



FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

# **COMPARACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DE RIESGO GENÉTICO EN LA ENFERMEDAD CELÍACA SEGÚN LA EDAD DE DIAGNÓSTICO**

Patricia Alonso Andrés

DIRECTORES DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER: José A.  
Garrote Adrados y Eduardo Arranz Sanz

**MÁSTER DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Julio, 2014

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD .....	2
1.2. SUSTANCIA CLAVE: EL GLUTEN .....	3
1.3. GENÉTICA .....	3
1.3.1. ESTUDIOS GWAS .....	5
1.3.2. POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPS) .....	5
1.4. INTERLEUCINA 15 Y SU RECEPTOR .....	6
1.5. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO .....	6
1.5.1. ANÁLISIS SEROLÓGICOS .....	7
1.5.2. BIOPSIA INTESTINAL.....	7
1.5.3. ANÁLISIS GENÉTICO .....	8
1.5.4. DIETA LIBRE DE GLUTEN (GLUTEN FREE DIET, GFD) .....	8
1.6. HIPÓTESIS .....	9
1.7. OBJETIVOS .....	9
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1. PROTOCOLO DE GENOTIPAJE DE UN SNP .....	9
2.1.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE .....	10
2.1.2. EXTRACCIÓN DEL DNA .....	10
2.1.3. PCR CUANTITATIVA.....	11
2.2. PROTOCOLO DE GENOTIPAJE HLA .....	12
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	14
2.3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	14
2.3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	15
2.3.3. CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	15
2.3.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	16
<b>3. RESULTADOS</b>	
3.1. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPS).....	16
3.2. ESTUDIO DEL HAPLOTIPO HLA-DQ .....	19
3.2.1. ANÁLISIS DE LA SEROLOGÍA Y EL RIESGO ASOCIADO. RELACIÓN CON LA EDAD DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.....	19
3.2.2. ESTUDIO DE LA HISTOLOGÍA Y EL RIESGO EN ADULTOS.....	22
3.2.3. ASOCIACIÓN DE LAS CLASIFICACIONES DEL RIESGO Y LOS SNPS DEL GEN DEL IL-15RA ESTUDIADOS .....	23
<b>4. DISCUSIÓN</b>	
4.1. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPS).....	25
4.2. ESTUDIO DEL HAPLOTIPO HLA-DQ .....	26
4.2.1. ANÁLISIS DE LA SEROLOGÍA Y EL RIESGO ASOCIADO. RELACIÓN CON LA EDAD DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.....	26
4.2.2. ESTUDIO DE LA HISTOLOGÍA Y EL RIESGO EN ADULTOS.....	26
4.2.3. ASOCIACIÓN DE LAS CLASIFICACIONES DEL RIESGO Y LOS SNPS DEL GEN DEL IL-15RA ESTUDIADOS .....	27
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	27
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	28

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad celíaca es una patología crónica, de tipo inmune que se manifiesta en individuos genéticamente susceptibles, caracterizada por la intolerancia al gluten de trigo y a otras prolaminas ingeridas (Fernandez-Jimenez et al., 2011), desarrollando en la mayoría de los casos, una cascada de respuesta innata y adaptativa inmune (Trynka et al., 2010).

Este trastorno inflamatorio afecta al intestino delgado y se caracteriza por linfocitosis intraepitelial y de la lámina propia, presencia de anticuerpos transglutaminasa (Arranz y Garrote, 2010), atrofia de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas (Santín et al., 2007), y presencia de una respuesta mediada por células T CD4<sup>+</sup> específicas contra el gluten. Todo este conjunto puede llegar a destruir el epitelio y la mucosa intestinal (Jabri y Sollid, 2006).

En 1953, el pediatra Willem Dicke asoció el consumo de pan blanco y cereales a la enfermedad celíaca (Dicke et al., 1953). Los síntomas que presentaban sus pacientes eran diversos: diarrea crónica, distensión abdominal y caquexia progresiva. El tratamiento propuesto por Dicke, fue mantener a los enfermos celíacos con una dieta libre de gluten (Van Berge-Henegouwen y Mulder, 1993).

Actualmente, las manifestaciones observadas son muy diversas (malabsorción, diarrea, anemia...) y no se centran exclusivamente en el sistema digestivo, sino que pueden afectar a todo el organismo. Además, la sintomatología puede ser grave y causar enfermedades neurológicas y alteraciones en la piel, como la dermatitis herpetiforme, consecuencia de la acumulación de anticuerpos IgA en la misma. En otras ocasiones, las complicaciones afectan a las células T, como la enteropatía asociada a linfoma de células T (EATL) (Jabri y Sollid, 2006).

La siguiente tabla recoge los principales síntomas observados en la enfermedad celíaca.

PRINCIPALES SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA	
Malabsorción sintomática	Obesidad (en casos sin diarrea)
Diarrea y pérdida de peso	Síndrome de colon irritable
Diarrea crónica con o sin dolor abdominal	Retraso en el desarrollo y pequeña estatura
Deficiencia crónica de hierro y anemia	Artralgia
Enfermedad metabólica y osteoporosis prematura	Hemosiderosis pulmonar
Elevación de las enzimas del hígado	Infertilidad masculina o femenina
Dermatitis herpetiforme	Dispepsia
Neuropatía periférica	Amenorrea
Úlceras aftósicas orales	Fatiga crónica
Pérdida de peso inexplicable	Epilepsia o ataxia
Enfermedades del tiroides	Constipación
Deficiencia de ácido fólico	Dolor abdominal recurrente.

Tabla 1: **Principal sintomatología observada en la enfermedad celíaca.** Rubio-Tapia et al, 2013; Sollid y Lundin, 2009; Lebwohl et al, 2012.

## 1.2. SUSTANCIA CLAVE: EL GLUTEN

Se sabe que el desencadenante de la enfermedad celíaca es el gluten, que se encuentra en el trigo, la cebada, el centeno y otros cereales (Sollid y Lundin, 2009). Los componentes del gluten, se conocen también como prolaminas, debido a su composición: aproximadamente 15% de prolina y 30% de glutamina, unidos por puentes disulfuro. Además, las prolaminas son poco solubles en ambientes acuosos y tienden a formar grandes agregados estabilizados por puentes de hidrógeno entre glutaminas repetidas. Todas estas características confieren al gluten una resistencia a la degradación por proteasas intestinales, generando grandes fragmentos de gluten (10-50 residuos), consecuencia de la digestión incompleta (Meresse et al., 2009).

En individuos genéticamente predispuestos, después de la ingestión del gluten, los fragmentos del mismo pueden atravesar la barrera epitelial, donde son reconocidos de forma muy afín por la transglutaminasa de tipo II. Esta enzima, realiza el proceso de deaminación de la glutamina a glutamato (Jabri y Sollid, 2009), de manera que porta a los péptidos de gluten de carga negativa, aumentando así su inmunogenicidad. Los péptidos de gluten que han sido deaminados por la transglutaminasa, se unen mejor a las moléculas de HLA tipo II (DQ2 o DQ8). Debido a la unión, se crea una respuesta mediada por linfocitos T  $CD4^+$ , con la producción de citoquinas proinflamatorias, como los interferones y la interleucina 15, entre otras. La producción de moléculas de carácter proinflamatorio, produce la remodelación y destrucción del tejido por parte de células NK (Harmon et al., 2011) y la generación de anticuerpos frente al gluten y autoanticuerpos contra la transglutaminasa endógena (Trynka et al., 2010).

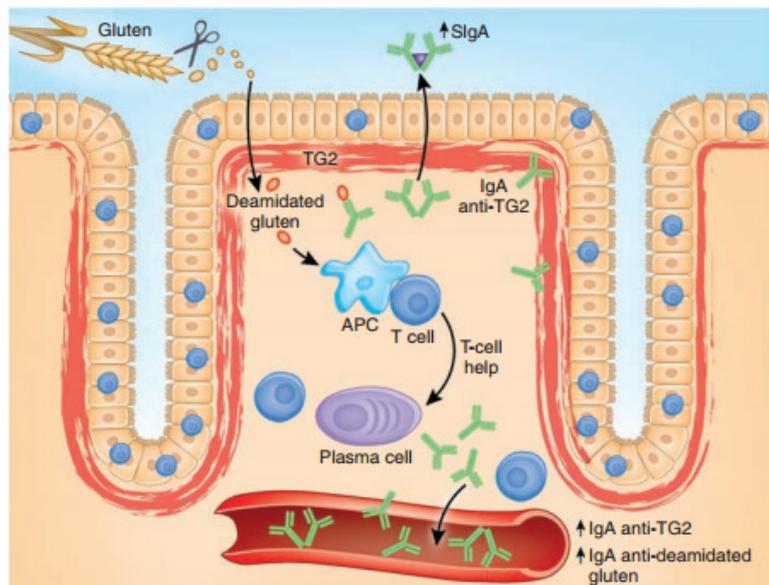


Figura 1: **Proceso esquemático que siguen los péptidos de gluten tras la ingestión en el intestino y principales consecuencias moleculares observadas en la respuesta inmune** (Sollid L.M., Lundin, 2009).

## 1.3. GENÉTICA

Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), tipo I y tipo II, desempeñan una función clave en el sistema inmune, ya que son los encargados de la presentación antigénica a las células T. Ambas clases, presentan desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium), donde dos alelos o genes en el mismo cromosoma, suelen asociarse con elevada frecuencia (Megiorni y Pizzuti, 2012). A su vez, las

moléculas del MHC de tipo II se dividen en tres grupos: HLA-DR (DRB1 y DRA), HLA-DQ (DQA1 y DQB1) y HLA-DP (DPA1 y DPB1) (Jabri y Sollid, 2006). Los heterodímeros de las moléculas de HLA de tipo II con los antígenos que han reconocido, desencadenan una respuesta humoral, en la que están involucradas las células T CD4<sup>+</sup> (Megiorni y Pizzuti, 2012).

Sollid et al., en 1989, estudiaron la posible relación entre la enfermedad celíaca y el heterodímero HLA-DQ  $\alpha/\beta$ . En la mayoría de los casos analizados, los pacientes celíacos portaban el heterodímero HLA-DQ  $\alpha/\beta$  codificado por DQA1 y DQB1.

Se ha comprobado que la afirmación de Sollid es cierta: la enfermedad celíaca se asocia a genes HLA tipo II, codificado por el cromosoma 6p21 (locus CELIAC1), con determinadas funciones de carácter inmune (Trynka et al., 2010). Cerca del 90% de los celíacos expresan el heterodímero HLA-DQ2 con cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  codificadas por HLA-DQA1\*05 y HLA-DQB1\*02, respectivamente. En menor proporción (5-10%), los pacientes presentan una genética positiva para DQ8 codificado por HLA-DQA\*03 (cadena  $\alpha$ ) y HLA-DQB1\*0302 (cadena  $\beta$ ) (Meresse et al., 2009).

Las moléculas HLA II predisponen al 35-40% de los pacientes a padecer celiaquía (Trynka et al., 2010). Sin embargo, la genética no es el único determinante para desarrollar la enfermedad celíaca: el 25% de la población es portadora de DQ2, y solo el 1% manifiesta la enfermedad (Sollid y Lie, 2005). Por tanto, estos datos sugieren que existen otros factores genéticos y ambientales, que pueden contribuir al desarrollo de esta patología (Arranz y Garrote, 2010). Otros loci candidatos han sido estudiados, pero solo tres regiones cromosómicas han sido reconocidas como factores genéticos de predisposición. Estas regiones son: 5q31-33 (CELIAC2), 2q33 (CELIAC 3) y 19q13.1 (CELIAC 4) (Megiorni y Pizzuti, 2012).

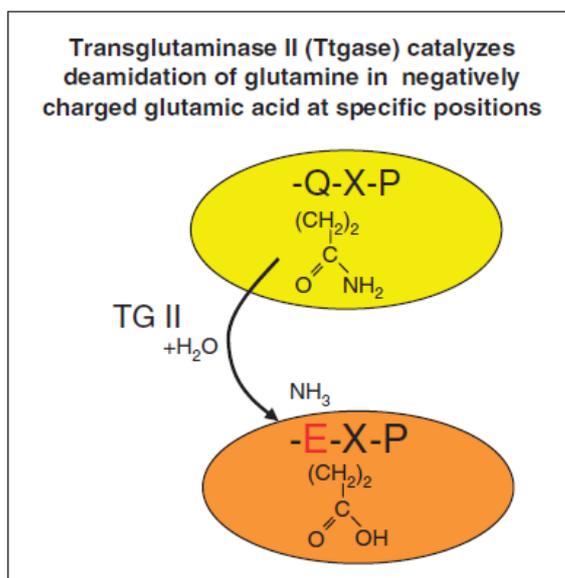


Figura 2: Esquema representativo de la deamidación de la glutamina a ácido glutámico por la transglutaminasa II (Meresse et al., 2009).

Además, estas moléculas HLA-II presentan alta afinidad por péptidos de gluten procedentes de una digestión incompleta, que han sido deamidados por la transglutaminasa de tipo 2. Los péptidos con carga negativa, interaccionan con las cargas positivas que se encuentran en los “bolsillos” de los dímeros de moléculas HLA-DQ2/8. Este contacto forma complejos estables que pueden ser reconocidos por células T (Medrano et al., 2012). Las interacciones clave suceden en nueve aminoácidos (Arranz y Garrote, 2010) P4, P6 y P7 para DQ2, y P1 y P9 para DQ8 (Megiorni y Pizzuti, 2012). El reconocimiento

desencadena una cascada de citoquinas (principalmente IL-15 e IL-21) e interferones (IFN- $\alpha$ ) proinflamatorios, causando una remodelación del tejido. Consecuentemente, se induce la formación de anticuerpos frente al gluten, y autoanticuerpos hacia la transglutaminasa endógena.

Todo ello genera un desequilibrio de la inmunidad en la mucosa intestinal, caracterizando la enfermedad celíaca (Trynka et al., 2010).

Los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02 se presentan frecuentemente en el mismo cromosoma, en conformación cis generando el haplotipo DR3 (DQ2.5 cis, DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01), pero también puede presentarse en trans, es decir, cada alelo en un cromosoma parental distinto, haplotipo DR5 o DR7 (DQ2.5 trans, DRB1\*11/12-DQA1\*05:05-DQB1\*03:01; DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02) (Medrano et al., 2012). Un haplotipo se define como las combinaciones de alelos en un loci adecuado, de cada cromosoma. Por otra parte, los dímeros de DQ8 vienen codificados por el alelo DQB1\*03:02, generalmente en combinación con variantes del alelo DQA1\*03 en posición cis, generando el haplotipo DR4 (DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02) (Megiorni y Pizzuti, 2012).

En 2004, Van Belzen et al., estudiaron que en algunas poblaciones europeas del norte, los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02 se presentan frecuentemente en un haplotipo que a su vez está relacionado con otros trastornos autoinmunes: diabetes mellitus tipo I, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto y miastenia gravis. Además, existen evidencias de que los celíacos que son homocigotos para DQB1\*02 en presencia de DQA1\*05, tienen un alto riesgo de desarrollar la enfermedad de forma severa (Ploski et al., 1993), (Conia et al., 1994), (Mustalahti et al., 2002), (Karinen et al., 2006), e incluso que la presencia de DQB1\*02 condiciona la aparición temprana de la enfermedad (Murray et al., 2007). Medrano y su grupo (2012), citan que la susceptibilidad a padecer la enfermedad es dependiente de la dosis alélica. Por ejemplo, existe alta probabilidad de desarrollar la enfermedad cuando hay homocigosidad para DQ2.5 cis o heterocigosidad para DQ 2.5 cis, si además hay presencia de un segundo alelo HLA-DQB1\*02.

### 1.3.1. ESTUDIOS GWAS

Para analizar otros genes que podrían estar implicados en la enfermedad celíaca, se han llevado a cabo estudios amplios de asociación al genoma (GWAS o Genome Wide Association Studies). Estos estudios han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido en regiones no-HLA de tipo inmune que codifican para citoquinas, quemoquinas y sus receptores, moléculas de adhesión y activadores de células T y B (Megiorni y Pizzuti, 2012). Se estima que las variantes de la enfermedad celíaca, incluyendo los haplotipos descritos y otros 26 loci implicados, representan un 15-20% de la variabilidad (Dubois et al., 2010). Trynka y su grupo (2010) sugieren que pueden existir otros 39 loci no-HLA que colaboran con la enfermedad celíaca.

### 1.3.2. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs)

Un polimorfismo de un solo nucleótido o *single nucleotide polymorphism* (SNP), es un cambio de un nucleótido en la secuencia de un gen, que se encuentra al menos en el 1% de la población. Para su detección se emplean sondas u oligonucleótidos que cubren la región de interés a analizar. Plaza-Izurrieta et al. (2011), genotiparon 11 SNPs mediante sondas Taqman, en ocho regiones analizadas previamente por GWAS. Los

polimorfismos se vieron en distintos genes, algunos de ellos interleucinas (IL12A, IL18RAP, IL21...). Muchos de estos cambios afectan a genes con función inmune, como los relacionados con la respuesta Th17 (Medrano et al., 2012), o con importantes funciones en la selección de células T en el timo (Dubois et al., 2010).

Además, los estudios de polimorfismos ayudan a determinar si la frecuencia alélica de ciertos genes está aumentada en pacientes celíacos, lo cual, determinaría que ese gen estuviera involucrado en la enfermedad. En otros casos, se puede ver que no existe relación de un gen con la enfermedad, por ejemplo, el gen IFNG codificante para el interferón  $\gamma$ , cuya expresión no está aumentada (Wapenaar et al., 2004) o STAT1, sin relación con la enfermedad celíaca en una población holandesa (Diosdado et al., 2006).

En 2011, Fernández-Jiménez et al., encontraron que la expresión del gen KIR3DL1 era mayor en pacientes con la enfermedad celíaca activa, que en pacientes con dieta sin gluten o sin la enfermedad. Hunt et al., (2008) comprobaron que existían regiones génicas alteradas comunes en la diabetes tipo I y la enfermedad celíaca (HLADQ, IL2/IL21, CCR3 y SH2B3). Además, se ha demostrado que hay asociación de la enfermedad celíaca con el receptor de la interleucina IL23R en poblaciones suizas con enfermedad inflamatoria intestinal (Einarsdottir et al., 2009).

Otros estudios de polimorfismos han sido llevados a cabo por Castellanos-Rubio y su grupo (2008), relacionados con el número de copias del gen de la  $\beta$ -defensina en la enfermedad celíaca, la implicación de los genes TLR (Fernández-Jiménez et al., 2010), y por otra parte, la asociación de un polimorfismo en el gen de la ubiquitina D (Castellanos-Rubio et al. 2010).

#### **1.4. INTERLEUCINA 15 Y SU RECEPTOR**

La interleucina 15 (IL-15) posee efectos específicos de la inmunidad innata (reprogramación NK-like de los linfocitos intraepiteliales, o la inducción de moléculas de estrés), pero también conecta con la respuesta adaptativa al ser un potente activador de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. El receptor de la IL-15 tiene en común dos subunidades con la IL-2 (IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma/\gamma_c$ ), aunque el papel que desempeña es distinto. El receptor de la IL-15 posee un rango de actuación mayor, fundamentalmente en la respuesta innata. La subunidad IL-15R $\alpha$  es la encargada de conferir gran especificidad de unión a su ligando, la IL-15. Se ha observado que pacientes con enfermedad celíaca tienen aumentados los niveles del receptor IL-15R $\alpha$ , incluso una vez normalizada la histología de la mucosa. Este aumento del receptor, disminuye el umbral de respuesta frente a la IL-15, predisponiendo a aquellos pacientes a desarrollar respuesta innata y adaptativa frente al gluten (Arranz y Garrote, 2011).

#### **1.5. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

Cuando hay sospecha de padecer la enfermedad celíaca, por la sintomatología, o por tener familiares próximos con dicha enfermedad, se recurre a un conjunto de técnicas que se emplean con el fin de confirmar el diagnóstico. Entre ellas encontramos: biopsias, análisis serológicos y análisis de genotipo.

### 1.5.1. ANÁLISIS SEROLÓGICOS

Los test serológicos son clave para la detección de la enfermedad. Los anticuerpos buscados son contra gliadina y péptidos deamidados, y contra componentes del tejido conectivo (anticuerpos antitransglutaminasa y anticuerpos antiendomiso) (Lebwohl et al., 2012). Los celíacos sin tratar tienen incrementados los anticuerpos IgA e IgG contra el gluten de trigo y contra el autoantígeno transglutaminasa II (TG2). Estos anticuerpos suelen desaparecer cuando los pacientes comienzan la dieta GFD. Antes de que los anticuerpos TG2 fueran identificados como los autoanticuerpos diana de la enfermedad celíaca, se empleaban para el diagnóstico los anticuerpos antiendomiso. Posteriormente, se empleó el test ELISA, que reconoce como antígeno TG2 y gliadina. Las inmunoglobulinas IgA contra gliadina y TG2 son más específicas que las inmunoglobulinas IgG, que se emplean en situaciones de deficiencia de IgA (Sollid y Lundin, 2009).

### 1.5.2. BIOPSIA INTESTINAL

La biopsia intestinal es la mejor técnica para confirmar o rechazar el diagnóstico de la enfermedad celíaca, aunque no en todos los casos se puede realizar. Se suele solicitar cuando hay un resultado positivo de serología, cuando hay síntomas evidentes o un test genético positivo. Los cambios histopatológicos del intestino suelen perdurar varios años, aún así, se recomienda no empezar una dieta excluyente de gluten, sin haber completado el diagnóstico de la enfermedad de una forma precisa y detallada (Lebwohl et al, 2012).

Se considera un diagnóstico de biopsia positivo, cuando el intestino delgado tiene una morfología que muestra linfocitosis intraepitelial, infiltración de la lámina propia con células T y células plasmáticas, atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas (Sollid y Lundin, 2009). La escala de Marsh establece una clasificación de la enfermedad celíaca, en función de los resultados de la biopsia (Tabla 2).

Escala de Marsh (modificada, Oberhuber)	Incremento de linfocitos intraepiteliales (>40linfocitos /100enterocitos)	Hiperplasia de las criptas	Atrofia vellositaria
Tipo 0	No	No	No
Tipo 1	Sí	No	No
Tipo 2	Sí	Sí	No
Tipo 3a	Sí	Sí	Sí (parcial)
Tipo 3b	Sí	Sí	Sí (subtotal)
Tipo 3c	Sí	Sí	Sí (total)

Tabla 2: Clasificación de la enfermedad celíaca según la escala de Marsh modificada (Oberhuber) (Rubio-Tapia, et al, 2013).

### 1.5.3. ANÁLISIS GENÉTICO

La mayoría de los celíacos son HLA-DQ2 o HLA-DQ8 positivos, siendo muy frecuente (95%) la presencia de DQ2 en los pacientes. Sin embargo, no siempre la existencia de HLA-DQ2 o DQ8 significa que se manifieste la enfermedad (Lebwohl et al., 2012). Por el contrario, la ausencia de estos heterodímeros tiene un alto valor predictivo negativo (Piccini et al., 2012).

En otras ocasiones, puede suceder que los pacientes no expresen ni DQ2 ni DQ8 completos, por tanto, son considerados portadores de algunos de los alelos de riesgo que forman parte de los haplotipos de interés. Tampoco hay que olvidar que solamente el 2% de los portadores DQ2 o DQ8 desarrollan la enfermedad (Arranz y Garrote, 2010), lo cual, hace más evidente la probabilidad de que otros genes o factores estén involucrados en la enfermedad celíaca (Jabri y Sollid, 2009).

La frecuencia de padecer esta enfermedad está incrementada en aquellos pacientes que cuentan con un familiar de primer grado afectado. El mayor riesgo está asociado a gemelos monocigóticos, después, hermanos con el mismo sistema HLA, seguido de hermanos sin concordancia HLA, y por último, padres e hijos de pacientes con la enfermedad. El riesgo de sufrir la enfermedad celíaca disminuye en relaciones familiares de segundo grado (Rubio-Tapia et al, 2013).

El empleo de test genéticos puede ser muy útil para descartar la enfermedad en algunos casos en los cuales, la biopsia de intestino delgado no puede proporcionar un diagnóstico preciso que confirme o rechace la enfermedad (Kaukinen et al., 2002). Además, puede realizarse en pacientes con dieta libre de gluten (GFD), ya que la presencia de los alelos DQ2/DQ8 no cambia.

Todas las técnicas de diagnóstico cuentan con una serie de limitaciones que hacen que se necesiten combinaciones de ellas para poder confirmar la enfermedad. Fernández-Cavada-Pollo et al, (2013) citan los criterios establecidos por la *ESPGHAN (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition)* para el diagnóstico de la celiacía. Según Catassi y Fasano (2010), la presencia de cuatro de estos cinco criterios, sería suficiente y necesario para poder confirmar la enfermedad celíaca.

- Síntomas de la enfermedad celíaca.
- Serología positiva a título alto.
- Presencia de haplotipo DQ2 o DQ8.
- Características histopatológicas determinadas.
- Respuesta serológica o histopatológica a una dieta GFD.

### 1.5.4. DIETA LIBRE DE GLUTEN (GLUTEN FREE DIET, GFD)

Una dieta libre de gluten, en condiciones generales mejora o elimina los síntomas reparando el daño intestinal en la mayoría de los pacientes con enfermedad celíaca. Se recomienda a todos los pacientes que tienen el diagnóstico hecho, aunque desafortunadamente no todos responden a este tipo de dieta, causando graves complicaciones (Rubio-Tapia et al., 2013).

La dieta GFD, implica la eliminación del trigo, cebada, centeno, y otros cereales próximos, incluida la espelta. En esta restricción puede incluirse también la avena, dependiendo del país, ya que en algunos casos, este compuesto puede no ser tolerado por los pacientes (Sollid y Lundin, 2009). La dieta GFD permite cantidades inferiores a 20 ppm de gluten, según el Codex Alimentarius (Rubio-Tapia et al., 2013).

## **1.6. HIPÓTESIS**

Adultos y niños presentan diferencias de comportamiento en la enfermedad celíaca. Estas distinciones se aprecian en la genética (haplotipos) de riesgo presentada, en los niveles de anticuerpos detectados, y en la respuesta frente a variaciones en la secuencia de determinados genes relacionados.

Previamente, en el grupo de investigación, se ha comprobado que existen variaciones en la aparición del receptor IL15RA en individuos celíacos y sanos. Por ello, con este trabajo, se pretenden estudiar las diferencias en las frecuencias de los alelos de los polimorfismos (localizados en este receptor) en cada grupo de análisis: adultos y niños. También, se quiere comprobar si la genética de riesgo presentada en celíacos tiene alguna relación con la edad de aparición de la enfermedad. Además, se analizan otros parámetros, como los anticuerpos (antiendomiso, transglutaminasa) presentados, la histología de los pacientes y el seguimiento de una dieta libre de gluten.

## **1.7. OBJETIVOS**

En este trabajo se engloban unos objetivos básicos. En primer lugar, la selección de pacientes en las consultas de Digestivo de adulto e infantil (Hospital Río Hortega, Valladolid), con posibilidad de padecer la enfermedad celíaca. En segundo lugar, la recogida de datos biológicos de serología y anatomía patológica, útiles para la clasificación de los individuos. Tercero, la comparación de frecuencias de serotipos de riesgo HLA-DQ en adultos y niños. Por último, el cotejo de frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs del receptor A de la interleucina 15 (IL-15RA).

Este trabajo formaría parte de un proyecto más amplio, que contaría con más casos y mayor número de polimorfismos de un solo nucleótido a analizar. Con el presente estudio, se pretenden obtener resultados preliminares, así como la puesta a punto del protocolo de trabajo.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. PROTOCOLO DE GENOTIPAJE DE UN SNP**

Para realizar el genotipaje de polimorfismos de un nucleótido (SNP), en primer lugar, se debe procesar las muestras de sangre a analizar, seguido de la extracción del ADN de las células aisladas de la sangre. Posteriormente, las muestras son cargadas en placas de 96 pocillos con distintas sondas y son sometidas a un programa de PCR cuantitativa con el objetivo de cubrir los cuatro polimorfismos que deseamos estudiar.

### 2.1.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre a analizar se encuentran en tubos de cristal donde se observan dos fracciones, la superior de color amarillo o transparente, que corresponde al plasma y la inferior de color rojo, que contiene las células. Se separa con cuidado el sobrenadante claro y se deposita en tubos eppendorf. Estos tubos se centrifugan a 10000 rpm durante 1 minuto. De aquí se extrae el sobrenadante (suero), que se almacenará, para posteriores estudios.

La fracción inferior del tubo inicial de la muestra, se cambia a otro tubo (10 ml). Para recoger la mayor parte de volumen, se añaden varias gotas de solución de lisis (10mM Tris pH=7.6; 10mM KCl; 10nM MgCl<sub>2</sub>+6H<sub>2</sub>O), que debe ser calentada previamente en el microondas. Se completa el volumen total de los tubos con esta misma solución y además, se añaden tres gotas de *Nonidet P40* a cada muestra. *Nonidet* es un detergente suave que disgrega las membranas celulares. Se deja actuar el conjunto de soluciones unos 10 minutos en la noria. Las muestras se centrifugan a 1200 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retira con cuidado y se reserva el pellet para la posterior extracción de DNA.

### 2.1.2. EXTRACCIÓN DEL DNA

Para extraer el DNA genómico de las células aisladas de la sangre se siguieron las indicaciones del protocolo comercial *UltraClean™ Blood DNA Isolation Kit de MO BIO laboratorios*.

1. Añadir 900 µl de Solución G1 (cloruro amónico) al pellet obtenido en el procesamiento de las 31 muestras y pasar cada muestra a un tubo de 2 ml procedentes del kit.
2. Invertir dos veces cada tubo e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Además, se deben invertir otras dos veces durante la incubación.
3. Los tubos se centrifugan 30 segundos a 13000 rpm. Se elimina el sobrenadante con una pipeta de punta fina, sin tocar el pellet.
4. Mezclar las muestras en el vórtex y añadir 300 µl de solución G2 (detergente).
5. Se pipetea varias veces para lisar las células e intentar deshacer los agregados celulares.
6. Para eliminar el ARN, se añaden 1.5 µl de RNasa A (25mg/ml), se invierten 5 veces y con ayuda de vórtex, se mezclan a baja velocidad durante 5 segundos. La RNasa se debe conservar a 4°C. Este paso ayuda en la purificación del ADN, pero no es imprescindible.
7. Añadir a los tubos 100 µl de solución G3 (acetato de amonio) y mezclar con el vórtex a alta velocidad 15 segundos.
8. Después, se centrifugan 3 minutos a 13000 rpm.
9. De cada muestra se toma el sobrenadante claro y se transfiere a un tubo limpio de 2 ml.
10. Se añaden 300 µl de Isopropanol 100%.
11. Las muestras se invierten 15 veces y se incuban a temperatura ambiente durante 3 minutos.
12. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm.

13. Con cuidado, se elimina el sobrenadante vertiendo el tubo y limpiando el sobrenadante que pueda quedar en el borde con un papel.
14. Se añaden 300 µl de etanol al 70% (70% de etanol en agua libre de ADN).
15. Invertir 5 veces para lavar.
16. Centrifugar 30 segundos a 13000 rpm.
17. Repetir el proceso anterior, eliminando el sobrenadante con cuidado de no desechar el pellet.
18. Los tubos se centrifugan 30 segundos y se elimina el sobrenadante con una pipeta de punta fina.
19. Las muestras se dejan secar en la estufa a 37°C durante 1 hora, con la tapa abierta, en una caja con papel húmedo.
20. Por último, a cada tubo con el ADN, se añaden 100 µl de solución G4 (Tris en agua libre de ADN) para resuspender material genético.

### 2.1.3. PCR CUANTITATIVA

En primer lugar se ha optimizado el protocolo de qPCR (*quantitative PCR*) estudiando varias concentraciones de ADN de las muestras, cuantificadas previamente, mediante NanoDrop. El volumen final de reacción en cada pocillo son 10 µl. El resto de componentes se especifican en la siguiente tabla:

Componentes	Volumen
LightCycler® 480 Probes Master, H2O, PCR-grade	1,5 µl
Sonda (40x)	1 µl
LightCycler® 480 Probes Master (2x)	5 µl
ADN (20-85 ng/µl)	2,5 µl
<i>Volumen final</i>	<i>10 µl</i>

Tabla 3: Componentes y cantidades necesarias para que funcione correctamente la PCR cuantitativa llevada a cabo en el estudio.

En total se emplearon cuatro sondas Taqman distintas, numeradas del 1 al 4, específicas para cuatro polimorfismos, de *Applied Biosystems* (Tabla 4).

Sonda	Referencia	Polimorfismo (SNP)	[VIC/FAM]	Localización Cromosómica	Alelo de menor frecuencia(MAF)
1	C__15751911_10	rs2296139	[T/C]	Chr. 10 - 6008172	T=0,199/433
2	C__3102586_10	rs8177685	[C/T]	Chr. 10 - 6008613	C=0,209/456
3	C__1882532_10	rs3136614	[A/G]	Chr. 10 - 6005674	G=0,144/344
4	C__1882552_20	rs8177636	[C/T]	Chr. 10 - 6018594	C=0,243/530

Tabla 4: **Sondas Taqman empleadas en el estudio.** Se indica la referencia, el SNP analizado, el nucleótido visible en cada canal de fluorescencia, la localización cromosómica y el alelo de menor frecuencia determinante del polimorfismo de un solo nucleótido.

Para realizar el genotipaje de las 31 muestras obtenidas se realiza una PCR cuantitativa mediante el sistema *LightCycler® 480 Instrument Probes Master Version 9.0*. El programa elegido es *Dual Color Hydrolysis UPL Probe-Probe 96-11*, que realiza la medida para dos fluorocromos distintos: VIC y FAM. Los ciclos del proceso se indican en la tabla 5.

El programa realiza la medida del fluoróforo FAM desde 465 a 510 nm, mientras que para VIC (Hex/Yellow) toma un rango desde 533 a 580 nm. El software nos proporciona una tabla para cada una de las sondas estudiadas, con las muestras clasificadas como “alelo X”, “alelo Y” o “ambos”. Además, nos ilustra esta clasificación en un gráfico en el cual X corresponde al fluoróforo FAM, e Y corresponde a VIC. También el programa refleja las curvas de las fluorescencias emitidas por cada sonda empleada.

PROGRAMA				
Nombre del programa	Ciclos		Modo de análisis	
Pre-incubación	1		Ninguno	
Amplificación	45		Cuantificación	
Enfriamiento	1		Ninguno	
CONDICIONES				
Temperatura (°C)	Modo de adquisición	Tiempo	Ratio de descenso (°C/s)	Adquisiciones (por °C)
<b>Pre-incubación</b>				
95	Ninguno	00:05:00	4.4	-
<b>Amplificación</b>				
95	Ninguno	00:00:10	4.4	-
60	Ninguno	00:00:30	2.2	-
72	Único	00:00:30	4.4	-
<b>Enfriamiento</b>				
40	Ninguno	00:00:10	1.5	-

Tabla 5: Programa detallado de la PCR cuantitativa realizada en el estudio. Se indican las fases, ciclos, temperatura, modo de adquisición, tiempo, ratio de descenso y modo de análisis.

## 2.2. PROTOCOLO DE GENOTIPAJE HLA

Se realizó un protocolo de PCR para el tipaje de genes DQA1 (DQA1\*05 y DQA1\*03) y DQB1 (DQB1\*02 y DQB1\*0302). Este protocolo se realiza mediante los reactivos de *INNOGENETICS “80704 INNO-LIPA HLA-DQA1 Multiplex”* y *“80337 INNO-LIPA HLA-DQB1 Multiplex”* para la PCR, con hibridación mediante sondas fijadas en membrana *“INNO-LIPA HLA-DQA1”* e *“INNO-LIPA HLA-DQB1”*, respectivamente.

- Gen HLA-DQA1 (OMIM\*146880): se amplifican el exón 1, generando un amplicón de 265 pb y el exón (2+3), generando un amplicón de 1065 pb.
- Gen HLA-DQB1 (OMIM\*604350): se amplifican el exón 2 (amplicón de 261 pb) y el exón 3 (amplicón de 250 pb).

Para la susceptibilidad a la Enfermedad Celíaca, sería suficiente con resolver a nivel de grupo alélico (dos dígitos), excepto para el DQB1\*0302 (DQ8), que debe resolverse a nivel alélico (cuatro dígitos).

#### **a) Procedimiento para la PCR:**

En campana de flujo, se preparan dos juegos de tubos de PCR de 250 µl.

- Preparar las mezclas de reacción en sendos tubos eppendorf o viales cónicos, siguiendo la de la hoja de trabajo.
- Las muestras se vortearán y después, muestras y controles se centrifugarán (un pulso).
- Poner 45µl de cada mezcla en cada tubo de PCR del juego correspondiente.
- Poner entre 0,1 y 7,5µg de DNA (aproximadamente 5µl de cada muestra, control, o blanco [agua]) en los tubos correspondientes de cada juego, según hoja de trabajo. Completar el volumen total de muestra con agua hasta 5µl.
- Cerrar los tubos de PCR y centrifugar o sacudir cada tubo para que la mezcla y el DNA se depositen en el fondo del tubo. NO VORTEAR.
- Encender el termociclador para que se caliente, poner los tubos y seleccionar: PROGRAMA HLA-DQ (tabla 6).
- Una vez terminada la PCR, guardar a 4° C (o congelar si no se va a hibridar en las siguientes 24h).
- Los productos de PCR deben comprobarse por electroforesis (10 µl/muestra) en agarosa al 2%, junto con un marcador de peso molecular.

<b>PROGRAMA</b>		
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Nº ciclos</b>
95	00:05:00	1
95	00:00:30	35
58	00:00:20	
72	00:00:30	
72	00:10:00	1
4	Conservación	-

Tabla 6: Programa de PCR para el genotipaje de alelos HLA-DQ.

#### **b) Procedimiento para la hibridación**

La hibridación se realizara en el *AUTO-LIPA 30 ó 48*. Cada muestra se hibridará en dos membranas (HLA-DQA1 y HLA-DQB1, en lo sucesivo tiras), marcadas con una línea verde (HLA-DQA1) o marrón (HLA-DQB1). Se siguen cuatro pasos fundamentales.

1. Encendido del aparato. Se colocan los reactivos en la placa calefactora y se prepara el volumen correspondiente de las soluciones de hibridación, lavado astringente, diluyente de sustrato, tampón de aclarado, conjugado y sustrato

- diluidos. Se comprueban otros parámetros y se selecciona el programa HLA56V3 a 55°C.
2. Preparación de la hibridación. En las bandejas adecuadas se añade al producto de PCR la solución de desnaturalización y se tapa.
  3. Programación y marcha del equipo según el programa indicado, introduciendo la posición de la primera cubeta ocupada. El proceso mantiene las tiras en tampón.
  4. Mantenimiento diario y apagado. Una vez terminado el uso hay que lavar con agua destilada mediante un programa de auto lavado.

### **c) Lectura e Interpretación:**

Se sacan las tiras de las cubetas, se depositan sobre un papel secante y se colocan sobre las hojas de lectura. Cada tira se pega en una banda adhesiva bien estirada y se alinea con la banda de control. La hoja se digitalizará e interpretará con el programa *LIRAS*, aunque podría hacerse de manera manual comparando los resultados con tablas de tipado. El escáner requiere una calibración previa anterior a la lectura. Las tiras se deben fijar en una hoja de lectura *Lipa-Scan Reading Template*, en la posición adecuada. La interpretación de las tiras se incluirá en la base de datos general. Al seleccionar cada tira, aparecerá con su resultado.

Cada haplotipo requiere uno o dos alelos determinados (Tabla 7), en posición cis o trans, confiriendo un riesgo relativo a manifestar la enfermedad. Este riesgo se modifica según los posibles alelos que acompañen al de interés.

Haplotipo	Alelo	Posición	Dosis génica necesaria	Riesgo relativo (solo ese alelo)
DQ2.5	DQA1*05	Cis	1	Alto
DQ2.2	DQB1*02	Trans	2	Intermedio
DQ7.5	DQB1*02	Trans	2	Bajo
DQ8	DQA1*03	Cis	2	Intermedio
	DQB1*0302			

Tabla 7: **Principales haplotipos de riesgo en la enfermedad celíaca.** Se indican los alelos involucrados, la dosis génica, posición y riesgo relativo.

## **2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **2.3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

El presente trabajo, se puede dividir en dos objetivos principales: análisis de cuatro SNPs del receptor A de la IL-15 y estudio del haplotipo HLA-DQ en pacientes celíacos.

Se pretende confirmar si la presencia de cuatro variaciones conocidas en la secuencia del gen del receptor de la IL-15, está relacionada con la edad de aparición de la enfermedad celíaca.

Por otra parte, se pretende comparar los distintos niveles de riesgo teórico asociados a cada haplotipo HLA-DQ con la edad de la presentación de la enfermedad y

observar la relación otros parámetros clínicos y biológicos recogidos en las bases de datos.

### **2.3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES**

Adultos y niños estudiados derivan del área de Digestivo o de Pediatría del Hospital Río Hortega de Valladolid. Los pacientes seleccionados son portadores de alelos de riesgo para la enfermedad celíaca. Además, en los adultos, la confirmación de la enfermedad se determinó por una biopsia duodenal, mediante la cual se definió el nivel de la escala de Marsh en la que se encontraban los pacientes. En niños, se seleccionaron aquellos que cumplían los criterios establecidos por la *ESPGHAN* de 2012.

Las historias clínicas, los datos de anatomía patológica y serología de anticuerpos antiendomio y antitransglutaminasa, fueron revisados y recogidos por los facultativos de los pacientes. En todos los casos, estos datos fueron codificados para respetar el anonimato de los pacientes.

#### ***Análisis de SNPs en IL-15RA***

Se seleccionaron un total de 31 pacientes con diagnóstico positivo para la enfermedad celíaca. Estos pacientes solicitaron una prueba genética en el año 2012, debido a que existía sospecha de padecer la enfermedad.

El grupo de adultos se conformó de 17 pacientes con edades comprendidas entre 29 y 67 años; mientras que el segundo grupo contaba con 14 niños, con un rango de edad de 0,9 a 11 años.

#### ***Estudio del haplotipo HLA-DQ***

Se seleccionaron 39 pacientes, algunos de ellos, estudiados en el caso anterior. Se contó con 14 adultos, con edades entre los 29 y 67. El grupo de los niños, formado por 26 participantes, sus edades entre 0,9 y 11 años.

### **2.3.3. CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

#### ***Análisis de los SNPs en IL-15RA***

Los adultos y niños seleccionados, se clasificaron en función de los genotipos estudiados (homocigotos y heterocigotos) para cada alelo de los cuatro polimorfismos (SNPs) estudiados. A continuación, se analizaron según los alelos de interés. Por último, se dividieron en función de si eran portadores o no del alelo en cada uno de los SNPs.

#### ***Estudio del haplotipo***

Se realizó un análisis de los haplotipos que portaban los pacientes con enfermedad celíaca, observando los dos serotipos de cada persona. De todos los haplotipos recogidos exclusivamente DQ2.2, DQ2.5, DQ7.5 y DQ8 son los haplotipos de riesgo

para la enfermedad celíaca. Por ello, se realizó un segundo análisis con los pacientes clasificados en función del riesgo (Tabla 8) conferido por estos genotipos.

GENOTIPOS	RIESGO RELATIVO	RIESGO A	RIESGO B
DQ2.5/DQ2.5	Muy alto	Alto-muy alto	Muy alto
DQ2.5/DQ2.2	Muy alto	Alto-muy alto	Muy alto
DQ2.5/DQ7.5	Alto	Alto-muy alto	Alto-intermedio
DQ2.5/DQ8	Alto	Alto-muy alto	Alto-intermedio
DQ2.5/Otro	Alto	Alto-muy alto	Alto-intermedio
DQ2.2/DQ7.5	Alto	Alto-muy alto	Alto-intermedio
DQ2.2/DQ8	Alto	Alto-muy alto	Alto-intermedio
DQ2.2/Otro	Intermedio	Intermedio	Alto-intermedio
DQ2.2/DQ2.2	Alto	Alto-muy alto	Alto-intermedio
DQ7.5/DQ7.5	Bajo	Bajo	Bajo
DQ7.5/DQ8	Intermedio	Intermedio	Alto-intermedio
DQ7.5/ Otro	Bajo	Bajo	Bajo
DQ8/Otro	Intermedio	Intermedio	Alto-intermedio
DQ8/DQ8	Alto	Alto-muy alto	Alto-intermedio
Otro/otro	Nulo	-	-

Tabla 8: **Principales genotipos en la enfermedad celíaca y riesgo relativo asignado en cada caso.** En la tercera columna (riesgo A), se clasifican los pacientes en los tres grupos de estudio, según el riesgo: alto-muy alto, intermedio y bajo. En la cuarta columna (riesgo B) también son tres grupos: muy alto, alto-intermedio y bajo.

### 2.3.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

La significación estadística se calculó mediante distintas tablas de contingencia, a las cuales se aplicó una prueba  $\chi^2$ , correlacionando distintas variables de estudio. En el caso de las tablas 2x2, se aplicó la prueba exacta de Fisher. Valores con un p-valor <0.05 fueron consideradas significativas (significación bivalente). Además, para estudiar la correlación entre distintos parámetros estudiados se aplicó la correlación de Spearman. El umbral de significación estadística se situó en 0,1.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs)

Se analizaron cuatro SNPs con sus correspondientes sondas: rs2296139, rs8177685, rs3136614 y rs8177636. Las posiciones observadas fueron 6008172, 6008613, 6005674 y 6018594, para cada sonda, estudiando el gen del receptor de la interleucina 15 (IL-15RA). Se observó que las variaciones en las secuencias estudiadas, se situaban en distinta proporción en los dos grupos de estudio (Figura 3).

El SNP1 (rs2296139) se localizaba en T, y era minoritario en la población de estudio, un 6% en adultos, mientras que en niños era inexistente. El SNP2 (rs8177685) correspondía a C y también era minoritario, en adultos el 13% y en niños el 7%. El cambio de base perteneciente a G, se estudiaba en el SNP3 (rs3136614), situándose en el 6% de los adultos y en el 29% de los niños. El SNP4 (rs8177636) era C, presente en la población con mayor frecuencia, 18 y 21%, para adultos y niños, respectivamente.

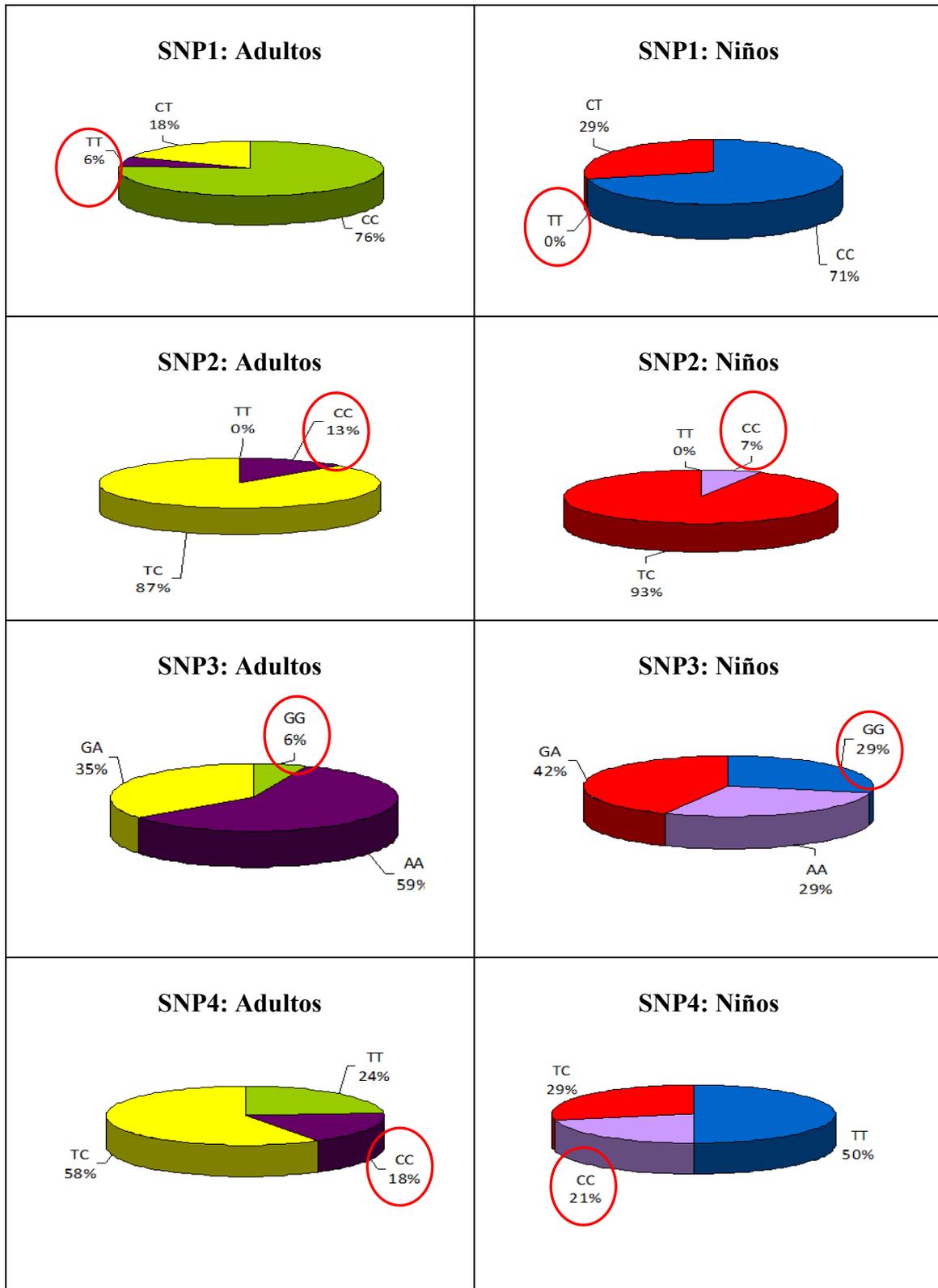


Figura 3: Representación en porcentajes de los genotipos de los SNPs estudiadas mediante cuatro sondas, en adultos y niños. En rojo se selecciona la base afectada en cada SNP.

Se realizaron tres análisis estadísticos para las muestras de interés. En el primero de ellos, se analizaron las frecuencias genotípicas posibles (Tabla 9) y sus tablas de contingencia no mostraron ninguna significación en los cuatro distintos polimorfismos estudiados. Se observa que la frecuencia del genotipo GG del SNP3, apunta un p-valor menor que el resto.

Por otra parte, se realizó un estudio de las frecuencias alélicas individuales, para cada SNP analizado (Tabla 10). La frecuencia del alelo G del SNP3 muestra un p-valor inferior al de referencia, por lo que existe significación estadística. Esto confirma nuestra hipótesis y sugiere que en el alelo G del SNP3 (rs3136614) existen diferencias entre adultos y niños.

Sin embargo, este hecho no pudo confirmarse mediante el análisis estadístico de los pacientes como portadores de los alelos de cada SNP (Tabla 11). No se observó asociación entre los portadores de ninguno de los alelos y los grupos de edad estudiados.

Bases		SNP1			SNP2		SNP3			SNP4		
		CC	CT	TT	CC	TC	AA	GA	GG	CC	TC	TT
Recuento	Adultos	13	3	1	2	14	10	6	1	3	10	4
	% Adultos	76,5%	17,6%	5,9%	12,5%	87,5%	58,8%	35,3%	5,9%	17,6%	58,8%	23,5%
	Niños	10	4	0	1	13	4	6	4	3	4	7
	% Niños	71,4%	28,6%	0%	7,1%	92,9%	28,6%	42,9%	28,6%	21,4%	28,6%	50%
Chi-cuadrado de Pearson		1,256			0,238		4,120			3,129		
Sig. asintótica (bilateral)		0,534			0,626		0,127			0,209		

Tabla 9: Resultados del análisis estadístico de las frecuencias genotípicas de los SNPs, en niños y adultos.

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4
	Alelo T	Alelo C	Alelo G	Alelo C
	n=62	n=60	n=62	n=62
%Adultos	14,70%	56,30%	23,50%	47,10%
% Niños	14,30%	53,60%	50%	35,70%
Chi-cuadrado de Pearson	0,002	0,043	4,7	0,812
Sig. asintótica (bilateral)	0,963	0,835	<b>0,03</b>	0,368
Estad. exacto de Fisher (sig. bilateral)	1	1	<b>0,037</b>	0,442
Estad. exacto de Fisher (sig. unilateral)	0,626	0,52	<b>0,028</b>	0,261

Tabla 10: Resultados del análisis estadístico de las frecuencias alélicas de los SNPs, en adultos y niños.

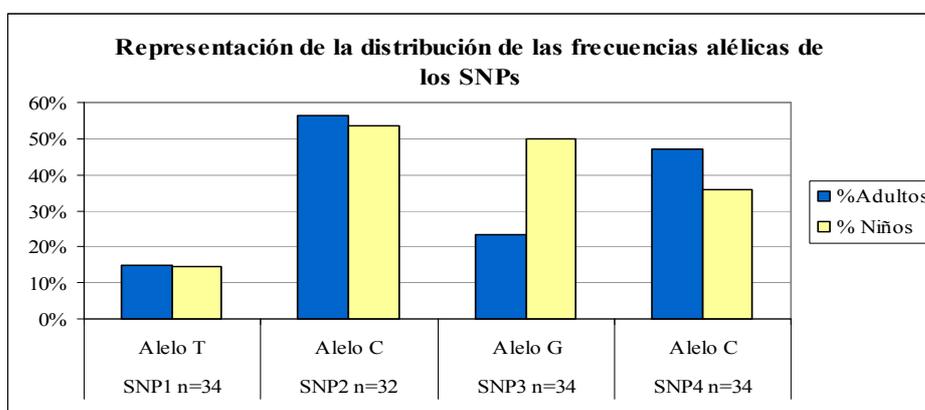


Figura 4: Representación de la distribución de las frecuencias alélicas de los SNPs, en adultos y niños.

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4
	Port T	Port C	Port G	Port C
	n=31	n=31	n=31	n=31
<b>%Adultos</b>	23,50%	100%	41,20%	76,50%
<b>%Niños</b>	28,60%	100%	71,40%	50%
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	0,102	-	2,837	2,35
<b>Sig. asintótica (bilateral)</b>	0,75	-	<b>0,092</b>	<b>0,125</b>
<b>Estad. exacto de Fisher (sig. bilateral)</b>	1	-	0,149	0,153
<b>Estad. exacto de Fisher (sig. unilateral)</b>	0,534	-	0,093	0,124

Tabla 11:  
**Resultados del análisis estadístico de los portadores de los alelos estudiados para cada SNPs.**

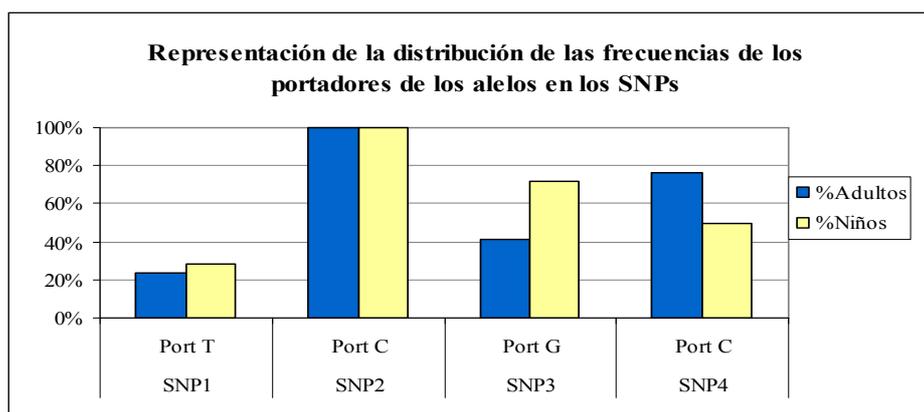


Figura 5:  
**Representación de la distribución de las frecuencias de los portadores de los alelos en los SNPs de adultos y niños.**

## 3.2. ESTUDIO DEL HAPLOTIPO HLA-DQ

### 3.2.1. ANÁLISIS DE LA SEROLOGÍA Y EL RIESGO ASOCIADO. RELACIÓN CON LA EDAD DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

La serología de los pacientes estudiados contaba con distintos haplotipos manifestados, de los cuales DQ2.2, DQ2.5, DQ7.5 y DQ8, son considerados genotipos de riesgo. En su correspondiente tabla de contingencia, se ha observado que no existen diferencias estadísticamente significativas en los serotipos seleccionados

		SEROTIPO				
		DQ2.2	DQ2.5	DQ7.5	DQ8	Otro
Adulto	Recuento	6	8	5	1	6
	%Adulto	23,1%	30,8%	19,2%	3,8%	23,1%
Niño	Recuento	10	24	3	2	13
	%Niño	19,2%	46,2%	5,8%	3,8%	25,0%
Chi cuadrado de Pearson		4,214				
Sig. asintótica (bilateral)		0,378				

Tabla 12: **Tabla de contingencia representativa del análisis estadístico para los serotipos encontrados en la población de estudio, dividido en dos grupos, adultos y niños.**

(Tabla 12). A pesar de este hecho, cabe resaltar que los haplotipos se presentan en distintas proporciones: el haplotipo DQ2.5 aparece un 30,8% de las veces en adultos y un 46,2% en niños. Además, DQ7.5 aparece con mayor frecuencia en adultos (19,2%), que en niños (5,8%). El resto de los haplotipos se presenta de forma más homogénea en el total de casos estudiados.

Por otra parte, examinándose dos clasificaciones de los pacientes por categorías de riesgo (A: muy alto-alto, intermedio y bajo; B: muy alto, alto-intermedio y bajo), tampoco se verifica la hipótesis inicial de partida (Tabla 13). Es decir, no existen diferencias significativas en adultos y niños, de la distribución de los haplotipos HLA-DQ de riesgo para la enfermedad celíaca. No obstante, podemos observar que en la primera clasificación (Muy alto-alto/Intermedio/Bajo), destacan las diferencias de frecuencias que hay en el grupo muy alto-alto de adultos y niños (76,9% y 96,2%, respectivamente) y en el grupo de bajo riesgo (15,4% en adultos y 0% en niños). Estas desigualdades, se atenúan en la segunda clasificación de las categorías (muy alto/alto-intermedio/bajo), a excepción del grupo de riesgo bajo, que mantiene los resultados anteriores.

		RIESGO (A)			RIESGO (B)		
		Muy alto - alto	Intermedio	Bajo	Muy alto	Alto-intermedio	Bajo
Adulto	Recuento	10	1	2	3	8	2
	% Adulto	76,9%	7,7%	15,4%	23,1%	61,5%	15,4%
Niño	Recuento	25	1	0	8	18	0
	% Niño	96,2%	3,8%	0,0%	30,8%	69,2%	0%
Chi cuadrado de Pearson		4,607			4,259		
Sig. asintótica (bilateral)		0,100			0,119		

Tabla 13: Tabla de contingencia representativa de dos análisis estadísticos para el riesgo asociado a los haplotipos encontrados en la población de estudio, dividido en dos grupos, adultos y niños. En el riesgo A, la población de estudio se clasifica en tres categorías: muy alto-alto, intermedio y bajo. En el riesgo B se conservan también tres categorías, pero de forma distinta: muy alto, alto-intermedio, bajo.

En la representación de los grupos de riesgo (muy alto-alto, intermedio y bajo) en adultos y niños (Figura 6) se observa, que el genotipo de riesgo predominante es alto o muy alto, con una prevalencia del 96,15 % y 76,92 % (adultos y niños). Destaca el hecho que en niños, no existen casos que tengan genotipo de riesgo bajo, mientras que para el genotipo de riesgo intermedio el porcentaje se sitúa en el 3,85%. En adultos, los pacientes encontrados con genotipo de riesgo bajo son más frecuentes (15,38%) que los de genotipo intermedio (7,69%).

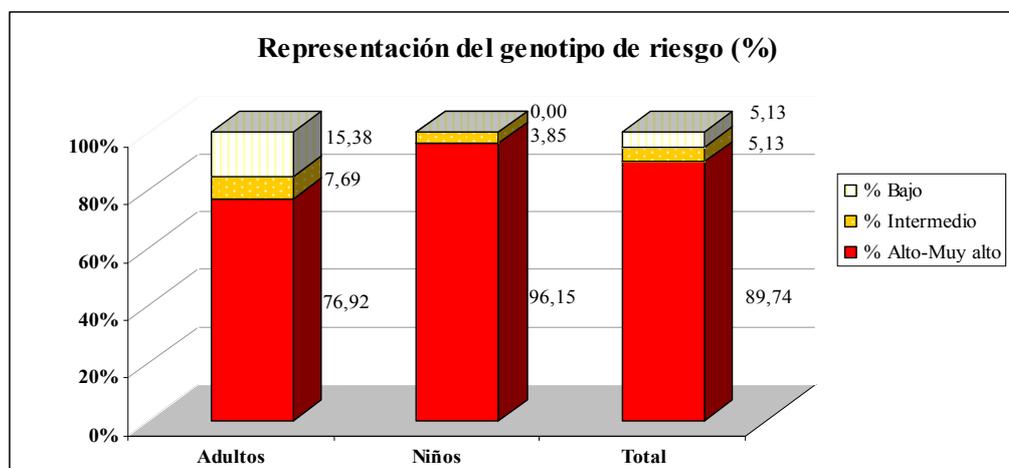


Figura 6: Representación de los porcentajes de los genotipos de riesgo (bajo, intermedio y alto-muy alto) en adultos y niños.

En la distribución del riesgo en cuatro grupos de edad (Figura 7), se aprecia que los niños con edades de 2 años o inferiores, portan un genotipo de riesgo alto o muy alto en todos los casos, y a medida que aumenta la edad (3-11 años), el porcentaje de este grupo disminuye (85,71%), para dejar paso al genotipo de riesgo intermedio, con un 14,29 % de importancia. En el grupo de pacientes analizados, no existían casos entre los 12 y 28 años. A partir de esta edad, el genotipo de riesgo bajo se presenta un 16,67% de las ocasiones entre 29 y 36 años, y se mantiene un 14,29% en la población desde los 37 a los 67 años. Por el contrario, el genotipo de riesgo intermedio se manifiesta en el último grupo de estudio (37-67 años) en la misma frecuencia que el genotipo de riesgo bajo. La distribución del riesgo alto-muy alto, disminuye con la edad, 83,33% en 29-36 años y 71,43% en 37-67 años.

Observando con más detalle los haplotipos HLA-DQ de riesgo, destaca la presencia mayoritaria del haplotipo DQ2.5, un 59,46% y 47,06% de las ocasiones en niños y adultos. Seguidamente, la segunda combinación de alelos con mayor riesgo presenta un valor cercano al 28% de las veces para ambos grupos. En menor proporción se expone el haplotipo DQ7.5 (8,11% y 17,65) en niños y adultos. Mientras que la presencia del DQ8 se mantiene en aproximadamente el 5%, en todos los grupos de edad (Figura 8).

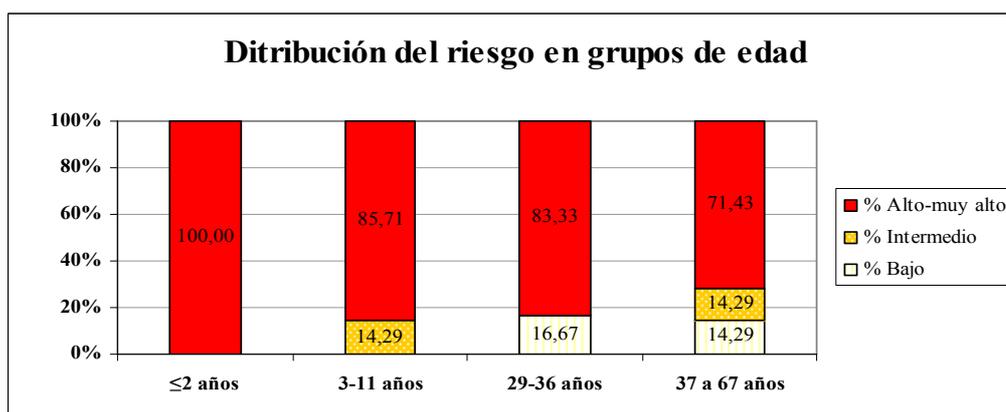


Figura 7: Representación de la distribución de los grupos de riesgo (alto-muy alto, intermedio y bajo) en cuatro subgrupos de edad: ≤2 años, 3-11 años, 29-36 años y 37-67 años.

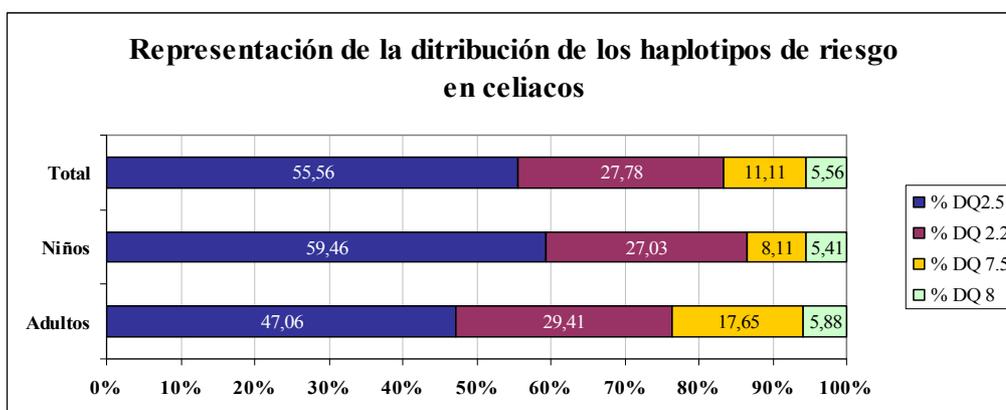


Figura 8: Representación de la distribución de los haplotipos de riesgo en celíacos adultos y niños.

Analizando la frecuencia de aparición de anticuerpos transglutaminasa y antiendomiso (Tabla 14), se detecta que la presencia de ambos anticuerpos se da el 100% de las veces en niños. En adultos, la presencia de anticuerpos no es necesaria para manifestar la enfermedad celíaca, ya que solo el 61,54% de los casos presentan anticuerpos transglutaminasa y el 66,67% de los pacientes, antiendomiso.

	Anticuerpos transglutaminasa	Anticuerpos antiendomiso
% Adultos	61,54%	66,67%
% Niños	100 %	100%

Tabla 14: Representación del porcentaje de anticuerpos (antiendomiso y antitransglutaminasa) detectados en adultos y niños.

### 3.2.2. ESTUDIO DE LA HISTOLOGÍA Y EL RIESGO EN ADULTOS

También, se analizaron los resultados de las biopsias disponibles, correspondientes a los adultos (Figura 9). En ellos, se observó que la mayoría de los pacientes (38,46%) se encontraban en estado Marsh IIIA, seguidos por Marsh IIIC (30,77%). Destaca el hecho que no se recogieron adultos en estado Marsh IIIB, y los pacientes con Marsh I y II se encontraron con la misma frecuencia (15,38%).

Para saber si existe alguna relación entre el estado histológico determinado por la escala de Marsh observado en las biopsia y la clasificación del riesgo, se realizaron tablas de contingencia para estas dos clasificaciones del mismo (Tabla 15). Para la primera clasificación, la mayoría de los pacientes incluidos en la categoría de riesgo alto o muy alto, tenían una histología en estado IIIA y IIIC, mientras que el grupo de riesgo intermedio, correspondía a un estado I en sus biopsias. En el tercer grupo, de riesgo bajo, los pacientes se distribuían en estados II y IIIA de Marsh.

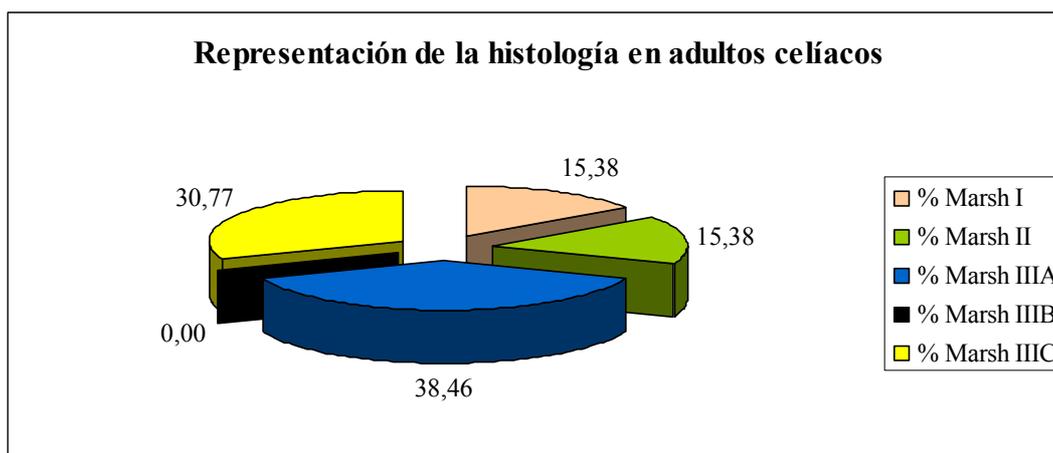


Figura 9: Representación de la clasificación de las biopsias en adultos celíacos según la escala de Marsh.

En la segunda de las clasificaciones, el primer grupo correspondiente al riesgo muy alto, situaba a los pacientes en los estados IIIA y IIIC, siendo mayoritario el

último. Los de riesgo alto-intermedio contaban con pacientes en estados I, II, IIIA y IIIC, siendo más frecuente el estado IIIA. El grupo de riesgo bajo, mantenía su clasificación de los pacientes en estados II y IIIA. En ambos casos, no existía diferencia estadísticamente significativa, pero sí correlación entre cada clasificación del riesgo y las biopsias.

		BIOPSIA (adultos)				
		I	II	IIIA	IIIC	
RIESGO A	% Muy alto-alto	10%	10%	40%	40%	
	%Intermedio	100%	0%	0%	0%	
	%Bajo	0%	50%	50%	0%	
	Chi cuadrado de Pearson	8,710				
	Significación asintótica (bilateral)	0,191				
	Correlación de Spearman	Valor	0,427			
		Sig. aproximada	0,146			
RIESGO B	% Muy alto	0%	0%	33,3%	66,7%	
	%Alto- intermedio	25,0%	12,5%	37,5%	25,0%	
	%Bajo	0%	50%	50%	0%	
	Chi cuadrado de Pearson	5,363				
	Significación asintótica (bilateral)	0,498				
	Correlación de Spearman	Valor	0,443			
		Sig. aproximada	0,129			

Tabla 15: Tabla de contingencia y correlaciones entre las dos clasificaciones de las categorías de riesgo y los estados de biopsias recogidas en los pacientes adultos.

### 3.2.3. ASOCIACIÓN DE LAS CLASIFICACIONES DEL RIESGO Y LOS SNPs DEL GEN DEL IL-15RA ESTUDIADOS.

Se observó si existía alguna diferencia significativa de las clasificaciones del riesgo con el genotipo determinado mediante el análisis de los SNPs (Tabla 16). Cabe resaltar que en la primera clasificación del riesgo existen diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos del SNP1, predominando el genotipo CC en los pacientes con riesgo genético muy alto-alto. En la segunda clasificación del riesgo, no hay diferencias significativas en ninguno de los casos. Además, se muestra que los genotipos TT (SNP1), CC (SNP2), GG (SNP3) y CC (SNP4) se relacionan con riesgos intermedios o riesgos muy altos-altos, de la primera clasificación del riesgo, o a riesgos muy altos o altos-intermedios de la segunda.

Fijándose en los adultos y niños por separado (datos no mostrados), se puede conocer que la significación estadística obtenida se debe al grupo de adultos. También se observa que los adultos cuentan con casos clasificados como riesgo bajo, intermedio, alto y muy alto, independientemente de la distribución del genotipo de los SNPs; mientras que en los niños la distribución de las categorías es más limitada.

		SNP1			SNP2		SNP3			SNP4		
		n=27			n=26		n=27			n=27		
Bases		CC	CT	TT	CC	TC	AA	GA	GG	CC	TC	TT
Riesgo A	%Muy alto-alto	78,3%	21,7%	0%	13,6%	86,4%	39,1%	43,5%	17,4%	17,4%	43,5%	39,1%
	% Intermedio	0%	50%	50%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
	% Bajo	50%	50%	0%	0%	100%	50%	50%	0%	0%	100%	0%
	Chi-cuadrado de Pearson	15,279			0,617		3,144			5,532		
	Sig. asintótica (bilateral)	0,004			0,735		0,534			0,237		
Riesgo B	%Muy alto	100%	0%	0%	0%	100%	16,7%	50%	33,3%	16,7%	66,7%	16,7%
	% Alto-intermedio	63,2%	31,6%	5,3%	16,7%	83,3%	52,6%	36,8%	10,5%	15,8%	31,6%	52,6%
	% Bajo	50%	50%	0%	0%	100%	50%	50%	0%	0%	100%	0%
	Chi-cuadrado de Pearson	3,665			1,507		3,502			5,413		
	Sig. asintótica (bilateral)	0,453			0,471		0,478			0,247		

Tabla 16: **Tabla de contingencia representativa de la relación entre el genotipo estudiado de los SNPs en la primera parte del estudio y los riesgos asociados a esos pacientes.**

Por otra parte, se analizó la distribución de los riesgos en el análisis de los portadores de los polimorfismos (Tabla 17).

Se encontraron diferencias significativas en los portadores del alelo C del SNP1 en la clasificación de riesgo A. También, se vio que solo la mitad del grupo del riesgo intermedio portaba este alelo. El resto de los portadores de los alelos, se distribuyeron de forma heterogénea. Cabe destacar que no existieron portadores del alelo T del SNP2 con riesgo bajo, ni tampoco portadores de los alelos G (SNP3) y C (SNP4) con riesgo intermedio.

En la segunda clasificación de las categorías de riesgo, no existieron diferencias significativas entre la distribución de las frecuencias de los portadores de los alelos, aunque al igual que en el caso anterior, la distribución fue también bastante heterogénea. Destacó que no existieron portadores del alelo T del SNP1 con riesgo muy alto. A diferencia del caso anterior, todos los portadores del alelo T del SNP2 fueron de riesgo bajo y los portadores de los alelos G y C de los SNP3 y 4, respectivamente, tuvieron la mitad del riesgo alto-intermedio.

En la primera clasificación del riesgo, se observó que el grupo predominante en todos los alelos, correspondía al riesgo muy alto-alto, o alto-intermedio, según la segunda. Además, estudiando a los adultos y niños por separado, se ha visto que la significación observada en el SNP1 correspondía a los adultos, mientras que los niños, mostraban una tendencia a alcanzar diferencias significativas en los portadores del alelo A del SNP3, en la segunda clasificación del riesgo (datos no mostrados).

Bases		SNP1		SNP2		SNP3		SNP4	
		n=27		n=26		n=27		n=27	
		Port.C	Port.T	Port.C	Port.T	Port.A	Port.G	Port.C	Port.T
RIESGO A	%Muy alto-alto	100%	21,7%	100%	86,4%	82,6%	60,9%	60,9%	100%
	%Intermedio	50%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%
	%Bajo	100%	50%	100%	0%	100%	50%	100%	82,6%
	Chi-cuadrado de Pearson	12,981	5,835	-	0,617	0,817	2,788	4,309	0,817
	Significación asintótica (bilateral)	<b>0,002</b>	0,054	-	0,735	0,665	0,248	0,116	0,665
RIESGO B	%Muy alto	100%	0%	100%	100%	66,7%	83,3%	83,3%	83,3%
	%Alto-Intermedio	94,7%	36,8%	100%	83,3%	89,5%	47,4%	47,4%	100%
	%Bajo	100%	50%	100%	100%	100%	50%	100%	84,2%
	Chi-cuadrado de Pearson	0,437	3,398	-	1,507	2,255	2,416	3,928	0,378
	Significación asintótica (bilateral)	0,804	0,183	-	0,471	0,324	0,299	0,140	0,828

Tabla 17: Tabla de contingencia representativa de la relación entre los portadores de los SNPs estudiados en la primera parte del estudio y las dos categorías de riesgos asociados a esos pacientes.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs)

Se estudiaron cuatro polimorfismos de un solo nucleótido en el gen del receptor de la interleucina 15 (IL-15RA). El genotipo TT del SNP1 (rs2296139) y CC del SNP2 (rs8177685), aparecen con mayor frecuencia en la población de adultos estudiada, mientras que los genotipos GG del SNP3 (rs3136614) y CC del SNP4 (rs8177636), se encuentran en mayor proporción en el grupo de niños.

Relacionado con este hecho, se llevaron a cabo tres pruebas de análisis para ver si existían diferencias estadísticas en la distribución observada. En el análisis de los genotipos de adultos y niños, no se pudo verificar la hipótesis, pero se puede ver que el SNP3 muestra cierta tendencia a esta comprobación. Estudiando los alelos de los pacientes, tan solo, se ha obtenido significación estadística en el análisis del SNP3. Es decir, en este caso, la distribución del alelo G del SNP3 (rs3136614) en los niños, alcanza el 50% de la frecuencia observada, mientras que en adultos, tan solo el 23,5%. Si se observan las frecuencias de los portadores de los SNPs concretos, tampoco existe significancia estadística, pero se puede ver la tendencia del alelo G del SNP3 (rs3136614) y del alelo C del SNP4 (rs8177636) a confirmar la hipótesis verificada por el alelo G del SNP3 mediante la prueba anterior.

En general, se necesitarían más pacientes en los grupos de adultos y niños para poder determinar si existen diferencias entre los adultos y niños seleccionados en el estudio de los cuatro polimorfismos de un solo nucleótido del gen del receptor A de la IL-15.

## **4.2. ESTUDIO DEL HAPLOTIPO HLA-DQ**

### **4.2.1. ANÁLISIS DE LA SEROLOGÍA Y EL RIESGO ASOCIADO**

Se observaron distintos haplotipos en la serología de los pacientes seleccionados: DQ2.2, DQ2.5, DQ5, DQ6, DQ7.2, DQ7.3, DQ7.5 Y DQ8. Todos estos genotipos no eran de riesgo, por eso, se clasificaron como DQ2.2, DQ2.5, DQ7.5, DQ8 y Otro, que englobaba a los que no eran de riesgo.

Las frecuencias obtenidas en ambos grupos (niños y adultos) son bastante parecidas en los casos de los haplotipos DQ8 y Otro. El haplotipo DQ2.2 muestra diferencias en sus porcentajes, pero no son demasiado altas. En todos estos haplotipos se necesitaría mayor número de casos, para saber si las frecuencias se mantienen o aumentan las desigualdades entre los dos grupos de estudio. Aún así, no se puede pasar por alto que DQ2.5 y DQ7.5 muestran bastantes diferencias entre los grupos, siendo DQ2.5 más frecuente en niños, y DQ7.5 en adultos (Tabla 15) (Figura 8).

A pesar de estas diferencias observadas, se ha visto que los haplotipos DQ 2.5 y DQ2.2 se presentan con mayor frecuencia en la población (Figura 8). Estos haplotipos están asociados a riesgos alto-muy alto o incluso intermedio, en algunos casos (Tabla 8). Este dato se ha podido comprobar en los análisis de los riesgos (Tabla 13). Además, el grupo de riesgo intermedio es bastante heterogéneo y se compone de dos haplotipos: DQ2.2 y DQ8. Se ha observado que la frecuencia del DQ2.2 es cinco veces mayor que la frecuencia del DQ8, tanto en adultos como en niños (Figura 8). Inicialmente, los niños cuentan con riesgo alto-muy alto en exclusivo y a medida que se estudian otros grupos de edad, aparecen genotipos de riesgo intermedio, aunque en menor proporción. El diagnóstico de la enfermedad celíaca da un salto entre niños y adultos, reduciendo el número de casos diagnosticados en la adolescencia y primeras edades jóvenes. A partir de los 29 años se manifiestan genotipos de riesgo bajo, disminuyendo progresivamente el genotipo de riesgo alto-muy alto, aunque en todos los casos, es el mayoritario (Figura 7).

Fijándose en los niveles de serología, se ha comprobado que los niños celíacos cuentan en todos los casos, con los dos tipos de anticuerpos determinantes de la enfermedad, antiendomiso y antitransglutaminasa. En adultos, solo estaban presentes un 60% de los casos (Tabla 14).

### **4.2.2. ESTUDIO DE LA HISTOLOGÍA Y EL RIESGO EN ADULTOS**

La histología clasificada según la escala de Marsh, nos indica la alteración de la mucosa intestinal. Los pacientes estudiados corresponden al grupo de adultos, y se observa que los dos grupos predominantes son Marsh IIIA y IIIC. Los estados Marsh I y II, están en la misma proporción (Figura 9). Además existe correlación estadísticamente significativa entre la clasificación del riesgo y el grado de lesión de las mucosas. En los grupos correspondientes a riesgo intermedio y bajo, se ha observado que los pacientes

se sitúan con mayor frecuencia en grupos con menor lesión en sus mucosas (estados de Marsh bajos) (Tabla 15).

Podemos decir que genotipos de riesgo alto y muy alto generan cambios histológicos severos, mientras que riesgos intermedios asocian cambios más leves. No hay que olvidar que pacientes con riesgo bajo, también relacionan cambios histológicos de severidad moderada.

#### **4.2.3. ASOCIACIÓN DE LAS CLASIFICACIONES DEL RIESGO Y LOS SNPs DEL GEN DEL IL-15RA ESTUDIADOS.**

Se estudió la relación del genotipo de los SNPs analizados anteriormente con las dos clasificaciones de las categorías de riesgo. Se observó que el genotipo CC del SNP1 (rs2296139) se asociaba con haplotipos de HLA de riesgo intermedio o alto. El genotipo CC del SNP2 (rs8177685), se puede asociar a riesgos altos, debido a que es el grupo compartido por ambas clasificaciones. Sin embargo, el genotipo GG del SNP3 (rs3136614) y el genotipo CC del SNP4 (rs8177636) se asocia a riesgos de carácter muy alto (o alto). Estos resultados, sugieren que la presencia de determinados genotipos de los SNPs se asocia a riesgos más altos.

En la asociación de los portadores de los SNPs con las categorías de riesgo, también se puede apreciar que existen diferencias significativas en los portadores del alelo C del SNP1 (rs2296139) y el riesgo muy alto-alto, según la primera clasificación del mismo. El resto de los portadores, en ambas clasificaciones del riesgo, se distribuyen de forma bastante heterogénea.

### **5. CONCLUSIONES**

Adultos y niños presentan diferencias de comportamiento en la enfermedad celíaca. Una vez seleccionados los pacientes con genética susceptible y recogidos los datos serológicos y de anatomía patológica, se comprobó que existían diferencias en la frecuencia de aparición de los SNPs estudiados del gen del receptor de la IL-15, en niños y adultos.

Los resultados mostraron que existían diferencias significativas entre ambos grupos de estudio, para el alelo G del SNP3 (rs3136614), y diferencias notables, pero no significativas, en los portadores de los alelos G y C de los SNP3 (rs3136614) y 4 (rs8177636), respectivamente.

Observando la serología HLA-DQ y el riesgo, se puede comprobar que existen diferencias, aunque no significativas de la distribución de DQ2.5 y DQ7.5, entre adultos y niños. Además, en los dos casos, DQ2.5 es el haplotipo mayoritario, seguido por DQ2.2. El grupo de riesgo más frecuente es muy alto-alto, y disminuye a medida que avanza la edad de los pacientes. Además, el grupo de riesgo intermedio, se mantiene constante, mientras que el de riesgo bajo aumenta progresivamente.

También, se observó que existía correlación entre el riesgo y la severidad de la lesión mucosa de los pacientes adultos, asociando la categoría de riesgo muy alto-alto a

estados de Marsh severos. Por último, se vieron diferencias significativas entre niños y adultos en la distribución de las frecuencias del genotipo CC y en los portadores del alelo C, del SNP1 (rs2296139), en la primera clasificación del riesgo.

En todos estos resultados, se han observado características y diferencias muy interesantes entre adultos y niños, que animan a repetir el estudio ampliando el número de casos y los SNPs a estudiar.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Arranz E, Garrote J.A. Inmunología de la enfermedad celíaca. *Gastroenterología y Hepatología*. 2010; 33(9): 643–51.
- Arranz E, Garrote JA. *Enfermedad celíaca: Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. 2ª edición. Ergon; 2011.
- Castellanos-Rubio A., Martín-Pagola A, Santin I., Hualde I., Aransay AM., Castaño L, et al. Bilbao JR. Combined Functional and positional gene indormation for the identification of susceptibility variants in celiac disease. *Gastroenterology*. 2008; 134:738-46.
- Castellanos-Rubio A, Santin I, Irastorza I, Sanchez-Valverde F, Castaño L, Vitoria JC et al. A regulatory single nucleotide polymorphism in the ubiquitin D gene associated with celiac disease. *Hum Immunol*. 2010;71:96-9.
- Catassi C, Fasano A. Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *Am J Med*. 2010; 123(8):691-3.
- Congia M, Cucca F, Frau F, Lampis R, Melis L, Clemente MG, et al. A gene dosage effect of the DQA1\*0501/DQB1\*0201 allelic combination influences the clinical heterogeneity of celiac disease. *Hum Immunol*. 1994;40(2):138-42.
- Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr*. 1953;42(1):34-42.
- Diosdado B, Monaur AJ, Mearin ML, Mulder C, Wijmenga C. The Downstream modulator of interferon- $\gamma$ , STAT1 is not genetically associated to the Dutch coeliac disease population. *Eur J Hum Genet*. 2006;14: 1120-4.
- Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*. 2010;42(4):295-302.
- Einarsdottir E, Koskinen LE, Dukes E, Kainu K, Suomela S, Lappalainen M, et al. IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD, and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Med Genet*. 2009;10:8.
- Fernández-Cavada-Pollo MJ, Alcalá-Peña MI, Vargas-Pérez ML, Vergara-Prieto E, Vallcorba-Gómez-Del Valle I, Melero-Ruiz J, et al. Celiac disease and HLA-DQ genotype: Diagnosis of different genetic risk profiles related to the age in Badajoz, southwestern Spain. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013;105(8):469-76.
- Fernandez-Jiménez N, Castellanos-Rubio A, Plaza-Izurieta L, Gutierrez G, Castaño L, Vitoria JC, et al. Analysis of  $\beta$ -defensin and Toll-like receptor gene copy number variation in celiac disease. *Hum Immunol*. 2010;71(8):833-6.
- Fernandez-Jimenez N, Santín I, Irastorza I, Plaza-Izurieta L, Castellanos-Rubio A, Vitoria JC, et al. Upregulation of KIR3DL1 gene expression in intestinal mucosa in active celiac disease. *Hum Immunol*. 2011;72(8):617-20.
- Harmon GS, Lebeck LK, Weidner N. Gluten-dependent enteropathy and atypical human leukocyte antigen alleles. *Hum Pathol*. 2011;42(8):1112-6.
- Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GAR, Franke L, Bruinenberg M, et al. Novel celiac disease genetic determinants related to the immune response. *Nat Genet*. 2008; 40(4):395-402.
- Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of Disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006; 3(9):516-25.

- Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nature reviews: Immunology*. 2009; 9(12):858-70.
- Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki 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;41(2):191-9.
- Kaukinen K, Partanen J, Mäki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(3):695-9.
- Lebwohl B, Rubio-Tapia A, Assiri A, Newland C, Guandalini S. Diagnosis of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2012;22(4):661-77.
- Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci*. 2012;19(1):88.
- Medrano LM, Dema B, López-Larios A, Maluenda C, Bodas A, López-Palacios N, et al. HLA and celiac disease susceptibility: new genetic factors bring open questions about the HLA influence and gene-dosage effects. *PLoS One*. 2012;7(10):e48403.
- Medrano LM, García-Magariños M, Dema B, Espino L, Maluenda C, Polanco I, et al. Th17-related genes and celiac disease susceptibility. *PLoS One*. 2012;7(2):e31244.
- Meresse B, Ripoche J, Heyman M, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol*. 2009;2(1):8-23.
- Murray JA, Moore SB, Van Dyke CT, Lahr BD, Dierkhising RA, Zinsmeister AR, et al. HLA DQ gene dosage and risk and severity of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(12):1406-12.
- Mustalahti K, Holopainen P, Karell K, Mäki M, Partanen J. Genetic dissection between silent and clinically diagnosed symptomatic forms of coeliac disease in multiplex families. *Dig Liver Dis*. 2002;34(12):842-5.
- Piccini B, Vascotto M, Serracca L, Luddi A, Margollicci MA, Balestri P, et al. HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2012;104(5):248-54.
- Plaza-Izurieta L, Castellanos-Rubio A, Irastorza I, Fernández-Jimenez N, Gutierrez G; CEGEC, Bilbao JR. Revisiting genome wide association studies (GWAS) in coeliac disease: replication study in Spanish population and expression analysis of candidate genes. *J Med Genet*. 2011;48(7):493-6.
- Ploski R, Ek J, Thorsby E, Sollid LM. On the HLA-DQ(alpha 1\*0501, beta 1\*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1\*0201. *Tissue Antigens*. 1993;41(4):173-7.
- Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA; American College of Gastroenterology. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656-76.
- Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(9):843-51.
- Sollid L.M., Lundin K.E. Diagnosis and treatment of celiac disease. *Mucosal Immunol*. 2009;2(1):3-7.
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*. 1989;169(1):345-50.
- Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med*. 2010;16(11):537-50.
- Van Belzen MJ, Koeleman BP, Crusius JB, Meijer JW, Bardoel AF, Pearson PL, et al. Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes Immun*. 2004;5(3):215-20.
- Van Berge-Henegouwen GP, Mulder C J. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut*. 1993;34(11): 1473-5.
- Wapenaar MC, Van Belzen MJ, Franssen JH, Sarasqueta AF, Houwen RH, Meijer JW, et al. The interferon gamma gene in celiac disease: augmented expression correlates with tissue damage but no evidence for genetic susceptibility. *J Autoimmun*. 2004;23(2):183-90.