobre todo al comparar las mujeres con EIIC y las controles, y la CU con la población control. Esta reducción de la prevalencia, va en sintonía con los hallazgos del grupo de EIIC Italiano, que valora la expresión de la celiaquía en la EIIC, no el HLA.

En nuestra población con EIIC, la menor prevalencia de HLA de riesgo de celiaquía parece estar en relación con una menor frecuencia de HLA-DQ2.5, sobre todo en pacientes con CU, y del HLA-DQ8, fundamentalmente en pacientes con ECr.

A continuación, se discuten los matices de los resultados fundamentales de esta tesis: que el HLA de la celiaquía no es más frecuente en la EIIC, que el HLA-DQ2 y HLA-DQ8 son menos frecuentes en la CU y en la ECr, respectivamente, que el HLA-DQ2.5 es, concretamente, menos frecuente en pacientes con CU, sobre todo mujeres, en los que actúa como factor protector, el HLA-DQ2.2 es significativamente más prevalente en la ECr, y que los alelos del HLA ayudan a diferenciar entre enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa y población sana.

A) Descripción de la muestra:

Para la consecución de este estudio, se ha dispuesto de una muestra amplia (1034 sujetos), de los cuales 457 eran pacientes con EIIC. Sin poder competir con la muestra de 1711 pacientes del grupo italiano (113), que no utiliza grupo control, nuestro estudio es de los que dispone de mayor número de sujetos para estudiar el vínculo entre la EIIC y la EC, y, actualmente, el único que calcula la prevalencia de

HLA de riesgo de celiaquía (positivo) en la población con EIIC, con un tamaño muestral relevante.

De esta forma, en nuestro estudio se ha dispuesto de una muestra con 457 individuos con EII, resultando un valor estimado de P (prevalencia) igual a 0.34. El error máximo cometido en la estimación (ϵ), correspondiente a la probabilidad 0.05 de superar dicho error es:

$$\epsilon = 1.96 \sqrt{\frac{0.34(1-0.34)}{457}} = 0.043$$

Así pues, con los 457 pacientes de nuestro estudio, para una prevalencia del 34% en la población general tenemos un nivel de confianza del 95% de que el error máximo sea 0.043 puntos porcentuales (4.3%).

El haber recogido los casos sistemáticamente y de forma prospectiva, ha conllevado el tener menos mujeres (40% de la muestra) que hombres, lo que, teniendo en cuenta la proporción 2:1 de la celiaquía, de mujeres respecto de los hombres, (47,131) podría haber supuesto una infravaloración de la proporción de HLA-EC. No obstante, puesto que la proporción de mujeres es inferior en los controles (38%) que en los casos (44%), es sobre todo en la población control en la que podemos pensar que se podría estar infravalorando la prevalencia de HLA-EC. Como hemos visto en los resultados, el HLA-EC es menos frecuente en el grupo de pacientes, en los que la proporción de mujeres es mayor (sobre todo en los enfermos de Crohn, cuya proporción de mujeres es del 49%), por lo que de haber un sesgo por existir menos mujeres en el estudio, sería a favor de enmascarar mayores diferencias aún entre casos y controles. Dicho de otra forma, puesto que la impronta paterna (47) es responsable de una mayor frecuencia de HLA de riesgo de celiaquía en mujeres de la población general (reflejado en nuestro estudio pero sin diferencias significativas globales), la menor proporción de mujeres en la población control podría suponer una frecuencia del HLA de riesgo de EC menor de la esperada en dicha población y, por tanto, menor diferencia entre los casos positivos (156) respecto de los controles positivos (227),

y, probablemente, suponga enmascarar una p aún menor de la que obtenemos en nuestro estudio, que es de 0.0852.

Esta, y otras “ p ” mayores de 0.05, pueden ser relevantes y, aunque con la cautela de no ser una p muy baja, deben ser tenidas en cuenta como marcadores de tendencias o incluso de posibles indicadores de diferencias en muestras de mayor tamaño. En esta línea escribe Prieto en su libro (132):

“En realidad, la utilización de unos valores límites o “críticos” para el P-value (como el 5% o el 1%), que separan los resultados “significativos” de los “no significativos” no es más que un anacronismo, reflejo de épocas en las que el cálculo exacto de estos P-values se hallaba fuera del alcance del investigador, que sólo podía hacerse una idea al respecto comparando los valores por él obtenidos con los reflejados en unas tablas que generalmente se limitaban a estos dos niveles.

Es el p-value, por tanto, lo que refleja el grado de evidencia de unos resultados contra la hipótesis nula y, en consecuencia, lo que debería acompañar al análisis de dichos resultados, y no la constatación de si resulta superior o inferior al 5%. ¿Qué diferencia hay, en la práctica, entre un p-value del 4.9% o del 5.1%?

En el campo de la investigación científica, el que unos resultados no lleguen a ser significativos estadísticamente (entendido ello de la forma habitual, como que el p-value sea superior al 5%) no significa necesariamente que no merezcan ser publicados, obviamente con las matizaciones pertinentes, especialmente si los efectos constatados van en el sentido que cabría esperar por las hipótesis de trabajo avanzadas en la investigación. Es posible que la no significación se deba sólo a un número insuficiente de datos, originado a veces por el elevado coste de estos estudios, pero que estos resultados, acumulados con otros obtenidos por otros equipos que trabajan sobre el tema, permitan llegar a la comunidad científica a conclusiones estadísticamente significativas sobre el tema”

Al analizar la muestra global (casos+controles), no se observan diferencias en la prevalencia de HLA-EC entre hombres y mujeres, que sí que son relevantes al comparar casos con controles y analizar la influencia de los dos tipos de EII individualmente.

En nuestro estudio, al comparar las mujeres control y caso, se observa que el HLA-EC es menos frecuente en las pacientes ($p=0.0565$), comprobando que la

presencia de HLA-EC reduce la prevalencia de EIIC en nueve puntos porcentuales, al pasarla del 43% de los controles al 34% de las pacientes. Es probable que, si la proporción de mujeres control hubiese sido mayor (por lo menos igual que la de los casos, 44%), las diferencias al comparar exclusivamente mujeres, hubieran sido aún más marcadas.

El grupo control del estudio de HLA, se trata de población sana, de la Comunidad Valenciana, con menor prevalencia de mujeres, hecho que puede ocurrir al coger un grupo al azar, y que supone, quizás, encontrar menos diferencias de las que cabría esperar a la luz de nuestros resultados sobre los haplotipos de riesgo de celiaquía, si se tratase de un estudio con mayor proporción de mujeres. No obstante, la prevalencia global de HLA-EC en controles es similar a la registrada en otras poblaciones generales.

El fenotipo de nuestra muestra de pacientes está descrito según los criterios de la clasificación de Montreal (108), que son los de más reciente aprobación y que son de fácil aplicación.

La localización y el patrón de comportamiento de la enfermedad de los pacientes con enfermedad de Crohn de nuestro estudio es algo distinto al descrito en la literatura, ya que un 51.2% de los casos tienen enfermedad íleo-cólica (frente al 40% descrito (107)) y un 41% un patrón estenosante (frente al 13% dado por Cosnes et al., y el 23-37% publicado por Freeman y cols (133,134)). A la hora de comparar los pacientes con un patrón fistulizante, hay que tener en cuenta el año de la publicación porque, previamente a la estandarización de los criterios de Montreal, se utilizaban los de Vienna, que incluían la enfermedad perianal fistulizante en el patrón fistulizante-penetrante luminal (108), lo que elevaba ostensiblemente el número de pacientes con patrón fistulizante (antes llamado penetrante), y quizás reducía el de estenosantes, como ocurre en el estudio de Cosnes *et al.* La enfermedad estenosante o fistulizante supone un 65% de la muestra, en sintonía con el 60% de Cosnes y cols. La mayor frecuencia de los patrones más graves y la enfermedad extensa probablemente esté en relación con que el estudio se ha realizado en un hospital de referencia, con una Consulta

de EIIC desde el 2007 y una larga historia de control de pacientes de EIIC en consultas de Digestivo, de tal forma que se remiten los casos más difíciles de controlar a nuestras consultas y de que los pacientes con EIIC se supervisan de por vida.

La extensión de la CU de nuestros pacientes también difiere de la habitual, en la que es más frecuente la proctitis y menos la colitis extensa. Farmer y cols (135), por ejemplo, observan proctitis en el 46.2% de los enfermos, frente al 9.2% de nuestra población con CU, y colitis extensas en el 36.7% de los casos, que dista mucho del 61.8% de colitis extensas de nuestra población.

La prevalencia de las manifestaciones extraintestinales (MEIs) de los pacientes con EIIC de nuestro estudio (37%) es similar a la descrita por otros autores (10-50%) (109). Como ocurre en nuestro estudio, la MEI más frecuentemente descrita en pacientes con EIIC es la artropatía periférica (0.5-35% vs 29% de nuestros pacientes), con un predominio de artropatía tipo 1, como es nuestro caso (22% T1 vs 9% de T2). Las prevalencias son tan dispares sobre todo porque los criterios utilizados para catalogar la MEI de artropatía periférica también lo son. De hecho, estrictamente hablando, la artropatía comporta un edema de la articulación, además del dolor, para ser etiquetado de artritis, no exclusivamente dolor articular (artralgia), como se ha observado en nuestros registros y en otros muchos, en los que se obtienen altas prevalencias de artropatía periférica. Por tanto, nuestros pacientes tienen una alta prevalencia de *artralgias*, en relación con su enfermedad, pero no tanto de artritis, cuya prevalencia es considerablemente menor.

La prevalencia de la mayor parte de las MEIs en nuestros pacientes es similar a la descrita por otros grupos, únicamente llamando la atención que ninguno de los tres casos de pioderma gangrenoso se dio en pacientes con CU (que es lo típico), y que tan sólo uno de nuestros pacientes tiene colangitis esclerosante (CEP), cuya incidencia en la literatura es baja (1.5-4%), pero superior a la nuestra (0.3%) (109). Estudios pormenorizados deberán determinar si se debe a un infradiagnóstico o a una reducción real de la aparición de CEP en los pacientes con EIIC de nuestra área.

Del grupo control del estudio de HLA, se habló previamente, comentándose que únicamente se conoce que se trata de población sana, de la Comunidad Valenciana, habiéndose puntualizado la menor prevalencia de mujeres, que puede ocurrir al coger un grupo al azar, y que supone, quizás, encontrar menos diferencias de las que cabría esperar a la luz de nuestros resultados sobre los haplotipos de riesgo de celiaquía, si se tratase de un estudio con mayor proporción de mujeres. No obstante, la prevalencia global de HLA-EC en controles, como se ha mencionado, es similar a la registrada en otras poblaciones generales.

B) Análisis de genes HLA:

1. Frecuencia de HLA positivo (HLA-EC):

La hipótesis de la tesis de que *los genes HLA-DQ2 y -DQ8, asociados a la enfermedad celíaca, no son más frecuentes en la EIIC que en la población general*, es correcta, a la luz de nuestros resultados.

Como se comentó en los primeros párrafos de la discusión, hay una tendencia a que la prevalencia de HLA-DQ2.5 y -DQ8 (HLA-EC) sea menos frecuente en los casos con EIIC que en los controles (34 vs 39%, $p=0.0852$), más marcada al comparar exclusivamente las mujeres con EIIC con las mujeres sanas (34 vs 43%, $p=0.0565$). Siendo conservador con los datos expuestos, lo que se puede concluir es que la prevalencia de HLA-EC no es mayor en población con EIIC, pero, a lo que apunta esa tendencia es a una menor prevalencia del HLA-EC en pacientes con EIIC. Así pues, alcanzado el primer objetivo de la tesis, podemos resumir que **la prevalencia de HLA-EC en pacientes con EIIC es del 34%, y que no hay diferencias significativas con la prevalencia del grupo control (39%), un grupo amplio de población sana de la Comunidad Valenciana.**

A diferencia de la uniformidad obtenida para el aumento de prevalencia de EIIC en pacientes con EC (16,136), hay controversia de si ocurre lo contrario. Como se expuso previamente, Leeds *et al* observan una prevalencia de celiaquía en pacientes con EIIC, similar a la población general (22), que iría en consonancia con nuestros hallazgos al evaluar la prevalencia de HLA-EC, y Casella y cols encuentran una menor prevalencia de celiaquía en pacientes con EIIC (113), en la línea de la tendencia de nuestros pacientes, sobre todo de las mujeres.

No obstante, hay que destacar, que en el estudio del grupo italiano del año 2013 (Casella et al.) no se comparan los resultados con una población control, sino con cifras publicadas de prevalencia de celiaquía, del 1-2%. Esto puede sesgar la conclusión de que el 0.5% de prevalencia de celiaquía en sus pacientes con EIIC es menor que la de la población general, ya que no disponen de la prevalencia real en población sana en el conjunto de sus centros. De hecho, obtienen una prevalencia de celiaquía en EIIC de 1/200, lo que es similar a la prevalencia de la población general, adulta, española (4-7,27). Leeds sí que utiliza población control, hallando una prevalencia de celiaquía en el 0.83% de los pacientes y el 0.85% de los controles, sin diferencias significativas.

En 2013, DiGiacomo y cols, publican un estudio en el que analizan el HLA-DQ2 y -DQ8 en diferentes patologías gastrointestinales, entre las que figura la EIIC. Tan sólo analizan 36 pacientes con EII, por lo que no es posible extrapolar los resultados, aunque son similares a los reflejados en esta tesis. Obtienen que la prevalencia de HLA-EC en sus pacientes con EIIC es de 38.9% (14/36) y no obtienen diferencias significativas al compararla con la publicada previamente por Megiorni de 39% en la población general italiana (23).

Si juntamos los hallazgos de esta tesis, de una prevalencia igual o menor de HLA-EC en población con EIIC, con los de la ausencia de mayor prevalencia de aparición de la EC en pacientes con EIIC en los estudios previamente descritos, podemos afirmar que la EC no es más frecuente en la EIIC y que, en parte, es porque el HLA-EC no es más prevalente en dicha población (como sugería Leeds en su estudio, basándose en publicaciones previas sobre alelos sueltos), a diferencia de lo que se sospechaba hace unos años. Y es que, aunque ambas

enfermedades suponen una inflamación crónica del intestino, con aumento de permeabilidad y una inmunidad aberrante y excesiva, su diferente base genética probablemente suponga una interacción diferente con el ambiente. Esto queda reflejado en los resultados del -DQ2.5 y -DQ8 aislados, que muestran que la presencia de los haplotipos de la celiacía, pueden incluso conferir protección frente al desarrollo de la EIIC.

2. Frecuencia de HLA-EC según el tipo de EIIC y el sexo:

En los estudios de la relación de alelos HLA con enfermedades, como vimos en la introducción de la tesis, el haplotipo HLA-DR4-DQ8 (86,120,137) parece menos frecuente en la CU y el DR3-DQ2 (portador de HLA-DQ2.5) en ECr (120), que globalmente coincide con la tendencia de nuestros pacientes a una menor frecuencia de HLA-EC que los controles, pero que, al analizar por tipo de EIIC es lo opuesto de lo que se observa en nuestra población enferma, en la que es menos frecuente el HLA-DQ2.5 en CU y HLA-DQ8 en la ECr.

Parece encontrarse una distribución similar en el estudio de Caruso *et al*, realizado en 1985, en 41 pacientes sicilianos con CU, en el que se observa una menor prevalencia de HLA-DR3, pero con un valor p que no alcanza significación (138), y en el de De la Concha *et al* (139), realizado en 1997 sobre 107 pacientes madrileños con CU, en los que observaba también una menor prevalencia de HLA-DRB1*03 ($p=0.002$) y HLA-DQB1*02 ($p=0.001$). En el estudio de Satsangi *et al*, se observa una menor prevalencia del HLA-DRB1*03-DQB1*02:01 en mujeres con CU ($p=0.037$) (140). Gómez-García *et al* realizan un amplio estudio en pacientes con CU de Madrid y Granada, y confirman el efecto protector (menor prevalencia del mismo) del HLA-DRB1*03 y, en menor grado del HLA-DRB1*04, en dicha población (141), haciendo mención al estudio de Heresbach *et al* ya que estos también encuentran una menor frecuencia de DRB1*03 en pacientes franceses. Gómez-García y cols sugieren que puede haber un papel protector del DRB1*03 frente a la CU, en las personas caucásicas originarias del Mediterráneo. En una carta al editor, Heresbach *et al* sugieren que la presencia o ausencia de

DRB1*03 puede determinar que aparezca una u otra patología autoinmune (Ej. Celiacía o EIIC), e incluso especula sobre que la presencia/ausencia de HLA-DRB1*03 pueda servir para orientar la etiología de las colitis (142).

Como el DRB1*03 va habitualmente ligado al DQ2, sería interesante conocer la prevalencia del DQ2 en la población española con EIIC, para ver si, al igual que el DRB1*03, está disminuido y por tanto actúa también como factor protector. Si efectivamente los heterodímeros DQ2.5 *cis* y *trans* estuviesen disminuidos en la población con EIIC, orientaría a que, atendiendo exclusivamente a la genética, cuando hay una EIIC, no suele haber una celiacía, apoyando los hallazgos de Casella *et al* (113).

Salvo estudios puntuales como el del japonés Yoshitake y cols (143), la mayor parte de los trabajos valoran alelos sueltos, sin tener en cuenta los haplotipos completos (DRB1-DQA1-DQB1...). Y como es evidente en los estudios génicos, el polimorfismo alélico es variable según la población, dificultando la comparación entre, por ejemplo, el HLA de un paciente con EIIC japonés, de uno español.

Como se comentó previamente, a excepción del reciente trabajo de DiGiacomo y cols (n=36) (23), no hemos encontrado ningún estudio en la literatura en el que se estudien concretamente los heterodímeros (DQ α +DQ β) relacionados con la celiacía (no únicamente alelos) en pacientes con EIIC, ni en el que se obtenga una prevalencia de los mismos en la EIIC, además de que la mayor parte de estudios de HLA en EIIC no diferencian por sexos. Dado el alto valor predictivo negativo del HLA en la celiacía, la menor prevalencia de los mismos, iría a favor de una menor prevalencia real de celiacía en EIIC. Esta menor prevalencia de HLA-EC que no es posible garantizar al analizar todos los casos juntos sin diferenciar por EIIC ni por sexo (p=0.085), va perfilándose al analizar hombres y mujeres por separado, llegando a la conclusión de que, en mujeres las diferencias van alcanzando significación (p=0.056), obteniéndose en las pacientes con EIIC un riesgo relativo de EC de 0.68, y obteniéndose una fracción preventiva del 14%.

La mayor parte de la literatura en relación con si la enfermedad celíaca es más frecuente en la CU o en la ECr, coincide en que es más frecuente en la CU

(22,113,144). En contraposición, encontramos precisamente un estudio español de Masachs *et al.*, uno de los pocos estudios que relaciona más la ECr que la CU con la EC (19).

En nuestra población, y concretando los resultados correspondientes al segundo objetivo de la tesis, se observa una **menor prevalencia de HLA-EC en pacientes con CU (32%), que en los que tienen ECr (36%) y en los controles (39%)**, con diferencias llamativas al comparar la CU con los controles ($p=0.0571$), de forma que, la presencia de HLA-EC, confiere un 11% de protección frente al desarrollo de la CU.

Porcentualmente, **esta diferencia de prevalencia global es aún más evidente al analizar mujeres exclusivamente**, obteniendo una frecuencia del 31% en la CU, 36% en la ECr y 43% en controles, aunque al ser un “n” más reducido, la p sale ligeramente menos significativa ($p=0.0613$). Sin embargo, al analizar los efectos del HLA-EC sobre la prevalencia de la CU y la ECr, en relación con el sexo, no se observan diferencias significativas ($p=0.644$).

La reducción porcentual del HLA-EC en mujeres, se justifica fundamentalmente por la menor prevalencia del heterodímero HLA-DQ2.5*cis* (el más frecuente en pacientes celíacos). La frecuencia de HLA-DQ2.5*cis* en mujeres con EIIC es sólo un 63% de la constatada para las mujeres del grupo control ($p=0.0593$). Del análisis de este subapartado (HLA-DQ2.5*cis* en mujeres con EIIC), se obtiene una FP del 9%, lo que significa que el 9% de los factores que pueden contribuir a proteger frente al desarrollo de una EIIC, los confiere el HLA-DQ2.5*cis*, en mujeres. Para ahondar en si todas estas tendencias a que el HLA-EC sea un factor protector de EIIC, llegan a ser estadísticamente significativas, se analizó la interacción del sexo, con el tipo de EIIC, en la frecuencia de HLA-EC.

Así pues, al analizar si la reducción de la frecuencia se asocia a una u otra EIIC, se observa que en las mujeres con colitis ulcerosa, la frecuencia de DQ2.5*cis* se reduce más del 50%, dado que se multiplica por 0.459 (p -value asociado = 0.0344). Esta reducción del riesgo de HLA-DQ2.5*cis* en la CU, no sólo se observa en mujeres, considerando conjuntamente ambos sexos, la presencia de DQ2.5*cis*

reduce significativamente la prevalencia de colitis ulcerosa, siendo la frecuencia de DQ2.5*cis* de un 20.28% en los controles frente a un 13.53% en pacientes con CU ($p=0.0319$). En esta línea, se obtiene una FP del 7%, indicando que el 7% de los factores que pueden proteger frente al desarrollo de una CU, los confiere el tener el HLA-DQ2.5*cis*. Como es lógico por todos los resultados de menor frecuencia de HLA-DQ2.5*cis* en mujeres, con RR inferiores a la unidad, la FP en las mujeres con HLA-DQ2.5*cis* aumenta hasta el 13%.

El análisis global del HLA-DQ2.5 (sin diferenciar por tipo de EIIC), incluyendo el haplotipo -DQ2.5 *cis* y *trans*, indica que el riesgo de HLA-DQ2.5 total en mujeres con EIIC es sólo un 69% del constatado para las mujeres del grupo control, pero, en este caso, la p no es significativa ($p\text{-value} = 0.1124$).

Al separar por tipo de EIIC, y en consonancia con lo hallado exclusivamente para el HLA-DQ2.5*cis*, considerando conjuntamente ambos sexos, la frecuencia de -DQ2.5 (*cis* y *trans*) se reduce considerablemente de un 23.74% en los controles a un 16.43% ($p=0.0287$) en la CU. Asimismo, en la CU se reduce casi en un 50% la frecuencia de DQ2.5total en mujeres, dado que multiplica dicho riesgo por 0.513 ($p=0.0466$), lo que conlleva una FP también del 13% y, por tanto, implica que, ser mujer con HLA-DQ2.5*cis* confiere un 13% de protección frente al desarrollo de una CU.

El HLA-DQ8 también es menos frecuente en los pacientes con EIIC que en los controles. El 13.13% de los pacientes (60 pacientes) con EIIC lo presenta, frente al 17.50% de los controles (101 controles), con una p de 0.0540. La FP del HLA-DQ8 en la EII es de 0.048, lo que significa que tener HLA-DQ8 confiere un 5% de protección frente al desarrollo de EIIC.

Como con variables previas, el HLA-DQ8 en mujeres con EIIC es un 65% del constatado para las mujeres del grupo control, pero sin diferencias significativas ($p\text{-value} = 0.1138$). Donde sí se observan importantes diferencias es en la valoración por separado de ECr y CU, en la que se pone de manifiesto que el HLA-DQ8 es menos frecuente en la ECr. Analizando la frecuencia de HLA-DQ8 en todos los pacientes con ECr (ambos sexos), se observa que tan sólo el 11.20% (28

pacientes) presentan el HLA-DQ8, a diferencia del 17.50% (101 personas) de los controles ($p=0.0217$). La FP del HLA-DQ8 en la ECr es del 7%, con lo que, **la contribución conferida por el HLA-DQ8 como protección al desarrollo de la enfermedad de Crohn es del 7%.**

Al diferenciar por sexos, observamos una significativa reducción de la frecuencia del HLA-DQ8 en mujeres, tanto con ECr como con CU, pero, en hombres, esta diferencia se presenta únicamente si tienen ECr y no si padecen CU, reduciéndose la frecuencia de HLA-DQ8 al 51% si son enfermos de Crohn. Por tanto, si diferenciamos por sexos y tenemos en cuenta exclusivamente el grupo de mujeres, en la CU también se reduce la frecuencia de HLA-DQ8, que algunos estudios apuntan incluso como factor protector (86).

Resumiendo el apartado de haplotipos de EC, en nuestra población, la tendencia a la reducción del HLA de riesgo de celiaquía en pacientes con EIIC, se debe fundamentalmente a una disminución significativa en el número de pacientes con CU con HLA-DQ2.5, y de enfermos de Crohn con HLA-DQ8. Las fracciones preventivas que oscilan entre el 5 y el 14%, sugieren que los haplotipos relacionados con la celiaquía, protegen frente al desarrollo de la EIIC de forma global, y, concretamente, el HLA-DQ2.5 frente a la aparición de CU y el HLA-DQ8 frente al inicio del Crohn. Estas fracciones preventivas bajas, se explican porque la ECr y la CU son enfermedades multifactoriales, que incluyen muchos fenotipos, y en las que, salvo excepciones (ej. Familias con genes concretos alterados como el de la IL-10), interaccionan varios factores para que se produzca la enfermedad.

Dado que el HLA-DQ2.5 es el más frecuente y el más estrechamente relacionado con la celiaquía, nuestros resultados pueden hacer pensar que el riesgo de celiaquía es menor en pacientes con EIIC y, por tanto, también lo será su expresión. Convendría realizar estudios amplios con biopsias duodenales de pacientes españoles con EIIC para comprobar si, al igual que se observa en el estudio italiano de Casella y cols (113), la prevalencia de EC en la EIIC es menor que en la población general. A juzgar por nuestros resultados de una menor frecuencia de HLA-DQ2.5 en la CU, es posible que nuestra población tenga una

distribución diferente a la de estudios como el de Casella *et al*, en el que la prevalencia de EC era mayor en CU que en ECr, pero en consonancia con el estudio de Masachs (19), todo ello dicho y tomado con la cautela que brindan los estudios genéticos en una enfermedad multifactorial como la celiacía.

Como vimos en la Introducción de esta tesis, el papel del dímero HLA-DQ2.2, codificado por el haplotipo DQA1*02:01+DQB1*02:02, es controvertido en lo referente a su contribución a la predisposición a celiacía. Hay una mayoría de detractores del papel de predisposición a la EC del HLA-DQ2.2 (40), incluso alguno sugiere que pueda tratarse de un factor protector (37), pero también hay algún autor que observa que claramente predispone a la EC (42).

En el metanálisis de Stokkers y cols, se observa una asociación positiva del HLA-DRB1*07 en pacientes con ECr(120), gen que habitualmente va estrechamente ligado al haplotipo HLA-DQA1*02:01+DQB1*02:02. En el estudio italiano de Lombardi y cols de 2001, también observan que el haplotipo DRB1*07-DQB1*0202 era el más frecuente en su población (145). La frecuencia de HLA-DR7 en la población europea con ECr es elevada (86,146,147), oscilando entre el 5 y 29%, a diferencia de la japonesa, en la que sólo se encuentra en el 1% de los enfermos (86).

En nuestro estudio, se observa que la frecuencia de HLA-DQ2.2 se incrementa en un 73% en los pacientes con enfermedad de Crohn (Odds Ratio=1.73139, p= 0.001). El riesgo relativo de ECr en pacientes con HLA-DQ2.2 es de 1.75, lo que hace que se calcule la fracción etiológica (15%) que tener este dímero supone para la aparición de ECr. Así pues, la contribución conferida por el HLA-DQ2.2 como factor de riesgo al desarrollo de ECr es del 15%.

El 31% de los hombres y el 37% de las mujeres con ECr, tienen el HLA-DQ2.2, mientras que tan sólo el 26 y 24% de los hombres con CU y controles, respectivamente, y el 20 y 21% de las mujeres con CU y controles lo presentan. El efecto de mayor frecuencia del HLA-DQ2.2 en la ECr es más marcado en mujeres que en hombres (p=0.0171), al comparar los enfermos de Crohn con los de colitis

ulcerosa o los controles, pero, comparando directamente hombres y mujeres con ECr, no se observan diferencias significativas en la prevalencia.

Al igual que en otros estudios europeos, como el español de Fernández *et al*, (148) en los que el HLA-DRB1*07 se encuentra en una elevada proporción de enfermos de Crohn con afectación ileal, en nuestra población con EIIC hay una elevada frecuencia de HLA-DQ2.2 entre los pacientes con enfermedad de Crohn de localización ileal (35.5% de los enfermos con Crohn ileal tienen el HLA-DQ2.2).

La aparición de este haplotipo como factor de riesgo para el desarrollo de la ECr, plantea varias cuestiones a resolver en estudios futuros: ¿el -DQ2.2 es un factor de riesgo de ECr pero no de EC? ¿Puede ser muy indicativo de un fenotipo concreto de ECr, si lográsemos subdividir adecuadamente? ¿Es más prevalente en familias que tienen algún enfermo de Crohn?

La debilidad de las asociaciones entre los haplotipos y la protección o el riesgo de desarrollo de la EIIC que confieren los haplotipos significativos, puede deberse a múltiples factores. En primer lugar, que se trate de enfermedades de etiología multifactorial (con varios genes y factores ambientales), hecho frecuentemente comentado al estudiar la EIIC, y, en segundo lugar, que haya una heterogeneidad de la enfermedad no reconocida (149), o, quizás, que se trate de genes de susceptibilidad de baja penetrancia genética. Es probable, que tanto la ECr (sobre todo) como la CU, se puedan subclasificar, como se intenta con las clasificaciones fenotípicas (ej. La de Montreal), y que la predisposición genética varíe entre los subgrupos, de forma que haya algún subgrupo muy relacionado con genes HLA, por ejemplo, y otro no. Si además existe un componente de similitud del epitopo con determinados antígenos externos (ej. Gérmenes), las diferencias genéticas entre subgrupos, pueden ser determinantes en la interacción gen-ambiente, tan mencionada en la EIIC.

3. *Expresión de diferentes alelos según se trate de enfermos con ECr, con CU o controles sanos:*

Hay un creciente interés por encontrar marcadores serológicos y moleculares que diferencien la ECr de la CU (86), que, hasta el momento no se han encontrado consistentemente en el HLA. Ambas EIICs comparten algunos alelos HLA en los estudios genéticos, lo cual podría ser una de las explicaciones de la mayor frecuencia de ambas enfermedades en una misma familia y, por ejemplo, la localización colónica del Crohn con DRB1*01:03 y B*52, que también son frecuentes en la CU. Dado que hay ostensibles diferencias en el mapa del HLA de las diferentes razas y grupos de poblaciones, para obtener respuestas certeras sobre la agrupación o no de alelos, se aconseja estudiar poblaciones homogéneas (86), del mismo grupo racial y étnico. De la misma forma, para evitar los errores del estudio de múltiples comparaciones en la misma población, el análisis estadístico de los estudios de HLA sugiere el uso de correcciones (149), como la de Holm-Bonferroni, de forma que lo que se acepta como significativo, lo sea realmente y no debido al azar. Estas restricciones, conllevan el riesgo de no aceptar como significativas asociaciones que sí lo sean, pero, quizás por tamaño muestral insuficiente, no alcancen niveles de significación en el estudio.

En nuestro estudio, realizado sobre una población homogénea de caucásicos de origen Valenciano, al analizar los alelos de los 1034 casos, sí que encontramos grandes diferencias que se plasman en los gráficos de factores observando una agrupación de alelos diferente en función de si se trata de ECr, CU o controles.

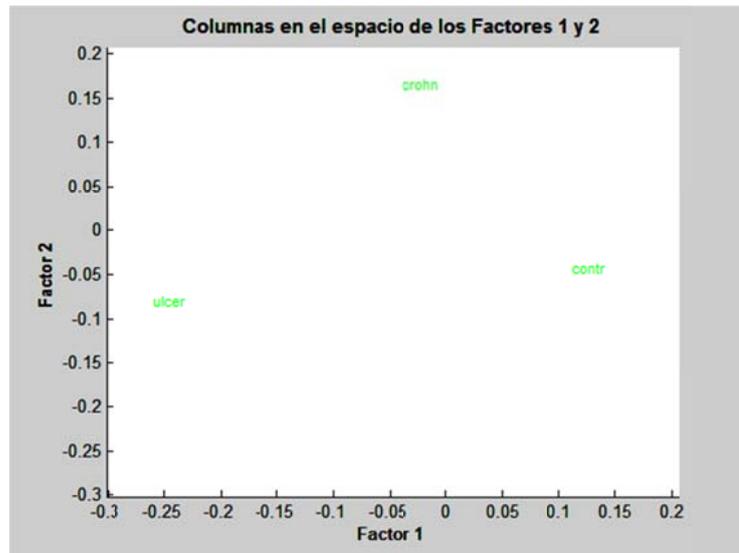


Figura 3.1. Representación de la distribución de los grupos (Ecr, CU controles) según los alelos DQA1 más frecuentemente hallados en cada grupo.

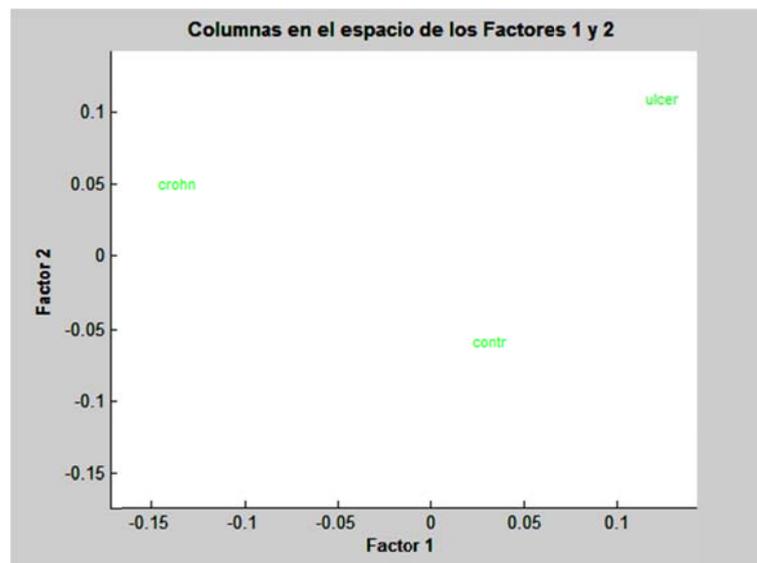


Figura 3.2. Agrupación alélica que diferencia la ECr, CU y los controles, según sus alelos DQB1.

La técnica utilizada para determinar el tipaje HLA (PCR-rSSO) ha sido de intermedia resolución, lo que ha conllevado que algunos casos se describan como grupos génicos (utilizando una nomenclatura de dos dígitos), y otros como alelos específicos (nomenclatura de cuatro dígitos) (40). Esto nos ha obligado a prescindir de algún caso suelto (como un DQA1*05 y un DQB1*02) y de reagrupar otros tantos en la misma proporción en la que están los demás (por ejemplo, los 11

DQA1*03 obtenidos se han distribuido proporcionalmente entre el DQA1*03:01, *03:02 y *03:03). Prescindir de tantos casos (34 DQA1*01 y 11 DQA1*03), habría conllevado un sesgo. Dicho sesgo se disminuye al redistribuirlos en función de las proporciones alélicas de nuestra muestra, porque, todos ellos, correspondían a HLA de pacientes con EIIC no de controles.

Al analizar la frecuencia de los alelos DQA1 en la ECr y la CU, se observa que, en la ECr, los alelos más frecuentes, en orden de frecuencia de mayor a menor, son: el DQA1*02:01 (supone el 22% de los alelos DQA1 de la ECr), *05:05 (16%), *01:02 (15%), *01:01 (12%) y *05:01 (11%). En la CU, los alelos más frecuentes son: DQA1*05:05 (18%), *02:01 (17%), *01:02 (15%), *01:01 (12%) y *01:03 (11%).

La diferencia de la CU respecto de los controles, se debe a una mayor frecuencia relativa de DQA1*04:02 (aunque el n es muy bajo), *01:04 y *01:03 y una menor frecuencia relativa de DQA1*03:02, *05:01, *05:03 y *01:05, mientras que, la diferencia de los pacientes con ECr respecto al resto se debe fundamentalmente a una mayor frecuencia relativa de DQA1*02:01 y a una menor frecuencia relativa de 01:04 y 05:03. Algunos alelos diferencian claramente a un grupo de otro, pese a ser poco frecuentes (Ej. DQA1*04:02) porque hay grandes diferencias entre grupos, como por ejemplo con el HLA-DQA1*01:04, que aparece en el 5.13% de los pacientes con CU y tan sólo en el 1.60% de los ECr.

En la CU, son inicialmente significativas la mayor frecuencia de DQA1*01:03 y *01:04 ($p=0.0547$ y $p=0.0024$, respectivamente) y la menor frecuencia de aparición del DQA1*05:01 ($p=0.0237$). De cara a nuestro análisis prioritario de la frecuencia del HLA de riesgo de celiaquía en la EIIC, la disminución del DQA1*05:01 en la CU, es lo más llamativo, ya que, como hemos visto en varias ocasiones, forma parte del haplotipo característico de la celiaquía, pero, tras la corrección de Holm-Bonferroni, deja de ser una reducción estadísticamente significativa, quedando únicamente como significativo el aumento de DQA1*01:04 en la CU ($p=0.036$). Esto, podría deberse a un tamaño muestral insuficiente para determinar estas diferencias, ya que el estudio se diseñó para confirmar o rechazar la hipótesis, y diferenciar entre la prevalencia global de HLA-EC en casos y controles. Puesto que

el “n” final ha resultado grande, nos permite diferenciar entre tipos de EII y por sexo, pero, al subanalizar por alelos sueltos, aunque se trate de uno de los estudios de HLA de mayor tamaño muestral en la EIIC, puede ser suficiente para resaltar las asociaciones más significativas en nuestra población con EIIC, pero no para todas las relevantes. Para ello, serían necesarios estudios específicos posteriores que buscasen la relación alelo-tipo de EIIC o fenotipo.

En la ECr, acorde con resultados previamente discutidos, el DQA1*02:01 es más frecuente en la ECr ($p=0.0028$), alelo que codifica la región α del dímero HLA-DQ2.2, aumentado en nuestra población con ECr. La asociación entre ECr y DQA1*02:01, se mantiene tras el test de Holm-Bonferroni, con una $p=0.0392$, lo que cuadra con la observación de que el HLA-DQ2.2 es más frecuente en la ECr y que tener el mismo aumenta el riesgo de padecer una ECr.

El alelo DQA1*03:02, que es más frecuente en los controles que en la EIIC, apareciendo en 2 ECr y ningún enfermo con CU, pierde significación al corregirse la p (pasa de un $p=0.0185$, a una $p=0.2405$ con el Holm-Bonferroni).

Para el DQB1, la distribución de los alelos en la EIIC es la siguiente: en la ECr, DQB1*02:02 (19%, bastante más frecuente en la ECr que en la CU y controles, $p=0.08$, corregida), *05 (19%), *03:01 (18%), *06 (18%) y *02:01 (11%), mientras que en la CU, el orden es *06 (22%), *05 (20%), *03:01 (20%), *02:02 (14%) y *02:01 (7%).

En los gráficos de factores (figuras 3.1 y 3.2 de la discusión y figuras 7.1 a 7.6 del apartado 7 de Resultados), se observa que la ECr y la CU difieren entre sí y de los controles. La diferencia de los enfermos de Crohn respecto de la CU y los controles, se debe fundamentalmente a una mayor frecuencia relativa de DQB1*02:02 (que era de esperar por presentar una mayor prevalencia de HLA-DQ2.2, es decir, de HLA-DQB1*02:02-DQA1*02:01) y DQB1*03:03, y una menor frecuencia relativa de DQB1*03:02 y *06. Nuestros resultados van en la línea con los hallados en el grupo de pacientes franceses afectados de ECr de Danzé *et al.*, en los que se observó una mayor prevalencia de HLA-DRB1*07 (estrechamente ligado al DQB1*02:02 y DQB1*03:03) y menor de HLA-DQB1*06:02 y *06:03 (146).

La colitis ulcerosa se diferencia sobre todo de los controles y, en menor grado, del Crohn, porque presenta una menor frecuencia relativa de DQB1*02:01 (lo que también concuerda con los resultados previamente expuestos de una menor frecuencia de HLA-DQ2.5) y, en menor grado, a una mayor frecuencia relativa de DQB1*02:02 y *05.

El estudio de Yoshitake *et al*, mencionado previamente, es un buen ejemplo de estudio con población homogénea, en el que también se observan diferencias entre la CU y la ECr, pero al ser japonés, los resultados no son los mismos que los que obtenemos en nuestro estudio. Presentan algún dato similar, como la mayor frecuencia de HLA-DQA1*01:03 y menor de DQA1*03:02, en la CU (143), pero los demás alelos con los que encuentran una relación positiva o negativa, difieren de los hallados en nuestra población.

Trachtenberg y cols. (150), analizando los alelos DRB1, DQB1 y DQA1 de una población caucásica americana, y diferenciando entre judíos Ashkenazi con EIIC, caucásicos no judíos con EIIC y población control, encuentran relación entre la EIIC y un haplotipo formado por DQA1*05:05–DQB1*03:01 y DQA1*01:01–DQB1*05:01. Ninguno de los alelos incluidos en estos haplotipos se ha mostrado más prevalente en nuestra población. Asimismo, encuentran el haplotipo DRB1*04:04–DQA1*03:01–DQB1*04:02 en 10 sujetos, 8 pacientes con EIIC (7 ECr y 1 CU) y 2 controles. En un estudio de Nakajima (151), sobre una muestra de 90 pacientes y 336 controles japoneses, también se observa una asociación positiva de la EIIC con el alelo DQB1*04:02. Encuentran otras asociaciones, que no se confirman en nuestra población, quizás por la variabilidad genética. Estos estudios reflejan lo dicho, los estudios HLA requieren realizarse en una población homogénea y no son extrapolables de una etnia a otra, de ahí la importancia de este proyecto, no sólo para cumplir los objetivos principales, que lo distinguen de otros estudios (determinar la prevalencia de HLA-EC en la EIIC, por subtipos de EIIC y en relación con el sexo, comparándola con población control), sino para dar una idea de los alelos más prevalentes en nuestra población con EIIC y de su relación con determinados fenotipos.

En nuestro estudio, el DQB1*04:02 se halló en 7 pacientes con EIIC (2 ECr y 5 CU) y en ningún control, aunque posteriormente no se analiza su significación porque es necesario reagrupar los DQB1*04 en dos dígitos. Quizás, en un segundo estudio con todos los alelos determinados con PCR de alta resolución, se pueda observar si hay diferencias significativas en la frecuencia de este alelo.

El resultado más relevante del estudio de los alelos en la EIIC, es la comprobación de que la ECr y la CU presentan alelos HLA diferentes, que apoya la corriente que considera que son entidades francamente distintas, aunque se traten de forma similar en la actualidad, por no disponer de un diagnóstico y tratamiento etiológico.

4. Relación entre los alelos y la expresión fenotípica de la EIIC:

Estudiamos también la relación de los alelos con la extensión de la EIIC, el patrón de la ECr, las complicaciones y las manifestaciones extraintestinales (MEIs).

Heresbach y De la Concha (139,142) encuentran que el HLA-DQB1*02 es menos frecuente en pacientes con EIIC más extensa, dándolo incluso como factor protector, contrastando con el estudio de Satsangi *et al* que observa una mayor frecuencia de HLA-DRB1*03-DQB1*02 en pacientes con CU extensa (140). Heresbach *et al* (año 1996, Francia) observan que el HLA-DRB1*03:01-DQB1*02:01 es menos frecuente en pacientes con ECr que toman azatioprina y en pacientes con CU sometidos a cirugía (142). Un año más tarde, en España, De la Concha *et al* encuentran una menor frecuencia de aparición del HLA-DQB1*02 en pacientes con pancolitis ulcerosa (139). Contrastando con esto, como mencionamos, está el estudio británico de Satsangi *et al* que observan una menor prevalencia del HLA-DRB1*03-DQB1*02 en mujeres con CU distal, siendo más frecuente en CUs extensas (140).

Nosotros observamos una menor frecuencia de HLA-DQB1*02:01 en la EIIC, a expensas de la CU, pero una mayor frecuencia de aparición del HLA-DQB1*02:02, por la mayor prevalencia de dicho alelo en la ECr. Estos datos van a favor de lo

expuesto previamente, de una frecuencia menor de HLA-DQ2.5_{cis} en la CU y mayor de HLA-DQ2.2 en pacientes con ECr.

En la revisión de Ahmad *et al* (80), se comenta la observación de que el haplotipo DRB1*04:01-DQB1*03:01 tiene un papel protector en la CU, cosa que nosotros no observamos. De hecho, lo que plasma nuestro estudio es que, en nuestra población con CU, el HLA-DQB1*03:01 se relaciona con el fenotipo de colitis extensa ($p=0.0049$, p corregida de 0.0392). De los 55 pacientes con CU con HLA-DQB1*03:01, 44 tienen una colitis extensa. Aunque en los pacientes con CU de nuestro estudio, es más frecuente la colitis extensa de por sí, lo que a priori podría inducir a error, se comparan las frecuencias relativas de los distintos fenotipos, suponiendo este alelo el 35% de los alelos de HLA en pacientes con colitis extensa, pero tan sólo el 15% de las izquierdas y el 11% de las proctitis.

En nuestra muestra, se observa una relación entre el HLA-DQA1*02:01 y la extensión de la CU, cuya frecuencia relativa en los casos de colitis izquierda (25.45%) es superior a la constatada para la colitis extensa (12.2%) y la proctitis (6.25%), pero que pierde significado estadístico al corregir la p mediante el Holm-Bonferroni, pasando de tener un p -value de 0.0441 a 0.5292.

En nuestra población, no encontramos diferencias significativas, con $p<0.05$, al analizar los alelos en relación con el patrón y la extensión de la ECr.

En cuanto a las complicaciones, se observa que los pacientes con DQB1*06 tienen menos frecuentemente complicaciones y que los portadores del DQB1*02:02, más. Estas relaciones dejan de ser estadísticamente significativas al aplicar la corrección de Holm-Bonferroni. Teniendo en cuenta que 46 de los 54 pacientes con complicaciones (hemorragia, megacolon, perforación o absceso intraabdominal), son enfermos de Crohn, y que, en estos, es más frecuente el HLA-DQB1*02:02 y menos el HLA-DQB1*06, los alelos asociados con las complicaciones, pueden serlo por estar relacionados positiva o negativamente, respectivamente, con la ECr.

Determinados genes de susceptibilidad en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (HLA, cromosoma 6) parecen ligados al desarrollo de

manifestaciones extraintestinales. En la enfermedad de Crohn, la comorbilidad extraintestinal es más frecuente en pacientes con HLA-A*02, HLA-DRB1*01 y HLA-DQB1*05, mientras que en la colitis ulcerosa los alelos HLA-DRB1*01:03, HLA-B*27 y HLA-B*58 están relacionados con manifestaciones articulares, cutáneas y oculares (109). Entre el 50 y 80% de los pacientes con EIIC con espondilitis anquilosante son positivos para el HLA-B*27. Además, el haplotipo HLA-B*08-DRB1*03 se asocia con colangitis esclerosante primaria y otras enfermedades autoinmunes en pacientes con colitis ulcerosa (109). En nuestro grupo, no sólo es menos frecuente el HLA-DQB1*02 (que suele ir ligado al DRB1*03), sino que no hay ningún paciente con colangitis esclerosante.

Las MEIs son menos frecuentes en pacientes con HLA-DQB1*03:03. Al analizar específicamente los distintos tipos de MEIs, se observa una tendencia a que los portadores del HLA-DQB1*04 tengan artropatía periférica menos a menudo. Esta tendencia parece confirmarse al analizar la artropatía T1, pauciarticular, en la que tan sólo 1 de los 23 pacientes portadores del DQB1*04, presenta artropatía tipo 1. Tras la corrección para comparaciones múltiples, ninguna MEI muestra asociación significativa con los alelos HLA.

La única otra relación de una MEI con un alelo cuya significación alcanza un valor inicial menor que 0.05 es el DQA1*01, más frecuente en pacientes con sacroileitis, significación que se pierde con el test de Holm-Bonferroni.

El DQB1*05 es el alelo más frecuente en los pacientes con espondilitis, pero sin alcanzar significación al compararlo con los pacientes que no tienen espondilitis. Se observa también una tendencia a una mayor prevalencia relativa de DQA1*05:01 y DQB1*02:01 en pacientes con MEIs oculares respecto de los que carecen de ellas. Hay que tener en cuenta que, dado que el “n” de cada MEI es muy reducido, los valores “p” pueden salir diferentes a lo que serían realmente, con una muestra suficientemente grande.

Como en la gran mayoría de los escasos estudios publicados sobre la relación del HLA-DQ con las MEIs de la EIIC, los resultados, significativos o no, hay que tomárselos con cautela, porque la tipificación de las MEIs (sobre todo las articulares) no siempre es adecuada, mezclándose la literatura, por ejemplo, de

artralgias y artritis. Además, como en casi todos los estudios, incluyendo alguno tan bien detallado como el de Orchard *et al* (152), el “n” es insuficiente para obtener conclusiones determinantes.

Hacen falta estudios con mayor número de pacientes, con MEIs, para confirmar el efecto protector del HLA-DQB1*03:03 (menos MEIs en portadores del mismo) y del HLA-DQB1*04 (menos artropatía tipo 1), y la relación positiva (de riesgo) del HLA-DQA1*01 con la sacroileítis, y quizás confirmar o descartar los que muestran una tendencia sin llegar a ser significativos en nuestro estudio.

Numerosos loci han sido asociados tanto con EIIC como con la celiacía (por ejemplo los cercanos a la *IL2* e *IL21* (chr4q21) y la *IL18RAP*) (153), pero, a juzgar por nuestros resultados, el HLA-DQ no suele coincidir. ¿Esto hará que si determinadas regiones génicas cercanas están afectas (Ej. la del TNF localizada en la región III del HLA), se tienda a presentar una u otra enfermedad?

Adentrándonos en la era “post-genómica”(80), según algunos autores, el siguiente paso es, no sólo ver la interacción de la genética con el ambiente, sino también la interacción de los genes entre sí, como ya han hecho algunos investigadores españoles analizando la interacción del CD209 con el HLA-DRB1*03 de algunas CU (154).

Si la celiacía es menos frecuente en pacientes con EIIC, estamos empezando a ver lo contrario de lo que se exponía en las revisiones (8) cuando iniciamos esta tesis, que añadían la EII como predisponente de la EC. Con los estudios de expresión varias veces expuestos en esta tesis, y que han sido publicados durante la realización de la misma, y los resultados genéticos presentados aquí, podemos confirmar que la enfermedad celíaca no es más frecuente en la EIIC, y que probablemente sea incluso menos prevalente.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones se agrupan, a continuación, siguiendo el esquema planteado por los objetivos de la tesis. En ellas, la más relevante, es la que acepta la hipótesis de la tesis como cierta, que el HLA-EC no es más frecuente en pacientes con EIIC que en la población general.

1. Frecuencia de HLA de riesgo de celiacía (HLA-EC):

- 1) Las moléculas HLA-DQ2 y -DQ8, asociadas a la enfermedad celíaca, no son más frecuentes en la EIIC que en la población general.
- 2) La frecuencia de HLA de riesgo de celiacía (HLA-DQ2.5*cis* y *trans*, y HLA-DQ8) en pacientes con EIIC es del 34%, con una tendencia a ser menor pero sin mostrar diferencias significativas al compararla con la de los sujetos sanos (frecuencia de 39% de HLA-EC en sujetos sanos caucásicos de la Comunidad Valenciana).

2. Frecuencia de HLA-EC según el tipo de EIIC y el sexo:

- 1) Al comparar exclusivamente las mujeres con EIIC con las mujeres sanas, se observa una tendencia a que existan mayores diferencias entre las frecuencias de HLA-EC (34% en pacientes con EIIC vs 43% en mujeres sanas), hasta el punto de que la presencia del HLA-EC actúa como factor protector del desarrollo de una EIIC en mujeres (RR=0.68 y FP=14%).
- 2) Teniendo en cuenta el HLA-EC global (incluyendo -DQ2 y -DQ8), se observa una menor frecuencia del mismo en pacientes con CU (32%), que

en los que tienen ECr (36%) y en los controles (39%), con diferencias llamativas, pero no estadísticamente significativas, al comparar la CU con los controles. Se pone de manifiesto que la presencia de HLA-EC confiere un 11% de protección frente al desarrollo de la CU.

- 3) El HLA-EC tiende a ser menos frecuente en CU fundamentalmente porque el HLA-DQ2.5*cis* es mucho menos frecuente en dicha patología (FP=7%), de forma más evidente en mujeres con CU. Teniendo en cuenta también el HLA-DQ2.5*trans*, se mantiene la reducción en la frecuencia, pudiendo considerarse el HLA-DQ2.5 como factor protector.

Se ha observado que, en las mujeres con colitis ulcerosa, la frecuencia de DQ2.5*cis* se reduce más del 50% (dado que multiplica dicho riesgo por 0.459 - factor de protección-), con resultados similares al analizar conjuntamente con el HLA-DQ2.5*trans*. Los datos obtenidos indican que ser mujer con HLA-DQ2.5 (*cis* y *trans*) confiere un 13% de protección frente al desarrollo de una CU.

- 4) El HLA-EC tiende a ser menos frecuente en EIIC, no sólo por la menor frecuencia de HLA-DQ2.5, sino también por la del HLA-DQ8, que es significativamente menos frecuente en pacientes de ambos sexos con ECr y en mujeres con CU, pudiendo también valorarse como factor protector, sobre todo en la ECr. Se observa que la contribución conferida por el HLA-DQ8 como protección al desarrollo de la enfermedad de Crohn es del 7%.
- 5) El HLA-DQ2.2 es un factor de riesgo de la ECr. Se ha observado que la frecuencia de HLA-DQ2.2 se incrementa en un 73% en los pacientes con ECr de nuestra zona. El riesgo relativo de ECr en pacientes con HLA-DQ2.2 es de 1.75 y la fracción etiológica conferida por el HLA-DQ2.2 como factor de riesgo al desarrollo de ECr es del 15%.

3. *Expresión de diferentes alelos según se trate de enfermos con ECr, con CU o controles sanos:*

La distribución de los alelos DQA1/DQB1 difiere según se trate de un sujeto sano (control), con ECr o con CU. Las diferencias relativas entre unos y otros, en sujetos caucásicos de nuestra área, son las siguientes:

- La ECr tiene una mayor frecuencia relativa de HLA-DQA1*02:01 (diferencia significativa), DQB1*02:02 y DQB1*03:03, y menor de DQA1*01:04, DQA1*05:03, DQB1*03:02 y DQB1*06.
- La CU presenta una mayor frecuencia relativa de HLA-DQA1*01:03, DQA1*01:04 (esta última con diferencias significativas), DQB1*02:02 y DQB1*05, y menor de DQA1*03:02, DQA1*01:05, DQA1*05:03, DQA1*05:01 y DQB1*02:01.

4. *Relación entre los alelos y la expresión fenotípica de la EIIC:*

El único alelo que muestra una relación estadísticamente significativa con el fenotipo de la EIIC, tras aplicar la corrección de Holm-Bonferroni, es el HLA-DQB1*03:01, que se relaciona con el fenotipo de colitis ulcerosa extensa.

VII. INVESTIGACIÓN FUTURA

VII. INVESTIGACIÓN FUTURA

Como de toda tesis, salen nuevas tesis, de la ejecución de ésta surgieron muchas dudas e hipótesis. Así pues, como estábamos estudiando el HLA como herramienta de diagnóstico en la EIIC, nos planteamos si la serología celíaca y las biopsias duodenales servirían para diagnosticar una celiaquía en un paciente con EC, y puesto que, según la bibliografía, existen errores diagnósticos utilizando estos en la EIIC (que es lo que se había hecho en otros estudios), nos preguntábamos si podíamos encontrar una herramienta óptima (fácil y de bajo coste) para facilitar el diagnóstico anatomopatológico.

El diagnóstico de una EC en un paciente con EIIC puede resultar complejo (20) puesto que la clínica puede ser parecida, los anticuerpos pueden estar alterados y las lesiones anatomopatológicas pueden ser similares (60).

Según diversos estudios, en la EIIC los anticuerpos utilizados para el cribado y control de cumplimiento del tratamiento de la EC (AGA, EMA y AAtTG), pueden estar falsamente disminuidos (por inmunosupresión farmacológica) o, lo que es más frecuente, falsamente aumentados (155-157). Se ha relacionado la aparición de auto-anticuerpos con la mayor gravedad de la lesión intestinal (155) y con el uso de Infliximab (anti-TNF α) (22).

La lesión anatomopatológica sugestiva de celiaquía es característica pero no patognomónica. Puede aparecer en otras patologías, entre las que cabe destacar la ECr. En la enfermedad de Crohn de intestino delgado puede aparecer una atrofia vellositaria y un aumento de linfocitos intraepiteliales, que puede ser difícil de distinguir de una EC. Si ya existe controversia sobre si tratar o no lesiones leves de mucosa (Marsh 1 y 2), más aún si hay dudas de si las lesiones son achacables a la ECr. Además, puesto que la medicación para la EIIC tiene como objetivo reducir la inflamación (corticoides, 5-ASA, inmunosupresores y anti-TNF), la lesión mucosa

de la EC también puede mejorar, sin llegar a curarse, salvo que se diagnostique y se retire el gluten de la dieta, y, por tanto ser aún más inespecífica. Todo ello sin tener en cuenta la distribución parcheada intrínseca a la celiaquía, que puede dar falsos negativos si no hay suficientes muestras de tejido duodenal o yeyunal(28). Por ello, como vimos en la introducción, se han buscado alternativas para precisar el diagnóstico: endomicroscopía, sobrenadante de anticuerpos o transglutaminasa en biopsia, etc.

Viendo que obteníamos unas diferencias en la prevalencia de HLA-EC, nos planteamos lo que Leeds y Casellas, si la prevalencia de la expresión de la celiaquía también estaría reducida o sería similar a la de la población general y, añadiendo un matiz: si realmente somos capaces de distinguir una atrofia duodenal de un celíaco respecto de la de un Crohn.

De la serología, hemos obtenido una prevalencia de serología celíaca positiva en nuestros pacientes con EIIC, del 1.2% (hasta el momento, se han estudiado 418 pacientes con EIIC), similar a la media nacional (1.39%, descrita por Mariné), lo que concuerda con los resultados globales de una prevalencia de HLA de riesgo de celiaquía similar, aunque discretamente inferior, a la población general.

De las endoscopias y estudio anatomopatológico, apenas hay resultados preliminares, ya que de aquí surge parte de la investigación futura. Se han realizado endoscopias digestivas altas, con toma de biopsias, a 55 pacientes, de 43 años de edad media, siendo el alto porcentaje de diagnóstico de atrofia duodenal (12.5%) poco valorable, por el escaso número de pacientes incluido hasta el momento, y porque acceden más rápidamente a la realización de endoscopias, los pacientes sintomáticos.

Este pequeño grupo de pacientes, tiene un 19% de test de ureasa del *Helicobacter Pylori* positivo, muy inferior al de la población general de 40 a 50 años, que oscila entre el 37 y 80%, según estudios. De momento, concuerda con lo expuesto por Sonnenberg. Sonnenberg *et al* hacen un estudio muy amplio, en el que observan que la infección por HP es menos frecuente en pacientes con EIIC.

Sugieren incluso un papel en la patogenia de la enfermedad. Sea por la propia enfermedad que favorece la colonización por cepas diferentes a las habituales o simplemente conlleva la menor infección por los gérmenes más frecuentes en la población general, o porque son pacientes generalmente tratados con inhibidores de la bomba de protones y a menudo también con antibióticos de amplio espectro, la realidad es que el HP parece menos prevalente en pacientes con EIIC, tanto en el estudio de Sonnenberg como en nuestros primeros resultados.

Teniendo en cuenta la importancia de la transglutaminasa (tTG) en la EC, y los estudios comentados en la introducción, a favor y en contra de una diferente distribución de la transglutaminasa en la mucosa de pacientes celíacos respecto de controles (sin EIIC), hemos decidido analizar el grado de tinción y la distribución de la tTG en los enterocitos de pacientes celíacos, con ECr y CU, mediante técnicas inmunohistoquímicas (usando anticuerpo anti-transglutaminasa -TGase1-Kit LSAB2, Santa Cruz Biotech, Ca USA-), en todas las muestras duodenales. La descripción de la técnica de inmunohistoquímica viene detallada en el **Anexo 3**.

Como no existe ninguna clasificación publicada del grado de tinción, se ha decidido crear una de fácil aplicación, con la que dos observadores (un anatómopatólogo experto, especializado en aparato digestivo, y la doctoranda) han coincidido en la práctica totalidad de la descripción de las muestras, analizadas hasta el momento.

Así pues, para el estudio inmunohistoquímico de determinación cualitativa de la transglutaminasa, se clasificaron las muestras en función de la intensidad de la tinción, en 0, 1, 2 y 3 para el citoplasma y 0, 1, 1 heterogéneo, 2 y 3, para describir el ribete (borde en cepillo). Se añade el "1 heterogéneo" (1.5 en las tablas) para describir el ribete que está teñido intermitentemente con una intensidad mayor que el 1 y menor que el 2.

Analizando primero, de forma global, el conjunto de 66 muestras de las que se dispone actualmente (54 pacientes con EIIC -34 ECr y 20 CU- y 12 controles con celiacía, uno de los cuales resultó tener una ECr también), se observa que sólo el 23% (15 biopsias) presentan una tinción intensa del ribete (grado 2-3), a diferencia de lo detectado en el citoplasma, teñido en un grado 2 y 3 en el 92% de las biopsias

estudiadas. Este primer análisis, con una mayoría de muestras con distribución citoplasmática de la transglutaminasa, hace plantearse por qué y qué pacientes tienen también teñido el ribete, que como se ve en los posteriores resultados, corresponden principalmente a pacientes con ECr.

Los grados de tinción del ribete más intensos (grado 2 y 3), se observan únicamente en pacientes con EIIC (13 ECr y 2 CU), con gastroscopia negativa para celiaquía. Para discernir las verdaderas diferencias, se ha llevado a cabo un análisis de varianzas.

Del test de ANOVA se deduce que:

- a. la tinción inmunohistoquímica del citoplasma es más intensa en la EIIC que en la EC ($p=0.0345$), pero que el tipo de EIIC (ECr/CU) y la positividad o negatividad de la endoscopia para celiaquía, no influye en la mayor tinción citoplasmática.
- b. La tinción del ribete es también más intensa en la EIIC que en la EC ($p=0.0392$). El tipo de EIIC sí que influye en la intensidad de la tinción del ribete ($p=0.0555$), siendo llamativa la mayor intensidad de la tinción en pacientes con ECr.

Al valorar microscópicamente las muestras teñidas por inmunohistoquímica, mediante anti-tTG, una vez ya cotejadas con su diagnóstico (ECr, CU o EC) lo que subjetivamente llama más la atención, es que el ribete teñido intensamente correspondía a pacientes con ECr. A continuación, se muestran gráficamente los resultados preliminares.

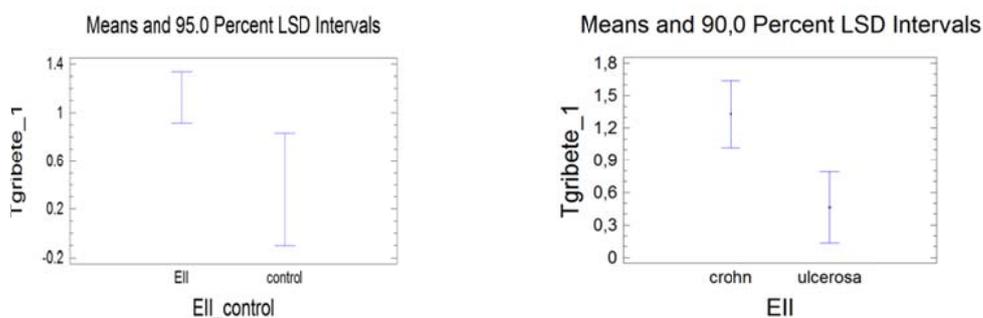


Figura VIII.1 y 2. Representación de la mayor tinción del ribete en EII respecto de controles, a mano izquierda, y en ECr respecto de la CU, a la derecha.

La pregunta de la tesis sobre la prevalencia del HLA-DQ de predisposición a la celiaquía en la EIIC, se responde con la tesis, apareciendo incluso datos que apuntan a un factor de protección de la EIIC respecto de ciertos haplotipos positivos para la celiaquía (como vimos, el HLA-DQ2 en la CU y el HLA-DQ8 en la ECr), pero, como toda línea de investigación, esta tesis ha permitido abrir nuevas vías de investigación, que aún tienen preguntas por responder y que nos van sorprendiendo en el proceso, como la aparición de una distribución diferente de la transglutaminasa en enfermos de Crohn, cuando lo esperable era en celíacos, hecho que habrá que comprobar con el siguiente proyecto de investigación.

Otra pregunta que surge con los resultados de la tesis, y que quizás convendría, también, estudiar es si esta reducción del HLA-DQ2 en CU, predispone a dichos pacientes a presentar cáncer colorrectal (CCR). El grupo de la Clínica Mayo, publicó en 2009 que el HLA-DQB1*02, en pacientes con CU, se asocia a un efecto protector frente al CCR(158). Si tenemos en cuenta sus resultados y los nuestros, se podría deducir que, la baja prevalencia del HLA-DQ2 en la CU justifica, en parte, el mayor riesgo de CCR en la CU. Habría que confirmar esto mediante un estudio y, a su vez, determinar si, dado que las mujeres con CU tienen aún menor prevalencia de DQ2, son ellas las más susceptibles para desarrollar un CCR, y si debería existir un seguimiento endoscópico algo más exhaustivo en mujeres frente hombres.

La revisión realizada para diseñar y escribir la tesis, y los resultados de la misma, ha conllevado, como es habitual en investigación, la aparición de preguntas por resolver, que pueden ser la base de otros estudios.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Delco F, El-Serag HB, Sonnenberg A. Celiac sprue among US military veterans: associated disorders and clinical manifestations. *Dig Dis Sci* 1999 May;44(5):966-972.
- (2) Casella G, D'Inca R, Oliva L, Daperno M, Saladino V, Zoli G, et al. Celiac Disease (CD) in Inflammatory Bowel Diseases (IBD): Preliminary Results of An Italian Multicenter Study. 2005;128 (Suppl 2):A254.
- (3) Rodrigo L, Pena AS. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca. 1ª edición © 2013 OmniaScience (Omnia Publisher SL) ed. España: OmniaScience; 2013.
- (4) Bosca MM, Lizarraga J, Minguez M. Enfermedad celiaca y diabetes. *Av Diabetol* 2007; 23:185-188.
- (5) van Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. *Gut* 2006 Jul; 55(7):1037-1046.
- (6) Jones RB, Robins GG, Howdle PD. Advances in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2006 Mar; 22(2):117-123.
- (7) 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.
- (8) Polanco I, Arroba ML, Gálvez P. Grupo de Trabajo sobre "Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca". Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2008:17-49.
- (9) Weersma RK, Stokkers PC, Cleynen I, Wolfkamp SC, Henckaerts L, Schreiber S, et al. Confirmation of multiple Crohn's disease susceptibility loci in a large Dutch-Belgian cohort. *Am J Gastroenterol* 2009 Mar; 104(3):630-638.

- (10) De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol* 2010 Feb 24; 10:63.
- (11) Festen EA, Szperl AM, Weersma RK, Wijmenga C, Wapenaar MC. Inflammatory bowel disease and celiac disease: overlaps in the pathology and genetics, and their potential drug targets. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009 Jun;9(2):199-218.
- (12) Tursi A, Giorgetti GM, Brandimarte G, Elisei W. High prevalence of celiac disease among patients affected by Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005 Jul;11(7):662-666.
- (13) Dickey W. A case of sequential development of celiac disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007 Aug; 4(8):463-467.
- (14) Day AS, Abbott GD. Simultaneous presentation of coeliac disease and ulcerative colitis in a child. *J Paediatr Child Health* 1999 Apr;35(2):204-206.
- (15) Cottone M, Marrone C, Casa A, Oliva L, Orlando A, Calabrese E, et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease in celiac disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003 Sep;9(5):321-323.
- (16) Yang A, Chen Y, Scherl E, Neugut AI, Bhagat G, Green PH. Inflammatory bowel disease in patients with celiac disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005 Jun;11(6):528-532.
- (17) Dickey W. A case of sequential development of celiac disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007 Aug;4(8):463-467.
- (18) Malekzadeh R, Sachdev A, Fahid Ali A. Coeliac disease in developing countries: Middle East, India and North Africa. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005 Jun;19(3):351-358.
- (19) Masachs M, Casellas F, Malagelada JR. Inflammatory bowel disease in celiac patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2007 Aug;99(8):446-450.
- (20) Cheikh I, Maamouri N, Chouaib S, Chaabouni H, Ouerghi H, Ben-Ammar A. Association maladie coéliqua et maladie de Crohn. À propos d'une observation. Association of celiac disease and Crohn's disease. One case report. *La Revue de Médecine Interne* 2003 11;24(11):755-756.

- (21) Roman AL, Munoz F. Comorbidity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2011 Jun 14;17(22):2723-2733.
- (22) Leeds JS, Horoldt BS, Sidhu R, Hopper AD, Robinson K, Toulson B, et al. Is there an association between coeliac disease and inflammatory bowel diseases? A study of relative prevalence in comparison with population controls. *Scand J Gastroenterol* 2007 Oct;42(10):1214-1220.
- (23) DiGiacomo D, Santonicola AF, Zingone FF, Troncone E, Caria MC, Borgheresi P, et al. Human leukocyte antigen DQ2/8 prevalence in non-coeliac patients with gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology : WJG JID - 100883448* 1231.
- (24) AGA Institute. AGA Institute Medical Position Statement on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology* 2006 Dec;131(6):1977-1980.
- (25) Jabri B, Kasarda DD, Green PH. Innate and adaptive immunity: the yin and yang of celiac disease. *Immunol Rev* 2005 Aug;206:219-231.
- (26) Koning F. Celiac disease: caught between a rock and a hard place. *Gastroenterology* 2005 Oct;129(4):1294-1301.
- (27) Casellas i Jorda F. Celiac disease. *Med Clin (Barc)* 2006 Feb 4;126(4):137-142.
- (28) Armstrong MJ, Robins GG, Howdle PD. Recent advances in coeliac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009 Mar;25(2):100-109.
- (29) Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994 Jan 22;343(8891):200-203.
- (30) Elli L, Bergamini CM, Bardella MT, Schuppan D. Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver. *Digestive and Liver Disease* 2009 8;41(8):541-550.
- (31) Ribeiro-Cabral VL, Da-Silva-Patricio FR, Ambrogini-Junior O, Jankiel-Miszputen S. Anti-tissue transglutaminase antibodies (IgA and IgG) in both Crohn's disease and autoimmune diabetes. *Rev Esp Enferm Dig* 2011 Sep;103(9):453-457.
- (32) Castells A, Gomollon F, Martin de Argila C, Vaquero E, Minguez M, Pique JM. Enfermedad celíaca ¿un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal? Barcelona: Gastroenterología y Hepatología Continuada. Ediciones Doyma.; 2006.

- (33) Stepniak D, Koning F. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2006 Jun;67(6):460-468.
- (34) van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005 Jun;19(3):323-339.
- (35) Torres MI, Lopez Casado MA, Rios A. New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2007 Feb 28;13(8):1156-1161.
- (36) James SP. Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. *J Allergy Clin Immunol* 2005 Jan;115(1):25-30.
- (37) Marquez M, Polanco I, Alonso M, Mearin ML, Ribes C, Garcia MD, et al. Enfermedad celíaca. Manual del celíaco. primera edición ed. Madrid, España: Real Patronato sobre Discapacidad; 2002.
- (38) Donat E. Análisis Genético de la Enfermedad Celíaca. 2010.
- (39) Snyder CL, Young DO, Green PHR, Taylor AK. Celiac Disease BTI. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. 2008 Jul 03. PMID: 20301720
- (40) Cassinotti A, Birindelli S, Clerici M, Trabattoni D, Lazzaroni M, Ardizzone S, et al. HLA and autoimmune digestive disease: a clinically oriented review for gastroenterologists. *Am J Gastroenterol* 2009 Jan;104(1):195-217; quiz 194, 218.
- (41) Donat E, Planelles D, Capilla-Villanueva A, Montoro JA, Palau F, Ribes-Koninckx C. Allelic distribution and the effect of haplotype combination for HLA type II loci in the celiac disease population of the Valencian community (Spain). *Tissue Antigens* 2009 Mar;73(3):255-261.
- (42) Zubillaga P, Vidales MC, Zubillaga I, Ormaechea V, García-Urkía 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. PMID: 12050583. JID - 8211545 0917.
- (43) Hernandez-Charro B, Donat E, Miner I, Aranburu E, Sanchez-Valverde F, Ramos-Arroyo MA. Modifying effect of HLA haplotypes located trans to DQB1*02-DRB1*03 in celiac patients of Southern Europe. *Tissue Antigens* 2008 Mar;71(3):213-218.

- (44) Nenna R, Mora B, Megiorni F, Mazzilli MC, Magliocca FM, Tiberti C, et al. HLA-DQB1*02 dose effect on RIA anti-tissue transglutaminase autoantibody levels and clinicopathological expressivity of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008 Sep;47(3):288-292.
- (45) 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):256-260.
- (46) Karinen H, Karkkainen P, Pihlajamaki J, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, et al. Gene dose effect of the DQB1*0201 allele contributes to severity of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2006 Feb;41(2):191-199.
- (47) Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Montuori M, Viola F, et al. HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: evidence for gender differences and parent-of-origin effects. *Am J Gastroenterol* 2008 Apr;103(4):997-1003.
- (48) Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011. Dec; 60(12):1739-53.doi: 10.1136/gut.2009.199679.
- (49) Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007 Jan;117(1):41-49.
- (50) Zanoni GF, Navone RF, Lunardi CF, Tridente GF, Bason CF, Sivori SF, et al. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS medicine* JID - 101231360 1226.
- (51) Iuorio R, Mercuri V, Barbarulo F, D'Amico T, Mecca N, Bassotti G, et al. Prevalence of celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis. *Minerva Endocrinol* 2007 Dec;32(4):239-243.
- (52) Green PH, Rostami K, Marsh MN. Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005 Jun;19(3):389-400.
- (53) Crovella S, Brandao L, Guimaraes R, Filho JL, Arraes LC, Ventura A, et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. *Dig Liver Dis* 2007 Oct;39(10):900-902.

- (54) Korponay-Szabo IR, Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmany E, Nemes E, et al. Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. *BMJ* 2007 Dec 15;335(7632):1244-1247.
- (55) Boger CP, Thomas PW, Nicholas DS, Surgenor SL, Snook JA. Determinants of endomysial antibody status in untreated coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007 Oct;19(10):890-895.
- (56) Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R. Coeliac disease: an update for pathologists. *J Clin Pathol* 2006 Oct;59(10):1008-1016.
- (57) Anderson RP. Coeliac disease: current approach and future prospects. *Intern Med J* 2008 Oct;38(10):790-799.
- (58) Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013 May;108(5):656-76; quiz 677. doi: 10.1038/ajg.2013.79. JID - 0421030 0624.
- (59) Chang F, Mahadeva U, Deere H. Pathological and clinical significance of increased intraepithelial lymphocytes (IELs) in small bowel mucosa. *APMIS* 2005 Jun;113(6):385-399.
- (60) Daum S, Cellier C, Mulder CJ. Refractory coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005 Jun;19(3):413-424.
- (61) Ludvigsson JF, Montgomery SM, Ekbom A, Brandt L, Granath F. Small-intestinal histopathology and mortality risk in celiac disease. *JAMA* 2009 Sep 16;302(11):1171-1178.
- (62) Leeds JS, Hopper AD, Sanders DS. Coeliac disease. *Br Med Bull* 2008;88(1):157-170.
- (63) Olivencia Palomar P, Cano Ruiz A, Martin Scapa MA, Leon Prieto F, Roy Arino G, Redondo Verge C. Adult celiac disease and intraepithelial lymphocytes. New options for diagnosis? *Gastroenterol Hepatol* 2008 Nov;31(9):555-559.
- (64) Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Calabro A, Renzi D, et al. Usefulness of the organ culture system in the in vitro diagnosis of coeliac disease: a multicentre study. *Scand J Gastroenterol* 2006 Feb;41(2):186-190.

- (65) Carroccio A, Iacono G, D'Amico D, Cavataio F, Teresi S, Caruso C, et al. Production of anti-endomysial antibodies in cultured duodenal mucosa: usefulness in coeliac disease diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 2002 Jan;37(1):32-38.
- (66) Carroccio A, Di Prima L, Pirrone G, Scalici C, Florena AM, Gasparin M, et al. Anti-transglutaminase antibody assay of the culture medium of intestinal biopsy specimens can improve the accuracy of celiac disease diagnosis. *Clin Chem* 2006 Jun;52(6):1175-1180.
- (67) Vetrano S, Zampaletta U, Anania MC, Di Tola M, Sabbatella L, Passarelli F, et al. Detection of anti-endomysial and anti-tissue transglutaminase autoantibodies in media following culture of oral biopsies from patients with untreated coeliac disease. *Dig Liver Dis* 2007 Oct;39(10):911-916.
- (68) Villanacci V, Not T, Sblattero D, Gaiotto T, Chirido F, Galletti A, et al. Mucosal tissue transglutaminase expression in celiac disease. *J Cell Mol Med* 2009 Feb;13(2):334-340.
- (69) Tuncer I, Bayram I, Kaba I, Mercan R, Ugras S. Tissue transglutaminase expression in duodenal mucosa of patients with celiac disease and of normal subjects. *Turk J Gastroenterol* 2003 Sep;14(3):185-188.
- (70) Kaukinen K, Peraaho M, Collin P, Partanen J, Woolley N, Kaartinen T, et al. 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):564-572.
- (71) Sakly WF, Sriha BF, Ghedira IF, Bienvenu FF, Ayadi AF, Sfar MT, et al. Localization of tissue transglutaminase and N (epsilon)-(gamma) -glutamyl lysine in duodenal mucosa during the development of mucosal atrophy in coeliac disease. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 2005 Jun;446(6):613-8.
- (72) Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Ara CF, Biagi FF, Perilli MF, Amicosante G, et al. Gliadin and tissue transglutaminase complexes in normal and coeliac duodenal mucosa. *Clin Exp Immunol.* 2003 Dec;134(3):516-24.

- (73) Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati VM, Mazzarella G, et al. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2003 Aug;98(8):1813-20.
- (74) Biagi F, Campanella J, Laforenza U, Gastaldi G, Tritto S, Grazioli M, et al. Transglutaminase 2 in the enterocytes is coeliac specific and gluten dependent. *Dig Liver Dis* 2006 Sep;38(9):652-658.
- (75) Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2009 11/19; 2011/11;361(21):2066-2078.
- (76) Khor BF, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011 Jun 15;474(7351):307-17. doi: 10.1038/nature10209.
- (77) Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Dig Dis*. 2010;28(3):395-405. doi: 10.1159/000320393.
- (78) Danese S, Fiocchi C. Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 2011 11/03; 2011/11;365(18):1713-1725.
- (79) Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011 May;140(6):1729-1737.
- (80) Ahmad TF, Satsangi JF, McGovern DF, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001 Jun;15(6):731-48.
- (81) Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis* 2010 Oct;11(5):266-276.
- (82) Tommasini A, Pirrone A, Palla G, Taddio A, Martelossi S, Crovella S, et al. The universe of immune deficiencies in Crohn's disease: a new viewpoint for an old disease? *Scand J Gastroenterol* 2010 May 24.
- (83) Triantafyllidis JK, Merikas E, Georgopoulos F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Des Devel Ther* 2011 Apr 6;5:185-210.

- (84) Niederreiter L, Kaser A. Endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2011 Jun;74(2):330-333.
- (85) Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2033-45. doi: 10.1056/NEJMoa0907206.
- (86) Ahmad TF, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J Gastroenterol*. 2006 Jun 21;12(23):3628-35.
- (87) Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med*. 2000 May;67(3):263-8.
- (88) Zhang FR, Liu H, Irwanto A, Fu XA, Li Y, Yu GQ, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*. 2013 Oct 24;369(17):1620-8.
- (89) Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis*. 2003 Aug;3(8):507-14.
- (90) Beckler DR, Elwasila S, Ghobrial G, Valentine JF, Naser SA. Correlation between *rpoB* gene mutation in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and clinical rifabutin and rifampicin resistance for treatment of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2008 May 7;14(17):2723-30.
- (91) Ferwerda G, Kullberg BJ, de Jong DJ, Girardin SE, Langenberg DM, van Crevel R, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol*. 2007 Oct;82(4):1011-8.
- (92) Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, Hold GL. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2010 Mar;45(3):266-76. doi: 10.1007/s00535-009-0191
- (93) Hansen R, Thomson JM, Fox JG, El-Omar EM, Hold GL. Could *Helicobacter* organisms cause inflammatory bowel disease? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Feb;61(1):1-14. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00744
- (94) Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011 Jun 15;474(7351):298-306. doi: 10.1038/nature10208.

- (95) Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Nov 14;13(42):5571-6.
- (96) Rolhion N, Barnich N, Bringer MA, Glasser AL, Ranc J, Hébuterne X, et al. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut*. 2010 Oct;59(10):1355-62. doi: 10.1136/gut.2010.207456.
- (97) Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004 Aug;127(2):412-21.
- (98) Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5529-37.
- (99) Dreux N, Denizot JF, Martinez-Medina MF, Mellmann AF, Billig MF, Kisiela DF, et al. Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog*. 2013 Jan;9(1):e1003141. doi: 10.1371/journal.ppat.1003141.
- (100) Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998 Dec;115(6):1405-13.
- (101) Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4499-509.
- (102) Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Jul 1;18(1):45-56.
- (103) Chassaing B, Koren O, Carvalho FA, Ley RE, Gewirtz AT. AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut*. 2014 Jul;63(7):1069-80. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304909.

- (104) Chassaing B, Rolhion N, de Vallée A, Salim SY, Prorok-Hamon M, Neut C, et al. Crohn disease--associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest*. 2011 Mar;121(3):966-75. doi: 10.1172/JCI44632.
- (105) Van Assche GF, Dignass AF, Panes JF, Beaugerie LF, Karagiannis JF, Allez MF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2010 Feb;4(1):7-27. doi: 10.1016/j.crohns.2009.12.003
- (106) Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002 Aug 8;347(6):417-429.
- (107) Gassull MA, Gomollon F, Hinojosa J, Obrador A editors. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. III ed. Madrid: Arán Ediciones; 2007.
- (108) Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006 Jun;55(6):749-753.
- (109) Cabre E. *Manifestaciones y Complicaciones Extraintestinales de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Barcelona: Temis Medical S.L.; 2007.
- (110) Nunez C, Alecsandru DM, Mendoza JL, Urcelay E, Diaz-Rubio M, de la Concha EG, et al. Genetic markers linked to rheumatoid arthritis are also strongly associated with articular manifestations in ulcerative colitis patients. *Hum Immunol* 2006 Apr-May;67(4-5):324-330.
- (111) Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & colitis JID* - 101318676 EDAT- 2008/03/01 00:00 MHDA- *J Crohns Colitis*. 2008 Mar;2(1):1-23. doi: 10.1016/j.crohns.2007.11.001.
- (112) Mayberry JF, Smart HL, Toghill PJ. Familial association between coeliac disease and ulcerative colitis: preliminary communication. *J R Soc Med* 1986 Apr;79(4):204-205.

- (113) Casella G, D'Inca R, Oliva L, Daperno M, Saladino V, Zoli G, et al. Prevalence of celiac disease in inflammatory bowel diseases: An IG-IBD multicentre study. *Dig Liver Dis* 2010 Mar;42(3):175-178.
- (114) Barisani D, Ceroni S, Meneveri R, Cesana BM, Bardella MT. IL-10 polymorphisms are associated with early-onset celiac disease and severe mucosal damage in patients of Caucasian origin. *Genet Med*. 2006 Mar;8(3):169-74.
- (115) Festen EA, Goyette P, Green T, Boucher G, Beauchamp C, Trynka G, et al. A meta-analysis of genome-wide association scans identifies IL18RAP, PTPN2, TAGAP, and PUS10 as shared risk loci for Crohn's disease and celiac disease. *PLoS Genet*. 2011 Jan 27;7(1):e1001283.
- (116) Wouters MM. New insight in the pathogenesis of functional gastrointestinal disorders: association between genetics and colonic transit. *Neurogastroenterol Motil* 2011 Oct;23(10):893-897.
- (117) Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Riva S, Clerici M, et al. Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *J Exp Med* 2009 Jun 8;206(6):1395-1408.
- (118) Arranz E, Garrote JA. *Gastroenterol Hepatol*. 2010 Nov;33(9):643-51. doi: 10.1016/j.gastrohep.2009.11.003.
- (119) Castro-Antunes MM, Crovella S, Brandão LA, Guimaraes RL, Motta ME, Silva GA. Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(2):227-31.
- (120) Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999 Sep;45(3):395-401.
- (121) Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis*. 2010 Feb;4(1):28-62. doi: 10.1016/j.crohns.2009.12.002.

- (122) Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, et al. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. Inflammatory bowel diseases JID - 9508162 0302. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Jan;16(1):112-24. doi: 10.1002/ibd.21048.
- (123) Ng J, Hurley CK, Baxter-Lowe LA, Chopek M, Coppo PA, Hegland J, et al. Large-scale oligonucleotide typing for HLA-DRB1/3/4 and HLA-DQB1 is highly accurate, specific, and reliable. *Tissue Antigens*. 1993 Nov;42(5):473-9.
- (124) Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Eur J Immunogenet*. 1999 Apr-Jun;26(2-3):81-116.
- (125) Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens*. 1999 Apr;53(4 Pt 2):407-46.
- (126) Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, et al. Nomenclature for factors of the HLA System, 1998. *Hum Immunol*. 1999 Apr;60(4):361-95.
- (127) Colinas RJ, Bellisario R, Pass KA.. Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres. *Clin Chem*. 2000 Jul;46(7):996-8.
- (128) R. Castaño. Estudio Genético (HLA-DR, DQ, DP) de los Pacientes con Asma por un Alérgeno Determinado: Parietaria. Valencia, España: Facultat de Medicina. Universitat de Valencia; 1997.
- (129) Tiwari JL, Terasaki PI. The Data and Statistical Analysis. In: Tiwari JL, Terasaki PI, editors. *HLA and Disease Associations*. New York: Springer-Verlag New York Inc; 1985. p. 18-27.
- (130) Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* 1979;6(2):65-70.
- (131) Cueto EA, Nanfeto G. Enfermedad celíaca. Rápida sospecha, diagnóstico oportuno, tratamiento adecuado y casi "un modo de ser". *Intramed* 2004 2004.

- (132) Prieto L, Herranz I. ¿Qué significa estadísticamente significativo? : Díaz de Santos; 2005.
- (133) Cosnes JF, Cattan SF, Blain AF, Beaugerie LF, Carbonnel FF, Parc RF, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases JID* - 9508162 0906.
- (134) Freeman HJ. Granuloma-positive Crohn's disease. *Can J Gastroenterol*. 2007 Sep;21(9):583-7.
- (135) Farmer RG, Easley KA, Rankin GB. Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients. *Dig Dis Sci*. 1993 Jun;38(6):1137-46.
- (136) Peters UF, Askling JF, Gridley GF, Ekblom AF, Linet M. Causes of death in patients with celiac disease in a population-based Swedish cohort. *Arch Intern Med*. 2003 Jul 14;163(13):1566-72.
- (137) Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tyan D, et al. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1993 Mar;104(3):741-8
- (138) Caruso CF, Palmeri PF, Oliva LF, Orlando AF, Cottone M. HLA antigens in ulcerative colitis: a study in the Sicilian population. *Tissue Antigens*. 1985 Jan;25(1):47-9.
- (139) De La Concha EG, Fernandez-Arquero M, Santa-Cruz S, Lopez-Nava G, Figueredo MA, Diaz-Rubio M, et al. Positive and negative associations of distinct HLA-DR2 subtypes with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1997 Jun;108(3):392-395.
- (140) Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1996 May 4;347(9010):1212-7.
- (141) Gómez-García M, Oliver J, Márquez A, Mendoza JL, López-Nevot MA, Fernández-Arquero M, et al. Strong protective effect of DR3 against ulcerative colitis in the Spanish population. *Am J Gastroenterol*. 2007 Dec;102(12):2762-6

- (142) Heresbach D, Colombel F, Danze PM, Semana G. The HLA DRB1*0301-DQB1*0201 haplotype confers protection against inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1996 May;91(5):1060.
- (143) Yoshitake SF, Kimura AF, Okada MF, Yao TF, Sasazuki T. HLA class II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*. 1999 Apr;53(4 Pt 1):350-8.
- (144) Villanacci V, Bassotti G. Coeliac disease and bowel disease: Business association or casual meeting? *Dig Liver Dis* 2010 Mar;42(3):171-172.
- (145) Lombardi M, Pirozzi G, Luongo V, Mercurio O, Pace E, Blanco Del Vecchio G, et al. Crohn disease: susceptibility and disease heterogeneity revealed by HLA genotyping. *Hum Immunol* 2001;72(7):701.
- (146) Danze PM, Colombel JF, Jacquot S, Loste MN, Heresbach D, Ategbo S, et al. Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut* 1996 Jul;39(1):69-72.
- (147) Bouma G, Oudkerk Pool M, Crusius JB, Schreuder GM, Hellemans HP, Meijer BU, et al. Evidence for genetic heterogeneity in inflammatory bowel disease (IBD); HLA genes in the predisposition to suffer from ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol*. 1997 Jul;109(1):175-9.
- (148) Fernandez L, Mendoza JL, Martinez A, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, et al. IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* 2004 Nov;10(6):715-722.
- (149) Rodey G. HLA Beyond Tears. *Introduction to Human Histocompatibility*. Durango, CO, USA: De Novo; 2000.
- (150) Trachtenberg EA, Yang H, Hayes E, Vinson M, Lin C, Targan SR, et al. HLA class II haplotype associations with inflammatory bowel disease in Jewish (Ashkenazi) and non-Jewish Caucasian populations. *Hum Immunol* 2000 3;61(3):326-333.
- (151) Nakajima A, Matsushashi N, Kodama T, Yazaki Y, Takazoe M, Kimura A. HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterol* 1995;109(- 0016-5085 (Print); - 0016-5085 (Linking)):1462. *Gastroenterology*. 1995 Nov;109(5):1462-7.

- (152) Orchard TR, Thiyagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000 Feb;118(2):274-8.
- (153) Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1704-12.
- (154) Núñez C, Oliver J, Mendoza JL, Gómez-García M, Taxonera C, Gómez LM, et al. CD209 in inflammatory bowel disease: a case-control study in the Spanish population. *BMC Med Genet*. 2007 Dec 10;8:75.
- (155) Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Viscido A, Caprilli R, Pica R, et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies in inflammatory bowel disease: new evidence. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(10):1092-1097.
- (156) Kull K, Uibo O, Salupere R, Metskula K, Uibo R. High frequency of antigliadin antibodies and absence of antireticulin and antiendomysium antibodies in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999 Feb;34(1):61-65.
- (157) Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Doria A, Tampoaia M, Bassetti D, et al. IgA and IgG tissue transglutaminase antibody prevalence and clinical significance in connective tissue diseases, inflammatory bowel disease, and primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003 Dec;48(12):2360-2365.
- (158) Garrity-Park MM, Loftus EV, Jr, Sandborn WJ, Bryant SC, Smyrk TC. MHC Class II alleles in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Gut* 2009 Sep;58(9):1226-1233.
- (159) Nos P, Clofent J. Enfermedad de Crohn. En Ponce J (editor) *Tratamiento de las Enfermedades Gastroenterológicas*. AEG. Elsevier. Barcelona, 2010:293-304.

IX. ANEXOS

IX. ANEXOS

Anexo 1: fenotipo de EIIC. Definiciones:

Fístulas: comunicaciones anormales entre el intestino y el mesenterio, u otras asas intestinales, vísceras, pared abdominal y piel.

Abscesos: colecciones de pus y detritus secundarios a perforaciones contenidas al adherirse la serosa inflamada a la serosa normal.

Estenosis: estrechamiento de la luz del intestino por el proceso inflamatorio, que produce un engrosamiento circular de la pared intestinal asociado a cambios cicatriciales.

Patrón inflamatorio: las lesiones mucosas iniciales consisten en ulceraciones superficiales de pequeño tamaño (aftas) que progresan a úlceras profundas lineales rodeadas de una mucosa en empedrado(159). Evoluciona en forma de brotes de actividad, frecuentemente con dolor abdominal y diarrea.

Patrón estenosante: se caracteriza por la disminución del calibre de la luz intestinal, sin evidencia de fístulas y en ausencia de actividad, y con dilatación preestenótica. Suele presentar una evolución inicial indolente, con cuadros suboclusivos u oclusivos cuando la luz intestinal es menor. Es importante su identificación diagnóstica para evitar el uso ineficaz y prolongado de fármacos.

Patrón fistulizante: se asocia con el desarrollo de fístulas intraabdominales o perianales, masas inflamatorias y/o abscesos en el curso de la enfermedad. Es la forma más agresiva, con necesidad precoz de cirugía y rápida recurrencia(159).

Proctitis ulcerosa: la enfermedad se limita al recto.

CU izquierda: la afectación e extiende al ángulo esplénico.

CU extensa: la inflamación supera el ángulo esplénico.

CU en remisión (S0): sin síntomas.

CU leve (S1): ≤ 4 deposiciones sin sangre o con mínima cantidad, sin signos sistémicos de toxicidad y con VSG y PCR normal.

CU moderada (S2): criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves (ver Índice de Truelove-Witts, Tabla).

Colitis grave (S3): seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afección (“toxicidad”) sistémica grave.

Anexo 2: Desarrollo de los métodos estadísticos utilizados en esta tesis:

1. Tamaño muestral y precisión de las estimaciones:

1.1 Imprecisión de las estimaciones

La estimación de la prevalencia P de un determinado suceso (por ejemplo, de la presencia de HLA-EC) en una población, a partir de una muestra obtenida de la misma, lleva siempre asociada un determinado margen de incertidumbre.

Asumiendo que los individuos que constituyen la muestra han sido obtenidos al azar de entre los que constituyen la población objeto del estudio, el valor desconocido de P se estimará mediante la frecuencia relativa P^* observada en la muestra del suceso considerado:

$$P^* = \frac{x}{N}$$

donde N es el número total de individuos de la muestra y x es el número de los que presentan la característica estudiada.

Se demuestra que el estimador P^* es realmente una variable aleatoria, definida sobre la población de todas las posibles muestras de tamaño N que podrían haberse obtenido de la población considerada, que, siempre que N no sea muy pequeña, se distribuye de forma aproximadamente Normal con media $E(P^*) = P$ y varianza $\sigma^2(P^*) = P(1-P)/N$

La expresión anterior de la varianza de P^* es correcta siempre que, como sucede en nuestro caso, el tamaño de la población objeto del estudio sea grande en relación al tamaño N de la muestra.

Por lo tanto, cuando se toma al azar una muestra de tamaño N de una población muy grande en la que un determinado suceso tiene una probabilidad P , el valor P^* que se obtiene fluctuará, en función de la muestra que se haya seleccionado, en torno al verdadero valor P que se pretende estimar, con una desviación típica $\sqrt{P(1-P)/N}$

El tamaño N de la muestra, condicionará por tanto la probabilidad de que el error cometido en la estimación, o sea P^*-P , sea más o menos grande.

1.2 Relación entre el Tamaño muestral y la precisión

Para determinar el tamaño muestral mínimo para conseguir una determinada precisión es necesario, en primer lugar, definir la precisión deseada. Ello se hace a partir de dos valores:

- El error máximo $\varepsilon = |P^* - P|$ que se está dispuesto a admitir

- la probabilidad α de que el error finalmente cometido resulte mayor que ε

Dada la normalidad de la distribución de P^* , siempre que N no sea muy pequeña, la relación entre las magnitudes anteriores es la siguiente:

$$\varepsilon = z_{\alpha} \sqrt{\frac{P(1-P)}{N}} \quad (1)$$

donde z_{α} se obtiene de la tabla de la distribución Normal tipificada de forma que cumpla que $\text{Prob}(|N(0,1)| > z_{\alpha}) = \alpha$. (Por ejemplo, para $\alpha = 0.05$ resulta $z_{\alpha} = 1.96$)

La expresión (1) permite obtener para un determinado N el valor del error máximo ε correspondiente a una determinada probabilidad α .

Alternativamente, el N mínimo necesario para conseguir una probabilidad $1-\alpha$ de que el error cometido sea inferior a ε se deduce de (1) que es:

$$N = \frac{z_{\alpha}^2 P(1-P)}{\varepsilon^2} \quad (2)$$

La aplicación de las expresiones (1) o (2) exige conocer el valor real de P , lo que no es posible, puesto que el valor de P es precisamente lo que se desea estimar. La forma de operar en la práctica consiste en sustituir en (2) P por alguna estimación previa aproximada que se tenga he dicho valor. En caso de que no se disponga de ninguna valor se utiliza $P = 0.5$, que conduce a valores conservadores de N , puesto que sea cual sea P la cantidad $P(1-P)$ nunca puede ser mayor 0.25.

Una vez obtenida a partir de una muestra la estimación P^* de P , el error máximo muestra para una probabilidad α puede deducirse de (1) sustituyendo P por dicha estimación P^*

2. Test Chi-2 de independencia entre variables cualitativas

La forma más sencilla y clásica de estudiar estadísticamente la posible dependencia entre dos variables cualitativas es mediante el test X^2 . que se expone a continuación.

Se parte de una muestra cuyos individuos pueden ser clasificados en diferentes grupos de acuerdo con dos variables o criterios de clasificación. Por ejemplo una variable podría definir si el individuo tiene o no la EII y la otra si presenta o no HLA-EC.

Siendo I el número de alternativas para la primera variable y J el número de alternativas para la segunda, los resultados observados pueden presentarse en una tabla de frecuencias cruzada, o tabla de contingencia, cuyo elemento genérico x_{ij} es el número de individuos de la muestra que presentan tanto la variante i de la primera variable como la variante j de la segunda.

Para estudiar si es admisible la hipótesis de independencia entre las dos variables estudiadas, los valores x_{ij} realmente observados en cada casilla de la tabla, se comparan con los valores t_{ij} que teóricamente deberían haberse observado en promedio si ambas variables fueran realmente independientes. Se demuestra que la estimación de estos valores teóricos se obtiene mediante la expresión $t_{ij} = TF_i \times TC_j / TG$, donde TF_i es el total de individuos observados en la fila i de la tabla, TC_j es el total de individuos observados en la columna j de la tabla y TG es el número total de individuos observados.

Se demuestra que el estadístico:

$$d = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \frac{(x_{ij} - t_{ij})^2}{t_{ij}}$$

se distribuye aproximadamente como una variable Chi-2 con (I-1)(J-1) grados de libertad, si es cierta la hipótesis de que las dos variables estudiadas son independientes, mientras que tiende a tomar valores mayores que los correspondientes a dicha variable en el caso de que las variables no sean independientes³.

Para ver hasta qué punto es admisible la hipótesis de independencia entre las dos variables analizadas se calcula el P-value:

$$P\text{-value} = \Pr \text{ob}(\chi_{(I-1)(J-1)}^2 > d)$$

donde $\chi_{(I-1)(J-1)}^2$ es una variable Chi-2 con (I-1)(J-1) grados de libertad.

³ Cuando las frecuencias teóricas en alguna casilla son muy bajas y la tabla es 2x2 se recomienda aplicar la corrección de continuidad de Yates. Existen procedimientos alternativos más complicados, basados en estudios de simulación, que pueden ser aconsejables cuando hay un número elevado de casillas con valores de t_{ij} bajos

Cuanto más bajo sea el valor obtenido para el P-value mayor será la evidencia estadística contra la hipótesis de independencia, es decir, mayor será la evidencia estadística de que existe una relación entre las dos variables analizadas.

El test Chi-2 que acaba de exponerse no puede, en principio, generalizarse directamente al estudio de las relaciones entre más de dos variables cualitativas, como es por ejemplo, el caso si se desea estudiar si la relación entre la EIIC y la presencia de HLA-EC es significativamente diferente en hombres que en mujeres.

La realización de estos análisis más complejos puede llevarse a cabo mediante el recurso a Modelos de Regresión Logística, modelos cuyos fundamentos y utilización se discuten más adelante.

Nota respecto a los P-values y a la “significación estadística”

En cualquier estudio estadístico el “P-value” indica el grado de evidencia estadística que hay en contra de la hipótesis nula, hipótesis cuya aceptación implica en general la inexistencia de relaciones entre las variables estudiadas.

Muchos autores [Prieto 2005] han criticado el abuso en el campo de la investigación médica del valor 0.05 para los P-values, para diferenciar los efectos que son “realmente significativos” de aquellos que no lo son. Las consideraciones que se recogen a continuación al respecto están extraídas de la referencia mencionada:

“En realidad, la utilización de unos valores límites o “críticos” para el P-value (como el 5% o el 1%), que separan los resultados “significativos” de los “no significativos” no es más que un anacronismo, reflejo de épocas en las que el cálculo exacto de estos P-values se hallaba fuera del alcance del investigador, que sólo podía hacerse una idea al respecto comparando los valores por él obtenidos con los reflejados en unas tablas que generalmente se limitaban a estos dos niveles.

Es el p-value, por tanto, lo que refleja el grado de evidencia de unos resultados contra la hipótesis nula y, en consecuencia, lo que debería acompañar al análisis de dichos resultados, y no la constatación de si resulta superior o inferior al 5%. ¿Qué diferencia hay, en la práctica, entre un p-value del 4.9% o del 5.1%?

En el campo de la investigación científica, el que unos resultados no lleguen a ser significativos estadísticamente (entendido ello de la forma habitual, como que el p-value sea superior al 5%) no significa necesariamente que no merezcan ser publicados, obviamente con las matizaciones pertinentes, especialmente si los efectos constatados van en el sentido que cabría esperar por las hipótesis de trabajo avanzadas en la investigación. Es posible que la no significación se deba sólo a un número insuficiente de datos, originado a

veces por el elevado coste de estos estudios, pero que estos resultados, acumulados con otros obtenidos por otros equipos que trabajan sobre el tema, permitan llegar a la comunidad científica a conclusiones estadísticamente significativas sobre el tema”

3. Modelo de regresión logística

3.1 Fundamento

Como se comenta en el apartado de Material y Métodos, los Modelos de Regresión Logística constituyen una técnica estadística muy poderosa para analizar las relaciones existentes entre dos o más variables de tipo cualitativo.

Ilustraremos el fundamento del Modelo de Regresión Logística (MRL) exponiendo su posible aplicación al análisis de unos datos como los de la tabla siguiente, en la que se recoge el número total de casos y la prevalencia de HLA-EC en función del sexo y de la presencia o no de EIIC

	Varones	mujeres
EII_NO	352 (130)	215 (93)
EII_SI	255 (87)	202 (69)

Tabla J.1. Prevalencia de HLA-EC

La casilla (i,j) de dicha tabla recoge los resultados observados para la variante i de EII (donde i=1 si EII_NO e i=2 si EII_SI) combinada con la variante j de Sexo (j=1 para varones y j=2) para mujeres. En dicha casilla, N_{ij} es el número de casos existentes en la muestra en las condiciones indicadas y X_{ij} , entre paréntesis, es el número de estos casos que presentaban HLA-EC.

El MRL asume que las X_{ij} son valores observados de variables binomiales⁴ independientes de parámetros: $N = N_{ij}$ y probabilidad $P = p_{ij}$ que es la prevalencia del HLA-EC en dichas condiciones

$X_{ij} \sim \text{Binomial}(N_{ij}, p_{ij})$

Los valores de las p_{ij} son función de un conjunto de parámetros que definen los posibles efectos, sobre la prevalencia del HLA-EC, de la variante EIIi y Sexoj correspondientes a dicha casilla.

Dado que los dos factores analizados son de naturaleza cualitativa, para modelar su efecto se opera de forma similar a como se hace en los modelos de regresión ordinarios, introduciendo variables binarias (con únicos valores posibles 0 ó 1) cuyos valores en cada observación definen la variante considerada de cada factor presente en la misma.

Así, para modelar el efecto del factor EII hay que introducir una variable binaria x_{EII} definida como sigue:

x_{EII} valdrá 1 en los individuos con EII y valdrá 0 en los controles

De forma similar, para modelar el efecto del factor Sexo hay que introducir otra variable binaria x_{SEXO} , que puede definirse como sigue:

x_{SEXO} valdrá 0 en las mujeres y valdrá 1 en los varones

El posible efecto de las variables sobre las p_{ij} se puede introducir a partir de una función de dichas variables. Por ejemplo, asumiendo la inexistencia de interacciones entre los efectos de ambos factores, podría operarse con una simple función lineal de las mismas:

$$h(\text{EII}, \text{Sexo}) = \beta_0 + \beta_1 x_{EII} + \beta_2 x_{SEXO} \quad (1)$$

Nota: si se desea plantear, como se hará más adelante en esta tesis, un modelo más general, que contemple la posible existencia de interacciones entre los dos factores, o sea que el efecto de la presencia de EII sobre la prevalencia de HLA sea diferente de un sexo a otro, basta incluir en el modelo una variable adicional definida como el producto de x_{EII} por x_{SEXO}

El problema de utilizar la (1) para definir el valor de las p_{ij} en función de los valores de x_{EII} y x_{SEXO} es que, dependiendo de los posibles valores de los parámetros β_i , el resultado de (1) podría tomar valores fuera del intervalo $[0, 1]$ que es el único que tiene sentido por tratarse de una

⁴ Una variable aleatoria X se dice que sigue una distribución Binomial de parámetros N y P (se escribe $X \sim \text{Binomial}(N, P)$) si es el número de veces que se presenta un suceso de probabilidad P en N repeticiones independientes de una experiencia aleatoria. En nuestro caso, la experiencia aleatoria consiste en seleccionar un individuo de entre todos los posibles de los que cumplen las condiciones definidas en cada casilla.

probabilidad. Para obviar este problema, el MRL asume que la relación entre las pij y las variables del modelo viene dada por la ecuación:

$$p_{ij} = \frac{e^{h(EI,Sexo)}}{1 + e^{h(EI,Sexo)}} \quad (2)$$

ecuación que, sea cual sea el valor de $h(EI,Sexo)$ proporciona siempre un resultados dentro del intervalo $[0, 1]$.

3.2 Interpretación de los parámetros del modelo

La interpretación de los parámetros en el MRL se basa en el concepto de Odds-ratio (OR)⁵.

El “odd” asociado a un determinado suceso de probabilidad P , se define como el cociente $P/(1-P)$. Así, un suceso tiene un odd igual a 2 si es el doble de probable que ocurra de que no ocurra, o sea si su probabilidad es $2/3$. Los odds pueden variar entre 0 e infinito y son una forma de evaluar probabilidades que se utiliza habitualmente en algunos campos, como el de las apuestas.

Obviamente existe una relación biunívoca entre la probabilidad de un suceso y el correspondiente “odd”, pudiéndose pasar rápidamente de un valor a otro:

$$\text{odd} = \frac{P}{1-P} \quad \Leftrightarrow \quad P = \frac{\text{odd}}{1+\text{odd}}$$

Nota: en la literatura médica se utiliza frecuentemente el término “riesgo” para referirse a los “odds”, de forma que, con esta nomenclatura, riesgo = prevalencia/(1-prevalencia) donde la prevalencia viene expresada en tanto por uno (y no en porcentaje, como se hace habitualmente)

De acuerdo con esta terminología, se comprueba fácilmente que el odd asociado al suceso “presencia de HLA-EC”, cuya probabilidad viene dada por la ecuación del MRL expuesta en (2), sería:

⁵ Como no existe un consenso generalizado sobre la traducción al castellano de los términos “odd” y “odds-ratio”, y dado que dichos términos se utilizan ampliamente en la literatura técnica, hemos decidido mantenerlos sin traducir.

$$\text{"odd" presencia HLA} = \frac{p_{ij}}{1-p_{ij}} = e^{h(EII, \text{Sexo})} \quad (3)$$

En el MRL el efecto de las variables sobre la probabilidad del suceso considerado se cuantifica a partir de su efecto sobre el correspondiente odd del mismo.

Así, la interpretación, por ejemplo, del parámetro β_1 en el modelo (2) se obtendría de la siguiente forma:

odd del suceso "presencia de HLA-EC" en individuos con EII (y, por tanto, $x_{EII} = 1$)

$$\text{odd HLA-EC en presencia de EII} = e^{\beta_0 + \beta_1 + \beta_2 x_{SEXO}} \quad (4)$$

odd del suceso "presencia e HLA-EC" en individuos control (y, por tanto, $x_{EII} = 0$)

$$\text{odd "presencia de HLA-EC" en individuos control} = e^{\beta_0 + \beta_2 x_{SEXO}} \quad (5)$$

El "efecto" sobre la probabilidad de presencia de HLA del hecho de la presencia de EII se cuantifica a partir del cociente de los odds dados por (4) y (5); a dicho cociente se le denomina odds-ratio

$$\text{odds-ratio asociado a la presencia de EII} = \frac{e^{\alpha + \beta_1 + \beta_2 x_{SEXO}}}{e^{\alpha + \beta_2 x_{SEXO}}} = e^{\beta_1} \quad (6)$$

Así si, por ejemplo, β_1 fuera = 0 como $e^0 = 1$, resultaría que la presencia de EII no afectaría a la prevalencia del HLA⁶

En general en los MRL junto al valor estimado para cada parámetro $\hat{\beta}$ se indica el valor de $e^{\hat{\beta}}$, que es la estimación del odds-ratio correspondiente a la variable asociada a dicho parámetro.

3.3 Estimación e inferencia en Modelos de Regresión Logística

⁶ Hay que hacer notar que en la deducción del resultado en (6) se ha asumido que el valor de la variable x_{SEXO} es el mismo en los individuos que se comparan, con y sin EII. Por lo tanto, y a diferencia de lo que sucedería en un análisis simplificado basado sólo en comparar las frecuencia relativas de HLA en individuos con y sin EII, esta estimación del efecto del EII sobre la prevalencia del HLA no viene afectada por el hecho de que el sexo pueda influir sobre dicha prevalencia y no estén perfectamente equilibrados ambos sexos entre controles y no controles

A continuación, se exponen los fundamentos de los procedimientos estadísticos que se utilizan para estimar, a partir de los datos disponibles, los parámetros de un Modelo de Regresión Logística y para realizar inferencias respecto a los mismos.

En particular, el procedimiento basado en el test de la Razón de Verosimilitudes Generalizada que se expone es el utilizado de forma general en esta tesis para analizar los resultados de los modelos propuestos.

3.3.1 Estimación de los parámetros en el MRL

3.3.1.1 El método de Máxima Verosimilitud

Postulado un determinado MRL, por ejemplo el definido por las expresiones (2) y (1), y conocidas las frecuencias observadas en cada situación (que en nuestro caso serían las X_{ij} correspondientes a las 4 casillas de la Tabla x), la estimación de los parámetros desconocidos del modelo β_i se lleva a cabo mediante el Método de Máxima Verosimilitud.

El fundamento de dicho método radica en tomar como estimadores de los parámetros desconocidos aquellos valores que hacen máxima la Verosimilitud de la muestra, o sea la probabilidad de haber observado precisamente los datos que se han obtenido.

Ejemplo elemental

Veamos un ejemplo aclaratorio, relacionado precisamente con la estimación del MRL. En N observaciones se ha constatado que un determinado suceso se ha presentado x veces. ¿Cuál será el estimador máximo verosímil p^* de la probabilidad p de dicho suceso?

Como la variable aleatoria X "número de veces que se presente un suceso de probabilidad p en N observaciones independientes" sigue una distribución Binomial(N,p), la Verosimilitud de la muestra observada será:

$$V = \text{Pr ob}(X = x) = \binom{N}{x} p^x (1-p)^{N-x}$$

La obtención del valor p^* de p que maximiza la expresión anterior se simplifica si se trabaja con el logaritmo L de V , puesto que, al ser el logaritmo una función monótona creciente p^* , será también el valor que maximiza $\ln(V)$ y los cálculos resultan mucho más sencillos al transformarse los productos en sumas:

$$L = \ln(V) = \ln \binom{N}{x} + x \ln(p) + (N-x) \ln(1-p)$$

Igualando a cero la derivada respecto a p para obtener el máximo se obtiene inmediatamente

$$\frac{dL}{dp} = \frac{x}{p} - \frac{N-x}{1-p} = 0 \quad \rightarrow \quad p^* = \frac{x}{N}$$

resultando, como era de prever, que el estimador máximo verosímil de p es precisamente la frecuencia relativa observada para el suceso.

3.3.1.2 Propiedades de los estimadores máximos verosímiles

Los estimadores obtenidos por el Método de Máxima Verosimilitud gozan en general de buenas propiedades estadísticas, especialmente si, como sucede en nuestro caso, los tamaños muestrales son grandes. Se demuestra, en efecto, que el estimador máximo verosímil $\vec{\theta}^*$ de un determinado vector de k parámetros $\vec{\theta}$ se distribuye asintóticamente de forma normal, siendo asintóticamente insesgado y teniendo una matriz de varianzas-covarianzas “menor o igual”⁷ que la de cualquier otro estimador que sea asintóticamente insesgado.

Se demuestra también que asintóticamente la matriz var-cov de $\vec{\theta}^*$ coincide con la cota de Cramer-Rao multivariante, que es la inversa de la matriz de información, definida esta última como la

matriz kxk cuyo término general es la esperanza matemática de $-\frac{\partial^2 L}{\partial \theta_i \partial \theta_j}$

Ejemplo

Así, en el ejemplo sencillo visto anteriormente, la matriz de información (que en este caso es un escalar dado que sólo hay un parámetro) sería:

$$I = -E \left(\frac{\partial^2 L}{\partial p^2} \right) = -E \left(-\frac{x}{p^2} - \frac{N-x}{(1-p)^2} \right) = \frac{Np}{p^2} + \frac{N-Np}{(1-p)^2} = \frac{N}{p} + \frac{N}{1-p} = \frac{N}{p(1-p)}$$

⁷ Decimos que una matriz A es “menor” que otra B si $A = B + C$ siendo C una matriz semidefinida positiva.

y la varianza de p^* sería la inversa de I , o sea $\frac{p(1-p)}{N}$, que puede estimarse sustituyendo el parámetro p por su estimador máximo verosímil p^* .

3.3.1.3 Estimación máximo verosímil del MRL

Considerando, por ejemplo, el MRL definido por (1) y (2) la verosimilitud conjunta de los 15 valores observados de las N_{ij} vendría dada por la expresión:

$$V = \prod_{i=1}^2 \prod_{j=1}^2 \binom{N_{ij}}{X_{ij}} p_{ij}^{X_{ij}} (1-p_{ij})^{N_{ij}-X_{ij}}$$

siendo, por tanto, el logaritmo de dicha verosimilitud:

$$L = \ln(V) = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \left(\ln \binom{N_{ij}}{X_{ij}} + X_{ij} \ln(p_{ij}) + (N_{ij} - X_{ij}) \ln(1-p_{ij}) \right) \quad (7)$$

donde, de acuerdo con (1) y (2), las p_{ij} están relacionadas de los parámetros a estimar β_i mediante la expresión

$$p_{ij} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 x_{eii} + \beta_2 x_{Sexo}}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x_{eii} + \beta_2 x_{Sexo}}}$$

Los estimadores máximos verosímiles de los parámetros β_i se obtienen calculando mediante técnicas de optimización numérica los valores de dichos parámetros que maximizan la expresión (7).

Como subproducto de este proceso de optimización se obtiene también una estimación de la matriz de información, evaluada sustituyendo en ella los parámetros por sus estimadores, cuya inversa permite estimar la matriz de varianzas-covarianzas de dichos estimadores.

3.3.2 Inferencia en Modelos de Regresión Logística

Una vez estimados los parámetros del modelo, la realización de inferencias respecto a los mismos puede llevarse a cabo utilizando las estimaciones obtenidas para sus varianzas (test de Wald) o,

preferiblemente, aplicando el denominado test de la razón de verosimilitudes generalizada (TRVG), cuyo fundamento se recuerda a continuación.

El TRVG es un procedimiento de inferencia de carácter general, para estudiar si es admisible la hipótesis de que los parámetros de un modelo cumplen o no un determinado conjunto de restricciones.

Ejemplo: en el MRL definido por (1) y (2) se desea estudiar si $\beta_1 = 0$, lo que implicaría que no habría efecto del EII sobre la prevalencia del HLA.

Siendo V la verosimilitud de la muestra (que depende del valor que tengan los parámetros del modelo), el TRVG se basa en el valor de un cociente, cuyo denominador es el máximo valor posible de dicha verosimilitud (que se obtiene sustituyendo los parámetros por sus estimadores máximo verosímiles) y cuyo numerador es el máximo valor posible de la verosimilitud cuando se impone a los parámetros el respetar la restricción a contrastar

$$rv = \frac{\max(V / \text{modelo restringido})}{\max(V / \text{modelo no restringido})}$$

El ratio de verosimilitudes está siempre comprendido entre 0 y 1, siendo tanto más pequeño cuanto menos verosímil sea la restricción impuesta a los parámetros a la luz de los datos disponibles.

Se demuestra en condiciones muy generales que cuando los tamaños muestrales crecen el estadístico $-2\ln(rv)$ tiende a distribuirse como una variable χ_k^2 (siendo k el número de restricciones impuestas) si es cierta la hipótesis nula implicada por las restricciones consideradas. Por tanto, denominando como anteriormente L a $\ln(V)$

$$-2\ln(rv) = 2(L_{\max/\text{modelo no restringido}} - L_{\max/\text{modelo restringido}}) \sim \chi_k^2$$

si son ciertas las restricciones impuestas a los parámetros

Obsérvese que cuanto más pequeño sea rv mayor resultará el valor de $-2\ln(rv)$, por estar rv comprendido entre 0 y 1, y más evidencia habrá a favor de rechazar la hipótesis nula.

En general cualquier software estadístico, por ejemplo Statgraphics, al estimar un MRL proporciona entre sus resultados el máximo obtenido para L . Para obtener el valor máximo de L cuando se imponen restricciones a los parámetros se operará de forma similar a como se hace en

los modelos de regresión ordinarios, estimando un modelo sin restricciones pero cuyo planteamiento lleve implícito el cumplimiento de la, o las, restricciones a considerar. Por ejemplo, plantear el modelo definido por (1) y (2) sin restricciones, pero sin incluir la variable x_{EII} , es equivalente a plantear el modelo completo incluyendo la restricción $\beta_1 = 0$.

En el análisis de los resultados obtenidos al aplicar el MRL al análisis de nuestros datos, el TRVG será utilizado de forma general.

4. Análisis de la Varianza

El Análisis de la Varianza (Anova) es una técnica estadística muy poderosa para el estudio del efecto de uno o más factores sobre la media de una variable.

La idea básica del Anova consiste en descomponer la variabilidad total observada en unos datos en una serie de términos, asociados a los efectos de cada factor estudiado y a sus posibles interacciones, más una parte residual con la que después se compararán las primeras.

Paralelamente a esta descomposición de la SC_{total} en sus componentes, se realiza una descomposición de los "grados de libertad" totales, que son siempre el número de datos menos 1, en los grados de libertad asociados a cada término. Los grados de libertad asociados al efecto de un factor son siempre el número de variantes del factor menos 1, mientras que los de una interacción son el producto de los grados de libertad de los factores correspondientes, quedando como grados de libertad residuales los restantes.

La comparación de la "varianza" asociada a cada efecto con la varianza residual permite estudiar si dicho efecto es o no significativo. Dichas varianzas se estiman dividiendo cada Suma de Cuadrados por sus correspondientes grados de libertad, obteniéndose unos estadísticos a los que se denomina Cuadrados Medios (El CM_{total} , que no es más que la varianza de los datos no acostumbra a calcularse).

El $CM_{residual}$ es una estimación de la σ^2 existente en las poblaciones muestreadas, asumiendo que dichas poblaciones tienen todas la misma σ^2 (o del promedio de dichas varianzas en el caso de que difieran de unas poblaciones a otras). El CM asociado a cada efecto es también una estimación (independiente de la anterior) de dicha σ^2 si dicho efecto no existe en la población, pero tiende a ser mayor que σ^2 en el caso de que exista un efecto real poblacional.

Para ver si el CM de un efecto es significativamente mayor que el $CM_{residual}$, lo que implicaría la existencia de un efecto real a nivel poblacional, se comprueba si el cociente $CM_{efecto}/CM_{residual}$ (al que se denomina F-ratio) es demasiado elevado para ser una F de Fisher con los grados de libertad correspondientes, calculándose para ello el valor *p-value* asociado. Contra menor sea este *p-value*, más fuerte será la evidencia respecto a la existencia poblacional del efecto correspondiente.

Anexo 3: Técnica de tinción inmunohistoquímica

Técnica de Inmunohistoquímica

1. Desparafinar cortes en estufa.
2. Hidratar los cortes pasándolos por xiloles (5 pasos, 20 min. en el primer xilol).
3. Pasarlos por alcoholes graduales (90o, 80o y 70o).
4. Lavar en agua destilada.
(Se utilizara desenmascaramiento antigénico en los anticuerpos que lo necesiten)
5. Inhibir la peroxidasa endógena:
Metanol -H₂O₂ al 3%
Metanol 97 ml
H₂O 2 3 ml
Dejar durante 30 minutos.
6. Lavar en agua destilada.
7. Cerclar las preparaciones con sigmacote (rodeando el corte).
8. Bloquear la colágena para que los aminoácidos no se peguen al colágeno del estroma
Suero de caballo o SBF 2 ml
Suero fisiológico 8 ml
Solución final al 20%
Dejar durante 20 min.
No lavar
9. Poner el primer anticuerpo, siempre diluido en suero de caballo al 10%, o diluyente comercializado. Con 200 µl se cubre el corte. Dejar 45-60 min. a temperatura ambiente.
10. Lavar tres veces con PBS.
11. Poner el anticuerpo secundario en una dilución 1:200, diluido en suero de caballo al 10%, o diluyente comercializado.
Monoclonal: anti-Mouse biotinizado.
Policlonal: anti-rabbit biotinizado (1:400).
Dejar durante 30 minutos.
12. Lavar tres veces con PBS.
13. Poner el complejo Avidina Biotina (ABC), que debe prepararse con 30 min. de anticipación.
Debe diluirse en suero de caballo al 10 %. o diluyente comercializado. Dejar durante 30 minutos.
(El 2º y ABC se puede utilizar productos comercializados)
14. Lavar tres veces con PBS.

15. Revelar con diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica (DAB).

Tris 0.2 M 100 ml

Ajustar a pH 7

DAB 75 mg

H₂O₂ 50 µl

16. Lavar con agua corriente.

17. Contrastar con hematoxilina de Harris, durante 30 seg.

18. Deshidratar con alcoholes graduales (70o, 80o y 90o) y xiloles.

19. Montar los cubreobjetos con entellan.