



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ANÁLISIS GENÉTICO Y FUNCIONAL DE GENES
NO HLA ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD
CELÍACA**

**TESIS DOCTORAL
Amalia Capilla Villanueva
Valencia, 2010**



D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor de Investigación del Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC y Dña. Carmen Ribes Koninckx, Doctora en Medicina y Cirugía y Jefa de Servicio de Gastroenterología y Hepatología Pediátrica del Hospital Universitario la Fe,

CERTIFICAN:

Que **Amalia Capilla Villanueva**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Análisis Genético y Funcional de Genes No HLA Asociados a la Enfermedad Celíaca".

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

En Valencia, a 1 de Septiembre de 2010

Dr. Francesc Palau Martínez

Dra. Carmen Ribes Koninckx

- [...] ¿Sabes que Thomas Edison llegó a fracasar en dos mil ocasiones antes de lograr el filamento de hilo de algodón carbonizado para su bombilla?

- ¿Edison?

- Y cuando le preguntaron dijo: no fracasé. Descubrí dos mil modos de cómo no se hace una bombilla, pero sólo debía encontrar un modo de que funcionara.

La Búsqueda (2004). Jon Turteltaub

A mis padres

A Marta

Agradecimientos:

No ha habido ni un solo día en el que no haya ido a trabajar orgullosa del laboratorio donde estaba, contenta por lo que hacía y agradecida de formar parte de este mundo. Tengo la suerte de poder decir que nunca he vuelto a casa sin haber aprendido algo nuevo y sorprendente y todo lo que he vivido aquí compensa con creces las dificultades que me haya podido encontrar.

Es por esto por lo que me siento tremendamente agradecida a todas las personas que me han guiado, acompañado o apoyado durante todo este tiempo, que son muchas:

A mis codirectores de tesis, Carmen Ribes y Francesc Palau, por abrirme las puertas, por inculcarme el amor por la ciencia y contagiarme su pasión por el trabajo.

A Carmina, por su implicación a todos los niveles en este trabajo. Gracias por ayudarme siempre.

A Ibo, por devolverme la ilusión por la investigación y por darme la oportunidad de trabajar en equipo.

A mis compañeros del laboratorio, tanto los que están como los que ya se han ido, porque no han sido sólo compañeros para mí y porque sin ellos no lo habría logrado. De manera especial a mi amiga Reyes, porque ha sido un ejemplo de fortaleza y trabajo y a Vincenzo, por enseñarme gran parte de las técnicas que aparecen en esta tesis y por quererme tanto. Muchísimas gracias a todos, de verdad.

A todas y cada una de las personas del Instituto de Biomedicina de Valencia, sea cual sea su rango, porque he tenido la suerte de entrar en contacto con todos y siempre me han ayudado con una sonrisa, especialmente a Mariano, por los experimentos en los que has estado ahí, sacrificando sábados y domingos por mí. Me siento muy afortunada de formar parte de esta casa.

A mis compañeras del Hospital la Fe, Ester Donat con la que empecé el proyecto y hacia la que siento un gran cariño y Begoña Polo, porque los congresos no habrían sido lo mismo sin ella.

A mis amigas María Fábregas, Araceli, Carol, Raquel, Carmencita y Carmina, cada una de un palo pero todas imprescindibles para mí en los buenos y en los malos momentos, porque si no hubiera sido por ellas no habría superado muchos obstáculos y no disfrutaría tanto de la vida.

A Arantxa y Alex porque me quieren tal y como soy y mi vida no sería la misma sin ellos.

A Carlos Lozano por ser uno de los pilares de mi vida, por estar siempre ahí. Carlos, eres mi mejor amigo.

A mi familia, mi gran árbol genealógico, porque es el regalo más grande que he recibido. A mi abuelo Ramón por guiarme hasta aquí y a mi abuela Pili, por su ejemplo, su cariño y por lo especial que me hace sentir cuando me llama Amalita.

Y sobre todas las cosas, a mis padres, Juan Ramón y Amalia por su amor infinito, por los principios que me han transmitido, por apoyarme en todas las decisiones que tomo y porque, haga lo que haga, sé que estáis orgullosos de mí. Y a mi hermana Marta, la persona que más quiero en este mundo, por ser mi mejor amiga y por cogerme fuerte de la mano para tirar de mí. Sin ti, muchas veces no hubiera podido seguir hacia delante.

Por último, me gustaría agradecer y demostrarles mi cariño a todas las familias que han participado en este estudio, a los profesionales y a las asociaciones de celíacos de toda España por la gran labor que realizan. Confío en que todo nuestro esfuerzo se verá recompensado.

ÍNDICE

Glosario, abreviaturas y acrónimos

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Origen Histórico de la Enfermedad Celíaca	1
2. Formas de Presentación de la Enfermedad	3
3. Epidemiología	5
4. El Componente Genético de la Enfermedad Celíaca	10
4.1 El Sistema HLA	10
4.2 Características del sistema HLA	12
4.3 Inmunogenética del Sistema HLA en la Enfermedad Celíaca	12
5. Otros Genes Implicados en la Enfermedad Celíaca	16
5.1 Regiones CELIAC Clásicas	18
5.2 Nuevas Regiones CELIAC Propuestas	20
6. El Factor Ambiental en la Enfermedad Celíaca: EL GLUTEN	22
7. Patogénesis de la Enfermedad Celíaca	26
7.1 Teorías de la Autoinmunidad	26
7.2 Arquitectura del Epitelio Intestinal	28
7.3 Patogenia de la Enfermedad Celíaca	29
8. Diagnóstico de la Enfermedad Celíaca	32
8.1 Sospecha Clínica	32
8.2 Determinación de Marcadores Serológicos	32
8.3 Estudio Genético	33
8.4 Biopsia Duodenoyeyunal	34
9. Tratamiento	36
10. El Estudio Genético de las Enfermedades Complejas	37
10.1 Teoría Poligénica de los Caracteres Continuos	37
10.2 Teoría Poligénica de los Caracteres Discontinuos	38
10.3 El Papel de los Estudios Familiares	39
10.4 El Cartografiado de Genes de Susceptibilidad Mediante Análisis de Ligamiento en las Enfermedades Complejas	40
10.5 Los Estudios de Asociación	41

10.5.1 Los Polimorfismos Genéticos como Marcadores	42
10.5.2 El Estudio de Haplotipos	43
10.5.3 El Proyecto HapMap	44
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
1. HIPÓTESIS	49
2. OBJETIVOS	51
III. PACIENTES Y METODOLOGÍA	53
1. SUJETOS	55
1.1 Pacientes y Familiares	55
1.2 Individuos Control	56
2. METODOLOGÍA	57
2.1 Diseño de un Estudio de Asociación	57
2.2 Análisis Genético de las Regiones CELIAC: Técnicas y Protocolos	59
2.2.1 Extracción de DNA Genómico	60
2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	61
2.2.3 Análisis de Polimorfismos Mediante RFLPs	62
2.2.4 Análisis de Polimorfismos Mediante SSCPs	63
2.2.5 Estudio Genético Indirecto con Marcadores Microsatélite	65
2.2.6 Análisis de Polimorfismos Mediante DHPLC	65
2.2.7 Secuenciación Automática	67
2.3 Análisis Estadístico	67
2.3.1 Estudios de Asociación Poblacional: Análisis Caso-Control	67
2.3.2 Estudios Familiares	69
2.3.3 Corrección del Estudio Genético	71
2.4 Análisis de la Región CELIAC1	72
2.4.1 Gen <i>TNFα</i>	72
2.4.2 Gen <i>LTα</i>	72
2.4.3 Construcción de Haplotipos	73
2.5 Análisis de la Región CELIAC3	73
2.5.1 Gen <i>CTLA4</i>	74
2.5.2 Gen <i>ICOS</i>	74
2.6 Análisis de la Región CELIAC4	76
2.7 Análisis Estadístico	77
2.8 Búsqueda de Nuevos Genes Asociados a la EC	79

2.8.1 Estudio del Gen <i>FOXP3</i>	79
2.8.2 Estudio del Gen <i>GILT</i>	80
2.9 Análisis Molecular del gen <i>GILT</i>	81
2.10 Ensayos de Actividad Enzimática	97
2.11 Estudios de Expresión en Biopsias Humanas	101
IV. RESULTADOS	105
1. Análisis genético de las regiones CELIAC	107
1.1 Cálculo del poder estadístico del estudio de asociación	107
1.2 Análisis de la región CELIAC1	108
1.3 Análisis de la región CELIAC3	112
1.4. Análisis de la región CELIAC4	118
2. Análisis del gen <i>FOXP3</i>	121
3. Análisis del gen <i>GILT</i>	123
4. Análisis funcional del gen <i>GILT</i>	125
4.1 Estudios celulares en la línea eucariota cos-7	125
4.1.1 Obtención del cDNA de <i>GILT</i>	125
4.1.2 Expresión de <i>GILT</i> en cultivo celular	126
4.1.3 Estudios de localización celular	129
4.2 Ensayos de actividad <i>in vitro</i> .	135
4.2.1 Purificación de <i>GILT</i>	135
4.2.2 Medida de actividad por reducción de insulina	136
4.3 Análisis de <i>GILT</i> en biopsias humanas	139
4.3.1 Estudio genético	139
4.3.2 Niveles de expresión de <i>GILT</i> en biopsias humanas	143
V. DISCUSIÓN	149
1. Análisis Genético Comparativo de la Enfermedad Celíaca	151
1.1 Poder estadístico del estudio	152
1.2 Análisis de la región CELIAC1	154
1.3 Análisis de la región CELIAC3	157
1.4 Análisis de la región CELIAC4	161
1.5 Divergencias en los estudios de asociación	163
2. Análisis de Nuevos Genes Candidatos	165

Índice

2.1 Estudio del gen <i>FOXP3</i>	165
2.2 Estudio del gen <i>GILT</i>	168
2.3 Estudios funcionales	170
2.3.1 <i>GILT</i> y HLA	170
2.3.2 Estudio funcional del polimorfismo rs11554159	172
VI. CONCLUSIONES	183
VII. BIBLIOGRAFÍA	189

Å: Amstrong
AA_tTG: Anticuerpo anti-Transglutaminasa tisular
AGA: Anticuerpo anti-Gliadina
AH: ancestral haplotype; haplotipo ancestral (HA)
APC: Antigen Presenting Cell
CI: Confidence Interval; **IC:** Intervalo de Confianza
CLIP: Class II associated Ii Peptide
CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXCR3: CXC chemokine receptor 3
DHPLC: denaturing high-performance liquid chromatography
DNA: Deoxyribonucleic Acid
DTT: Ditioneitol
EC: Enfermedad Celíaca
EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EEA1: Early Endosome Antigen 1
EMA: Anticuerpo anti-Endomiosio
ESPGHAN: European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.
FOXP3: Forkhead box P3
GILT: Gamma Interferon inducible Lysosomal Thiol reductase
GRP94: Glucose-Regulated Protein of 94 kDa
GTPasa: Guanosin Trifosfatasa
GWA: Genome Wide Association
HLA: Human Leukocyte Antigen
HRR: Haplotype Relative Risk
ICOS: Inducible T-cell costimulator
IFI30: Interferon gamma-Inducible protein 30
IFN- γ : Interferón gamma
Ig: Inmunoglobulina
IL: interleuquina
Kb: Kilobases
LB: Luria Bertani
LD: Linkage Disequilibrium; Desequilibrio de Ligamiento (DL)
LT α : Linfotoxina alfa
M6PR: Mannose 6-Phosphate Receptor
Mb: Megabase

Glosario, Abreviaturas y Acrónimos

MHC: Major Histocompatibility Complex
MICA: MHC class I Chain related gene A
MIIC: MHC class II Compartments
MIM: Mendelian Inheritance in Man
MyD88: Myeloid Differentiation factor 88
MYO9B: Myosin-IXb
NFκB: Nuclear Factor kappa-B
NKG2D: Receptor que se expresa en la células *Natural Killers* (NK) y en otras subpoblaciones de linfocitos T.
OR: Odds ratio
pb: pares de bases
PCR: Polymerase Chain reaction
PI3K: Fosfoinositol-3- quinasa
RE: Retículo endoplásmico
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SE: Standard Error
SHP-2: SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SSCPs: Single Strand Conformation Polymorphisms
SSP-PCR: Sequence Specific Primer- Polymerase Chain reaction
S-TDT: Sibpair Transmission Disequilibrium Test
STR: Short Tandem Repeat
TCR: T Cell Receptor; receptor de célula T
TDT: Transmission Disequilibrium Test
TE: Tris- EDTA
TGt: transglutaminasa tisular; Transglutaminasa 2
Th: T helper
TJ: Tight Junctions; Uniones estrechas
TLR4: Toll-Like Receptor 4
Tm: melting temperature
TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha
UTR: Untranslated Region
V: volumen
ZAP70: Zeta-chain Associated Protein kinase 70kDa
ZOT: Zonula Occludens Toxin

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC; *Celiac Disease*, CD; MIM 212750) es la intolerancia permanente al gluten que padecen aquellos individuos genéticamente predispuestos. Con una prevalencia estimada entre el 0.5 -1% en poblaciones de origen caucásico, nos encontramos ante una enfermedad multifactorial, ya que en ella participan tanto la carga genética del individuo como el ambiente que le rodea, y compleja, dado que son múltiples los genes implicados y es la suma de los pequeños efectos que pueda estar ejerciendo cada uno de ellos lo que va a originar en última instancia a la patología.

1. Origen Histórico de la Enfermedad Celíaca

Ya en el siglo II d. C Areteo de Capadocia, un notable médico de la época imperial romana, hace referencia por primera vez en la historia a sujetos desnutridos con deposiciones abundantes y malolientes que empeoran cuando ingieren trigo, uno de los productos que forman la base de la alimentación de la humanidad. De este modo, Areteo de Capadocia se considera el primer médico en diagnosticar la EC y utilizar el término *κοιλιακος* («koiliakos»: abdomen) para describir un síntoma característico: la distensión abdominal.

Sin embargo, el nombre de la enfermedad no fue acuñado hasta 1888, cuando Samuel Gee, estudioso de los textos de Areteo de Capadocia, publicó por primera vez una descripción clínica totalmente detallada de una enteropatía provocada por trastornos en la alimentación que sin duda, debía ser curada mediante un tratamiento dietético (Gee 1888).

Fue en el año 1950 cuando el pediatra holandés William Dicke, describió magistralmente y demostró por primera vez, la relación entre la ingesta de determinados cereales y la presentación de la enfermedad, comprobando que la EC se desencadenaba al ingerir, aquellos sujetos predispuestos, harinas de trigo y centeno (Figura I.1) (Dicke 1950).

I. Introducción

Tres años más tarde, el mismo Dicke, junto con Weijers y Van de Kamer, demostraron que la acción tóxica de la harina estaba ligada a la fracción proteica de los cereales, el gluten y más concretamente a la gliadina. (Dicke et al. 1953).

En 1955 se comenzaron a realizar por primera vez biopsias perorales de intestino delgado, lo que permitió conocer las alteraciones morfológicas que se producían en las personas intolerantes al gluten, aportando al mismo tiempo un método de diagnóstico rápido y eficaz.



6. 2.—Photograph of five cases of coeliac disease showing the general clinical feature

Figura I.1. Fotografía de un grupo de niños con una clara distensión abdominal típica de la sintomatología de la enfermedad celíaca. Londres, 1938.

Hoy en día la EC está considerada como una enfermedad de carácter autoinmune por los daños que la ingesta de gluten produce en el organismo y cuya consecuencia principal es la malabsorción de

nutrientes, principios inmediatos y vitaminas esenciales para la vida. (Marsh 1992).

2. Formas de Presentación de la Enfermedad

En las últimas dos décadas, la EC se ha comparado con un gran iceberg del que sólo hemos visto la parte que sobresale en la superficie. Esto ha ocurrido porque la EC clásica con sintomatología digestiva representa sólo una pequeña parte del amplio espectro de situaciones en las que se puede encontrar un individuo susceptible de ser celiaco (Figura I.2).

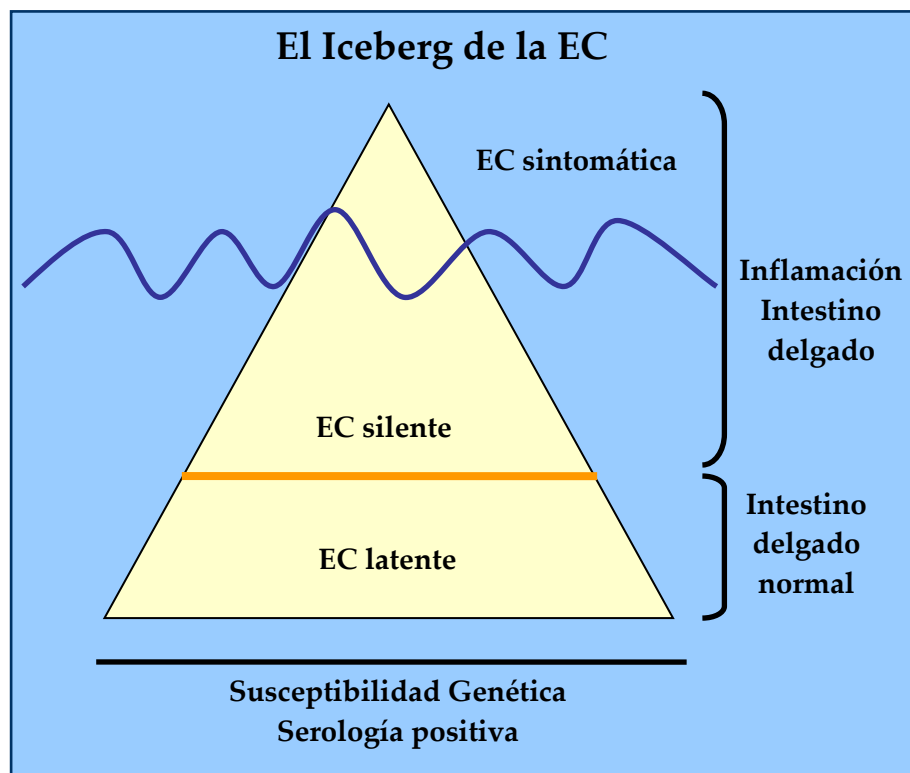


Figura I.2. El iceberg de la EC

2.1 Enfermedad Celíaca Clásica

Está determinada por el conjunto de síntomas intestinales y extraintestinales acompañado de marcadores serológicos positivos (anticuerpos antigliadina, antiendomiso y antitransglutaminasa) y alteraciones en la mucosa intestinal. El cuadro clínico, serológico y los cambios anatómicos se normalizan con la dieta exenta de gluten.

2.1.1 Síntomas Intestinales: Aunque las características clínicas difieren considerablemente en función de la edad de presentación, podemos destacar como síntomas intestinales principales la diarrea crónica, vómitos reiterados, retraso del crecimiento, distensión abdominal, falta de masa muscular, pérdida de peso, escasa estatura, cabello y piel secos, descalcificación, inapetencia, aumento del mal carácter y merma de la actividad dinámica, con síntomas de cansancio en aquellos niños diagnosticados en los primeros años de vida.

2.1.2 Síntomas Extraintestinales: El desarrollo de la EC en momentos posteriores a la infancia viene marcado por la aparición de dolor abdominal, pocas ganas de hacer actividad física y retraso en el ciclo menstrual en el caso de las niñas. En los adultos, además, produce serios trastornos como la descalcificación con posibles fracturas, estreñimiento, anemia, fatiga, desnutrición, abortos de repetición, impotencia, síntomas neurológicos y linfoma intestinal.

2.2 Enfermedad Celíaca Silente

La EC puede mantenerse clínicamente silente e incluso en situación de latencia con mucosa intestinal inicialmente normal consumiendo gluten. La malignización de la enfermedad viene dada por la presencia mantenida de gluten en la dieta, incluso en pequeñas cantidades. Por tanto, una dieta estricta sin gluten constituye la piedra angular del tratamiento de la EC y debe ser recomendada durante toda la vida, tanto a los enfermos sintomáticos como a los asintomáticos (Polanco and Ribes-Koninckx 1999).

2.3 Enfermedad celíaca Latente

Individuos asintomáticos con biopsia yeyunal normal (o exclusivamente con aumento de linfocitos intraepiteliales) que, pasados generalmente años consumiendo gluten de manera normal, presentan alteraciones típicas en la mucosa que revierten con la dieta exenta de gluten. (Sierra-Pérez 2003)

Se ha descrito numerosas asociaciones de EC con otras patologías, la mayoría con base inmunológica como dermatitis herpetiforme, déficit selectivo de IgA, diabetes tipo I, tiroiditis y hepatitis autoinmune, síndrome de Sjörgren, colitis microscópica, artritis reumatoide, síndrome de Down y nefropatía IgA entre otras. (Baranzini 2009)

3. Epidemiología

Existe un debate abierto sobre los beneficios que los cribados poblacionales tendrían en la detección precoz de la enfermedad y el conocimiento de su prevalencia real. El estudio serológico para la detección de presencia/ausencia de anticuerpos es la medida más aceptada, dada su elevada sensibilidad. Además de detectar EC no diagnosticada, permite hacer un seguimiento del paciente para asegurar que no haya trazas de gluten en su dieta.

En la actualidad está recomendado el rastreo de anticuerpos en pacientes que han sido recientemente diagnosticados de síndrome de fatiga crónica y síndrome de colon irritable. También se hace rastreo en enfermedades asociadas a la EC como son la diabetes tipo I, anemia, síndrome de Down, síndrome de Turner, lupus y tiroiditis autoinmune.

Aunque las pruebas dieran resultados positivos, podrían darse las siguientes situaciones:

- No desarrollar la enfermedad ni en la infancia ni en la edad adulta
- Desarrollar la enfermedad clásica, que suele ocurrir antes de los dos años de vida, aunque puede suceder a cualquier edad.

I. Introducción

- Presentarse de forma mono u oligosintomática, habitualmente con síntomas extraintestinales.
- Presentar una enfermedad con carácter autoinmune que conduzca al diagnóstico de la EC.
- Mantenerse asintomático clínicamente pero con marcadores serológicos positivos y cambios en la mucosa intestinal.
- Encontrarse asintomático con serología negativa y mucosa intestinal normal o con mínimos cambios, y posteriormente, a lo largo del tiempo, desarrollar la enfermedad sintomática o silente.

La EC afecta tanto a niños como a adultos y la relación mujer/varón es de 2:1. En distintos estudios se había descrito que la prevalencia de la EC clínicamente diagnosticada era 0,05-0,27% (tabla I.1), sin embargo, a raíz de la aparición del concepto de Iceberg de la EC y tras llevarse a cabo cribados poblacionales por análisis serológico en Europa, Sudamérica, Australasia y EE.UU, se ha demostrado que aproximadamente el 0,33%-1,06% de la población infantil en estos países podría tener EC no diagnosticada (Fasano et al. 2003) (5,66% en niños saharauis (Catassi et al. 1999)), y en adultos los datos serían del 0,18-1,2% (van Heel and West 2006). En poblaciones con ascendencia africana, japonesa y china, es raro el diagnóstico de la enfermedad, lo que reflejaría una incidencia mucho menor de los factores de riesgo genéticos.

En la actualidad se estima que la prevalencia de la EC entre los familiares en primer y segundo grado es superior al 5%, lo que supondría multiplicar por cinco la de la población general. En el síndrome de Down la EC es también aproximadamente cinco veces la de la población general y en la deficiencia de IgA todavía mayor, en torno al 8% de los casos desarrollan EC (Bonamico et al. 2001). La prevalencia de otras enfermedades autoinmunes (Collin et al. 1992; Counsell et al. 1994; Iltanen et al. 1999), especialmente diabetes (Cronin et al. 1997), en pacientes celíacos se encuentra en torno al 8%, muy superior a la de la población general.

Los estudios poblacionales nos indican que el incremento de casos de EC no se debe a que en los últimos años haya habido una epidemia, sino a la mejora del diagnóstico tras la concienciación de la enfermedad por parte de la comunidad clínica y sanitaria, aunque sabemos que a día de hoy existe una gran proporción de celíacos que no han sido diagnosticados (Zipser et al. 2005).

Actualmente se estima que la prevalencia mundial de la enfermedad celíaca es 1/266 y en España oscila entre 1/118 en la población infantil y 1/389 en la población adulta (Casellas 2006).

I. Introducción

Tabla I.1. Prevalencia de la EC en estudios basados en la población general.

Población Origen	Nº de casos	Rangos de edad	Prevalencia EC por mil	Prevalencia 1/población	Referencia
Italia	3351	11-15 años	3,28	1/305	(Catassi et al. 1994)
Italia	17201	6-15 años	4,77	1/210	(Catassi et al. 1996)
Dinamarca	1573	Adultos	1,9	1/526	(Weile et al. 1996)
Norte Irlanda	1823	15-65	8	1/125	(Houlston et al. 1997)
San Marino	2237	20-87	1,8	1/555	(Corazza et al. 1997)
Hungría	427	3-6 años	11,7	1/85	(Korponay-Szabo et al. 1999)
Sahara	989	4-7 años	56	1/18	(Catassi et al. 1999)
Francia	1163	35-64	2,6	1/389	(Couignoux et al. 2000)
Suecia	690	2-3 años	13	1/77	(Carlsson et al. 2001)
Argentina	2000	16-79	6	1/166	(Gomez et al. 2001)

Australia	3011	20-79	2,3	1/434	(Hovell et al. 2001)
España	3378	10-12 años	3,55	1/281	(Cilleruelo et al. 2002)
Portugal	536	13-14 años	7,46	1/134	(Antunes 2002)
Israel	1571	Población general	6	1/157	(Shamir et al. 2002)
EE.UU.	4126	Población general	7,5	1/133	(Clemente et al. 2003)
Finlandia	3654	7-16 años	15,32	1/99	(Maki et al. 2003)
Reino Unido	5470	7,5 años	10	1/100	(Bingley et al. 2004)
Uruguay	2000	1-14	19,6	1/51	(Méndez et al. 2004)
Egipto	1064	6-18	4,7	1/213	(Catassi et al. 2004)
Alemania	4173	adultos	4,5	1/220	(Mustalahti 2006)
India	4347	3-17	3,22	1/310	(Sood et al. 2006)

4. El Componente Genético de la Enfermedad Celíaca

El componente genético de la EC se demostró tras los estudios realizados en gemelos monozigóticos y fue alrededor de los años 70, cuando se relacionó por primera vez con los genes del sistema HLA (Bardella et al. 2005). Éste se hizo evidente ante dos observaciones:

- La frecuencia con la que aparece la enfermedad en los familiares en primer grado de un paciente celíaco (padres y hermanos) es mayor (aproximadamente de un 10%) que en individuos no emparentados (1%). (Sollid and Thorsby 1993)

- La concordancia entre gemelos monozigóticos está en torno al 70-80%, mientras que en hermanos dizigóticos es de un 11% (Greco et al. 2002). Los valores de riesgo relativo entre hermanos (λ_s entre 20-60) proporcionan el indicio más claro de que la enfermedad tiene un agrupamiento familiar, teniendo en cuenta la prevalencia en la población general. Este dato, además, apoya la implicación de los factores ambientales que rodean al individuo, ya que, de no ser así, la concordancia sería de un 100%. (Nistico et al. 2006).

4.1 El Sistema HLA

La EC está fuertemente asociada al sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), denominación que se le ha otorgado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) humano. El sistema HLA está integrado por un conjunto de genes denominados **genes de histocompatibilidad** y se localiza en la región cromosómica 6p21.31-6p21.32 abarcando un segmento de 4.000 Kb.

Los genes del sistema HLA se clasifican en tres regiones, denominadas clase I, II y III. Las moléculas de la clase I y II representan entidades estructurales diferentes, aunque todos los productos de estos genes pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas e intervienen en procesos de activación y restricción de la respuesta de los linfocitos T. La región de clase III está integrada por los genes que codifican moléculas del complemento (C2, C4A, C4B y factor B) y las isoenzimas de la 21-

hidroxilasa. Entre la región de clase III y la de la clase I existe un grupo de genes que codifican proteínas relacionadas con situaciones de estrés, inflamación o infección (figura I.3).

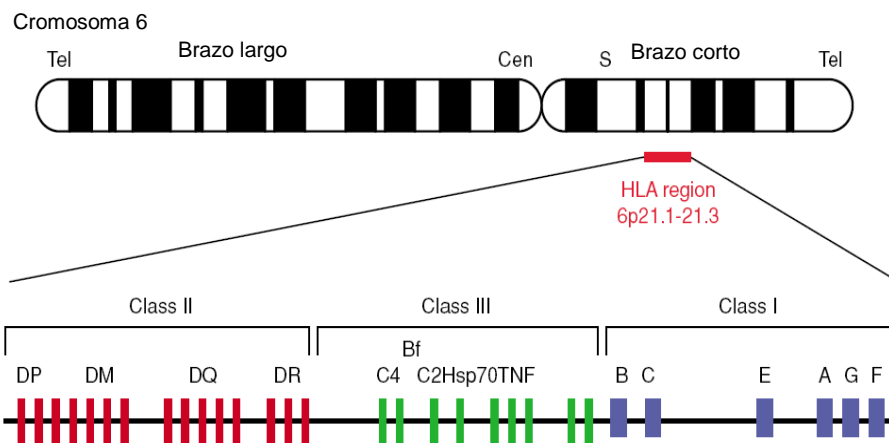


Figura I.3. Esquema del conjunto de genes que conforman el sistema HLA.

La EC está principalmente asociada a los genes HLA de clase II. La región que abarcan ha sido bautizada como **CELIAC1** y se agrupan en la denominación **HLA-D**. Se distinguen 5 familias o isotipos: DM, DO, DP, DQ y DR (figura I.4). Cada una de estas familias presenta dos *loci*, A y B, que codifican las cadenas α y β que se anclan en la superficie celular formando heterodímeros.

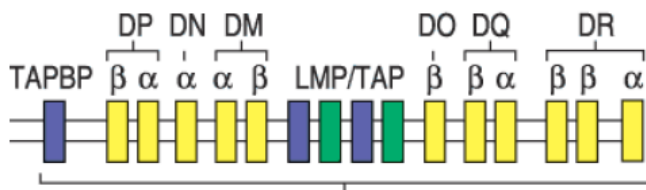


Fig. I.4 Conjunto de genes que integran el sistema HLA de clase II

La expresión de antígenos de clase II está restringida, en condiciones fisiológicas, a células del sistema inmune presentadoras

de antígenos (APCs: linfocitos B, células dendríticas y macrófagos) y del sistema retículo-endotelial.

4.2 Características del sistema HLA

- Codominancia y fenotipo: El sistema HLA se comporta de forma dialélica, autosómica y codominante. En la membrana celular se presentan los productos de ambos alelos.
- Haplotipos y segregación: la proximidad física de estos genes hace que éstos se transmitan juntos.
- Desequilibrio de ligamiento (DL): ciertas combinaciones de variantes alélicas se dan con mayor frecuencia que la que sería de esperar si la asociación fuera al azar.
- Altamente polimórfico: cada uno de los genes contiene un gran número de alelos. La diversidad de variantes genera una gran cantidad de combinaciones en un mismo cromosoma. La mayor parte de la variabilidad se localiza en el segundo exón de los genes de clase II. La variabilidad está, a su vez, concentrada en determinadas posiciones, las cuales están implicadas directa o indirectamente en la región de unión al péptido antigénico.

4.3 Inmunogenética del Sistema HLA en la Enfermedad Celíaca

Los primeros estudios de asociación del HLA con la EC se basaron en métodos serológicos que identificaban la variante B8 y posteriormente la variante DRB1*03 (Falchuk et al. 1972; Keuning et al. 1976). Estas moléculas están codificadas por alelos situados en un "haplotipo extendido" que abarca 6 Mb (A1-B8-DRB1*03-DQ2) presente en el 10% de la población del norte de Europa. Curiosamente, muchas otras enfermedades con carácter autoinmune están asociadas a este haplotipo, como son la diabetes tipo I y la tiroiditis autoinmune. Estudios posteriores señalaron con más exactitud a la molécula **DQ2** y en particular a la combinación HLA-DQA1*05 y HLA-DQB1*02 como la causa de la asociación a la EC.

(Sollid et al. 1989; Tosi et al. 1983). La importancia inmunopatogénica de esta asociación se fundamenta en el hecho de que en el intestino delgado la molécula DQ2 es la principal presentadora del gluten. (Lundin et al. 1990).

El heterodímero DQ2 puede ser codificado bien en *cis*, con los alelos DQA1*05:01-DQB1*02:01 (haplotipo DQ2.5) situados en el mismo cromosoma junto con el alelo DRB1*03, o en *trans* con cada alelo situado en uno de los cromosomas materno y paterno: esta vez sería las variantes DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02 (haplotipo DQ2.2) de un cromosoma que se heredan en combinación con los alelos DRB1*11/DRB1*12-DQA1*05:05-DQB1*03:01 (haplotipo DQ7) en el otro (figura I.5).

Ser portador en homocigosis del haplotipo DQ2.5 o ser heterocigoto compuesto DQ2.5/DQ2.2, confiere una susceptibilidad significativamente superior de ser celíaco que ser portador de uno de éstos en heterocigosis, lo que soporta la hipótesis del efecto dosis DQ2 en el desarrollo de la EC (Hernandez-Charro et al. 2008).

Aproximadamente y dependiendo de la población de estudio, el 95% de los afectados por la EC son portadores de los haplotipos DQ2.5 o DQ2.2, el resto son portadores del haplotipo denominado DQ8 (DQA1*03:01-DQB1*03:02) (Mearin et al. 1983; Sollid and Thorsby 1993). Sin embargo, cerca de un 30% de la población sana y de origen caucásico es portadora de uno de estos haplotipos de riesgo. Este hecho ha dado lugar a un modelo de patogénesis de la enfermedad en el que el genotipo DQ es necesario pero no suficiente para desencadenar la enfermedad (tabla I.2).

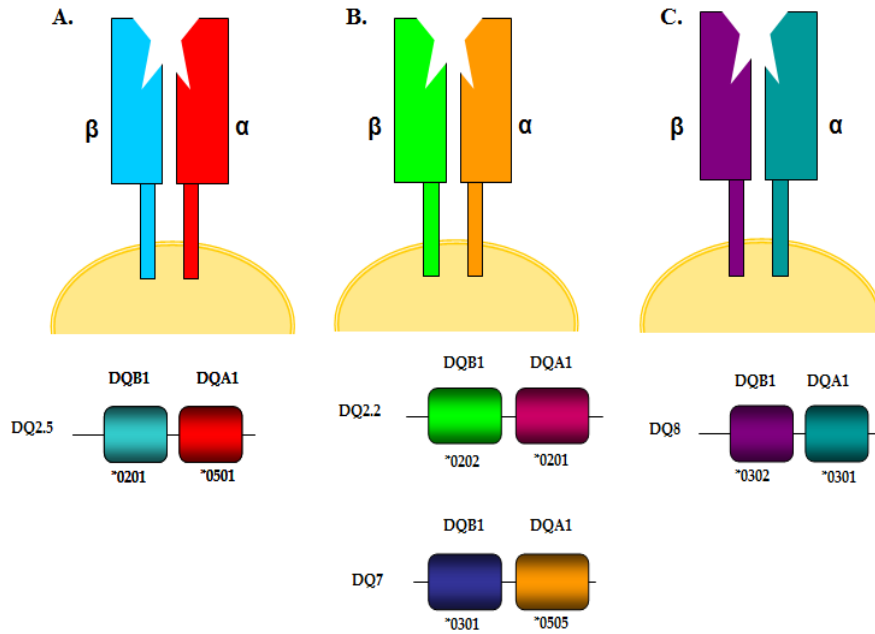


Figura I.5. Cadenas DQ-alfa y DQ-beta formando el heterodímero DQ2 y DQ8 en la superficie celular. En la parte inferior, esquema de los loci DQA1 y DQB1 situados de manera consecutiva en el cromosoma 6. **A.** Haplotipo DQ2.5, que codifica la molécula DQ2 en cis. **B.** El alelo DQA1*05:05 de un cromosoma y el alelo DQB1*02:02 en el otro cromosoma conforman la molécula DQ2 en trans. **C.** Haplotipo DQ8.

Tipo serológico	genotipo	Tipo DQ	Suscept. celíaca
DRB1*03:DQ2/DRB1*03:DQ2	DQA1*05:01-DQB1*02:01/ DQA1*05:01-DQB1*02:01	DQ2.5 <i>cis</i> en homocigosis	Alta
DRB1*03:DQ2/DRB1*07:DQ2	DQA1*05:01-DQB1*02:01/ DQA1*02:01-DQB1*02:02	DQ2.5 <i>cis</i> + DQ2.2	Alta
DRB1*03:DQ2/ otro	DQA1*05:01-DQB1*02:01/ otro	DQ2.5 <i>cis</i> en heterocigosis	moderada
DRB1*11/DRB1*12:DQ7/ DRB1*07:DQ2	DQA1*05:05-DQB1*03:01/ DQA1*02:01-DQB1*02:02	DQ2.5 <i>trans</i>	moderada
DRB1*07:DQ2/ otro	DQA1*02:01-DQB1*02:02/ Otro	DQ2.2	nula
DR4:DQ8	DQA1*03:01-DQB1*03:02/ Otro	DQ8	moderada

Tabla I.2. Variantes HLA-DQ asociados a la EC. Nomenclatura en función de los haplotipos DQ parentales y susceptibilidad.

5. Otros Genes Implicados en la Enfermedad Celíaca

Los resultados obtenidos en los estudios familiares nos sugieren la hipótesis de que existen otros genes no HLA implicados en la EC. Incluso dentro del mismo complejo HLA encontramos loci con funciones inmunológicas que también podrían estar contribuyendo a la enfermedad y en los que también se ha observado asociación. Sin embargo, el desequilibrio de ligamiento que existe entre las variantes génicas de toda la región es un obstáculo a la hora de demostrar dicha asociación.

Al genotipo HLA se le atribuye un 40% de la heredabilidad de la EC, por ello son necesarios estudios de ligamiento y de asociación genética que nos ayuden a explicar el 60% de la susceptibilidad genética restante. Se han realizado numerosos estudios poblacionales con el fin de encontrar nuevos genes, lo que ha llevado a definir las regiones **CELIAC** (tabla I.3) como aquellas regiones cromosómicas en las que se ha encontrado cierta asociación con polimorfismos genéticos que, de alguna manera, actuarían como factores de riesgo y contribuirían a ese 60% de carga genética que falta por determinar.

La mayoría de los loci encontrados están relacionados con la regulación de los linfocitos T, procesos de inflamación, alteración del citoesqueleto y cambios en la permeabilidad intestinal (Schuppan et al. 2009).

Loci identificados	Análisis empleado	Población de origen	Genes candidatos
CELIAC 2 5q31-q33	GWA (microsatélites)	Italia, Finlandia, Escandinavia, Meta-análisis europeo	Desconocidos
CELIAC 3 2q33	Aproximación por genes candidatos	Francia, Holanda, Suecia, Noruega, Noruega	<i>CTLA4</i>
CELIAC 4 19q13.1	GWA (SNPs)	Holanda	<i>Myosin IXB</i>
CELIAC 5 15q-11-q13	GWA (microsatélites)	Finlandia	Desconocido
CELIAC 6 4q27	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda, Italia, USA, Escandinavia	<i>KIAA1109, TENR (ADA1), IL2, IL21</i>
CELIAC 7 1q31	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda, Italia, USA	<i>RGS1</i>
CELIAC 8 2q11-q12	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda	<i>IL18RAP, IL18R1</i>
CELIAC 9 3p21	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda, España	<i>CCR1, CCR2, CCRL2, CCR3, CCR5, XCR1</i>
CELIAC 10 3q25-q26	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda, Italia, USA	<i>IL12A</i>
CELIAC 11 3q28	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda, Italia, USA	<i>LPP</i>
CELIAC 12 6q25.3	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda, Italia	<i>TAGAP</i>
CELIAC 13 12q24	GWA (SNPs)	UK, Holanda, Irlanda, Italia, USA	<i>SH2B3</i>

Tabla I.3. Resultados de los estudios de asociación poblacionales para la localización de genes no-HLA de susceptibilidad en la EC, regiones CELIAC a las que pertenecen y región cromosómica donde se localizan. GWA: *Genome wide Analysis*. SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*.

5.1 Regiones CELIAC Clásicas

5.1.1 CELIAC1: se localiza en la región cromosómica 6p21.31-6p21.32 y ésta fue la primera región descrita mediante estudios de ligamiento. Alberga los genes del sistema HLA clase II. Como ya hemos descrito anteriormente, es la única región cuyos resultados han sido reproducidos en todos los estudios poblacionales realizados hasta el momento.

Situados entre los genes del sistema HLA clase I y clase II se encuentran los genes *TNF α* (*Tumor Necrosis Factor alfa*) y *LT α* (*Linfotoxin alfa*, también conocido como *TNF β*), en los que diversos estudios han descrito los polimorfismos *TNF α :308A* (polimorfismo en la región promotora) y *LT α :NcoIG* (polimorfismo en el primer intrón) como marcadores adicionales de EC por estar implicados en el aumento de la secreción del factor de necrosis tumoral (Garrote et al. 2002).

Debido a su cercanía con el sistema HLA, existen controversias sobre su verdadera implicación o si por el contrario los resultados de asociación positiva se deben a un fenómeno de desequilibrio de ligamiento.

5.1.2 CELIAC2: se localiza en la región cromosómica 5q31-5q33 y fue descrita por primera vez en 1998 en población italiana (Greco et al. 1998). Contiene genes implicados en la activación y diferenciación de los linfocitos T y genes que codifican interleuquinas asociadas a la respuesta Th2. También se ha asociado con otras enfermedades de carácter autoinmune o inflamatorio. Aunque los análisis de ligamiento han dado resultados positivos en diversas poblaciones, hasta la fecha no existe una asociación robusta con ningún gen en particular (Babron et al. 2003; Koskinen et al. 2009b; Liu et al. 2002; Naluai et al. 2001).

5.1.3 CELIAC3: se localiza en el cromosoma 2q33 y es la región no HLA más destacable en cuanto a la reproducibilidad de los resultados que se han obtenido en ella. Contiene los genes *CD28*, *CTLA4* (*Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4*) e *ICOS* (*Inducible CO-stimulator*) (Haimila et al. 2004; Holopainen et al. 1999; Naluai et

al. 2000; Popat et al. 2002) que codifican moléculas coestimuladoras y estabilizadoras de señal en los linfocitos T y por tanto son reguladores de su actividad (Ueda et al. 2003). Mientras que la molécula CD28 estimula la respuesta linfocitaria, CTLA4 compite por su mismo ligando, las moléculas CD80 y CD86, para inhibirla (figura I.6) (Djilali-Saiah et al. 1998; Haimila et al. 2009; van Belzen et al. 2004a). Dentro de esta región, los polimorfismos asociados implicarían una menor producción de CTLA4 y por tanto, una menor capacidad de control de respuesta por parte del linfocito T.

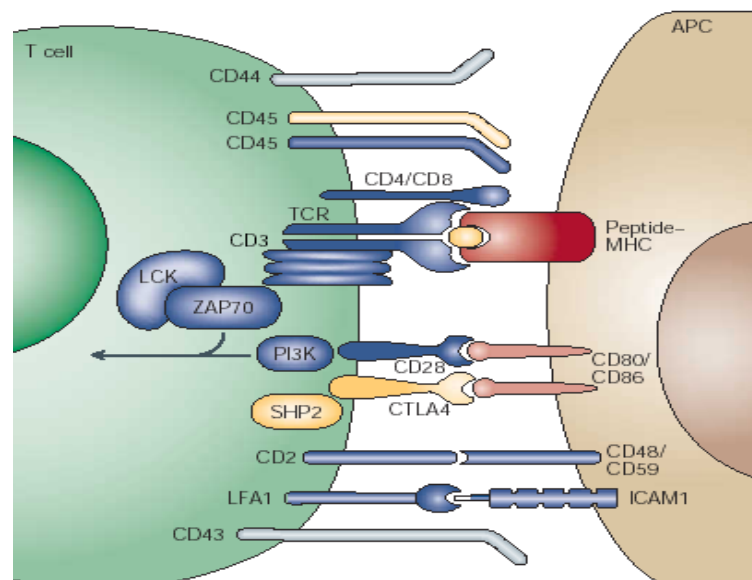


Figura I.6. Esquema de la interacción de un linfocito T con la célula presentadora de antígeno. CD28 y CTLA4 compiten por el mismo ligando. CD28 activa una proteína quinasa (PI3K) que potencia la cascada de señalización en el linfocito T mientras que CTLA4 activa una fosfatasa (SHP2) que inhibe la respuesta del linfocito. (Huppa and Davis 2003)

5.1.4 CELIAC 4: se localiza en el cromosoma 19p13 donde se ha encontrado una fuerte asociación con el gen *MYO9B* (*myosin IXB*), una miosina no convencional que actúa como una GTPasa activadora de la proteína Rho. Está implicada en el movimiento del citoesqueleto mediante la remodelación de los filamentos de actina y las uniones

intercelulares. (Monsuur et al. 2005; Van Belzen et al. 2003). Dadas las nuevas teorías etiopatogénicas sobre la disfunción del epitelio intestinal en el control de la permeabilidad, este locus ha cobrado una gran importancia en los estudios poblacionales y aunque los estudios de asociación no se han reproducido, ésta sigue considerándose una región potencial ya que en ella existen más de 140 genes que de una u otra forma podrían estar implicados en la EC dada la función de las proteínas que codifican ya sean estructurales o inmunoreguladoras (Achkar and Duerr 2008; Capilla et al. 2007; Giordano et al. 2006; Nunez et al. 2006).

5.2 Nuevas Regiones CELIAC Propuestas

Desde que se inició la búsqueda de genes no HLA implicados en la EC, han sido muchas las regiones que han dado resultados positivos en análisis de ligamiento a lo largo del genoma. Sin embargo, no llegaron a considerarse regiones CELIAC dado el tamaño muestral empleado o el valor de significación estadística, pero sobre todo porque los resultados no eran reproducibles en el resto de poblaciones.

En la actualidad, para evitar problemas como el que un tamaño muestral no sea lo suficientemente elevado o el fondo genético de una población sesgue los resultados de asociación, se están llevando a cabo meta-análisis en los que se unifican conjuntos de poblaciones europeas (tabla I.3). Así, se han llegado a sugerir hasta 9 regiones CELIAC nuevas que contienen genes cuya función es totalmente coherente con las teorías patogénicas de la enfermedad (figura I.7) (Dema et al. 2009; Garner et al. 2009; Hunt et al. 2008; Koskinen et al. 2009a; Romanos et al. 2009; van Heel et al. 2007; Woolley et al. 2002).

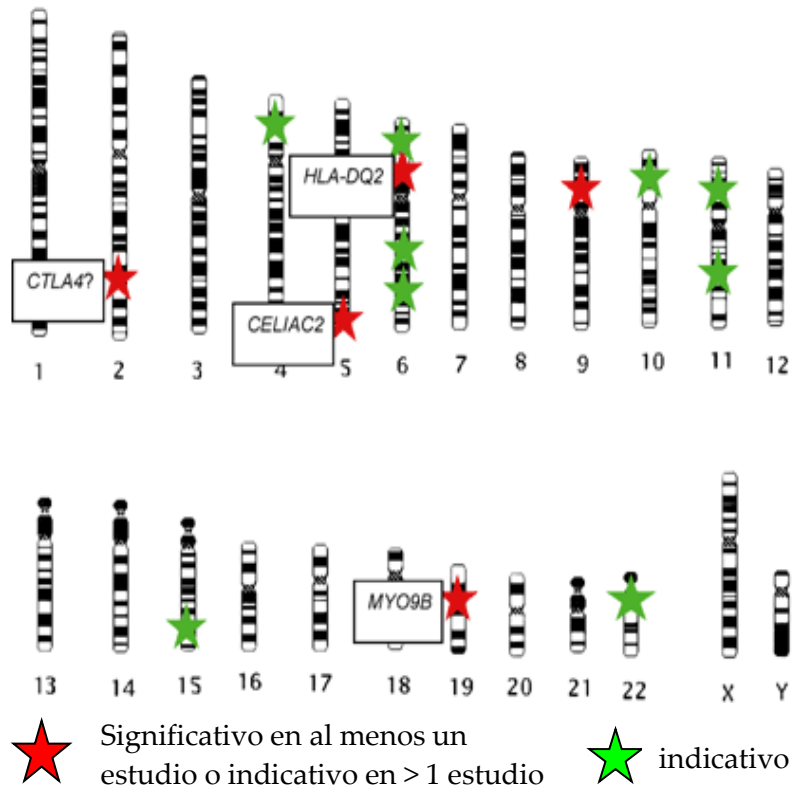


Figura I.7. Principales regiones cromosómicas relacionadas con la EC.

6. El Factor Ambiental en la Enfermedad Celíaca: EL GLUTEN

En los años 50, Dicke identificaba el gluten como la porción proteica tóxica del trigo. El gluten es un conjunto de proteínas individuales que se pueden clasificar en dos grupos: **prolaminas** (solubles en etanol 40-70%) y **gluteninas** (insolubles). Hoy en día sabemos que la EC está causada principalmente por la intolerancia a las prolaminas del gluten: la **gliadina** presente en el trigo, así como a las proteínas análogas en el centeno (secalina), la cebada (hordeína) y la avena (avenina) (tabla I.4).

Las prolaminas de los distintos cereales son:

Cereal	Tipo de Prolamina	Contenido (%)
Trigo	Gliadina	69 %
Centeno	Secalina	30-50%
Cebada	Hordeína	46-52%
Avena	Avenina	16%
Borona	Panicina	40%
Maíz	Ziena	55%
Arroz	Orzenina	5%
Sorgo	Kafirina	52%

Tabla I.4. Tipos de prolaminas y presencia en los cereales

6.1 Afinidad del Epítipo de Gliadina por la Molécula DQ2

Los péptidos de gliadina entran en el organismo al ser ingeridos como componentes de los cereales de la dieta. El tipo de aminoácidos que los componen, así como su posición en el péptido, es esencial para la unión a la molécula DQ2. La unión se produce en la hendidura que forma el heterodímero DQ que forma concavidades o "Pockets" (P) donde se acoplan estos residuos (Figura I.8). Por ejemplo, el glutamato en la posición P6 es un residuo de gran importancia ya que actúa como ancla con el residuo de Lys- β 71 de la molécula DQ2. Los aminoácidos Tyr α 22, Arg β 70 y Lys β 71 son los responsables de la preferencia de unión de los residuos con carga negativa del glutamato en los sitios P4, P6 y P7. La deamidación del péptido de gliadina por parte de la enzima Transglutaminasa tisular (tTG o TG2) es imprescindible para que la unión del péptido a la molécula DQ2 se dé con una afinidad tan elevada

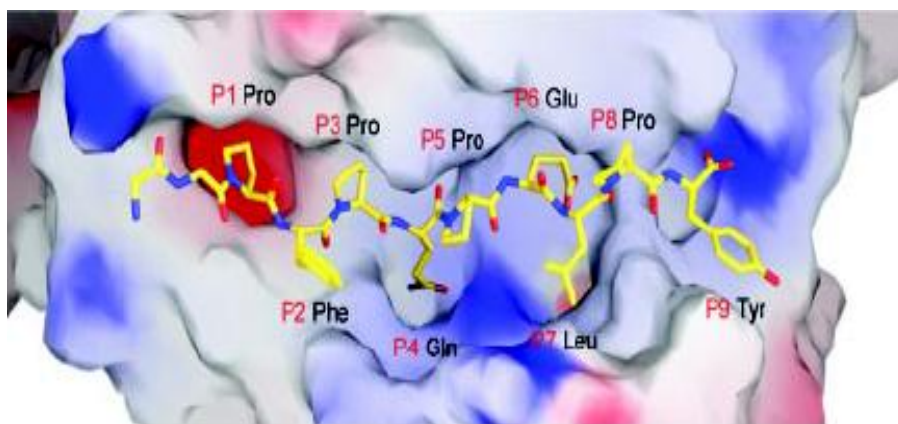


Figura I.8. Determinación mediante cristalografía de rayos X del complejo formado por la molécula DQ2 unida al péptido antigénico. Resolución de 2,2 Å

La gliadina presenta un fragmento peptídico principal de 33 residuos (33-mer, LQLQFPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF; α 2-gliadin 56-88) que se produce tras la proteólisis gastrointestinal y que contiene seis copias de tres epítipos de linfocitos T que se

solapan parcialmente (Figura I.9). Su estructura general así como su alto contenido en prolina (P) y glutamina (Q) le hace resistente a la completa digestión proteolítica por parte de las enzimas del intestino delgado como la pepsina y la quimiotripsina, que son deficientes en actividad prolil-endopeptidasa, así como enzimas gástricas y pancreáticas. (Arentz-Hansen et al. 2002; Hausch et al. 2002; Shan et al. 2002)

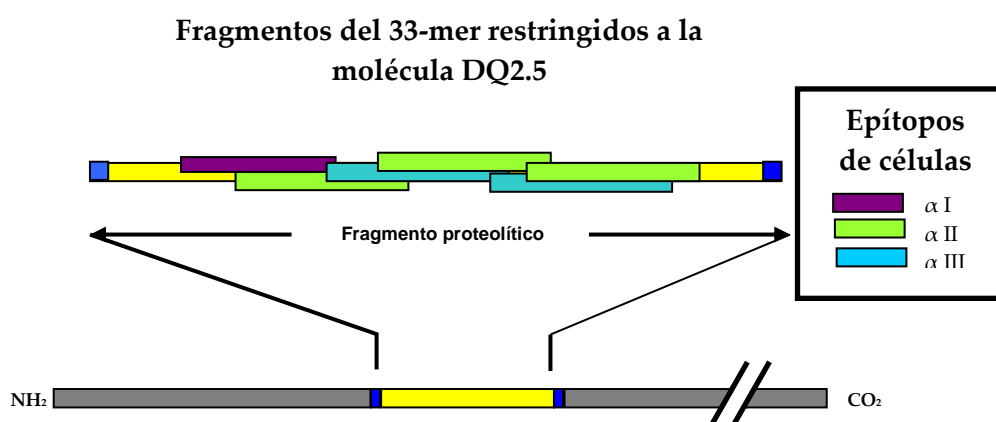


Figura I.9. El péptido 33-mer contiene seis copias de los epítomos restringidos a las células T-DQ2.5 que son parcialmente solapantes.

Tras haber sido deamidados por la tTG, algunos de los residuos de glutamina del péptido 33-mer, se transforman en ácido glutámico que presenta carga negativa aumentando su inmunogenicidad y convirtiéndose en un estimulador muy potente de las células T (Tabla I.5).

En comparación con otros péptidos del gluten que también son reconocidos por la molécula DQ2, esta unión es la que se produce con mayor intensidad (Qiao et al. 2004). La activación de los linfocitos T reactivos al gluten representa el detonante de la EC.

Origen	Cereal	Secuencia peptídica	HLA-DQ
α - Gliadina	Trigo	PQPQLPYPQ	DQ2
Hordeína	Cebada	PQPQQPFPQ	DQ2
Secalina	Centeno	PQPQQPFPQ	DQ2
α - Gliadina	Trigo	PFQPQLPY	DQ2
Hordeína	Cebada	PFQPQQPF	DQ2
Secalina	Centeno	PFQPQQPF	DQ2
Avenina	Avena	PYPEQQEPF	DQ2
Avenina	Avena	PYPEQQQPF	DQ2
α - Gliadina	Trigo	FRPQQYPYQ	DQ2
Hordeína	Cebada	FPPQQPFPQ	DQ2
α - Gliadina	Trigo	QGSFQPSQQ	DQ8
γ - Gliadina	Trigo	FPOQSFPOQQ	DQ2
Avenina	Avena	FVQQQQQPF	DQ2
γ - Gliadina	Trigo	PQQSFPQQQ	DQ2
Secalina	Centeno	PQQSFPQQP	DQ2
γ - Gliadina	Trigo	IIQPQQPAQ	DQ2
LMW-glutenina	Trigo	FSQQQQSPF	DQ2
LMW-glutenina	Trigo	FSQQQQQPL	DQ2
HMW-glutenina	Trigo	QGYPTSPQ	DQ8
Gluten	Trigo	QLPQQPQQF	DQ2

Tabla I.5. Visión general de los péptidos presentes en los distintos cereales que son capaces de estimular la respuesta de los linfocitos T. Alineamiento de la secuencia principal de los epítomos de gliadina más inmunogénicos y molécula DQ a la que se encuentran restringidos. Los residuos marcados en negrita son aquéllos modificados por la enzima tTG.

7. Patogénesis de la Enfermedad Celíaca

7.1 Teorías de la Autoinmunidad

La EC ha sido descrita como una enfermedad autoinmune. Una enfermedad autoinmune es aquella en la que el sistema inmunológico actúa contra componentes del propio organismo, convirtiéndose en su propio agresor en lugar de protegerlo.

Desde que las enfermedades autoinmunes fueron descritas por primera vez, los investigadores las han relacionado con procesos de infección viral o bacteriana dado el denominado “mimetismo molecular” según el cual, los antígenos microbianos/virales son similares a los autoantígenos. Esto significaría que la inducción de la respuesta inmune a este tipo de epítomos daría lugar a una reacción cruzada con los autoantígenos originando así la autoinmunidad. De acuerdo con esta teoría, una vez se activa el proceso autoinmune, éste se hace independiente del factor ambiental que lo ha desencadenado y se perpetúa de manera irreversible (Christen and von Herrath 2004; Perl 2004).

Existe otra teoría que apoya la idea de que los microorganismos exponen los autoantígenos al sistema inmune cuando están dañando directamente a los tejidos durante una infección activa y que esto daría lugar al proceso de autoinmunidad (Miller et al. 1991).

Y por último, encontramos una nueva teoría que ha sido bautizada como la “Teoría de la Higiene” según la cual, el aumento de la limpieza y la falta de exposición a determinados organismos son los responsables de la epidemia de enfermedades autoinmunes que han aparecido en los últimos 40 años en los países industrializados. De hecho, se ha comprobado que en los neonatos, los antígenos microbianos pueden inducir la respuesta por parte de los linfocitos Th1 (CD4+ que inducen la producción de IFN γ y TNF α), compensando la respuesta normalmente dominante de los Th2 (inducen la producción de IL-4 e IL-13). En ausencia de microbios, el intestino estaría predispuesto a una respuesta exagerada por parte de

éstos últimos dando lugar al desarrollo de una enfermedad atópica. (Sudo et al. 2002)

En la actualidad la hipótesis más aceptada es que tanto la inmunidad adquirida como el desequilibrio entre la respuesta de los linfocitos Th1 y Th2 son los elementos clave que subyacen la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. El comportamiento de la EC "activa" es idéntico al de cualquier enfermedad autoinmune y se caracteriza por un predominio de respuesta por parte de los linfocitos Th1.

Cabe destacar que la EC no es una enfermedad autoinmune como tal ya que un diagnóstico a tiempo y una dieta exenta de gluten hacen que los síntomas desaparezcan y el intestino de la persona afectada recupere su estructura y su función con normalidad. Por eso se habla de la "condición celíaca". Sin gluten el enfermo pasa a ser un individuo totalmente sano, cosa que no sucede en las enfermedades autoinmunes.

7.2 Arquitectura del Epitelio Intestinal

El epitelio intestinal está formado por una monocapa de células epiteliales polarizadas cuya característica principal es su “ribete en cepillo”. Esta morfología aumenta su superficie y por tanto, el área de absorción de nutrientes. Las células están unidas por *Tight Junctions* (TJ) o “uniones estrechas” que lo convierten en un epitelio con permeabilidad selectiva (figura I.10).

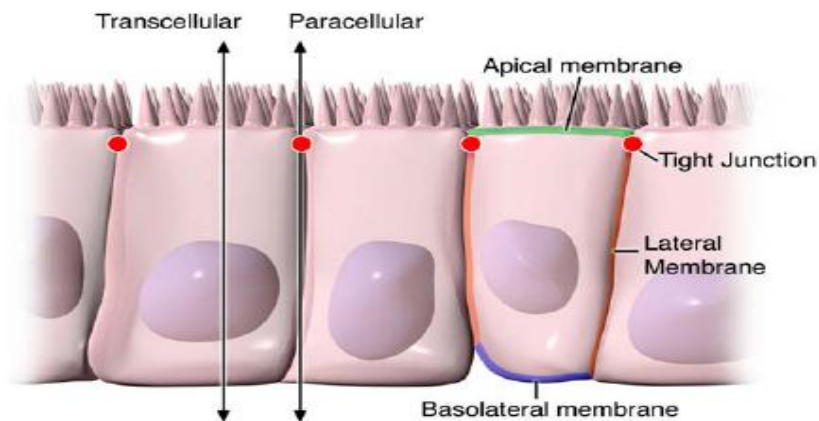


Figura I.10. Rutas de permeabilidad epitelial. La permeabilidad transcelular está asociada al paso de agua y solutos a través de las células intestinales. La permeabilidad paracelular está asociada con el movimiento a través del espacio intercelular y está regulada por las TJ localizadas en la membrana apical lateral (Groschwitz and Hogan 2009)

El epitelio intestinal forma parte del sistema digestivo pero además es un componente clave del sistema inmune de las mucosas y exhibe características inmunológicas innatas y adquiridas. Actúa tanto como barrera física de protección y como primera línea de reconocimiento de patógenos ya que sus células expresan en su superficie distintos tipos de receptores *toll like* (TLR) que inician y regulan distintas respuestas innatas, así como moléculas HLA de clase I y II que median respuestas inmunes adaptativas (Cario and Podolsky 2003). Un intestino normal debe ser capaz de mantener la “hipo-reactividad” frente a la flora comensal.

7.3 Patogenia de la Enfermedad Celíaca

Aunque el mecanismo exacto con el que se desarrolla la EC no se conoce todavía, en este apartado trataremos de exponer en qué punto nos encontramos ante las hipótesis que se barajan en la actualidad.

En condiciones fisiológicas, al acceso de la gliadina (30-90 KDa) al tejido linfático asociado al intestino se encuentra impedido por las TJ que limitan el paso de macromoléculas a través de la barrera intestinal (Schneeberger and Lynch 2004). Sin embargo en individuos susceptibles, la interacción entre la gliadina y la célula intestinal da lugar al desensamblaje de las TJ y es esta alteración la que se ha postulado como la primera causante de los sucesos inmunológicos que van a suceder.

La enzima **zonulina** es una proteína capaz de inducir el desensamblaje de las TJ y su descubrimiento ha causado una revolución en la teoría de la patogénesis de la EC. Su producción en la fase activa de la enfermedad es continua y además se encuentra aumentada en comparación con individuos sanos (Fasano et al. 2000). La secreción de zonulina comienza tras la exposición de las células a la gliadina en su porción apical y no en la basolateral (Clemente et al. 2003).

En un primer momento, el receptor de quimoquinas **CXCR3** actúa como receptor de la gliadina y esta interacción da lugar al reclutamiento de la proteína adaptadora **MyD88** (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) (Lammers et al. 2008), lo que provoca una liberación de zonulina MyD88-dependiente (Thomas et al. 2006). CXCR3 se expresa en células del epitelio intestinal y está relacionado con el reclutamiento de leucocitos en órganos diana y el consecuente daño tisular mediado por los Th1 en infecciones víricas y bacterianas (Stiles et al. 2006).

MyD88 es capaz de inducir una cascada de señalización intracelular clásica que implica en última instancia, la activación de $\text{NF}\kappa\beta$ y la consecuente transcripción de genes, resultando en la producción de citoquinas y quimoquinas (figura I.11).

I. Introducción

Además de la predisposición genética y la exposición a un agente externo, son necesarios tres puntos clave para que se desarrolle el proceso de autoinmunidad:

- 1) La descoordinación entre la inmunidad innata y la adquirida.
- 2) El mimetismo molecular
- 3) La pérdida de la función protectora de la barrera intestinal

En cuanto a cómo se desarrollaría el proceso de reconocimiento del péptido de gliadina, la hipótesis más relevante es que los linfocitos B específicos de la tTG unirían e internalizarían los complejos gliadina-tTG mediante inmunoglobulinas específicas de superficie. El fragmento de gliadina acabaría procesado finalmente y presentado por las moléculas DQ2 o DQ8 a las células T específicas de gliadina, proporcionando la ayuda necesaria para la maduración de los linfocitos B y la secreción de anticuerpos. Esto explicaría porqué los niveles de anticuerpos anti-tTG en la EC son dependientes de la presencia de gliadina en la dieta y porqué la eliminación de ésta anularía la ayuda necesaria por parte de los linfocitos T para la producción de anticuerpos.

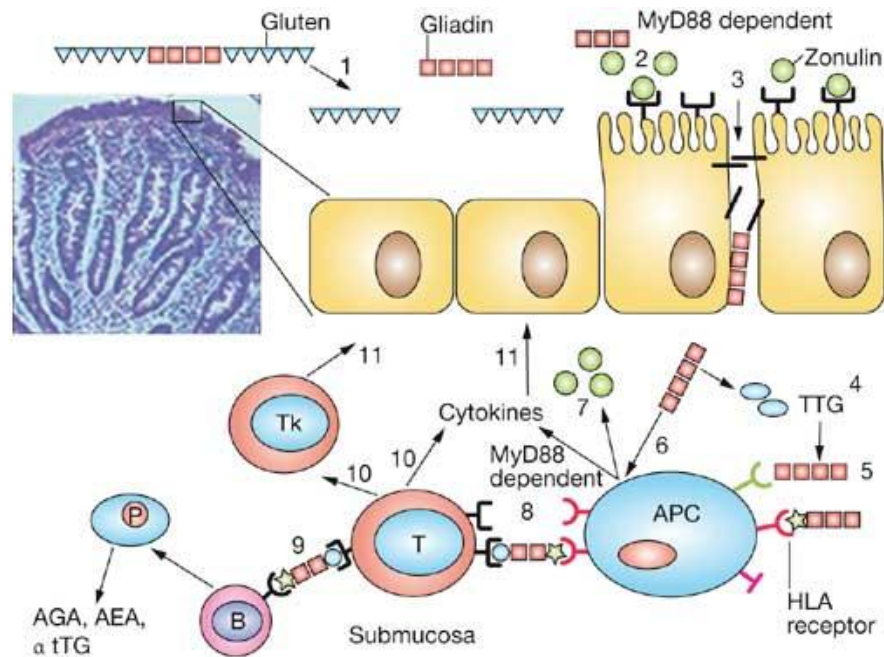


Figura I.11. **Modelo de permeabilidad intestinal alterada en la patogénesis de la EC.** La gliadina y sus fragmentos inmunogénicos son presentados en el lumen intestinal y son reconocidos por el receptor CXCR3 (1) dando lugar a la activación de MyD88 y la liberación de zonulina (2). En aquellos individuos con alteraciones en el sistema de secreción de zonulina se produce una apertura descontrolada de las TJ y el paso indiscriminado de la gliadina (3). Después de la deamidación por parte de la transglutaminasa tisular (4), los péptidos de gliadina se unirán a los receptores HLA de las células presentadoras de antígeno (APCs) (5). Por otro lado, la gliadina puede actuar directamente en las APCs (6) aumentando la liberación de citoquinas y zonulina. Los estudios *in vitro* señalan que algunas citoquinas y en particular $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ y radicales como el óxido nítrico, pueden provocar la disfunción de la mucosa intestinal durante la fase aguda de las enfermedades inflamatorias intestinales (7). Los péptidos de gliadina son presentados a los linfocitos T (8) dando lugar a una respuesta inmune aberrante, tanto humoral (9) como mediada por células (10) en individuos genéticamente susceptibles. Esta interacción entre la respuesta innata y la adquirida va a ser la responsable del proceso autoinmune que atacará a las células intestinales originando así la lesión típica de la EC (11). P: célula plasmática; Tk: célula T *killer*; AEA: anticuerpos anti-endomisio; α tTG: anticuerpos anti-transglutaminasa; AGA: anticuerpos anti-gliadina (Fasano and Shea-Donohue 2005).

8. Diagnóstico de la Enfermedad Celíaca

8.1 Sospecha Clínica

El paciente presenta síntomas y signos de la enfermedad o bien pertenece a un grupo de riesgo, ya sea por padecer otra enfermedad que pudiera estar asociada a la EC o por ser familiar en primer o segundo grado de una persona afectada.

Existen distintas pruebas a llevar a cabo para el diagnóstico de la enfermedad y es el grado de afectación lo que va a determinar el orden de éstas. Ninguna prueba tendrá validez si el paciente está siguiendo una dieta exenta de gluten. La lesión intestinal empieza a recuperarse a las pocas semanas de haber eliminado el gluten de la dieta mientras que los niveles de anticuerpos tardan meses en disminuir.

8.2 Determinación de Marcadores Serológicos

El análisis de los marcadores serológicos es la primera prueba a realizar ante la sospecha de EC, aunque la negatividad de los mismos no es excluyente en el diagnóstico. Cabe destacar su utilidad en la detección de aquellos individuos con mayor probabilidad de presentar la EC, sobre todo en aquellas personas que no presenten síntomas gastrointestinales, que padezcan determinadas enfermedades autoinmunes o para el despistaje de familiares de primer grado de enfermos diagnosticados.

Los tests serológicos se basan en ensayos de inmunofluorescencia (endomiso y gliadina) indirecta o ELISA (gliadina y transglutaminasa). (Farrell and Kelly 2001). Los resultados determinarán la conducta a seguir (tabla I.6).

Marcadores serológicos:

- **Anticuerpos Antigliadina (AGA):** Fueron los primeros en utilizarse y se encuentran en el 80% de los pacientes. Son tanto de clase IgA como IgG. Se utilizan preferentemente los de clase IgA y su eficacia para el cribado de la EC es mayor en niños que en adultos. (Volta et al. 1985)

▪ **Anticuerpos Antiendomiso (EMA):** De clase IgA. Su sensibilidad y su especificidad son variables según la edad. Tienen el inconveniente de la laboriosidad de su determinación y su interpretación es subjetiva.

▪ **Anticuerpos Antitransglutaminasa de clase IgA (AAtTG):** Su análisis ha suplantado otros test serológicos más antiguos debido a su alta sensibilidad y especificidad para detectar la enfermedad. Los ensayos se basan en la proteína humana recombinante como antígeno. (Sblattero et al. 2000) Se utilizan sobre todo para el cribado de la EC. También está disponible la determinación de AAtTG de clase IgG, especialmente útil en caso de un déficit de IgA asociado a EC.

Anticuerpos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Antigliadina	75-90	82-95
Antiendomiso	85-98	97-100
Antitransglutaminasa	90-98	94-97

Tabla I.6. Eficacia y sensibilidad de los diferentes anticuerpos de clase IgA considerados en el diagnóstico serológico de la EC (Polanco 2008).

8.3 Estudio Genético

La implicación del sistema HLA en la EC se conoce desde los estudios de asociación basados en el análisis de serotipos. Tal como se indicó en el apartado 1.4.3, el 95% de los pacientes celíacos son portadores del haplotipo DQ2.5 o DQ2.2, mientras que el 5% restante son portadores del haplotipo DQ8. No es habitual encontrar pacientes con un genotipo HLA DQ2 o DQ8 negativo, aunque puede darse el caso. El genotipo HLA como herramienta de diagnóstico genético resulta útil para una predicción negativa de la enfermedad aunque, al igual que sucede con el análisis serológico, no es excluyente ni determinante (tabla I.7) (Hadithi et al. 2007).

Test	Sensibilidad	Especificidad
HLA-DQ2	94%	73%
HLA-DQ8	12%	81%

Tabla I.7. Sensibilidad y especificidad de los marcadores HLA-DQ2 y HLA-DQ8 en la EC (Polanco 2008).

8.4 Biopsia Duodenoyeyunal

La EC compromete la mucosa del intestino delgado. Las submucosas muscular y serosa por lo común no están afectadas. Realizar una biopsia en el duodeno proximal o del yeyuno (procedimiento más habitual en niños) antes de la retirada del gluten de la dieta es la única prueba que realmente establece un diagnóstico definitivo. El resultado del estudio anatomopatológico permite confirmar la existencia de lesiones compatibles con la EC y establecer el estadio de la lesión (figura I.12) mediante la **Clasificación de Marsh** (Marsh 1992):

- **Marsh 0:** Mucosa preinfiltrativa
- **Marsh 1:** Incremento de linfocitos intraepiteliales (población >25%)
- **Marsh 2:** Hiperplasia de las criptas
- **Marsh 3:** Atrofia vellositaria parcial (3a), subtotal (3b), total (3c)
- **Marsh 4:** Hipoplasia.

Estos cambios en la arquitectura reducen la cantidad de superficie epitelial disponible para la digestión y la absorción de nutrientes en el intestino afectado. Las anormalidades estructurales de las uniones estrechas entre las células absorbentes lesionadas, explican la permeabilidad aumentada de la barrera mucosal. Las enzimas que contribuyen a la digestión y a la absorción están alteradas debido al daño de las células absorbentes. Las disacaridasas, peptidasas, la fosfatasa alcalina, la adenosina trifosfatasa y las estererasas están disminuidas mientras que las hidrolasas ácidas se encuentran aumentadas.

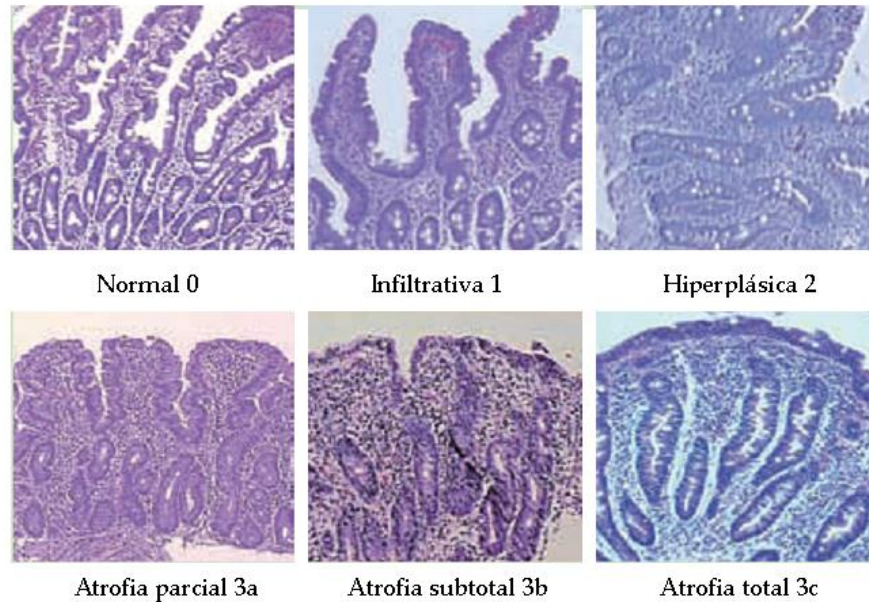


Fig. I.12 Evolución de la lesión intestinal celíaca.

La celularidad de la lámina propia se ve incrementada principalmente por células plasmáticas y linfocitos, sobre todo las células productoras de IgM, IgG e IgA, predominando éstas últimas. Los leucocitos polimorfonucleares, mastocitos y eosinófilos pueden contribuir al aumento de la celularidad. Existe un incremento de la expresión de moléculas HLA-DR y HLA-DP.

La longitud del intestino delgado lesionado se correlaciona con la gravedad de los síntomas clínicos. El intestino proximal es la parte más gravemente afectada. De hecho, la indemnidad del intestino proximal con sólo compromiso de la porción distal, no es una característica de la EC.

Los cambios en la mucosa revierten tras la eliminación del gluten de la dieta. La biopsia debe repetirse de 4-6 meses después de la retirada del gluten para comprobar que la lesión ha desaparecido y la histología del intestino es normal, afianzando así el diagnóstico (Polanco 2008).

9. Tratamiento

El único tratamiento conocido para la EC es una dieta totalmente exenta de gluten durante el resto de la vida del individuo. De ahí que realmente se haya denominado “**condición celíaca**” ya que, pasados unos meses siguiendo una dieta sin gluten, el organismo vuelve a la normalidad (Kupper 2005).

Puede darse el caso de personas que no recuperen totalmente esta calidad de vida y tengan síntomas digestivos persistentes o dermatitis herpetiforme, úlceras bucales, síndrome de colon irritable, ansiedad, fatiga, dispepsia, dolor músculo-esquelético y osteoporosis y como consecuencia, fracturas. Esto ocurre con mayor frecuencia en el caso de las mujeres que en el de los hombres. (Goddard and Gillett 2006)

En una pequeña minoría, existe la posibilidad de que el paciente no mejore con la dieta. Esto puede deberse a que la enfermedad haya estado presente sin ser diagnosticada demasiado tiempo o que haya estado ingiriendo alimentos contaminados con trazas de gluten, lo que ha ocasionado que la lesión intestinal sea irreversible.

9.1 Tratamientos Experimentales

Con el fin de evitar una dieta exenta de gluten, se han diseñado otras aproximaciones para un posible tratamiento que mejore la calidad de vida del paciente.

- Ingeniería genética en distintas especies de trigo generadas selectivamente para disminuir su inmunogenicidad.
- La combinación de la enzima prolilendopeptidasa con una enzima de la cebada específica de glutamina, la cisteínendopeptidasa, que degradan el péptido 33-mer en el duodeno. Esta combinación permitiría al individuo consumir alimentos con gluten (Siegel et al. 2006).

- Inhibición de la **zonulina** para controlar la permeabilidad intestinal y por tanto, la exposición de gliadina al sistema inmune del organismo (Fasano et al. 2000).
- Otros tratamientos estarían relacionados con rutas involucradas en la patogénesis de la EC, como podría ser la acción de la molécula HLA-DQ2, el mecanismo de acción de la enzima tTG y la interacción de los genes MICA/NKG2D, los cuales podrían estar involucrados en la muerte de los enterocitos.

10. El Estudio Genético de las Enfermedades Complejas

La metodología que se emplea en el estudio de las enfermedades multifactoriales y complejas difiere de las enfermedades monogénicas o mendelianas.

Una enfermedad monogénica es aquella producida por la mutación o alteración en la secuencia de DNA de un solo gen y se transmite según los patrones hereditarios mendelianos. El tipo de herencia puede determinarse observando la transmisión de la enfermedad en el árbol genealógico del probando si se dispone de éste. El probando, *propositus* o caso índice en términos de genética es aquella persona o paciente por la cual se inicia el estudio y que habitualmente es el más examinado clínicamente.

En el caso de las enfermedades complejas y multifactoriales, cuanto más lejos se encuentra un carácter de la acción génica primaria es menos probable que muestre un patrón de transmisión mendeliano sencillo ya que dependen de varios loci genéticos, con mayor o menor contribución de los factores ambientales (Strachan and Read 1999).

10.1 Teoría Poligénica de los Caracteres Continuos

Este concepto se remonta a **Francis Galton** (1822-1911), quien dedicó gran parte de su vida a sistematizar el estudio de la variación humana, la cuantificación de observaciones y a la aplicación del

análisis estadístico en caracteres no mendelianos continuos y **cuantitativos** (peso, altura...). Sentó las bases de la biometría y rechazó las teorías mendelianas ya que señalaba que la mayor parte de los caracteres eran cuantitativos, continuamente variables y no eran susceptibles del análisis mendeliano, por lo que era imposible seguir su herencia dibujando genealogías. La controversia duró hasta 1918 cuando **R. A. Fisher** (1890-1962), creador de la estadística inferencial (deducir propiedades de una población a partir de una pequeña parte de la misma) demostró que los caracteres gobernados por un gran número de factores mendelianos independientes (caracteres poligénicos) mostrarían la variación cuantitativa y las correlaciones familiares descritas por los biométricos.

10.2 Teoría Poligénica de los Caracteres Discontinuos

Se basa en el estudio de enfermedades que tienden a ser familiares pero que no presentan patrones de herencia mendelianos. Los caracteres discontinuos o dicotómicos son aquéllos que se tienen o no se tienen y en este sentido los estudios de **Falconer** (1913-2004) proveyeron una herramienta conceptual muy importante para el entendimiento de la transmisión no mendeliana de un rasgo. Falconer introdujo el **modelo poligénico umbral**, en el que se introducen dos conceptos fundamentales:

- La susceptibilidad: variable continua que resulta de la interacción de factores genéticos y ambientales.
- El umbral: según Falconer, la susceptibilidad de un carácter discontinuo no mendeliano sigue una distribución normal en la población, de modo que aquellos individuos cuya susceptibilidad esté por encima del umbral presentarán dicho carácter y los que estén por debajo no lo expresarán.

Este modelo permite calcular dos parámetros:

- La heredabilidad (h^2): Proporción de la varianza del carácter atribuible a factores genéticos.

- El riesgo de incidencia: medida del riesgo que tiene un sujeto sano de contraer una enfermedad.

Entre los rasgos puramente mendelianos y los puramente poligénicos existe un completo espectro de caracteres gobernados por loci principales de susceptibilidad en un fondo genético posiblemente oligogénico y algunas veces sujeto a importantes determinantes ambientales como es el caso de lo que sucede en la enfermedad celíaca.

10.3 El Papel de los Estudios Familiares

Cuando hablamos de caracteres no mendelianos, es necesario demostrar la determinación genética. Los individuos afectados por una enfermedad multifactorial han heredado una combinación determinada de genes de elevada susceptibilidad. Los parientes que compartan genes con ellos también tendrán una susceptibilidad alta. La divergencia respecto a la media poblacional dependerá de la proporción de genes que compartan con los individuos afectados. De esta forma, los caracteres con umbrales poligénicos tienden a transmitirse familiarmente.

Las propiedades matemáticas de la distribución normal predicen el parámetro λ (proporción de la incidencia en parientes respecto a la incidencia en la población general). La medida del grado de asociación familiar es λ_R . Para los diferentes grados de parentesco (hermanos, hijos...) se calculan parámetros λ distintos por ejemplo λ_s es el coeficiente de incidencia en hermanos. La asociación familiar se hace evidente a elevados valores de λ . En el caso de la EC, como se ha descrito en el apartado 1.4 de esta memoria, existe una clara agrupación familiar. (Bevan et al. 1999)

10.3.1 Los Estudios en Hermanos Gemelos

Francis Galton destacó el valor que los gemelos monozigóticos tienen para la genética humana, ya que por tratarse de individuos genéticamente idénticos necesariamente serán concordantes en todos

los caracteres determinados genéticamente aunque con las siguientes excepciones:

- Su repertorio de anticuerpos y receptores de linfocitos T es distinto debido a reordenaciones epigenéticas y a mutaciones somáticas.
- El número de moléculas de DNA mitocondrial
- Mutaciones somáticas en general
- El patrón de inactivación del cromosoma X en el caso de tratarse de una mujer.

10.4 El Cartografiado de Genes de Susceptibilidad Mediante Análisis de Ligamiento en las Enfermedades Complejas

Si la predisposición a una enfermedad no mendeliana está determinada por un número limitado de loci, debería ser posible el cartografiado de éstos mediante **análisis de ligamiento** con marcadores informativos. En los años 90, el desarrollo de mapas genéticos permitió una aplicación generalizada del análisis de ligamiento global del genoma en enfermedades reconocidas.

Estrategias a seguir:

1. Identificar familias en las que la transmisión de la enfermedad sea compatible con la de un rasgo mendeliano, aunque de penetrancia reducida pero con un elevado trasfondo de susceptibilidad, de manera que la presencia o ausencia de un solo alelo principal sea suficiente para superar el umbral de susceptibilidad y manifestar la enfermedad. En estas familias dicho alelo actuaría como un rasgo mendeliano, a pesar de que en otras familias con una susceptibilidad menor no sería relevante.

2. Disponer de un tamaño muestral muy grande para llevar a cabo un análisis de ligamiento.

3. Utilizar una elevada densidad de marcadores en familias con varias generaciones.

Si este análisis es correcto, el gen principal puede localizarse empleando el análisis de ligamiento con una batería de marcadores.

A pesar de ser altamente robusto cuando se trata de rasgos mendelianos sencillos, suele ser ineficaz para encontrar genes involucrados en rasgos complejos.

En el caso de la EC, esta estrategia ha servido para determinar únicamente los genes del sistema HLA II como genes ligados a la EC (valores de lod diferentes en función de la población de estudio pero siempre superiores a 3) (Houlston et al. 1997; Liu et al. 2002; Neuhausen et al. 2001; Van Belzen et al. 2003; Zhong et al. 1996). Hasta el momento, tal como se indicaba en el apartado 1.5, no se ha encontrado ningún otro gen cuyos resultados de ligamiento sean reproducibles en todas las poblaciones (Babron et al. 2003; Ding et al. 2008; Garner et al. 2007; van Belzen et al. 2004b).

10.5 Los Estudios de Asociación

Los estudios de asociación tienen un carácter no paramétrico y se realizan tanto en familias como a nivel poblacional. Son mucho más potentes a la hora de detectar genes que aportan un efecto modesto a la enfermedad. El ligamiento y la asociación son fenómenos diferentes: el ligamiento es la relación entre loci mientras que la asociación es la relación entre alelos. La asociación alélica implica que, si se analiza toda la población, los individuos que presentan un alelo determinado en un gen tienen una probabilidad estadísticamente superior a la del azar de presentar un alelo particular en un segundo gen. Habitualmente, que los genes estén ligados es una condición necesaria pero no suficiente para que exista asociación alélica.

En la última década ha habido avances revolucionarios en el campo de la genética humana, entre ellos, los más relevantes han sido para los estudios de asociación: la finalización de la secuenciación del genoma humano, la identificación de un gran número de marcadores genéticos, mayoritariamente SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), el desarrollo de métodos de genotipado de SNPs rápidos y de alto rendimiento, el entendimiento de las correlaciones entre SNPs cercanos o en desequilibrio de ligamiento. Estas nuevas herramientas

permiten estudios de asociación a gran escala con SNPs para estudiar loci o regiones cromosómicas en busca de variaciones que contribuyan a la susceptibilidad de una enfermedad.

10.5.1 Los Polimorfismos Genéticos como Marcadores

La noción de polimorfismo genético se define por la presencia, en un locus dado y en una misma población, de dos o varias formas alélicas, las cuales tienen una frecuencia apreciable, es decir, que el alelo más frecuente no sobrepasa el 0,99. Se denomina polimorfismo a aquella variación del genoma que aparece por sustitución, delección o inserción de uno o varios nucleótidos y que puede provocar, o no, una alteración en la secuencia de una proteína o su nivel de expresión. Un marcador genético es un segmento de DNA con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear en una familia. Un marcador puede ser un gen o puede ser un fragmento de DNA sin función conocida (Franco 2009).

Marcadores Principales:

- **RFLPs:** Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Secuencias específicas de nucleótidos reconocidas y cortadas por enzimas de restricción. Presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el DNA de diferentes individuos de una población.
- **SSCPs:** Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (*Single Strand Conformation Polymorphisms*). Permiten detectar variaciones en la secuencia de las muestras. La detección se basa en diferencias de plegamiento de las cadenas simples de DNA una vez desnaturalizadas.
- **Microsatélites o STR:** Repeticiones de secuencias de DNA cortas en tándem (*Short Tandem Repeat*), cuyo tamaño va desde uno hasta seis nucleótidos, que se repiten de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos que se distinguen entre sí por su longitud total. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del DNA. Su herencia es neutra y codominante y

poseen una alta tasa de mutación, por lo que son altamente polimórficos. Su variabilidad los convierte en útiles para su uso por el número de repeticiones, no por la secuencia repetida.

- **SNPs:** Polimorfismos de una sola base (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que se localizan a lo largo de todo el genoma y se presentan de forma bialélica. Tienen una tasa de mutación muy baja y se denominan “sinónimos” o “no sinónimos” en función de si provocan un cambio de aminoácido o no. Los SNPs que no se encuentran en regiones codificantes pueden tener consecuencias en los procesos de traducción, sobre todo en el proceso de *splicing* (eliminación de los intrones mediante corte y unión de las regiones codificantes), la unión de factores de transcripción o modificación del RNA no codificante. Se estima que su frecuencia en el genoma humano es de uno cada 100-300 nucleótidos. Dada su densidad, pueden ser relevantes para la localización de genes. Además, estas variaciones en la secuencia del DNA pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc.

Los SNPs se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie. Se estima que en el genoma hay 11 millones de SNPs que superan la frecuencia del 1% y que son en mayor o menor grado beneficiosos evolutivamente según su funcionalidad por pertenecer a secuencias reguladoras importantes.

10.5.2 El Estudio de Haplotipos

Dado un grupo determinado de marcadores genéticos, un haplotipo es el conjunto de alelos de los distintos loci que se localizan físicamente en el mismo cromosoma y que se transmiten juntos por encontrarse en desequilibrio de ligamiento (LD). Estos alelos se transmiten en "bloques", ya que apenas se produce el fenómeno de recombinación entre ellos. Los haplotipos son una valiosa herramienta genética tanto por la determinación de la relación génica entre individuos y el estudio del origen de las mutaciones como para

el estudio de la transmisión de SNPs, actuando como una nueva unidad funcional de la genómica.

10.5.3 El Proyecto HapMap

En octubre del año 2002 comenzó un nuevo proyecto similar al Proyecto del Genoma Humano, al cual se le denominó Proyecto Internacional HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) en el que participan 9 grupos de investigación de los 5 continentes. El proyecto consiste en una colaboración de científicos y agencias de EEUU, Japón, Reino Unido, Canadá, China y Nigeria para desarrollar un mapa de haplotipos del genoma humano. Este proyecto trata de identificar SNPs específicos (tags o diana) que identifican estos bloques de haplotipos. (Frazer et al. 2007) Gracias a él disponemos de información de los bloques de desequilibrio de ligamiento en las principales poblaciones humanas y herramientas bioinformáticas (Haploview) necesarias para un estudio de asociación. De esta manera, nos permite seleccionar una pequeña fracción de SNPs que nos aportarán información sobre el resto de variantes cercanas.

La idea es realizar estudios de asociación con un grupo de enfermos y un grupo control, de modo que se puedan encontrar SNPs (y en consecuencia genes) asociados a una enfermedad determinando haplotipos a partir de los patrones genéticos identificados en muestras de sangre de 200-400 personas de diferente origen étnico.

Los haplotipos son más relevantes clínicamente que el genotipo de un único SNP, debido a que el haplotipo puede reflejar la presencia de sitios de mutaciones no identificadas adicionales, que pueden estar relacionados con la enfermedad. También los haplotipos pueden reflejar dos o más mutaciones que pueden actuar juntas para causar una enfermedad.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

1. El fondo genético de una población puede determinar la asociación o no asociación de un locus a una enfermedad. Las frecuencias de los alelos de susceptibilidad asociados a una enfermedad compleja varían debido a las diferencias genéticas poblacionales. Caracterizar los principales polimorfismos asociados a la enfermedad celíaca en la población de la Comunidad Valenciana permitirá establecer cómo afecta el fondo genético de nuestra población a las asociaciones ya descritas en las principales regiones CELIAC.

2. Estudios previos llevados a cabo con hermanos monozigóticos indican que la heredabilidad atribuible al genotipo HLA es aproximadamente de un 40%, indicando la posible implicación de genes no HLA en la enfermedad celíaca. En este contexto, se han descrito otros loci, denominados CELIAC, como posibles localizaciones en las que pudiera haber genes implicados en la patogenia. Sin embargo, la carga genética responsable de la enfermedad celíaca no se ha definido todavía en su totalidad. Por ello, postulamos que otros loci no considerados hasta el momento podrían estar asociados a la enfermedad celíaca en nuestra y otras poblaciones.

2. OBJETIVOS

1. Analizar marcadores genéticos localizados en las principales regiones CELIAC, descritos por su asociación a la enfermedad celíaca en diversas poblaciones europeas. Este análisis se llevará a cabo en una serie clínica compuesta por individuos de origen caucásico pertenecientes a la Comunidad Valenciana, lo que nos permitirá conocer así, el fondo genético de nuestra población respecto a la enfermedad celíaca.

2. Analizar molecular y funcionalmente polimorfismos de nuevos loci candidatos que pudieran estar implicados en la patogenia de la enfermedad celíaca.

III. PACIENTES Y METODOLOGÍA

1. SUJETOS

1.1 Pacientes y Familiares

La serie clínica objeto de estudio comprende 168 pacientes celíacos en edad pediátrica: 13 de ellos son casos familiares y los restantes 155 son casos aislados. De este conjunto, hemos dispuesto del DNA de los familiares en primer grado (padre, madre, hermano/s) de 113 de los probandos incluyendo los casos familiares y los casos aislados.

Todos los probandos se han diagnosticado según los criterios de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) establecidos en 1990 (Walker-Smith 1990). Estos criterios incluyen la realización de una o varias biopsias intestinales y la determinación de los marcadores serológicos de la EC. Todos los pacientes presentaron una lesión histológica de tipo Marsh 3 compatible con EC. (Marsh 1992). Con toda la información obtenida se ha creado una base de datos específica y de carácter confidencial.

Los pacientes han sido supervisados en los siguientes hospitales:

- Hospital Universitario La Fe de Valencia
- Hospital General Universitario de Valencia
- Hospital Lluís Alcanyis de Xàtiva
- Hospital Francesc de Borja de Gandía.

Los padres de los pacientes han estado en todo momento al corriente de las investigaciones que se estaban llevando a cabo y firmaron, en todos los casos, el consentimiento informado aprobado por el comité de ética de sus respectivos hospitales.

1.2 Individuos Control

Para el abordaje de este estudio hemos contado con un grupo control formado por un total de 378 individuos sanos. De éstos, 186 eran donantes de órganos y médula ósea reclutados aleatoriamente en el Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, los restantes forman parte de las 64 familias control compuestas por madre, padre e hijo. Este conjunto de individuos control fue necesario para llevar a cabo el estudio caso-control en los distintos marcadores analizados.

A todas las muestras procedentes del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, esto es, pacientes y familiares remitidos por los distintos hospitales antes mencionados, así como los 186 individuos control no relacionados, se les realizó previamente el tipaje de los loci HLA de clase II DRB1, DRB3/4/5, DQA1 y DQB1 en dicho centro.

2. METODOLOGÍA

2.1 Diseño de un Estudio de Asociación

Los estudios de asociación tienen dos vertientes:

- Análisis genómico global: rastreando el genoma con marcadores genéticos sin considerar la etiopatogenia de la enfermedad.
- Estudio de genes candidatos: análisis de polimorfismos en la secuencia de genes candidatos elegidos por las características biológicas de la proteína que codifican (expresión, interacción con otras proteínas, rutas metabólicas en las que participa...) o por su localización cromosómica cercana a regiones CELIAC previamente descritas (Newton-Cheh and Hirschhorn 2005).

2.1.1 Planificación y Consideraciones

- Reclutamiento de individuos: En función del tipo de estudio (prospectivo o retrospectivo) que se va a llevar a cabo.
- Cálculo del Poder del estudio: dado el efecto modesto que pueda tener una variante común en una enfermedad compleja, el tamaño muestral debe ser lo suficientemente grande como para alcanzar un valor de significación (p-valor) menor de 0,05. Siendo β la probabilidad de obtener un falso negativo (error tipo II), el poder del estudio se define como $1 - \beta$ y depende de:

- la magnitud del efecto
- el tamaño muestral
- el nivel de significación estadística requerido
- α : falsos positivos

Para ello, utilizamos la herramienta disponible en la red "Genetic Power Calculator" (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc>) con la que hay que considerar factores como la prevalencia de la enfermedad, los valores de desequilibrio de ligamiento (D') entre los marcadores estudiados, la distribución de frecuencias de éstos y el valor de riesgo relativo del alelo asociado a la enfermedad debido a esta frecuencia.

III. Pacientes y Metodología

- El método analítico para probar la asociación entre los datos de genotipo y fenotipo.
- Elección de Marcadores: considerar el análisis de cada marcador de manera individual o estudiar la posible asociación mediante el análisis de haplotipos que contengan diferentes marcadores.
- Equilibrio de Hardy-Weinberg: establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Así, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. Estas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus.

2.2 Análisis Genético de las Regiones CELIAC: Técnicas y Protocolos

El primer objetivo de este trabajo ha consistido en la caracterización en nuestra población de los polimorfismos más relevantes asociados a la EC en poblaciones de origen caucásico.

En este trabajo se aborda el estudio de genes no HLA pertenecientes a las regiones CELIAC1, CELIAC3 y CELIAC4. El motivo por el que no se consideró el análisis de la región CELIAC2 fue porque, tal como hemos comentado en el punto 5 del apartado de Introducción, al inicio de esta tesis no se había descrito ningún gen candidato en este locus que estuviera asociado a la enfermedad.

El protocolo llevado a cabo fue el siguiente:

- Extracción de DNA genómico
- Amplificación de las secuencias de interés mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*).
- Análisis de polimorfismos mediante SSCPs (*Single Strand Conformation Polymorphisms*), análisis de microsatélites, análisis de restricción o RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y/o DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*).
- Secuenciación automática en un analizador genético ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, Foster, CA) para asociar los cambios de patrón observados en cada tipo de análisis con el genotipo correspondiente.
- Estudio de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos.
- Construcción de haplotipos.
- Análisis estadístico: estudios caso-control y TDT (*Transmission Disequilibrium Test*).

2.2.1 Extracción de DNA Genómico

El análisis genético se llevó a cabo en DNA genómico extraído a partir de sangre periférica. La extracción se realizó según el método clásico de digestión enzimática con proteinasa K y purificación mediante fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Kunkel et al. 1982).

Extracción de DNA mediante el método de fenol-cloroformo:

1. Partiendo de un volumen de 5 ml, lavar la sangre total con 10 ml de suero fisiológico NaCl 0.9%. Centrifugar 10' a 4000 rpm (repetir este procedimiento 2 veces).
2. Lisar los glóbulos rojos añadiendo 10 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 20mM pH 7.5, MgCl₂ 5mM). Mezclar y centrifugar 10' a 4000 rpm (repetir 2 veces).
3. Decantar el sobrenadante y homogeneizar bien el precipitado que corresponde al paquete celular de linfocitos. Añadir 5 ml de Nonidet P-40 al 0.1%, agitar y centrifugar 10' a 4000 rpm.
4. Decantar el sobrenadante, homogeneizar el precipitado celular y añadir 5 ml de solución A (NaCl 0,1M, EDTA 25mM pH 8, SDS 0,5%, proteinasa K 0,2 mg/ml) con el fin de lisar todas las células mediante digestión enzimática.

Tanto el tampón de lisis como el Nonidet 0,1% pueden conservarse a 4°C mientras, mientras que la solución A debe prepararse en el momento de la extracción.

5. Incubar a 56 °C durante un mínimo 2 horas.
6. Para purificar el DNA y eliminar restos proteicos, añadir V/V de fenol: cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma) mezclar bien mediante vórtex y centrifugar 10' a 4000 rpm. Recuperar la fase acuosa superior que contendrá el DNA y pasarla a un tubo limpio (repetir el procedimiento dos veces).
7. Añadir V/V de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1). Mezclar bien con vórtex y centrifugar 10' a 4000 rpm. Recuperar la fase acuosa (repetir dos veces).
8. Precipitar el DNA añadiendo 2V de etanol absoluto y NaCl 0,4M. Agitar suavemente hasta se haga visible el precipitado de DNA.

9. Pescar el precipitado con una pipeta pasteur de vidrio y sumergirlo dos veces en un tubo que contenga etanol 70%.

10. Disolver el DNA precipitado en 200-500 μ l de TE (Tris- HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1mM pH 8.0)

11. Cuantificación del DNA obtenido mediante el espectrofotómetro NanoDrop[®] a una longitud de onda de 260 nm. La pureza de la muestra se considera óptima si la relación 260nm/280nm (DNA/proteínas) es cercana a 2. Lo ideal es que la pureza de la muestra sea superior a 1,6.

2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Emplearemos la PCR para la amplificación del fragmento de DNA de interés con el que llevaremos a cabo el análisis de los diferentes polimorfismos. De forma generalizada, los reactivos utilizados y las concentraciones de cada uno de ellos para llevar a cabo la PCR en un volumen final de 25 μ l fueron:

Reactivo	Concentración	Volumen (μ l)
Tampón	10x	2.5
dNTPs	5mM	0.5
Cebador directo	20mM	0.2
Cebador reverso	20mM	0.2
Taq Polimerasa	1U/ μ l	0.5
DNA	50ng/ μ l	1
H ₂ O		20.1

III. Pacientes y Metodología

Las condiciones en las que se llevó a cabo la PCR fueron:

Tª (°C)	Tiempo	
96	10'	
96	30''	} 35 ciclos
Tm	30''	
72	30''	
72	7'	
10	∞	

Donde el valor de Tm (*melting temperature* o temperatura de unión de los cebadores) varía en función del marcador analizado dada la secuencia de los cebadores empleados.

La detección del producto de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 0,11%, EDTA 1 mM) y tinción con Bromuro de Etidio.

2.2.3 Análisis de Polimorfismos Mediante RFLPs

Los RFLPs son polimorfismos en la longitud de fragmentos de DNA obtenidos mediante el corte por enzimas de restricción específicas que reconocen secuencias consenso. Presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el DNA de diferentes individuos de una población.

El estudio de polimorfismos en el DNA según la longitud de los fragmentos de restricción, se llevó a cabo mediante enzimas específicas para cada polimorfismo objeto de estudio. La elección de estas enzimas se realizó utilizando la herramienta disponible en la red "Webcutter 2.0" (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). La combinación de reactivos por cada muestra en un volumen final de 25 µl fue la siguiente:

Reactivo	Volumen (μ l)
Producto de PCR	10
Tampón específico	2,5
Enzima de restricción	1 U
H ₂ O	12,5
Volumen final	25

Las digestiones se incubaron a la temperatura óptima señalada para cada enzima durante 4 - 16 horas. Posteriormente, los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X mediante electroforesis horizontal.

2.2.4 Análisis de Polimorfismos Mediante SSCPs

Los SSCPs son polimorfismos conformacionales de cadena sencilla que permiten la detección de variaciones en la secuencia de las muestras analizadas por las diferencias en el plegamiento de las cadenas simples de DNA al ser analizadas en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Con esta técnica podemos detectar cambios de una sola base por diferencias en la movilidad electroforética mediante electroforesis vertical en un gel de acrilamida (Orita et al. 1989).

El protocolo llevado a cabo fue el siguiente:

1. Preparar la mezcla acrilamida: bisacrilamida (29:1) al 12% con o sin glicerol (en el caso de añadir glicerol, restar el volumen al del agua).
2. Introducir esta mezcla, con ayuda de una jeringa, entre los cristales que hayan sido limpiados previamente con etanol y Dimetildiclorosán al 5% para facilitar su deslizamiento. Dejar polimerizar.
3. Montar el gel en una cubeta de electroforesis vertical adecuada. Añadir TBE 1x.

III. Pacientes y Metodología

4. Mezclar 5 μ l de producto de PCR con 3 μ l de tampón de carga de SSCPs (98% formamida desionizada, 0.25% azul bromofenol, 0,25% azul xilencianol, 10 mM EDTA pH 8). Desnaturalizar durante 10' a 95°C. Poner inmediatamente en hielo.
6. Cargar 6 μ l de la mezcla en el gel de poliacrilamida.
7. Aplicar un voltaje de alrededor de 800V durante 18-20h a temperatura ambiente
8. Desmontar los cristales y proceder al revelado del gel mediante tinción con plata.

Reactivo	Volumen
Acrilamida: Bisacrilamida (29:1)	9 ml
TBE 5X	6 ml
H ₂ O	15 ml
Glicerol (opcional)	(1,5 ml)
PSA 10%	180 μ l
TEMED	9 μ l
Volumen final	30 ml

Revelado de geles de poliacrilamida mediante tinción por plata:

1. Fijación: introducir el gel en una cubeta con etanol (EtOH) al 10% durante 5'. Mantener en agitación.
2. Oxidación: retirar el etanol y añadir ácido nítrico al 65% (HNO₃, 15,4 ml/L) que reducirá la plata. Bañar en agitación durante 3'.
3. Eliminar el oxidante y realizar 1 lavado con agua destilada.
4. Impregnación: añadir la solución de nitrato de plata (AgNO₃, 2,02 g/L) y dejar en agitación 20'.
5. Eliminar la solución y realizar 1 lavado con agua destilada.
6. Revelado: Añadir el carbonato sódico y formaldehído 37% (Na₂CO₃, 29,6g/L, 540 μ L de formaldehído) y agitar, esto provocará un cambio brusco de pH dando lugar a la precipitación de las sales de plata. Mantener el gel en agitación suave hasta la visualización de las bandas.

7. Cuando se obtiene una intensidad de color deseada, eliminar la solución y añadir ácido acético al 10%, disminuirá el pH y se parará la reacción.
8. Secar el gel entre dos hojas de celofán sobre un soporte rígido o bien empleando la secadora al vacío de geles.

2.2.5 Estudio Genético Indirecto con Marcadores Microsatélite

Los marcadores microsatélite se analizaron mediante amplificación por PCR y posterior electroforesis en gel de acrilamida al 12% (ver preparación de geles de acrilamida en el 2.2.4).

Las muestras se prepararon mezclando 3 μ L del producto de PCR con 5 μ L de azul de xilencianol. De esta mezcla se corrieron 6 μ L entre 5-8 h a 800 V según el tamaño amplificado, junto con el marcador de pesos moleculares.

2.2.6 Análisis de Polimorfismos Mediante DHPLC

DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) son las siglas en inglés de "Cromatografía Líquida Desnaturalizante de Alto Rendimiento" (Oefner 2000). Es un método físico de separación basado en la movilidad relativa de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La fase móvil es un líquido que fluye, a una presión determinada, a través de una columna que contiene la fase fija. La cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento es una técnica basada en una columna de elución de fase reversa utilizada para la separación diferencial de fragmentos cortos de DNA que previamente han sido desnaturalizados (Kosaki et al. 2005). Esta técnica es aplicable tanto para la búsqueda de mutaciones en una secuencia dada, como para el análisis de SNPs conocidos, siempre y cuando se disponga del cromatograma de una muestra control con el que poder comparar el patrón obtenido. Aunque es un proceso totalmente automatizado, éstos son los pasos a seguir:

Protocolo para DHPLC (Transgenomic Wave System):

1. Amplificar el fragmento de DNA que queremos estudiar mediante PCR.
2. Desnaturalizar el producto de PCR a 95°C durante tres minutos, seguida de una disminución paulatina de la temperatura de 95 °C a 65°C durante 30 minutos, permitiendo así que las hebras de DNA desnaturalizado renaturalicen lentamente, formando heterodúplex.

Este proceso permite detectar las mutaciones mediante desapareamientos (errores en la complementariedad) en base a las diferentes uniones formadas en el proceso de renaturalización de los fragmentos de gen amplificados. Las hebras que sean perfectamente complementarias o complementarias formarán homodúplex mientras que en aquellas en las que exista un desapareamiento a causa de un polimorfismo se formará un heterodúplex, que tendrá una movilidad cromatográfica diferente. Para detectar un polimorfismo en homocigosis es necesario mezclar dicha muestra con una que contenga el alelo salvaje.

3. Antes de colocar las muestras es importante realizar un lavado de la columna (tampón Wash) y el equilibrado de la misma (tampón D).
4. La muestra es inyectada de manera automatizada en una columna (DNASep™, Transgenomic Wave System, San Jose, CA) junto con las proporciones de tampón A y tampón B (solvente orgánico, fase móvil) estimadas para unas condiciones óptimas de trabajo.

Los heterodúplex y los homodúplex migran con distinto tiempo de retención en la columna, eluyendo antes los heterodúplex. Este proceso es dependiente de la temperatura que se aplique. A temperatura <50°C el orden de elución es estrictamente basado en la longitud de la doble cadena de DNA, en cambio a temperatura >50°C las moléculas de DNA se desnaturalizan, separándose en dos cadenas simples complementarias.

5. Medición automática de la absorbancia de la elución a 254 nm mediante la lámpara ultravioleta del equipo.
6. Interpretación del cromatograma, que presentará patrones alterados con respecto a una muestra control con la secuencia silvestre.

Tampón Reactivo	A	B	Wash	D
TEAA 2M	50 ml	50 ml	-	-
Acetonitrilo (ACN)	250 µL	250 ml	45 ml	750 ml
H ₂ O miliQ	950 ml	700 ml	955 ml	250 ml
Volumen final	1L	1L	1L	1 L

2.2.7 Secuenciación Automática

Se utilizó la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR para la identificación de cambios en la secuencia nucleotídica y la asociación de éstos a los distintos patrones obtenidos mediante las técnicas empleadas. De esta forma se establecieron controles positivos para cada análisis.

Los productos de PCR se purificaron mediante una columna de purificación (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) y se analizaron en un analizador genético ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster, CA) empleando, para ello, los mismos cebadores diseñados para la PCR. Los resultados se analizaron con el programa de análisis Chromas 2.33 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

2.3 Análisis Estadístico

2.3.1 Estudios de Asociación Poblacional: Análisis Caso-Control

La asociación entre marcador y enfermedad se encuentra comparando las frecuencias alélicas o genotípicas de un alelo particular de un marcador en una serie de pacientes con las de una serie de controles sanos considerando como "Hipótesis Nula" (H₀) que la distribución en las frecuencias de los genotipos entre los dos

III. Pacientes y Metodología

grupos de individuos es la misma. La principal medida utilizada en epidemiología es el *Odds Ratio* (OR), que es la probabilidad de que un determinado evento ocurra frente a la probabilidad de que no ocurra y su objetivo es el de cuantificar la magnitud de la asociación entre un factor de riesgo y una determinada enfermedad. La significación del OR viene dada por la prueba del χ^2 en una tabla 2x2 (figura III.1). En esta prueba se estima, además, un intervalo de confianza con una significación del 95%. Si el valor de OR <1, hablamos de un factor protector.

Cálculo del riesgo: OR (*Odds Ratio*)

	Casos	Controles	
A1	a	b	$OR = \frac{\frac{a}{c}}{\frac{b}{d}} = \frac{ad}{bc}$
A2	c	d	

$$CI\ 95\% = \exp(\ln OR \pm 1.96SE)$$

$$SE = \left(\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Figura III.1. Prueba estadística estándar (χ^2) para contrastar la hipótesis nula de igual frecuencia de alelos (o genotipos) en casos y controles. OR: *Odds Ratio*, CI: *Confidence Interval*, SE: *Standard Error*. A1: alelo 1, A2:alelo 2

Este tipo de estudios presenta dos problemas principales:

- En la selección de los controles: una elección errónea del grupo control puede llevar a confundir el desequilibrio de ligamiento con un locus de susceptibilidad con una estratificación poblacional.
- El análisis estadístico puede no ser lo suficientemente riguroso o que la corrección que se aplique no sea la adecuada.

2.3.2 Estudios Familiares

Los estudios en individuos emparentados comparan la distribución de los genotipos observada en los parientes con la frecuencia esperada dada las relaciones familiares bajo la suposición de que no existe asociación.

2.3.2.1 La Prueba HRR: la prueba de *Haplotype Relative Risk* (Khoury 1994) emplea el trío formado por el probando y sus progenitores como objeto del análisis. Los tres son tipificados para un mismo conjunto de marcadores que están constituyendo un haplotipo, uno de cuyos alelos se cree que está asociado a la enfermedad. Los datos de este marcador en aquellos cromosomas parentales que no han sido heredados por el probando se utilizan para generar el haplotipo “control” hipotético, no de un individuo real. Con estos datos se elabora una tabla 2 X 2 con las frecuencias génicas en los portadores y controles, y se realiza la prueba χ^2 sin hacer distinciones entre probandos que sean homocigotos o heterocigotos para el marcador, ni entre progenitores afectados y no afectados.

En esta memoria, el estudio de riesgo relativo de los haplotipos transmitidos se ha llevado a cabo mediante el análisis implementado en los siguientes programas:

- UNPHASED(<http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/~fdudbrid/software/unphased/>). Este programa permite inferir la fase de los haplotipos en los que no haya podido ser establecida por herencia. Para ello considera la frecuencia de cada haplotipo con fase conocida, bien por herencia, bien por homocigosidad, estimando como probables a los más prevalentes (Dudbridge 2003).
- Aplicando el programa Haploview v3.2 en familias con haplotipos de fase conocida.

2.3.2.2 La Prueba TDT: La prueba de *Transmission Disequilibrium Test* (Spielman et al. 1993) se realiza en familias informativas, es decir, con uno o más descendientes afectados en las que al menos uno de los progenitores, dado un marcador concreto, es heterocigoto para el alelo candidato a estar asociado con la enfermedad. Esta prueba analiza si la frecuencia entre los alelos transmitidos y los no transmitidos a la descendencia afectada se desvía de la esperada por azar (50%) (Figura III.2). La significación estadística de la asociación se calcula mediante la prueba χ^2 .

Alelo transmitido	Alelo no transmitido		Total
	M1	M2	
M1	a	b	a+b
M2	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	2n

$$\chi^2 = \frac{[b - (b+c)/2]^2}{(b+c)/2} + \frac{[c - (b+c)/2]^2}{(b+c)/2} = \frac{(b-c)^2}{b+c}$$

Figura III.2. Prueba estadística estándar (χ^2) empleada en el análisis por TDT. M1:alelo 1, M2: alelo 2.

El resultado de estas pruebas no se ve afectado por la estratificación poblacional, sin embargo, no pueden distinguir las asociaciones causadas por desequilibrio en el ligamiento de las asociaciones en las que el propio marcador es un factor de susceptibilidad.

2.3.3 Corrección del Estudio Genético

En los estudios de asociación la probabilidad de encontrar resultados positivos falsos es relativamente elevada. Para evitar este tipo de errores se debe aplicar la **corrección de Bonferroni**, con la que el nivel de significación no se fija al convencional $p\text{-valor}=0,05$ sino a $p\text{-valor}=0.05/n$, donde n es el número de asociaciones potenciales que se comprueban. Dado un estudio en el que están implicados n loci con m alelos el factor de corrección es $n(m-1)$.

Cuando se trata de comparaciones múltiples, el método Bonferroni no es lo suficientemente riguroso por lo que conviene la utilización de permutaciones, esto es, cada una de las posibles ordenaciones de los elementos del conjunto que se esté analizando. Por ejemplo, si un estudio de asociación diera un $p\text{-valor}=0.001$ y este valor se observara en 60 de 1000 permutaciones, el $p\text{-valor}$ corregido sería 0.06. Existe una elevada probabilidad de encontrar un verdadero positivo cuando el $p\text{-valor}$ obtenido es menor de 10^{-4} para variantes localizadas en genes candidatos y 10^{-7} en el caso de variantes aleatorias.

2.4 Análisis de la Región CELIAC1

2.4.1 Gen *TNF α*

Se analizó el polimorfismo rs1800629 (-308A>G) localizado en la región promotora mediante amplificación de un segmento de DNA de 107 pb por PCR y análisis de restricción con la enzima *NcoI* (figura III.3). Se introdujo un cambio en cebador directo para que la enzima reconociera su secuencia específica de corte (c/catgG) y a su vez el polimorfismo. La digestión del producto de PCR de individuos portadores del alelo -308*G en homocigosis (-308*G/G) dio como resultado dos fragmentos de 87 y 20 pb, mientras que el de los individuos con el genotipo -308*A/A dio una única banda de 107 pb por no contener la secuencia diana.

2.4.2 Gen *LT α*

Al igual que en el apartado anterior, se analizó el polimorfismo rs909253*A>G (*NcoIA*>G) situado en el primer intrón del gen, mediante amplificación del DNA por PCR y análisis de restricción con la enzima *NcoI*.

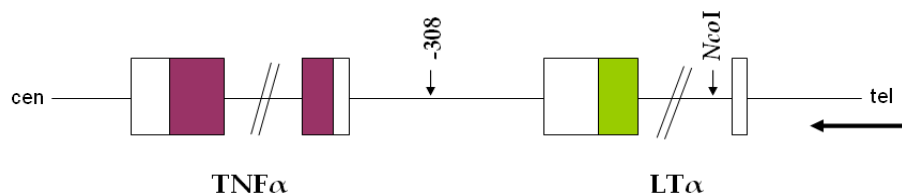


Figura III.3 Representación esquemática del tándem formado por los genes *TNF α* y *LT α* y localización de los polimorfismos rs1800629 (-308) y rs909253 (*NcoI*). Las formas coloreadas corresponden a las regiones exónicas traducidas. La flecha señala la dirección de la transcripción.

Cebadores empleados:

Polimorfismo	Cebadores (5'- 3')	Tm	bp
rs1800629	D-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT R-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	60	107
rs909253	D-CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA R-AGAGCTGGTGGGGACATGTCTG	59	750

2.4.3 Construcción de Haplotipos

Se procedió a la construcción de los haplotipos formados por las polimorfismos estudiados en los genes *LTα*, *TNFα*, *DRB1*, *DQA1* y *DQB1* en los árboles genealógicos disponibles mediante el programa informático *Cyrillic 2.02* (*Cherwell Scientific Publishing Ltd.*)

2.5 Análisis de la Región CELIAC3

Se analizaron los principales polimorfismos asociados a la EC en los genes *CTLA4* e *ICOS* (figura III.4):

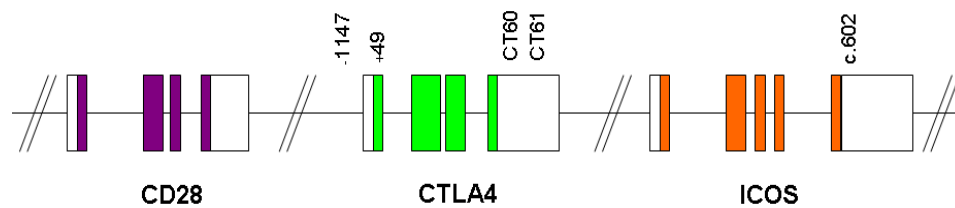


Figura III.4. Polimorfismos SNP analizados en los loci *CTLA4* e *ICOS*, estos loci se sitúan de manera consecutiva en la región cromosómica 2q33 (dirección centrómero → telómero) y a excepción del SNP +49, los demás se sitúan en regiones no codificantes.

2.5.1 Gen CTLA4

Los polimorfismos analizados (dirección 5'-3') del gen *CTLA4* fueron los siguientes:

- 1147*C>T: se localiza en la región promotora de *CTLA4* y se analizó mediante SSCPs.
- rs231775 (c.49A>G): se localiza en el primer exón y da lugar a un cambio de aminoácido de treonina a alanina en el residuo 17 de la proteína (Thr17Ala). Se analizó mediante RFLP con la enzima *BbvI*.
- rs3087243 (CT60A>G): se localiza en la región 3' UTR (*untranslated region*) y se analizó mediante RFLP con la enzima *MaeII*.
- rs11571319 (CT61C>T): se localiza a continuación del polimorfismo CT60 en la región 3' UTR y se analizó mediante DHPLC.

2.5.2 Gen ICOS:

- rs10183087 (c.602A>C): se escogió concretamente este polimorfismo no sólo por los resultados positivos de asociación obtenidos en otras poblaciones sino que además está descrito como tag SNP o SNP diana, esto es, su análisis nos aporta información sobre el resto de polimorfismos que le acompañan en el mismo haplotipo. Se analizó mediante PCR específica de alelo (SSP-PCR *Sequence Specific Primers Polymerase Chain Reaction*) empleando dos cebadores directos diferentes en función del alelo que se pretendía detectar.

Cebadores empleados para el análisis de la región CELIAC3:

Región CELIAC 3			
Polimorfismo	Cebadores (5' - 3')	Tm	pb
-1147	D-ATGAGGCCTGAAAGAGGC R-AAACAGACAGTTGTAACAGGG	58	200
rs231775	D-GCTCTACTTCTGAAGACCT R-CCAGCCAAGCCAGATTGGAG	64	284
rs3087243	D-CAGTATCTGGTGGACGTCTC R-GCAGGCGGTAAGAAAGGGG	60	262
rs11571319	D-TGGGTTAACACAGAC R-AGCAACATAGGACCACAGG	62	262
rs10183087	D1-CACAGATGTGACCCTATAATA D2-CACAGATGTGACCCTATAATC R- AGATGTGGAGACAGGGATTC	58	290

2.6 Análisis de la Región CELIAC4

Se seleccionaron polimorfismos en regiones no codificantes del gen *MYO9B* altamente asociados a la EC en población holandesa (figura III.5) (Monsuur et al. 2005; Van Belzen et al. 2003):

- *D19S899*: se localiza en el primer intrón y los cebadores, así como la información acerca del número de repeticiones de este marcador microsatélite, se obtuvieron a partir de la base de datos disponible UCSC (*University of California Santa Cruz*; <http://www.genome.ucsc.edu>). El análisis se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.6
- rs2305767*A>G: se localiza en el intrón 14 y su análisis se llevó a cabo mediante DHPLC. Las muestras de cada alelo en homocigosis se chequearon mediante SSCPs.
- rs2305764*A>G: se localiza en el intrón 28. Además de haber sido descrito por su elevada asociación a la EC, es un SNP diana del haplotipo en el que se transmite. Se caracterizó mediante análisis de restricción con la enzima *BcnI*.

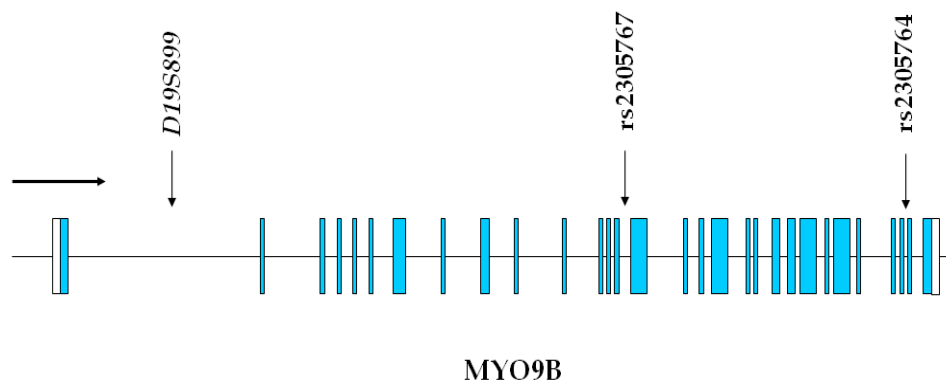


Figura III.5 Polimorfismos analizados en el gen *MYO9B*. Tanto el polimorfismo microsatélite *D19S899* como los SNPs rs2305767 y rs2305764, se localizan en regiones intrónicas.

Cebadores empleados:

Región CELIAC 4			
Polimorfismo	Cebadores (5'- 3')	Tm	pb
D19S899	D-AGCTGAGATCATGCCACC R-GCCACTGCCTTTATACAGTAGA	64	109-129
rs2305767	D-ATCCTGCTGTGATCTGGG R- AAGGAACACAGTGTCGGG	61	350
rs2305764	D-ATGAGAGTCCGAGCAGGC R-GGATGACGACCCATGGGAT	62	216

2.7 Análisis Estadístico

El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes y controles, así como la medida del desequilibrio de ligamiento entre los marcadores estudiados y el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de ellos, se llevó a cabo mediante el programa PypopWin vs.32-0.6.0. (<http://www.pypop.org>) que aplica, por defecto, 1000 permutaciones para la corrección estadística (Lancaster et al. 2003). Los datos obtenidos sobre las frecuencias se emplearon para el estudio caso-control aplicando la prueba χ^2 de Fisher y la corrección de Bonferroni.

El desequilibrio de ligamiento entre marcadores SNPs es la medida de la desviación respecto de una asociación al azar de dos alelos en dos SNPs distintos y se lleva a cabo mediante la estimación del valor D' y r^2 (Coeficiente de correlación). Además del PypopWin vs.32-0.6.0, existen otros programas disponibles en la red como Haploview (<http://www.broadinstitute.org/mpg/haploview>).

III. Pacientes y Metodología

El estudio familiar se llevó a cabo empleando el análisis TDT clásico y éste mismo modificado, el S-TDT (*sibpair-transmission disequilibrium test*) el cual, se emplea en el caso de ausencia del genotipo de los padres si se dispone del genotipo de un hermano informativo del probando (Spielman and Ewens 1998; Spielman et al. 1993) ambos disponibles en el programa Haploview 3.2.

El estudio de la transmisión de haplotipos se llevó a cabo con el programa Haploview 3.2, realizando 1000 permutaciones para la corrección estadística.

2.8 Búsqueda de Nuevos Genes Asociados a la EC

2.8.1 Estudio del Gen *FOXP3*

Se analizó el polimorfismo microsatélite (GT)_n localizado en la región promotora del gen (figura III.6) previamente asociado a la diabetes tipo 1. Posee 6 alelos diferentes en función del número de repeticiones del dinucleótido GT: (GT)₁₄– (GT)₁₉.

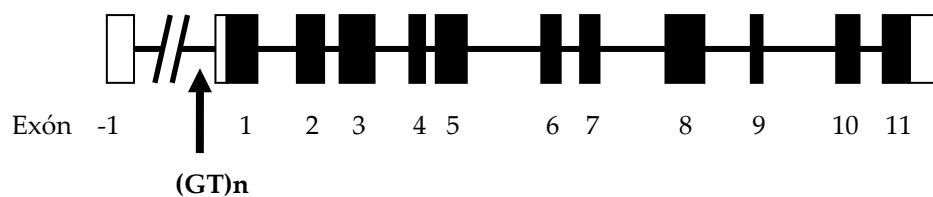


Figura III.6. Esquema del gen *FOXP3*. Localización del marcador microsatélite (GT)_n

Para ello empleamos los cebadores recomendados por Bassuny y col. (Bassuny et al. 2003) y realizamos el análisis mediante electroforesis en gel de acrilamida (apartado 2.2.4)

Polimorfismo	Cebadores (5'- 3')	Tm	pb
(GT) _n región promotora <i>FOXP3</i>	D- CAACCATTGCCCTCATAGAGG R- GGCGGTATGAGATACTCGACCA	60	259-269

Al no disponer de la información sobre el sexo de los individuos del grupo control, el estudio caso-control se llevó a cabo comparando las frecuencias cromosómicas. El estudio familiar se realizó en aquellas familias informativas mediante el TDT.

2.8.2 Estudio del Gen *GILT*

Se realizó el estudio de asociación genética analizando dos SNPs diana del gen *GILT*, localizado en el locus CELIAC4 (figura III.7):

- rs273266*C>T: se localiza en una región no codificante ~3000 pares de bases antes del comienzo de la región 5' UTR de *GILT*. Se analizó mediante RFLPs con la enzima *BcnI*.
- rs11554159*G>A: se localiza en el exón 2 de *GILT* y produce un cambio de aminoácido de arginina a glutamina (*GILT*:p.R76Q). Se analizó mediante DHPLC, testándose los controles homocigotos mediante SSCPs.

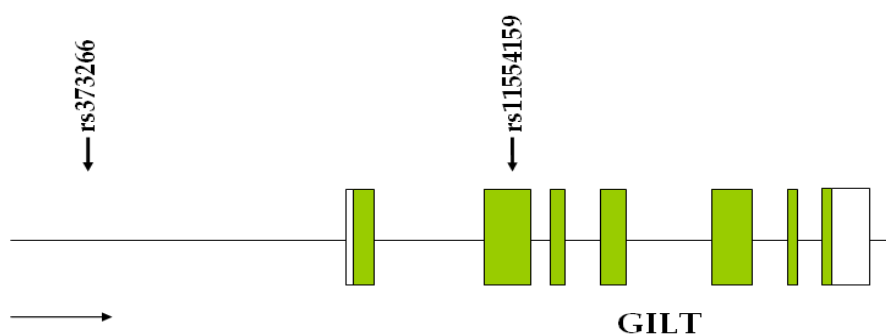


Figura III.7 Polimorfismos diana analizados para el estudio del gen *GILT*

Cebadores empleados:

GILT			
Polimorfismo	Cebadores (5'- 3')	Tm	pb
rs273266	D-ACCATCCAGCCACTGGG R-TACACAGGACAGTGGCCC	60	298
rs11554159	D-TTCCTAATCCACAGACAGG R- TTGAGGATCTCCATGACC	55	166

El análisis estadístico se llevó a cabo tal y como se ha expuesto en el punto 2.7 de este apartado.

2.9 Análisis Molecular del gen *GILT*

La proteína GILT fue descrita por primera vez en 1988 como una proteína soluble sintetizada como un precursor de 35 KDa que, tras su incorporación al sistema endosomal-lisosomal mediante el receptor de Manosa-6-Fosfato (M6PR), se procesa para formar una proteína madura de 30 KDa por la eliminación de los propéptidos en sus extremos N- y C- terminal (Figura III.8) (Phan et al. 2000).

```

1      MTLSPLLLFLPPLLLLLLDVPTAAVQA SPLQALDFGNGFPVNYKTGNLYLRGPLK
61     KSNAPLVNVTLYYEALCGGCRAFLIRELFPTWLLVMEILNVTLPYGNAQEONVS
121    GRWEFKCQHGEEECKFNKVEACVLDELDMELAFITVCMEEFEDMERSLPLCLQL
181    YAPGLSPDTIMECAMGDRGMQLMHANAQRD DALQPPHEYVPWVTVNGKPLEDQTO
241    LLTLVCQLYQGRKPDVCPSSSTSSLRVCFK*
    
```

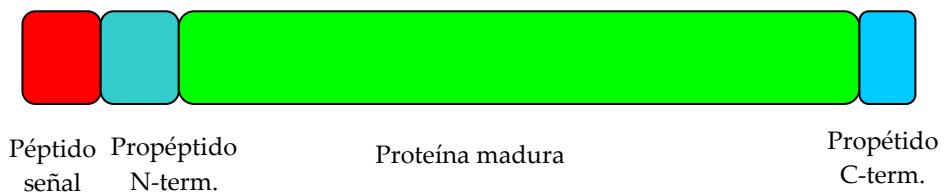


Figura III.8. Secuencia aminoacídica de GILT y esquema de la proteína.

GILT se expresa en las células presentadoras de moléculas HLA de clase II, donde los endosomas y los lisosomas se denominan MIICs (*MHC class II-Containing compartments*) y tienen una apariencia multivesicular. La pro- forma de GILT se encuentra en el retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, MIICs tempranos (endosomas tempranos) y MIICs tardíos (endosomas tardíos multivesiculares y lisosomas multilaminares). La forma madura de GILT se encuentra únicamente en éstos últimos, junto con las moléculas HLA de clase II (Arunachalam et al. 2000).

GILT contiene un motivo CXXC (Cisteína-X-X-Cisteína) característico de la familia de las tioredoxinas, que constituye su

centro activo. El polimorfismo rs11554159 (NM_006332.3:c.227G>A; NP_006323.2:p.Arg76Gln; NT_011295.11:g.9548746G>A) se localiza en el codón adyacente al centro activo de GILT: CGGCR/Q y provoca el cambio de un aminoácido de carga positiva a un aminoácido de carga neutra.

2.9.1 Aislamiento del cDNA de GILT:

Para la obtención del cDNA (DNA codificante) de GILT se diseñaron cebadores específicos para amplificar el fragmento de 753 pb que abarca desde el codón de inicio de la transcripción hasta el codón de parada:

GILT-ATG: 5' ATGACCCTGTCGCCACTTCTGC 3'

GILT-STOP: 5' TCACTTGAAGCAAACACTCC 3'

Realizamos la PCR utilizando como molde el cDNA de distintas líneas celulares humanas:

- 293T: fibroblastos embrionarios de riñón
- HeLa: células procedentes de carcinoma de cuello de útero
- LN9: fibroblastos de epidermis
- SHSY5Y: neuroblastoma
- Adipocitos

Purificamos el producto de PCR (High pure PCR purification KIT, Roche, Germany) y lo secuenciamos. Repetimos la PCR (3 tubos de 50 µl/muestra) en las líneas 293T y de adipocitos con el fin de purificar el fragmento antes de clonarlo:

<u>Condiciones de la PCR</u>			<u>Condiciones del termociclador</u>	
Reactivo	Concentración	Vol. (µl)	T ^a (°C)	Tiempo
Tampón	10x	5	96	10'
dNTPs	5mM	1	96	40''
Cebadores	20m	0.4 (x2)	60	40''
<i>Pfu</i> DNA Pol.	1U/µl	0.5	72	40''
DNA		5	72	7'
H2O		37,7	10	∞

} 35 x

Resolvemos el producto de PCR mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa y purificamos los fragmentos que contienen el cDNA de GILT, cada uno con su respectivo alelo (A o G).

2.9.2 Clonación de GILT en el Vector pGEM-T

El vector pGEM-T (promega) se utiliza como punto de partida para el clonado de fragmentos amplificados por PCR. Su uso se basa en la capacidad de la Taq DNA polimerasa de adicionar un nucleótido de adenina en los extremos 3' de los fragmentos sintetizados. El vector pGEM-T tiene agregada una timina en sus extremos 5', lo cual hace posible ligar fragmentos de DNA generados mediante PCR en condiciones similares a una ligación inserto-vector con extremos cohesivos.

Posee numerosos sitios de restricción que permitirán extraer posteriormente el inserto y clonarlo en otros vectores.

III. Pacientes y Metodología

Preparación de la ligación:

Preparamos la mezcla para cada una de las muestras o insertos:

Reactivo	Volumen (µl)
Tampón	7
T4 ligasa	1
Vector	1
Inserto	5
Volumen final	14

Dejamos que se produzca la reacción durante toda la noche a 4°C

2.9.3 Transformación de Células Competentes *E. coli*

Cepa XL1-Blue para transformación por choque térmico:

1. Mezclar en un tubo en un tubo *Eppendorf* la reacción de ligación con 100 µl de células competentes.
2. Incubar durante 20 min. Poner el baño húmedo a 37°C.
3. Incubar en el baño a 37°C durante 2 min.
4. Poner en hielo 4 min.
5. Añadir 900 µl de medio LB (en condiciones de esterilidad)
6. Incubar a 37°C en agitación durante 1h.
7. Centrifugar para quitar el exceso de medio LB, reduciendo el volumen a 100µl para sembrar.
7. Sembrar en placas de LB-agar (base sólida) conteniendo el antibiótico de selección adecuado, en este caso Ampicilina.
8. Incubar la placa boca abajo toda la noche a 37°C
9. A la mañana siguiente sacar las placas de la estufa y comprobar que haya colonias.

Medio LB (Luria-Bertoni): 10 g NaCl + 10 g Triptona + 5 g de Extracto de levadura. Disolver en 1L de agua destilada ajustando el pH a 7,5 con NaOH y autoclavar.

Si lo que queremos es preparar placas para sembrar un cultivo, añadiremos 20g de agar antes de autoclavar y, posteriormente, el antibiótico restrictivo para la selección de los clones. Distribuir en placas Petri y esperar a que solidifique.

2.9.4 Testado de Colonias por PCR

Con el fin de comprobar que los clones han incorporado el inserto realizamos una PCR utilizando los cebadores T7 y SP6 que reconocen su secuencia complementaria en el vector. Sabremos si el inserto está presente por el tamaño molecular de las bandas que aparezca tras la electroforesis en gel de agarosa.

Testaremos el DNA de varias colonias: picamos cada colonia con un palillo estéril, arrastramos el palillo en una placa nueva de LB-Agar con Ampicilina donde previamente hemos dibujado una cuadrícula numerada (cada colonia un cuadrado numerado) y posteriormente, sumergimos el palillo en su correspondiente tubo eppendorf de 0,2 ml que contiene la mezcla de PCR.

Condiciones de la PCR

Condiciones del termociclador

Reactivo	Concentración	Vol. (20 µl)	T ^a (°C)	Tiempo
Tampón	10x	2	96	10'
dNTPs	5mM	0,5	96	40''
Cebadores	10mM	0.5 (x2)	55	40''
Netzyme Pol.	1U/µl	0.5	72	1'
DNA		-	72	7'
H2O		16,5	10	∞

} 35 x

2.9.5 Obtención del Plásmido a Partir de Cultivo

Una vez hemos comprobado que tenemos colonias aisladas positivas con el inserto clonado en el plásmido, obtenemos el DNA plasmídico por miniprep, técnica que consiste en amplificar este DNA mediante el cultivo de colonias positivas para su posterior purificación. Para ello, utilizamos el Kit "High pure plasmid isolation Kit", Roche, Germany) y comprobamos que no ha habido errores mediante secuenciación automática.

2.9.6 Clonación en Vectores de Expresión en Células de Mamífero

Para comprobar el efecto del polimorfismo p.R76Q en la proteína GILT, decidimos llevar a cabo experimentos de localización subcelular transfectando células de mamífero procedentes la línea celular cos-7 con ambos alelos.

2.9.6.1 Clonación en el Vector pCDNA3

Este vector no posee ninguna proteína recombinante como etiqueta (figura III.9). Clonamos ambos polimorfismos aprovechando los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI* del *polylinker* (lugar de clonación en el vector), tras haber comprobado que la secuencia consenso reconocida por estas enzimas no se encontraba en la secuencia del cDNA de GILT. Diseñamos cebadores con los sitios de restricción

para crear extremos cohesivos entre el inserto y el vector.

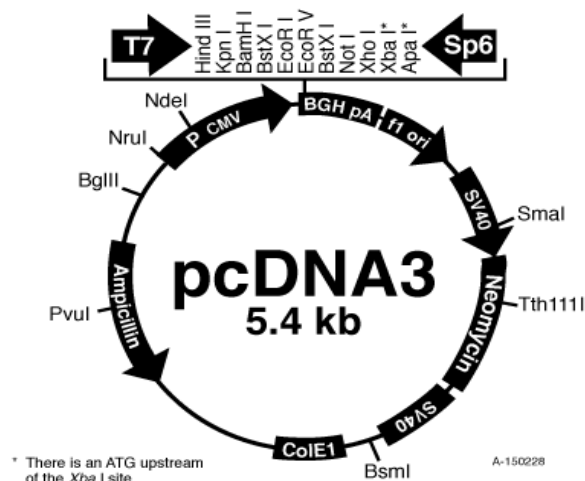


Figura III.9. Esquema de los componentes del vector pCDNA3 (Invitrogen).

Cebadores empleados:

GILT-pCDNA3EcoRI:5' ggaagaattcATGACCCTGTCGCCACTTCTGC 3'

SP6: 5' ATTAGGTGACACTATAG 3'

Para la obtención del inserto, realizamos la PCR utilizando estos cebadores y como molde de DNA, el producto de las minipreps de ambos polimorfismos de GILT clonado en p-GEMT (haciendo una dilución 1:100) con la enzima *pfu*.

Purificamos el producto de la PCR y realizamos una doble digestión, tanto de los insertos como del vector pCDNA3:

Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Inserto/vector	100 µg	1ª digestión	30 µl
Tampón <i>EcoRI</i>	4 µl	Tampón <i>NotI</i>	4 µl
<i>EcoRI</i>	5 U	<i>NotI</i>	5 U
H ₂ O	Hasta 40 µl	H ₂ O	Hasta 40 µl

Realizamos la primera digestión incubándola toda la noche a 37°C, la purificamos con el kit de purificación de PCR eluyéndola en 30 µl. Realizamos, a partir de este volumen, la segunda digestión, la incubamos durante el día, la purificamos y procedemos a la ligación tal y como hemos indicado en el apartado 2.9.2.

2.9.6.2 Clonación en los Vectores pECFP-N1 y pEYFP-N1

Realizamos experimentos de coexpresión de ambas variantes de GILT. Clonamos el cDNA conteniendo cada alelo, en dos vectores diferentes pero con características muy similares para que uno no interfiera sobre el otro, que nos permitan diferenciarlos.

Seleccionamos los vectores pECFP-N1 y pEYFP-N1 (Clontech) que contienen como etiqueta, dominios de las proteínas fluorescentes cyan y yellow, respectivamente (Figura III.10). Éstas irán clonadas en

III. Pacientes y Metodología

pauta tras el extremo C-terminal de GILT. Diseñamos cebadores específicos para clonar en pauta con estos dominios, el cDNA sin el fragmento que codifica el propéptido C-terminal de GILT para que, al ser procesada la proteína, no pierda la etiqueta. Partimos de una dilución 1:100 de las minipreps con las variantes de GILT clonadas en pCDNA3.

Cebadores empleados:

FP-GILT-EcoRI: ggaagaattcggATGGATAGTCGCCACACC

FP-GILT-BamHI: ggaaggatccgCTTGCCCTGGTACAACCTGGC

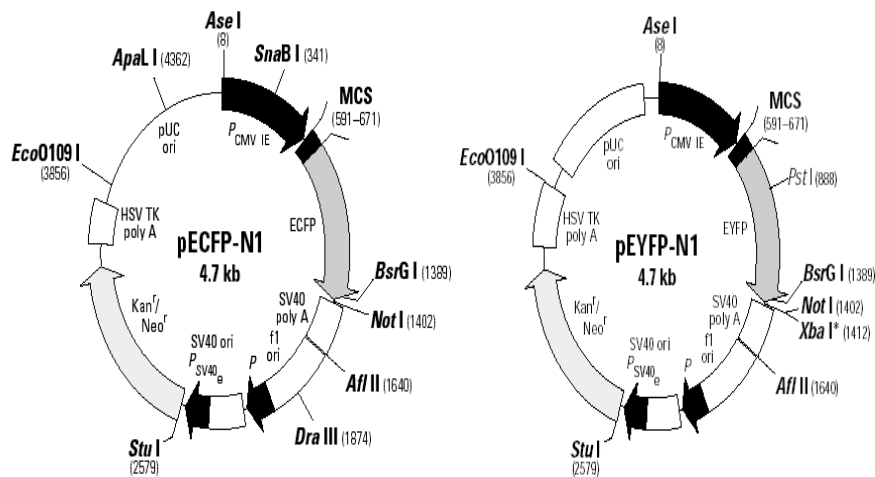


Figura III.10. Esquema de los vectores pECFP-N1 y pEYFP-N1 de Clontech. Ambos poseen resistencia a Kanamicina.

Realizamos una digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para crear extremos cohesivos y procedemos a la ligación del inserto con su respectivo vector como hemos descrito para el vector pCDNA3.

2.9.7 Electrotransformación de Células *E. coli* Electrocompetentes

Empleamos la cepa DH5 α de *E. coli* para la electrotransformación:

1. En hielo, echamos 2-3 μ l de la ligación en una alícuota de células electrocompetentes DH5 α .
2. Pipetear y echar en una cubeta estéril de electroporación (en hielo también)
3. Electroporar aplicando 1700 voltios
4. Sacar la cubeta del electroporador y añadirle 300 μ l de medio LB, resuspender y pipetearlo para pasarlo a un tubo *ependorf* de 1,5 ml.
5. Incubar en agitación durante 45'.
6. Plaquear en placas de LB-agar Ampicilina como antibiótico de selección de las colonias que hayan incorporado el producto de la ligación. Incubar toda la noche.
7. Al día siguiente, testar por PCR las colonias positivas
8. Preparar minipreps de al menos 3 colonias positivas y secuenciarlas para comprobar que el inserto no tiene errores y está clonado en pauta de lectura.

2.9.8 Amplificación del DNA plasmídico Mediante Midiprep

Con el fin de obtener una concentración de DNA plasmídico superior a un 1 μ g para los experimentos de expresión en células de mamífero, realizamos una Midiprep con el Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) a partir de colonias seleccionadas.

2.9.9 Estudios Celulares en una Línea Eucariota

Para comprobar que la localización subcelular de GILT no se ve afectada por este polimorfismo adyacente al centro activo, expresamos GILT en sus dos variantes realizando experimentos *in vitro* en la línea celular de mamífero cos-7.

Descripción de la línea celular

Nombre de la línea: COS-7

ECACC N°: 87021302

Descripción: Células de riñón mono verde africano transformadas con el virus SV40

Morfología: Típica de fibroblasto

Medio de cultivo: Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% + penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 mg/ml)

Crecimiento: Adherente en monocapa

2.9.9.1 Cuantificación Celular

Previamente a los experimentos de transfección es necesario cuantificar el número de células que vamos a “sembrar”. De esa manera se optimiza el crecimiento celular y permite la estandarización de los procedimientos de cultivo.

Protocolo de cuantificación celular:

1. Partimos de células COS-7 crecidas en frasco de 75 cm² de superficie.
2. Eliminar el medio de cultivo aspirándolo con una punta de vidrio estéril.
3. Lavar 2 veces con PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline*).
4. Añadir 3 ml de tripsina e incubar a 37°C y 5% CO₂ 4 minutos.
5. Añadir 10 ml de medio de cultivo y pipetear varias veces para que se separen bien las células.
6. Recoger el contenido del frasco en un tubo de 50 ml.
7. Pipetear 10µl del frasco y colocarlos en la cámara de Neubauer. Contar al microscopio óptico el número de células viables.
8. Para un pocillo de ~2,2 cm de diámetro sembramos 1x10⁵ células. Este número varía en función del tipo celular con el que se trabaje. La cantidad de ml del medio que contiene las células en suspensión será igual al número total de células que se necesite (según el n° de pocillos que necesite transfectar) divididir entre el (n° de

células/cuadrado de la cámara) $\times 10^4$ (factor de corrección de la cámara).

9. Al día siguiente se tendrá una confluencia celular del 80-90% necesaria para los experimentos de transfección.

2.9.9.2 Transfección de la Línea Celular Cos-7

Con el fin de estudiar la expresión de las dos variantes de GILT en cos-7 se transfectaron las células con FuGENE® Transfection Reagent (Roche).

Protocolo de transfección para extracción proteica

1. Utilizamos placas de 6 pocillos de 2,2 cm Ø, 2 pocillos para cada variante, un pocillo control de células transfectadas con el vector vacío y otro con células que no van a ser transfectadas y que emplearemos como control negativo.

Para cada pocillo, diluir 5 μ l de Fugene junto con 2 μ g de DNA plasmídico en 100 μ l de medio Opti-MEM (Gibco).

2. Aplicar vórtex e incubar durante 20' a temperatura ambiente para favorecer la formación de complejos Fugene-DNA plasmídico.

3. Aplicar este volumen en cada pocillo en el que vayamos a realizar una transfección y agitar la placa para que se distribuya bien por el medio.

4. Incubar las células a 37°C y 5% de CO₂.

5. A las 24h, cambiar el medio (aspirar, lavar con PBS 1x y poner 3ml de medio nuevo/pocillo) para eliminar el fugene.

6. Para saber los niveles de expresión celular en función del tiempo, dejaremos la transfección 24, 48 y 72h antes de realizar la extracción proteica.

7. Para la extracción de proteínas, aspiramos el medio y lavamos dos veces con PBS 1x.

8. Echamos en cada pocillo 60-80 μ l de tampón de lisis (PBS 1x junto con inhibidor de proteasas Complete mini, EDTA free de Roche).

9. Separar las células de la superficie del pocillo con un rascador (*cell scraper*), recoger y echar en un *ependorf* de 1,5 ml.

10. Romper las células con una jeringuilla (aspirando e inyectando 5 veces).
11. Centrifugar y separar el sobrenadante del pellet.
12. Cuantificar las proteínas mediante un ensayo espectrofotométrico con el reactivo de Bradford.

Para establecer la curva patrón utilizamos concentraciones conocidas de la proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*):

BSA (1µg/µl) (µl)	0	2	4	6	8	10
Agua destilada (µl)	820	818	816	814	812	810
Bradford 5x (µl)	200	200	200	200	200	200

En el caso de nuestras muestras, echamos 200 µl de Bradford 5x, 818 µl de agua destilada y 2 µl de nuestro sobrenadante. Medir la absorbancia a 595 nm. En el caso de que la concentración de nuestra proteína se salga del rango de la curva patrón, realizar diluciones y luego multiplicar el resultado por la dilución aplicada.

2.9.9.3 Detección de GILT por Western Blot

Esta técnica se emplea para la detección de proteínas y consiste en una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes según el método descrito por Towbin en 1979 (Towbin et al. 1979) utilizando geles discontinuos de poliacrilamida al 12% y sistema Mini Protean II de Bio-Rad (Richmond, Ca. EE.UU.). La electroforesis se realiza en tampón *running* 1X y la transferencia en tampon "de transferencia" 1X.

- Tampón Running 5X (1L): Tris 125 mM pH 8,3, glicina 1M, SDS 0,1%.
- Tampón de transferencia 5X (1L): Tris 125 mM pH 8,3 y glicina 1M. Para cambiar la concentración a 1X, añadir metanol al 20%.

Reactivos empleados para preparar geles de acrilamida discontinuos:

1) Solución Resolving		2) Solución Stacking	
Acrilamida 30%	2,1 ml	Acrilamida 30%	230 μ L
Tampón II	1,3 ml	Tampón III	380 μ L
Agua destilada	1,5 ml	Agua destilada	860 μ L
PSA	100 μ L	PSA	50 μ L
TEMED	6 μ L	TEMED	3 μ L

Tampón II: Tris 1,5M pH 8.8 + SDS 0,4%

Tampón III: Tris 0,5M pH 6.8 + SDS 0,4%

- Mezclar el volumen que contenga los μ g de extracto de proteínas que deseamos cargar junto con tampón de carga para proteínas 3x (Tris-HCl 150 mM pH 6.8, DTT 300 mM, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3% y glicerol 30%).

- Hervir esta mezcla durante 5' para desnaturalizar las proteínas. Cargar en los distintos pocillos y aplicar 150 V durante el tiempo necesario para que las proteínas hayan migrado por el gel. Poner como referencia un marcador de pesos moleculares.

- Transferir las proteínas a una membrana BioTrace™ de PVDF en tampón de transferencia durante 1 hora.

- Quitar la transferencia e incubar la membrana con las proteínas transferidas en solución de bloqueo (leche desnatada 5% en TBST) durante 45'.

TBS-T 1L (Tris Buffer Saline Tween20): 60ml NaCl 2,5M, 10 ml Tris-HCl 2M, 1 ml Tween 20, 929 ml de agua destilada).

- Lavar la membrana con TBS-T.

- Poner el anticuerpo primario en solución de bloqueo (Goat polyclonal IgG GILT (T-18) sc-21827, Santa Cruz, CA) que reconoce un epítipo de la región interna de GILT humano, por ello es capaz de detectar tanto la proforma como la forma madura de la proteína. Probamos distintas diluciones del mismo para optimizar la detección de la proteína. Poner simultáneamente (tras comprobar que no interfieren el uno sobre el otro) un anticuerpo primario anti- actina de

conejo 1: 4000 (Sigma), que nos va a servir como proteína control de carga. Incubar durante 45'.

- Quitar en anticuerpo primario y hacer 3 lavados de 10' con TBST 1x.
- En solución de bloqueo, incubar la membrana con los anticuerpos secundarios donkey anti-Goat (1:5000) y donkey anti-rabbit (1:10000) conjugados con la enzima HRP (*Horseradish Peroxidase*) durante 45'.
- Hacer 3 lavados de 10' con TBS-T.
- Revelar la membrana con el sistema ECL plus (Amersham) por quimioluminiscencia (Fujifilm LAS-3000).

2.9.9.4 Experimentos de Inmunofluorescencia Indirecta

Utilizamos la microscopía de fluorescencia para detectar la presencia de un antígeno indirectamente empleando dos tipos de anticuerpos: un anticuerpo primario contra el antígeno de interés y un anticuerpo secundario que irá asociado a un fluorocromo que reconoce a dicho anticuerpo primario.

La finalidad de este experimento es comprobar la localización celular de GILT. Para llevar a cabo este experimento transfectamos células cos-7 tal como hemos descrito en el apartado 2.9.9.2, con las dos variantes de GILT clonadas en el vector pCDNA3 pero quedándonos en el 5º paso del protocolo. Utilizando placas de 6 pocillos, colocamos esta vez en su interior, discos portaobjetos donde se adherirán y crecerán las células. Podemos colocar hasta 3 discos/pocillo.

Protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta

1. sacar las placas del incubador, aspirar el medio y lavar bien con PBS 1X.
2. Fijar con metanol 20' a -20 °C. Echar el metanol con cuidado.
3. Lavar bien con PBS 1X.
4. Pasar los cubres a una placa petri de 14,5 cm Ø envuelta en papel de aluminio para impedir que pase la luz. Colocamos en la base papel húmedo y un cuadrado de parafilm donde colocar los portas.
5. Permeabilizar la membrana de las células con Tritón 0,5% en PBS 1X 20' a temperatura ambiente.
6. Lavar bien con PBS 1X.
7. Bloquear con suero HS (Horse serum) al 5% en PBS 1X durante 45'
8. Bloquear con Avidina/Biotina (Kit Vector). Avidina 10'/lavado/Biotina 10'.
9. Incubar con el anticuerpo (Ab) primario * en toda la noche a 4°C
10. Lavar con PBS 1X.
11. Incubar con Ab secundario* biotilado en HS 45' a temperatura ambiente.
13. Incubar con Streptavidina-FITC en HS y Alexa Fluor® 633.
14. Lavar con PBS 1X.
15. Montar con Fluoromont (Southern Biotech), dejar secar en oscuridad a temperatura ambiente y guardar a 4°C hasta su análisis.

*Anticuerpos empleados

Anticuerpos primarios	Marcaje	Dilución	Anticuerpos secundarios	Dilución
Anti-GILT (T-18) (policlonal cabra)	GILT	1:250	Anti-goat biotinilado	1:200
Anti-GRP94 (policlonal conejo)	Retículo endoplásmico	1:300	Alexa Fluor 633 anti-rabbit	1:200
Anti-EEA1 (monoclonal ratón)	Endosomas tempranos	1:100	Alexa Fluor 633 anti-mouse	1:200
Anti-M6PR (monoclonal ratón)	Endosomas tardíos	1:250	Alexa Fluor 633 anti-mouse	1:200

2.9.9.5 Experimentos de Cotransfección

La finalidad de este experimento va a ser comprobar que las dos variantes de GILT se comportan de la misma forma o simultáneamente en el interior celular, localizándose en los mismos compartimentos a la par, tal y como debería suceder en los individuos heterocigotos para este polimorfismo.

Para ello cotransfectamos células cos-7 con las dos variantes de GILT, c.227A clonada en el vector con el dominio de proteína recombinante *Cyan Fluorescent Protein* y c.227G con *Yellow Fluorescent Protein*. El protocolo es el mismo que el en la transfección con el vector pCDNA3 pero cambiando las proporciones de Fugene: para cada pocillo cotransfectado, diluiremos 10 µl de Fugene junto con 2 µg de DNA plasmídico de cada variante en 100 µl de medio Opti-MEM (Gibco).

Tras 48 h de transfección:

1. sacamos las placas del incubador, aspiramos el medio y lavamos bien con PBS 1X
2. Fijamos con PFA 4% (paraformaldehído) durante 15' a temperatura ambiente.
3. Lavamos bien con PBS 1X.
4. Montar con Fluoromont, dejar secar en oscuridad 1h a temperatura ambiente y guardar a 4°C.

2.10 Ensayos de Actividad Enzimática

Con el fin de analizar el efecto del cambio de aminoácido GILT:p.R76Q, procedimos a la realización de ensayos de actividad con ambas variantes de GILT. Para ello, era necesario disponer de una concentración lo suficientemente elevada de proteína por lo que GILT se expresó y purificó en células de la cepa *Rosetta* de *E. coli*. Clonamos la fracción de cDNA de GILT correspondiente a la forma madura de la proteína en vectores de expresión compatibles con *E. coli*. La variante GILT:p.76R se clonó en el vector pNIC28-Bsa4 y la variante GILT:p.76Q, en el vector pLIC-SGC1. Ambos vectores poseen, entre otras características, un péptido de fusión de 6 histidinas, un sitio de clonación LIC (*Ligation Independent Cloning*) y un inserto con el gen *sacB* que permite la selección negativa de colonias en un medio con sacarosa al 5%; pNIC28 lleva resistencia a kanamicina y pLIC-SGC1 a Ampicilina (figura III.11).

Los cebadores empleados para la clonación en ambos vectores fueron:

GILT-mature-DIR: TACTTCCAATCCATGaatgcaccgcttgc

GILT-mature-REV: TATCCACCTTTACTGctacttgccctggtac

Se transformaron células competentes TOP10 (Invitrogen) por choque térmico y se amplió el DNA plasmídico por miniprep para secuenciar. Se utilizaron 0,5 µL de la miniprep de las colonias seleccionadas para la transformación de células *E. coli- Rosetta* (resistencia al cloranfenicol) por choque térmico.

III. Pacientes y Metodología

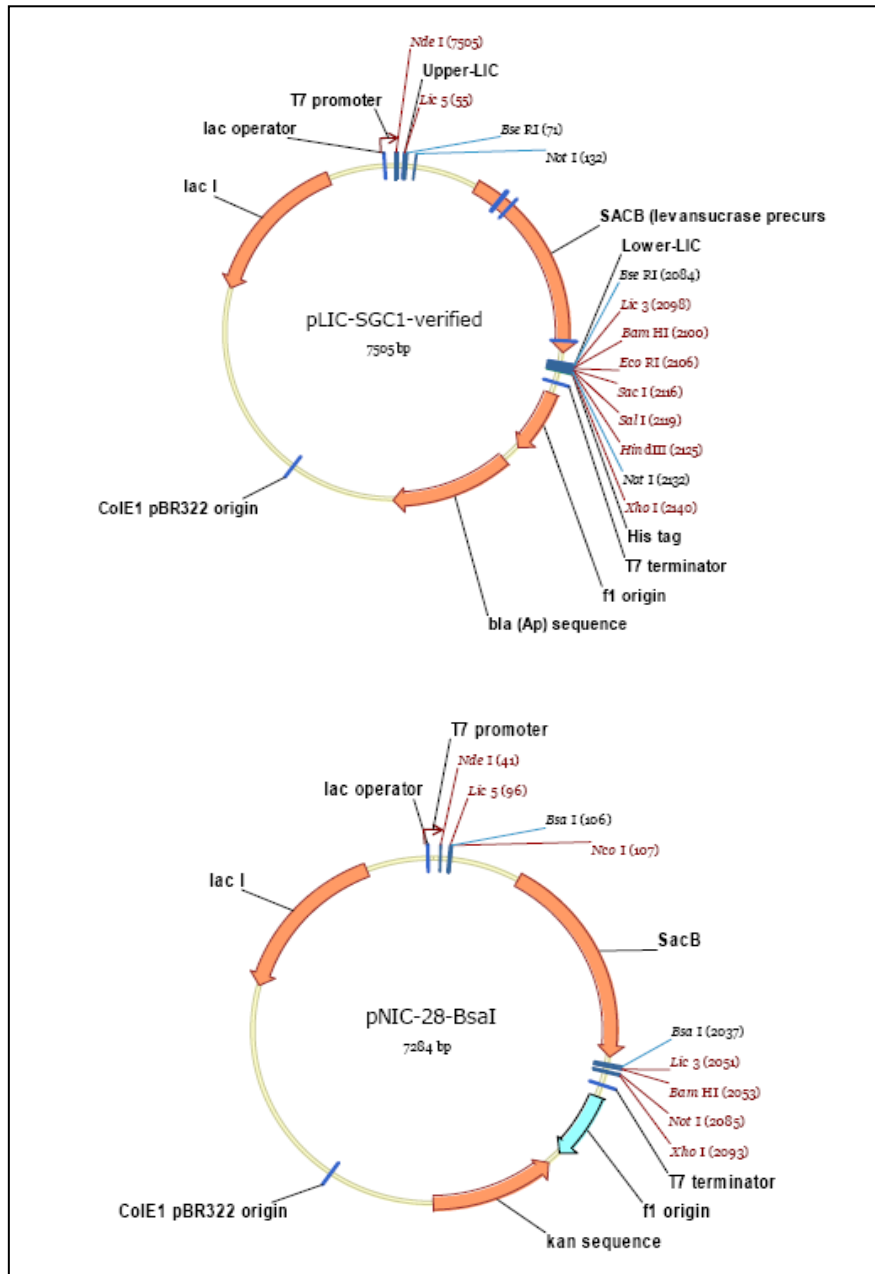


Figura III.11. Vectores empleados para la expresión de ambas variantes de GILT en células *Rosetta*.

Protocolo de expresión de GILT en células Rosetta

1. Sembrar un precultivo en medio LB con antibiótico (Ampicilina o kanamicina 50mg/ml y cloranfenicol) durante toda la noche a 37°C.
2. Pasar 6 ml del precultivo a un matraz con 250 ml de LB-antibiótico. Crecer en agitación y a 37°C hasta que la densidad óptica (O.D) a 600 nm alcance un valor de 2.
3. Centrifugar el contenido de este matraz, aspirar el medio LB y resuspender las células en 250 ml de medio LB-antibiótico nuevo.
4. Incubar en agitación y a 37°C durante 1 hora.
5. Inducir la expresión de GILT con IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranoside) 0,02 mM
6. Incubar durante 36 horas a 18°C.
7. Centrifugar 15' a 10000rpm y eliminar el medio
8. Resuspender las células en 3ml de tampón A (20mM Tampón fosfato sódico pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) diluido en proporción 1:3 con agua destilada para que las sales no inhiban a la lisozima, 0, 2mg/ml de lisozima, MgCl₂ 1mM e inhibidor de proteasas. Dejar a temperatura ambiente 30'.
9. Sonicar las células
10. Centrifugar durante 30' a 4°C y separar el sobrenadante del precipitado.
11. Purificar por cromatografía de afinidad inyectando la muestra en una columna HiTrap con resina cargada con Ni²⁺ y lavar la columna con tampón B (20mM Tampón fosfato sódico pH 7.5, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol).
12. Segunda purificación por cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75 10/300 GL; GE Healthcare)
13. Cuantificar el producto de la purificación mediante Bradford, testar en un gel de acrilamida 12% teñido con azul de Coomassie.

2.10.1 Ensayos de Actividad por Reducción de Insulina

GILT ha sido descrita como una enzima con actividad tiorredoxina (Hastings et al. 2006). En 1979 Arne Holmgren describió un ensayo en el que espectrofotométricamente y en función del tiempo, podía medirse el aumento de la turbidez de una disolución de insulina por la reducción de los puentes disulfuro que unen sus cadenas polipeptídicas α y β . Tras romperse, estos enlaces disulfuro se vuelven a formar aleatoriamente y dan lugar a agregados, resultando en un aumento de la absorbancia a 650 nm. La capacidad de reducir las cadenas de insulina por DTT (Ditiotreitol) es intrínseca a toda proteína con actividad tiorredoxina (Holmgren 1979).

Protocolo de análisis de reducción de insulina

1. Preparar una disolución de insulina 10x disolviendo 50 mg en 5 ml de agua ultrapura. Para evitar agregados hay que realizar un salto de pH añadiendo HCl 1M hasta alcanzar un valor de pH 3 y rápidamente añadir NaOH 1M hasta alcanzar un pH de 7.
2. Disponer en una cubeta 0,9 ml de la mezcla compuesta por tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,1, EDTA 2 mM, DTT 1mM y GILT (a distintas concentraciones).
3. Colocar la cubeta en un espectrofotómetro que lleve acoplado un baño termostatzado para que la reacción se produzca a 37°C.
4. Para que GILT sea activa debe ser previamente reducida por el DTT. Esperar 15 minutos para que se produzca esta reducción de GILT.
5. Añadir 50 μ L de la solución stock de insulina.
6. Medir la absorbancia a 650 nm durante 30'
7. Realizar un blanco paralelo sin añadir GILT.

2.11 Estudios de Expresión en Biopsias Humanas

Con el fin de detectar variaciones en los niveles de expresión de GILT en tejido intestinal de pacientes con EC activa, realizamos la extracción de proteína total de biopsias humanas procedentes de pacientes así como de individuos control para la detección de GILT mediante Western blot.

Las biopsias de 7 individuos control nos fueron cedidas por el Servicio de Pediatría del Hospital General Universitario de Valencia (Dr. Miguel Calabuig) donde previamente se les realizó el test de la ureasa como indicador de *Helicobacter pylori*.

Las biopsias de 18 pacientes nos fueron cedidas por el Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital Sant Joan de Reus (Dra. Gemma Castillejo) donde previamente se les realizó el estudio histológico de la lesión intestinal y la clasificación de Marsh.

Todas las biopsias llegaron a nuestro laboratorio congeladas en hielo seco. Con ayuda de un bisturí, y manteniéndolas sobre el hielo seco, cada biopsia se dividió en dos fragmentos (~ 2,5 mm de longitud). Se destinó un fragmento para la extracción de DNA genómico y el otro para la extracción de proteínas.

El DNA se extrajo mediante el protocolo estándar de fenolización descrito en el punto 2.2.1 de este apartado y se realizó el tipaje por alta resolución de los genes HLA DQA1 y DQB1 mediante PCR específica de alelo (Dynal AllSet+™ SSP, OXOID) así como para el estudio del polimorfismo GILT:c.G227A que condiciona las dos variantes de GILT.

Protocolo de extracción proteica de tejido intestinal

1. En hielo, introducir el fragmento de tejido en 1ml de tampón de lisis:
 - Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,4
 - NaCl 150 mM (provocará un choque osmótico)
 - EDTA 5 mM
2. Homogeneizar el tejido con un Ultra Turrax T8 (IKA labortechnik, Germany) o en su defecto romper el tejido con una jeringuilla hasta que se haga homogéneo.
3. Añadirle inhibidor de proteasas (Roche) y aplicar vórtex
4. Centrifugar y separar el sobrenadante del pellet.
5. Concentrar las proteínas por centrifugación con membranas Millipore (10K)
6. Medir concentración de proteínas con el reactivo de Bradford (apartado 2.7.9.2)
7. Analizar los niveles de expresión de GILT mediante western blot (apartado 2.7.9.3)
8. Cuantificar los niveles de expresión con los programas *Image Gauge v. 4.0* y *Multi Gauge V. 2.1*
9. Normalizar los niveles de expresión frente al control de carga (detección de actina)
10. Relativizar los niveles de expresión frente a una muestra control, que será la misma en todos los western blot que realicemos con estas muestras.
11. Análisis estadístico mediante el test de la t-student.

IV. RESULTADOS

1. Análisis genético de las regiones CELIAC

Se realizó un estudio genético comparativo de las regiones CELIAC clásicas descritas hasta el momento con el fin de conocer el fondo genético de la población de la Comunidad valenciana respecto a genes no HLA relacionados con la enfermedad celíaca.

1.1 Cálculo del poder estadístico del estudio de asociación

Para conocer el poder estadístico del estudio genético realizado, utilizamos el programa "Genetic Power Calculator" (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>) asumiendo los siguientes parámetros teóricos:

- Prevalencia de la enfermedad: 0,02 (asumimos que la prevalencia en nuestra población es de 1:200) (García Novo et al. 2007).

- Desequilibrio de ligamiento (D'): 0,99. Teóricamente, cada marcador genético estudiado se encontraría en desequilibrio de ligamiento con los marcadores adyacentes.

Y considerando que:

- Frecuencia del alelo marcador: 0,4 (los marcadores seleccionados para los estudios de asociación deben tener un valor mínimo de heterozigosidad cercano a 0,5 con el fin de que resulten informativos)

- Riesgo relativo para el alelo asociado a la enfermedad en heterozigosis: 2 y en homozigosis: 4 (Haimila et al. 2004)

Así, cuando la frecuencia de alelo asociado a la enfermedad es 0.5, 0.25 y 0.1, el poder de un estudio de asociación llevado a cabo en nuestra serie, es de un 76%, 68% y 20% respectivamente. Teniendo en cuenta las mismas frecuencias del alelo de riesgo, el poder de los estudios caso-control en nuestra serie es de 94%, 89% y 31% respectivamente.

1.2 Análisis de la región CELIAC1

Tal como hemos mencionado en el punto 1 del apartado "Pacientes y Metodología", se dispuso, previamente, de la información acerca del genotipo HLA de los pacientes y familiares así como de los 186 individuos control no relacionados. Los genes HLA de clase II analizados fueron: *DRB1*, *DRB3/4/5*, *DQA1* y *DQB1*.

Dentro de la región CELIAC1, se analizaron polimorfismos localizados en genes no HLA: rs1800629, localizado en la región promotora de *TNF α* y rs909253 localizado en *LT α* . Estos polimorfismos se han relacionado con el incremento de la secreción de *TNF α* y *LT α* , alterando la respuesta inmunológica (Bouma et al. 1996; Wilson et al. 1997).

1.2.1 Estudio caso-control

El análisis de rs1800629 y rs909253 se llevó a cabo estimando sus frecuencias alélicas y genotípicas y se determinó si los marcadores se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Tras comprobar que se encontraban en equilibrio, realizamos el estudio caso-control. Los resultados se resumen en las tablas IV.1 y IV.2:

Polimorfismo	Alelo	Pacientes (%)	Controles (%)	p-valor (χ^2)	OR (95% IC)
rs1800629 (-308*A>G)	G	224 (77,77)	442 (86,32)	0,0026 (9,06)	0,55 (0,38-0,80)
	A	64 (22,22)	70 (13,67)		1,80 (1,24-2,62)
rs909253 (NcoI*A>G)	G	115 (37,82)	155 (26,54)	0,0006 (11,51)	1,68 (1,25-2,26)
	A	189 (69,17)	429 (73,45)		0,59 (0,44-0,79)

Tabla IV.1. Frecuencias alélicas y estudio caso control de los polimorfismos estudiados en los genes *TNF α* y *LT α* . (OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de confianza).

Polimorfismo	Pacientes (%)	Controles (%)	χ^2	p-valor
rs1800629 (-308*A>G)				
GG	90 (62,50)	191 (74,60)	9,84	0,007
AG	44 (30,55)	60 (23,43)		
AA	10 (6,94)	5 (1,95)		
rs909253 (NcoI*A>G)				
GG	23 (15,13)	27 (9,24)	11,64	0,003
AG	69 (45,39)	101 (34,58)		
AA	60 (39,47)	164 (56,16)		

Tabla IV.2. Frecuencias genotípicas y estudio caso control de los polimorfismos estudiados en *TNF α* y *LT α* .

A los resultados mostrados en las tablas se les ha aplicado la corrección estadística de Yates, que ajusta la fórmula del test χ^2 cuando al menos el valor de una frecuencia esperada es menor que 5. Para la estimación del p-valor hemos considerado un nivel de significación del 95%.

Los resultados del estudio caso-control muestran que las frecuencias, tanto alélicas como genotípicas difieren significativamente entre pacientes e individuos sanos, lo cual sugiere una posible implicación de ambos genes en la EC. Con el fin de ahondar más en este hallazgo, procedimos al estudio familiar.

1.2.2 Estudio Familiar

Dado que *LT α* y *TNF α* se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la región HLA, investigamos el papel del haplotipo DRB1*3-DQA1*05:01-DQB1*02:01 en esta asociación. Para ello aplicamos el S-TDT (Sibling- Transmission Disequilibrium Test) en el estudio de ambos polimorfismos (Spielman and Ewens 1998). Esta prueba consiste en la aplicación del TDT con la ventaja de considerar el genotipo informativo de los hermanos del probando (heterocigotos

IV. Resultados

para el marcador genético objeto de estudio), en el caso de ausencia del genotipo de los padres. Para este análisis distribuimos los datos genotípicos de las familias en tres grupos:

1. Todas las familias informativas juntas, independientemente del genotipo HLA del probando.
2. Familias en las que el probando es portador del haplotipo DQ2.5
3. Familias en la que el probando no es portador del haplotipo DQ2.5

Los resultados del S-TDT muestran una asociación estadísticamente significativa entre el alelo -308A y la enfermedad celíaca (Z' : 2,135; p-valor: 0,01). Al separar los datos genotípicos de ambos marcadores en función del genotipo HLA, vemos que la asociación detectada en el estudio caso-control se ve incrementada en el grupo de probandos portadores del haplotipo DQ2.5 (Z' : 3,258; p-valor: 0,0008) mientras que, en el grupo de pacientes no portadores del haplotipo DQ2.5 no se detecta asociación (tabla IV.3).

Polimorfismo	Serie Completa		Portadores DQ2.5		No DQ2.5	
	<i>NcoI</i> *A>G	-308*A>G	<i>NcoI</i> *A>G	-308*A>G	<i>NcoI</i> *A>G	308*A>G
Familias informativas	57	63	42	36	15	27
Z' (P-valor)	0,00 (n.s.)	2.135 p = 0,01	0,48 (n.s.)	3.258 p=0,0008	0,25 (n.s.)	0,762 (n.s.)

Tabla IV.3. Resultados del S-TDT en el conjunto global de la serie clínica y en función del genotipo HLA. El haplotipo DQ2.5 está compuesto por las variantes alélicas DRB1*3-DQA1*05:01-DQB1*02:01. (n.s.: no significativo).

1.2.3 Estudio de haplotipos

Realizamos el cálculo de la frecuencia de transmisión de haplotipos de fase conocida, comparando cada haplotipo con aquél que se ha transmitido con mayor frecuencia. La distribución de los

haplotipos no muestra diferencias significativas entre pacientes y controles (tabla IV.4).

Haplotipo rs909253- rs1800629	Pacientes (%)	Controles (%)	χ^2 (p-valor)	OR (95% CI)
G - G	27 (11,5)	17 (15,74)	0,6 (0,44)	1,30 (0,67-2,53)
G - A	50 (21,17)	14 (12,96)	2,8 (0,09)	0,58 (0,30-1,11)
A - G	159 (67,37)	77 (71,29)		
A - A	0	0		

Tabla IV.4. Cálculo de la frecuencia de transmisión de los haplotipos de fase conocida. Valores establecidos tras la corrección de Yates. (OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de confianza).

Estos resultados muestran la relación existente entre los genes HLA y los genes no HLA, *LT α* y *TNF α* , considerados en la región CELIAC1 y apoyan el desequilibrio de ligamiento de los genes HLA de la región CELIAC1 y otros genes de la misma como explicación de la asociación genética entre éstos y la enfermedad celíaca.

1.3 Análisis de la región CELIAC3

En esta región se analizaron polimorfismos localizados en los genes *CTLA4* e *ICOS*, descritos por su relación con alteraciones de la respuesta linfocitaria (Amundsen et al. 2004). En el gen *CTLA4* se analizaron los SNPs -1147, rs231775, rs3087243 y rs11571319 y en el gen *ICOS* se analizó el SNP rs10183087.

1.3.1 Estudio caso-control

El análisis de la distribución de las frecuencias alélicas de los marcadores en pacientes y controles se muestra en la tabla IV.5. En todos ellos, los resultados no mostraron un p-valor estadísticamente significativo.

SNP	Pacientes (%)	Controles (%)	χ^2 (p-valor)	OR (95% CI)
-1147C>T				
C	259 (79,93)	171 (79,16)	0,011 (0,91)	0,95 (0,62-1,46)
T	65 (20,06)	45 (20,83)		1,05 (0,69-1,61)
rs231775 (c.49A>G)				
A	253 (75,29)	275 (73,92)	0,11 (0,73)	1,08 (0,77-1,52)
G	83 (24,70)	97 (26,07)		0,93 (0,66-1,31)
rs3087243 (CT60A>G)				
A	172 (50,88)	131 (55,5)	1,32 (0,25)	0,81 (0,58-1,13)
G	170 (49,11)	105 (44,49)		1,23 (0,88-1,72)
rs11571319 (CT61G>A)				
A	45 (19,73)	75 (22,18)	0,35 (0,55)	0,86 (0,57-1,30)
G	183 (80,26)	263 (77,81)		1,16 (0,77 -1,76)
rs10183087 (c.602A>C)				
A	155 (59,61)	168 (68,02)	3,62 (0,07)	0,69 (0,48-0,99)
C	105 (40,38)	80 (32,25)		1,44 (1- 2,07)

Tabla IV.5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados en la región CELIAC3. (OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de confianza).

Continuando con este estudio, realizamos el análisis de las frecuencias genotípicas de los marcadores, observando que éstas no presentaban diferencias remarcables entre pacientes y controles en el caso de *CTLA4*. Sin embargo, en el caso del marcador c.602 del gen *ICOS*, sí que apreciamos diferencias en la distribución genotípica (χ^2 : 7,26; p-valor: 0,026) (tabla IV.6).

SNP	Pacientes (%)	controles (%)	χ^2	P-valor
-1147C>T				
CC	103 (65,06)	63 (60,0)	0,63	0,73
CT	53 (32,71)	39 (37,14)		
TT	6 (3,70)	3 (2,85)		
rs231775 (c.49A>G)				
AA	95 (56,54)	97 (52,15)	1,58	0,45
AG	63 (37,50)	81 (43,54)		
GG	10 (5,95)	8 (4,30)		
rs3087243 (CT60A>G)				
AA	40 (23,66)	27 (22,88)	5,33	0,07
AG	92 (54,43)	77 (65,25)		
GG	37 (21,89)	14 (11,86)		
rs11571319 (CT61G>A)				
AA	6 (5,55)	5 (2,95)	2,59	0,27
AG	33 (30,55)	65 (38,46)		
GG	69 (63,88)	99 (58,57)		
rs10183087 (c.602A>C)				
AA	38 (29,23)	56 (45,16)	7,26	0,026
AC	79 (60,77)	56 (45,16)		
CC	13 (10,00)	12 (9,68)		

Tabla IV.6. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados en la región CELIAC3.

1.3.2 Estudio familiar

Al realizar el estudio familiar comprobamos que no había una desviación estadísticamente significativa en la transmisión de los alelos, excepto en el caso del alelo c.49A. Los mismos resultados fueron confirmados empleando el TDT disponible en el programa Haploview 3.2 (<http://www.broadinstitute.org/mpg/haploview>) (c.49A χ^2 : 6.37, p-valor: 0.016). La tabla IV.7 recoge los resultados obtenidos del estudio tras aplicar el análisis S-TDT:

SNP	-1147	c.49	CT60	CT61	c.602
Familias Informativas	48	70	84	< 30	66
Z' (p-valor)	0,42 (0,33)	2,28 (0,01)	1,41(0,08)	-	0,139 (0,44)

Tabla IV.7. Resultados del análisis S-TDT.

El valor del estadístico Z' para el marcador CT61 no se ha tenido en cuenta dado el número de familias informativas (inferior a 30), que no aseguraba la fiabilidad del test. Esto se debe a la baja heterozigosidad de este marcador ya que, en población caucásica, la frecuencia estimada para el alelo CT61G es de 97,4% y para el alelo CT61A, de 2,6%.

1.3.3 Desequilibrio de ligamiento entre marcadores

Dentro de la región CELIAC3 estudiamos el efecto del desequilibrio de ligamiento entre los marcadores -1147, c.49, CT60 y CT61 mediante los programas Haploview v3.2 y PyPopWin 32-0.6.0 (<http://www.pyppop.org>). Comparándolos dos a dos, en todos los casos los valores de D' eran próximos a 1, excepto entre los marcadores -1147C>T y CT60A>G, en los que los valores estaban disminuidos (D'= 0.59 con Haploview y D'= 0.81 con PyPop) mostrando poco desequilibrio de ligamiento entre estos dos marcadores (Figura IV.1).

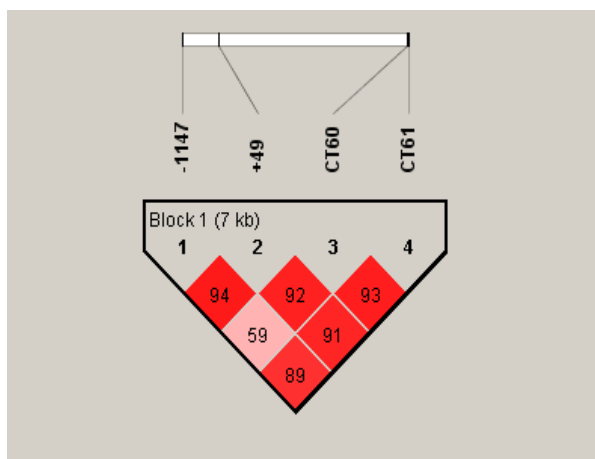


Figura IV.1. Representación gráfica de los valores de D' (desequilibrio de ligamiento; DL) para cada par de marcadores de CTLA4. La intensidad del color rojo refleja el grado de DL, a mayor intensidad de color rojo, mayor grado de DL.

1.3.4 Estudio de haplotipos

Con el fin de profundizar en la asociación entre el marcador c.49A y la EC, realizamos el análisis de la transmisión de haplotipos mediante dos aproximaciones:

- Utilizando la herramienta TDTphase disponible en el programa UNPHASED(<http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/~fdudbrid/software/unphased/>). Para ello, tuvimos en cuenta aquellos haplotipos transmitidos con una frecuencia superior al 5% por considerarse, a partir de este valor, como haplotipos comunes (Johnson et al. 2001). Para el test estadístico χ^2 , empleamos el haplotipo cen_1147C-c.49A-CT60A-CT61G_ tel como referencia por ser el de mayor frecuencia de transmisión. Comparando las frecuencias de cada haplotipo con éste de mayor frecuencia, observamos que el haplotipo cen_-1147T-c.49A-CT60G-CT61A_tel se ha transmitido con una frecuencia mayor estadísticamente significativa y el valor de OR nos indica que ser portador de este haplotipo implicaría mayor riesgo de EC (OR= 2.12,

IV. Resultados

dos veces más), que ser portador de cualquiera de los otros haplotipos (tabla IV.8).

Haplotipo -1147 - c.49 - CT60 - CT61	Frec. T	Frec. NT	OR	% T	χ^2	p-valor
C-A-A-G	0,45	0,44	1,016	52,52	0,83	0,36
C-A-G-G	0,05	0,02	0,9	47,54	0,44	0,5
C-G-G-G	0,22	0,28	0,78	44,12	1,82	0,17
T-A-G-A	0,17	0,08	2,12	68,04	3,9	0,04

Tabla IV.8. Estudio de la transmisión de haplotipos formados por los marcadores estudiados en el gen *CTLA4* mediante el programa UNPHASED. T= número de haplotipos transmitidos; NT= número de haplotipos no transmitidos; OR= Odds Ratio.

▪ Aplicando el programa Haploview v3.2 en familias con haplotipos de fase conocida. En este caso, hemos observado tres haplotipos que se hayan transmitido con una frecuencia superior al 5%. Con esta herramienta vemos que los resultados de asociación son negativos y que además, difieren totalmente de los obtenidos mediante la primera aproximación (tabla IV.9).

Posteriormente, el estudio de la transmisión de haplotipos se llevó a cabo teniendo en cuenta los marcadores de *CTLA4* junto el marcador c.602 del gen *ICOS*. Al igual que en el caso anterior, no se obtuvieron valores estadísticamente significativos (tabla IV.10).

Haplotipo -1147 - c.49 - CT60 - CT61	Frec. T	χ^2	p-valor
C-A-A-G	0,45	3,62	0,57
C-G-G-G	0,25	2,80	0,09
T-A-G-A	0,16	0,02	0,88

Tabla IV.9. Estudio de la transmisión de haplotipos mediante Haploview v3.2. T= frecuencia de transmisión del haplotipo.

Haplotipo -1147 - c.49 - CT60 - CT61 - c.602	Frec. T	χ^2	p-valor
C-A-A-G-A	0,29	0,24	0,62
C-A-A-G-C	0,15	0,34	0,55
C-G-G-G-A	0,14	1,33	0,24
T-A-G-A-A	0,13	1,18	0,27
C-G-G-G-C	0,11	0,08	0,76
T-A-G-A-C	0,08	0,46	0,49

Tabla IV.10. Análisis de la transmisión de los marcadores estudiados en los loci CTLA4 e ICOS. Únicamente se tuvieron en cuenta aquellos haplotipos con una frecuencia de transmisión superior al 5%. T: transmitidos.

Analizando globalmente el conjunto de análisis llevados a cabo mediante las dos aproximaciones y teniendo en cuenta el ajustado p-valor obtenido para el haplotipo cen_-1147T-c.49A-CT60G-CT61A_tel (p-valor=0,04; tabla IV.8) mediante el análisis TDTphase, se descartó la asociación entre alguno de los haplotipos formados por los marcadores genéticos analizados en la región CELIAC3 y la enfermedad celíaca en nuestra población.

1.4. Análisis de la región CELIAC4

En la región CELIAC4 se analizaron distintos marcadores localizados en el gen *MYO9B*.

1.4.1 Estudio del marcador microsatélite *D19S899*

Se ha descrito la existencia de ocho alelos en este marcador, en función del número de repeticiones del dinucleótido CA.

1.4.1.1 Estudio caso-control

El estudio de las frecuencias alélicas muestra los siguientes resultados (tabla IV.11):

Alelo	Pacientes (frec. %) n= 328	Controles (frec. %) n=197
(CA) ₁₅	14 (4,26)	12 (6,09)
(CA) ₁₆	90 (27,43)	50 (25,38)
(CA) ₁₇	49 (14,93)	32 (16,24)
(CA) ₁₈	21 (6,40)	8 (4,06)
(CA) ₁₉	109 (33,23)	64 (32,48)
(CA) ₂₃	6 (1,83)	13 (6,59)
(CA) ₂₄	33 (10,06)	15 (7,61)
(CA) ₂₅	6 (1, 83)	3 (1,52)

Tabla IV.11. Estudio caso-control. Distribución de las frecuencias alélicas del marcador *D19S899* (n: número de cromosomas).

Podemos observar que, tanto en el caso de los pacientes como en el de los controles, los alelos que aparecen con mayor frecuencia son (CA)₁₆ y (CA)₁₉. Al realizar el estudio caso-control, vemos que no hay diferencias significativas entre las frecuencias alélicas.

1.4.1.2 Estudio familiar

Aplicamos el análisis S-TDT en los alelos más frecuentes comparando cada alelo frente al total del resto de alelos, dada la limitación que supone el número de familias que puedan resultar informativas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p -valor $> 0,05$).

1.4.2 Estudio de los polimorfismos rs2305767 y rs2305764

Continuamos el estudio de *MYO9B* con el análisis de los marcadores SNP rs2305767 y rs2305764. En el caso del polimorfismo **rs2305764**, utilizando el programa PyPopWin 32-0.6.0 para la estimación de la variación de las frecuencias alélicas, comprobamos que este marcador no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población control, por lo que tuvimos que desestimarlos para los estudios caso-control y familiares.

En el caso del marcador **rs2305767**, que sí se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población, los resultados que obtuvimos se tabulan en las tablas IV.12 y IV.13.

1.4.2.1 Estudio caso-control

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas en el conjunto de pacientes aislados, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas:

Alelo	Pacientes (%) (n=234)	Controles (%) (n= 272)	χ^2 (p-valor)	OR (95% IC)
T	138 (58,9)	160 (58,8)	0,001 (0,97)	1,01 (0,71-1,44)
C	96 (41,02)	112 (41,17)		0,99 (0,69-1,41)

Tabla IV.12. Estudio caso-control de la distribución de las frecuencias alélicas del marcador rs2305767. OR: *Odds Ratio*. IC: Intervalo de confianza; n: número de cromosomas.

IV. Resultados

Estimación de las frecuencias genotípicas:

Genotipo	Pacientes (n=117)	Controles (n=136)	χ^2 (p-valor)
CC	15 (12,8)	21 (15,44)	0,694 (0,70)
CT	66 (56,41)	70 (51,47)	
TT	36 (30,76)	45 (33,08)	

Tabla IV.13. Estudio caso-control de las frecuencias genotípicas del marcador rs2305767; n: número de individuos.

Los resultados negativos del estudio caso control indicaban la ausencia de asociación entre este marcador y la enfermedad, pero quisimos reafirmarlo mediante el estudio familiar.

1.4.2.2 Estudio familiar

El estudio familiar se llevó a cabo en 54 familias informativas y los resultados que obtuvimos fueron similares a los del estudio caso-control ($Z' = 1.155$; p-valor > 0.05 , no significativo), así comprobamos que, en nuestra población, *MYO9B* no mostraba signos de relación con la enfermedad celíaca. Estos resultados contrastan con los valores de asociación tan llamativos obtenidos en la población holandesa, donde se ha considerado incluso incluir el polimorfismo rs2305764 (p-valor en población holandesa = $2,1 \cdot 10^{-6}$) en el estudio genético de diagnóstico, junto con el genotipo HLA (Monsuur et al. 2005; Van Belzen et al. 2003).

2. Análisis del gen *FOXP3*

Dada la asociación descrita entre el marcador microsatélite (GT)_n localizado en la región promotora del gen *FOXP3* con enfermedades de carácter autoinmune en población asiática (Bassuny et al. 2003), procedimos a analizarlo en nuestra población. Éste marcador tiene seis alelos que contienen desde 14 hasta 19 repeticiones.

2.1 Estudio Caso-Control:

Teniendo en cuenta que cada alelo corresponde a las distintas repeticiones (GT), estudiamos la distribución de las frecuencias alélicas, comprobando que no había diferencias en la distribución (tabla IV.14).

Polimorfismo	Pacientes	controles	p-valor
(GT) ₁₄	0	1(0,67%)	n.s.
(GT) ₁₅	128 (51,2%)	81 (54,73%)	n.s.
(GT) ₁₆	110 (44%)	61 (41,2%)	n.s.
(GT) ₁₇	11 (4,4%)	2 (1,35%)	n.s.
(GT) ₁₈	0	0	
(GT) ₁₉	0	0	

Tabla IV.14. Cálculo de frecuencias alélicas y estudio caso-control del marcador microsatélite (GT) de n repeticiones estudiado en *FOXP3*.

2.2 Estudio familiar

Considerando aquellos alelos con mayor frecuencia de transmisión, realizamos el análisis TDT, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla IV.15. Como se puede apreciar, no se obtuvieron valores de transmisión estadísticamente significativos y consecuentemente, descartamos la asociación entre este marcador y la enfermedad celíaca en nuestra población.

Alelo	Familias informativas	Z' (p-valor)
(GT) ₁₅	42	1,237 (n,s)
(GT) ₁₆	37	1,115 (n,s)
(GT) ₁₇	12	0,756 (n,s)

Tabla IV.15. Resultados del análisis TDT en familias informativas para el marcador microsatélite de *FOXP3*.

3. Análisis del gen *GILT*

Se realizó el estudio del gen *GILT* por su implicación en el procesamiento de antígenos. Para ello, se seleccionaron dos SNP diana principales, rs273266 y rs11554159 (www.hapmap.org) localizados a 1,1 Mb del gen *MYO9B*.

3.1 Estudio caso-control

El análisis de la distribución alélica y genotípica en ambos marcadores SNP en nuestra serie clínica dieron los resultados reflejados en las tablas IV 16 y IV.17.

Marcador	alelo	Pacientes (%)	Control (%)	χ^2 (p-valor)	OR (95% IC)
rs273266	T	222(73,02)	366 (75,0)	0,23 (0,62)	1,1 (0,79-1,53)
	C	82 (26,97)	122 (25,0)		0,91(0,66-1,26)
rs11554159	G	291 (65,24)	443 (71,2)	4,04 (0,04)	0,76(0,59-0,99)
	A	155 (34,75)	179 (28,8)		1,32 (1,02-1,71)

Tabla IV.16. Distribución de las frecuencias alélicas en ambos marcadores.

Marcador	Genotipo	Pacientes (%)	Controles (%)	χ^2 (p-valor)
rs273266	TT	83 (54,6)	135 (55,32)	1,64 (0,43)
	TC	56 (36,84)	96 (39,34)	
	CC	13(8,55)	13 (5,32)	
rs11554159	GG	93 (37,38)	163 (52,41)	6,1 (0,04)
	GA	105 (54,20)	117 (37,62)	
	AA	25 (8,41)	31 (9,96)	

Tabla IV.17. Distribución de las frecuencias genotípicas en ambos marcadores.

IV. Resultados

Los resultados del estudio caso-control nos indican que no existe ningún indicio de asociación entre el marcador rs273266 y la enfermedad. Sin embargo, en el caso del polimorfismo rs11554159, sí observamos asociación (p-valor inferior a 0,05).

Cabe destacar que ambos marcadores se localizan a una distancia de aproximadamente 2,5 Kb y se encuentran en desequilibrio de ligamiento, sin embargo existe disparidad en los resultados obtenidos en el estudio de asociación posiblemente debido a diferencias en las frecuencias de los alelos y la heterocigosidad de cada marcador.

3.2 Estudio familiar

El estudio familiar se llevó a cabo mediante el análisis S-TDT considerándose el genotipo HLA de los pacientes. En ambos marcadores no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (p-valor>0,05).

	Total familias	Portadores DQ2.5	Portadores DQ2.2/DQ7
Marcador	n Z' (p-valor)	n Z' (p-valor)	n Z' (p-valor)
rs273266	50 1.33 (n.s.)	18 0.00 (n.s.)	-
rs11554159	116 0,549 (n.s.)	77 0,196 (n.s.)	20 0.00 (n.s.)

Tabla IV.18. Análisis S-TDT de los marcadores estudiados en GILT.

Sin embargo, el resultado positivo obtenido en el estudio caso-control nos llevó a plantearnos la naturaleza de la asociación o si, por el contrario ésta se debía a errores en el planteamiento del estudio o el tamaño de la serie.

4. Análisis funcional del gen *GILT*

Dada la función de la proteína *GILT* quisimos establecer, mediante el análisis molecular y funcional, el efecto del polimorfismo rs11554159 (c.227G>A; p.R76Q), por ello se procedió a su caracterización con el fin comprobar la verdadera relación entre el éste y la enfermedad celíaca.

4.1 Estudios celulares en la línea eucariota cos-7

GILT se analizó en el modelo celular eucariota cos-7 para el análisis de la expresión y localización celular de la proteína con las dos variaciones, p.76R y p.76Q.

4.1.1 Obtención del cDNA de *GILT*

Para obtener el cDNA del gen *GILT* diseñamos cebadores específicos que abarcaran su secuencia desde el codón de inicio de la transcripción hasta el codón de parada y empleamos como molde el cDNA de distintas líneas celulares humanas tal como se ha descrito en el punto 2.9.1 del apartado de metodología (figura IV.3)

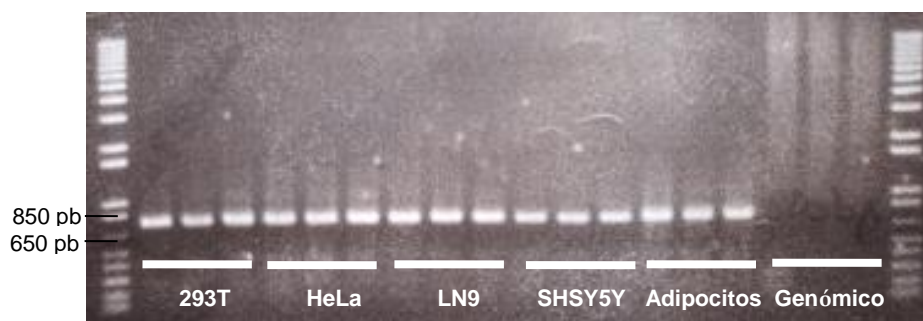


Figura IV.3. Amplificación del cDNA de *GILT* por PCR a partir del cDNA de distintas líneas celulares humanas.

Tras obtener un resultado positivo en todas las líneas celulares, procedimos a la secuenciación del fragmento amplificado en todas ellas para comprobar que se trataba del cDNA de *GILT* y siendo así, analizar en dicha secuencia el polimorfismo c.227G>A. De esta forma, comprobamos que el alelo c.227G (p.76R) se encontraba

en homocigosis de la línea 293T, mientras que el alelo c.227A (p.76Q) se encontraba en homocigosis en el cDNA de la línea de adipocitos humanos, por lo que no fue necesario realizar una mutagénesis dirigida. Esto supuso una ventaja, dado que, tratándose de un SNP diana, al haber obtenido los dos alelos directamente de la línea celular, les acompañarán el resto de polimorfismos que se transmitan juntos en el mismo haplotipo.

Se subclonó cada variante de *GILT* en el vector pGEM-T y posteriormente se subclonaron en el vector pCDNA3 para realizar los estudios de expresión en células de mamífero. Este vector se caracteriza por no poseer etiqueta alguna que pudiera representar un artefacto a la hora de realizar los experimentos.

Para la transfección de células cos-7, preparamos distintos cultivos de células *E. coli* DH5 α transformadas con pCDNA3::GILTc.227G o pCDNA3::GILTc.227A para, posteriormente, amplificar el plásmido por midiprep y obtener una concentración de cDNA lo suficientemente elevada para la transfección.

4.1.2 Expresión de GILT en cultivo celular

Tras la extracción proteica del cultivo de células cos-7 y el análisis por western blot, se comprobó que la expresión de GILT comienza a las 48 horas de la transfección. Como controles de la transfección empleamos el vector pCDNA3 sin el inserto y testamos células no transfectadas para la detección de artefactos o niveles endógenos de GILT, observando pequeñas trazas de proteína endógena (figura IV.4). GILT se sintetiza como una proteína precursora o proforma, pudiendo presentar distintos puntos de glicosilación en el extremo N-terminal (Arunachalam et al. 2000). Las bandas que observamos en el western blot corresponden a la proforma de GILT en distintas formas de glicosilación (figuras IV.4 y IV.5).

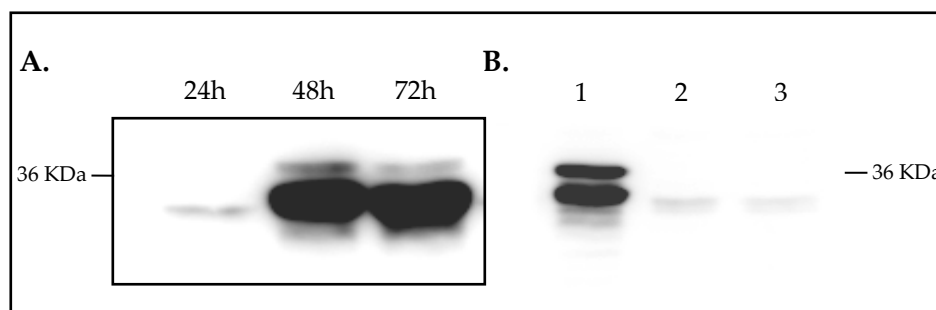


Figura IV.4 Detección de GILT por Western blot A. Niveles de expresión de la proforma de GILT a las 24h, 48h y 72h. B. Controles de transfección: 1. Transfección de células cos-7 de GILT:c.227G (WT, *wild type*) clonado en el vector pCDNA3. 2. Transfección del vector pCDNA3 vacío. 3. Células no transfectadas.

La proforma de GILT es soluble y puede ser secretada al medio extracelular por las células cos-7 transfectadas, donde aparece con una forma de glicosilación predominante. Estas formas glicosiladas aparecen tanto en la proforma secretada como en la del interior celular aunque, según la localización, predominará una forma u otra. Observamos que el polimorfismo c.227G>A (GILT:p.R76Q), no altera la capacidad de glicosilación de la proteína tal como apreciamos en la figura IV.5.

Así, hemos comprobado que las dos variantes de GILT (p.76R y p.76Q) se comportan de manera similar, no viéndose alterada su transcripción y posterior expresión. Ambas presentan el mismo tamaño y patrón de glicosilación. Los niveles de expresión de cada polimorfismo pueden variar en función del éxito de la transfección (figura IV.5).

IV. Resultados

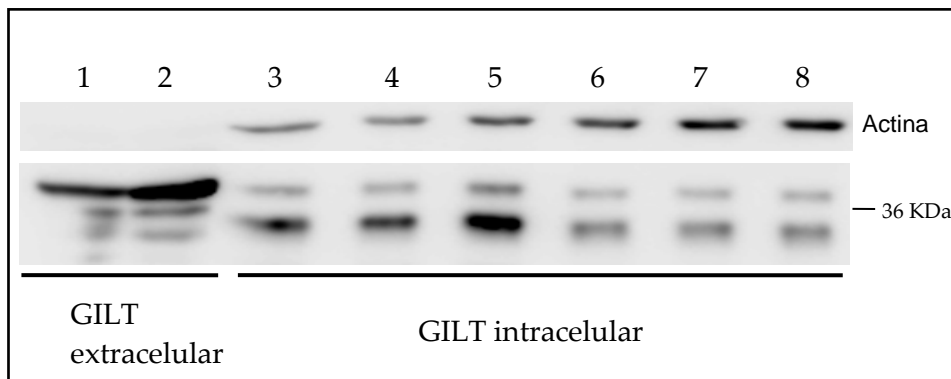


Figura IV.5. Muestras: 1. Medio extracelular de células transfectadas con GIL_{Tc}.227G, 2. Medio extracelular de células transfectadas con GIL_{Tc}.227A. Muestras 3-5: GIL_{Tc}.227G (**p.76R**) procedente del extracto soluble de proteínas intracelulares. Muestras 6-8: GIL_{Tc}.227A (**p.76Q**) procedente del extracto soluble de proteínas intracelulares.

4.1.3 Estudios de localización celular

Por su implicación en el procesamiento de antígenos, GILT ha sido descrita como una proteína localizada en compartimentos vesiculares específicos denominados MIICs donde se localizan las moléculas HLA de clase II.

Con el fin de comprobar el efecto de la mutación p.R76Q en la localización subcelular de GILT, llevamos a cabo experimentos de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo policlonal anti-GILT (T-18) que, por la localización de la secuencia peptídica que reconoce, nos permite detectar tanto la proforma, como la forma madura de la proteína. GILT presenta un patrón perinuclear y vesicular (figura IV.6).

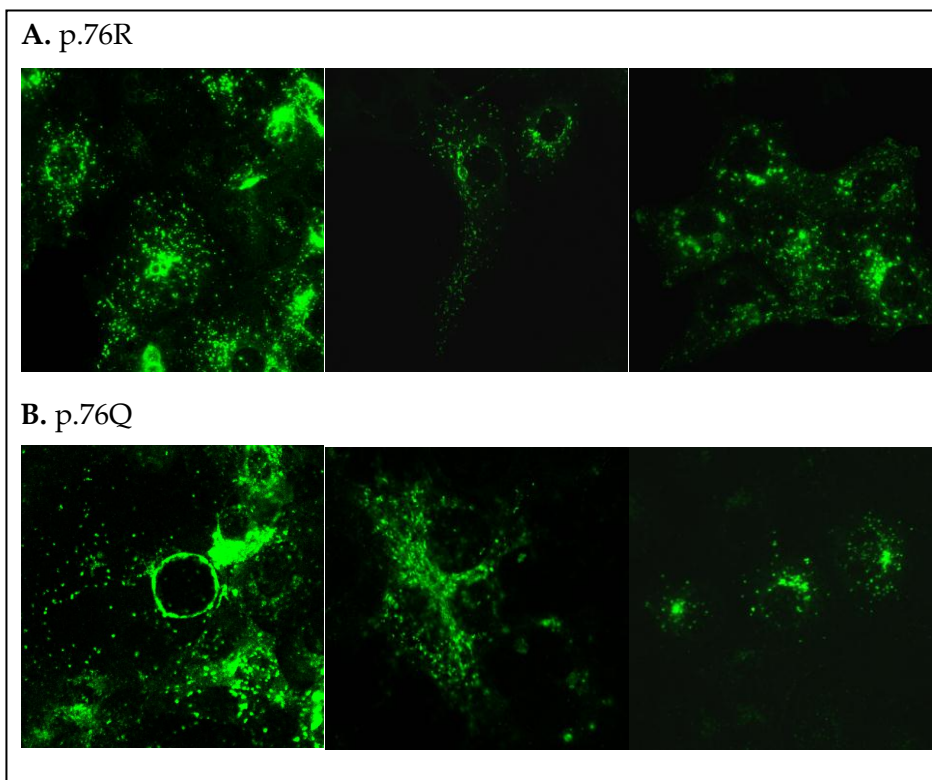


Figura IV.6 Localización celular GILT en células cos-7 por inmunofluorescencia indirecta **A.** Localización de la variante p.76R. **B.** Localización de la variante p.76Q.

IV. Resultados

Tras observar que el polimorfismo no provoca una alteración drástica en el patrón de localización celular de GILT, realizamos experimentos de colocalización mediante inmunofluorescencia indirecta empleando marcadores específicos de orgánulo y microscopía confocal.

GILT se localiza en el retículo endoplásmico (RE)

Se emplearon los anticuerpos anti-GILT y anti-GRP94 para la detección del RE (*Glucose-regulated protein 94*). Las imágenes muestran un solapamiento parcial, indicando la presencia de ambas variantes en este orgánulo (figura IV.7).

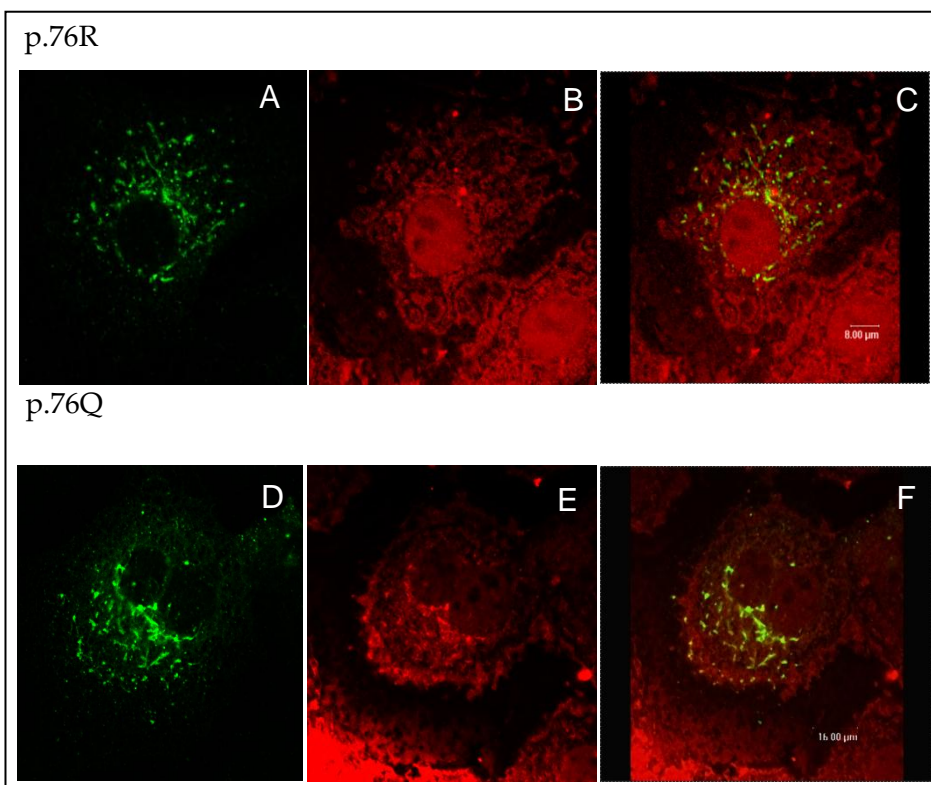


Figura IV.7 Experimentos de colocalización de GILT y retículo endoplásmico en células cos-7 mediante inmunofluorescencia indirecta. GILT fue detectado con el anticuerpo anti GILT T-18 (verde) (A, D) y las estructuras del retículo endoplásmico se detectaron con el anticuerpo anti-GRP94 (rojo) (B,E). La colocalización, con ambas variantes de GILT se muestra en las figuras C y F (amarillo).

GILT se localiza en endosomas tempranos

Para el marcaje de los endosomas tempranos empleamos el anticuerpo anti-EEA1 (*Early Endosome Associated protein*). Al igual que sucedía en el RE, observamos un solapamiento parcial, indicando que las dos variantes de la proteína pueden localizarse en este orgánulo (figura IV.8).

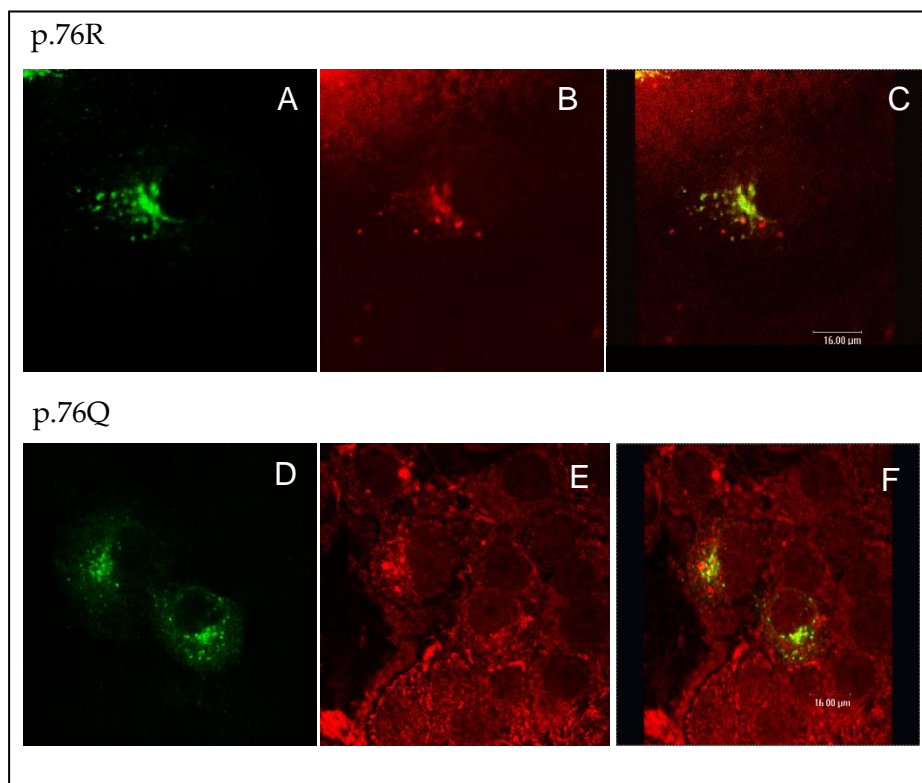


Figura IV.8 Experimentos de colocalización de GILT y endosomas tempranos en células cos-7 mediante inmunofluorescencia indirecta. GILT fue detectado con el anticuerpo anti GILT T-18 (verde) (A,D) y las estructuras de los endosomas tempranos se detectaron con el anticuerpo anti-EEA1 (rojo) (B,E). La colocalización, con ambas variantes de GILT se muestra en las figuras C y F (amarillo)

GILT se localiza en endosomas tardíos

Analizamos la presencia de GILT en endosomas tardíos empleando el anticuerpo anti-M6PR (*Mannose 6-Phosphate Receptor*). Los puntos potenciales de glicosilación que posee GILT en el extremo N-terminal guiarán a la proteína a través de la ruta endocítica mediante el receptor de manosa-6 fosfato. Los resultados muestran una colocación total, dada la diana del anticuerpo anti-M6PR y la naturaleza de GILT, cuyos glicanos contienen moléculas de manosa-6-fosfato que interactúan con el M6PR (Arunachalam et al. 2000) (figura IV.9). Observamos que las dos variantes se localizan en las mismas estructuras.

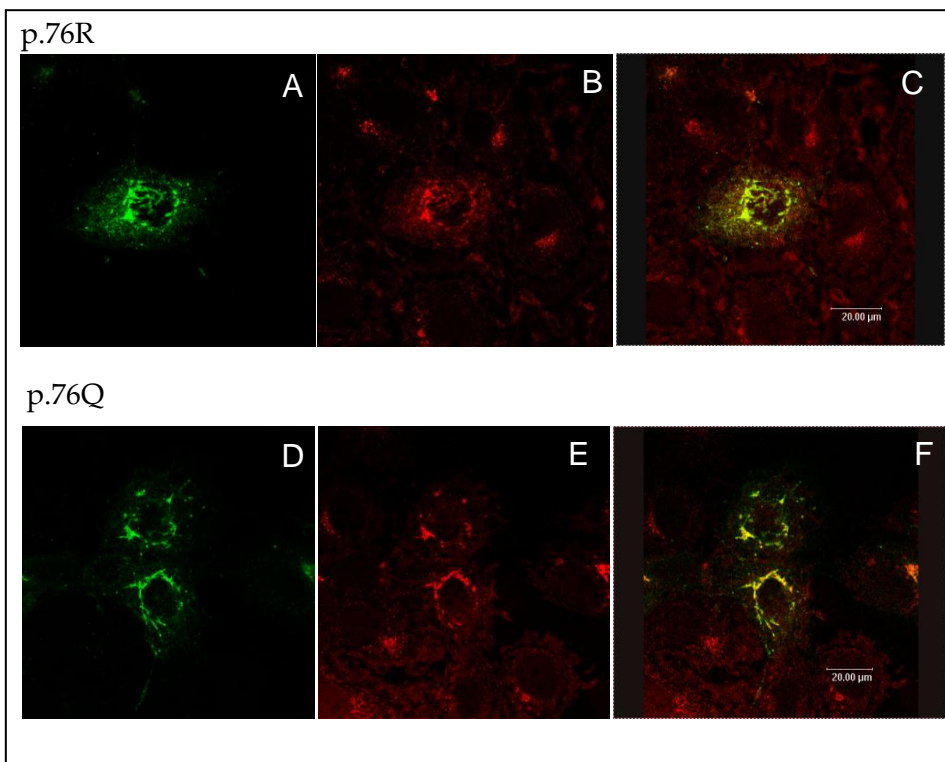


Figura IV.9 Colocalización de GILT en endosomas tardíos de células cos-7. Detección de GILT anti GILT T-18 (verde) (A,D) y estructuras de los endosomas tardíos con anti-M6PR (rojo) (B,E). La colocación, con ambas variantes de GILT se muestra en las figuras C y F (amarillo).

Los estudios de inmunofluorescencia indirecta confirman que GILT se localiza en orgánulos de la ruta endocítica, principalmente en aquellas estructuras que poseen receptores de la molécula manosa-6-fosfato, responsables de albergar enzimas lisosomales que van a ser transportadas desde el aparato de Golgi hacia compartimentos prelisosomales de bajo pH. Además, GILT se localiza en estructuras lisosomales que no aparecen marcadas por los anticuerpos empleados para el marcaje de orgánulos, lo que se correspondería con la fracción de GILT que es secretada directamente al medio extracelular sin pasar por la ruta endocítica.

Tanto en los orgánulos vinculados con el proceso de secreción extracelular como en la localización subcelular, las variantes de GILT muestran un patrón similar no apreciándose alteraciones importantes. Dado que estos experimentos no nos permitirían la detección de pequeñas diferencias en el espacio-tiempo, se procedió a la cotransfección de p.76Q y p.76R clonadas en los vectores pECFP-N1 y pEYFP-N1 respectivamente, caracterizados por ser portadores de dominios de proteínas fluorescentes (cian y amarillo) (figura IV.10).

Los resultados de la cotransfección muestran como ambas variantes se procesan y distribuyen simultáneamente en las estructuras subcelulares, señalando, una vez más, que el polimorfismo caracterizado p.R76Q no afecta directamente a la localización de GILT, lo que supondría que la posible asociación genética entre p.R76Q y la enfermedad celíaca no se debe a diferencias estructurales que pudieran estar influyendo en el procesamiento de antígenos, sino a otras causas ajenas a ésta.

IV. Resultados

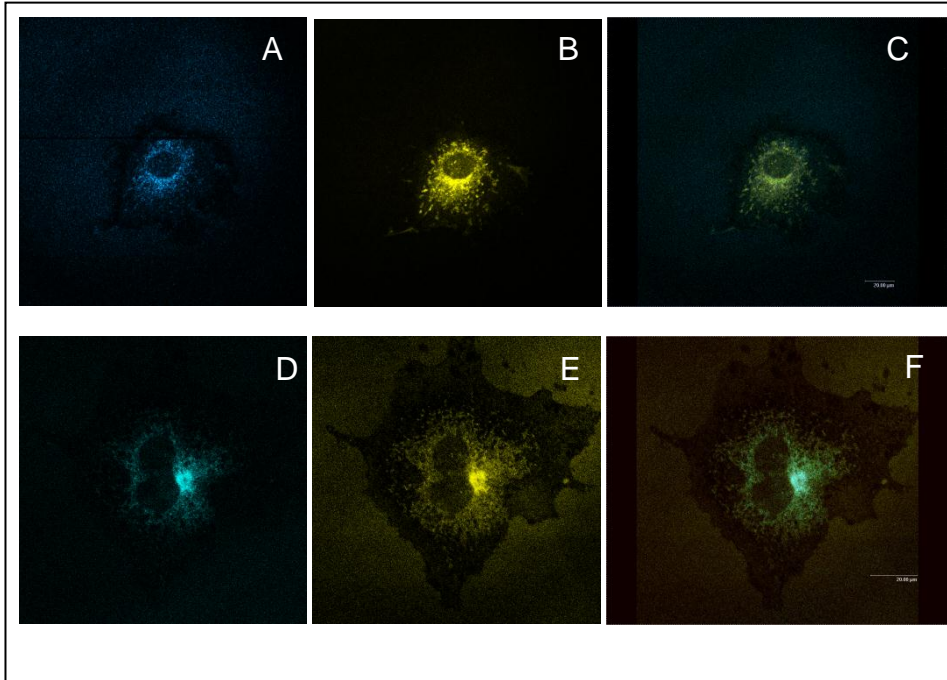


Figura IV.10 Experimentos de cotransfección de las variantes p.76Q clonada en el vector pECFP-N1 (azul; A y E) y p.76R clonada en el vector pEYFP-N1 (amarillo; B y F). Las figuras C y F muestran la colocalización de ambas.

4.2 Ensayos de actividad *in vitro*.

Una vez confirmado que no existen alteraciones a nivel subcelular que pudieran ser consecuencia de la asociación genética descrita, se procedió al análisis de la actividad de las dos variantes de GILT con el fin de detectar *in vitro* diferencias funcionales entre ellas.

Dada la secuencia de aminoácidos que conforma el centro activo de GILT, se postuló que podría pertenecer a la familia de las tiorredoxinas (Phan et al. 2000). Las tiorredoxinas tienen la capacidad intrínseca de catalizar la reacción de reducción de insulina por DTT (Holmgren 1979). Se procedió al ensayo de actividad tiorredoxina de las dos variantes de GILT con el fin de determinar, por un lado, si realmente se comportaba como una tiorredoxina convencional y por otro, si existían diferencias funcionales entre p.76R y p.76Q.

Para ello, se subclonó el cDNA correspondiente a la secuencia de la forma madura de la proteína, esto es, sin la secuencia del péptido señal ni los propéptidos en N- y C-terminal, en vectores de expresión específicos de procariotas: pNIC28-Bsa4 en el caso de la variante GILT:p76R y pLIC-SGC1 para el polimorfismo GILT:p76Q. El motivo de utilizar vectores diferentes fue que tuvieran resistencias a antibióticos distintas que nos permitieran la identificación de cada variante clonada durante todo el proceso. Ambos vectores poseen características similares como son: el péptido de fusión de poli-histidinas, un sitio de clonación LIC (*Ligation Independent Cloning*) y un inserto con el gen *sacB* para selección negativa de colonias.

4.2.1 Purificación de GILT

A partir de 250 ml de cultivo de la cepa Rosetta de E.Coli transformada por separado con cada variante, obtuvimos la expresión de una cantidad suficiente de GILT para poder llevar a cabo los ensayos de actividad tiorredoxina (figura IV.11).

Tras una primera purificación por columna de afinidad-HiTrap y una segunda purificación por cromatografía de exclusión molecular obtuvimos, en cada muestra, una banda mayoritaria cuyo

IV. Resultados

tamaño (~25 KDa) se correspondía con el de la forma madura de la proteína. Tras relativizar la banda principal frente al total de la muestra concluimos que las dos variantes de GILT se habían obtenido con una pureza en torno al 60%. Las muestras se analizaron mediante western blot con el anticuerpo anti-GILT para comprobar que se trataba de la proteína GILT humana, reconocida por este anticuerpo y no de una proteína endógena de *E. Coli*.

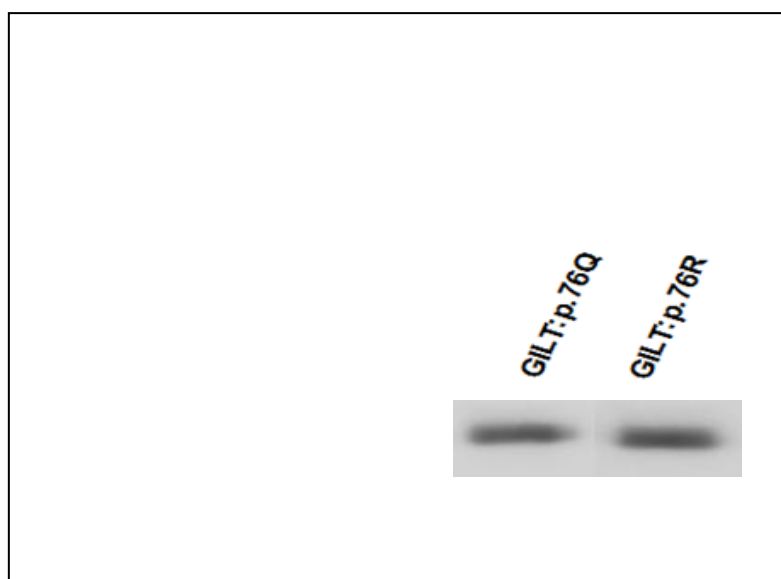


Figura IV.11. Tinción de Coomassie (izquierda) y Western blot (derecha) tras la purificación de GILT.

4.2.2 Medida de actividad por reducción de insulina

Realizamos el ensayo de reducción de insulina por DTT (Ditiotreitol) comprobando que la proteína purificada era activa. En primer lugar, realizamos ensayos de cinética de la reacción a distintas concentraciones de la variante p.76R, considerada como la forma silvestre de la proteína (figura IV.12) y posteriormente, realizamos experimentos de curvas de actividad para p.76R y p.76Q a una concentración dada, como por ejemplo a 2,5 μM tal y como se muestra en la figura IV.13.

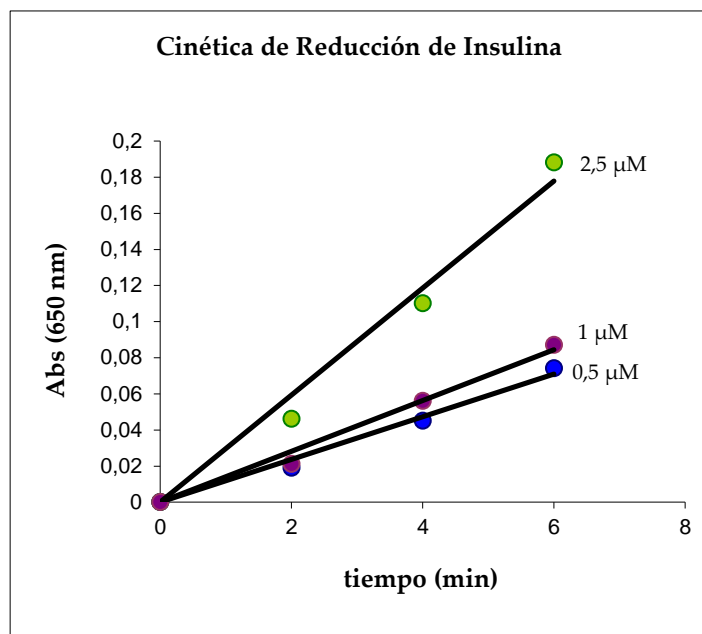


Figura IV.12 Tres cinéticas de reducción de Insulina por DTT catalizada por GILT:p.76R a distintas concentraciones (0,5 μM , 1 μM y 2,5 μM). El ensayo se llevó a cabo a pH 7 y a una temperatura constante de 37°C.

El incremento de la absorbancia debido a los agregados formados por la reducción de la insulina, dio lugar a curvas de actividad similares para p.76R y p.76Q. La actividad se observa tanto por la pendiente de la curva como por el tiempo en el que empieza el incremento de la absorbancia. El blanco se realizó con insulina y DTT, comprobándose que en el minuto 30 aún no había comenzado la reacción (figura IV.13).

IV. Resultados

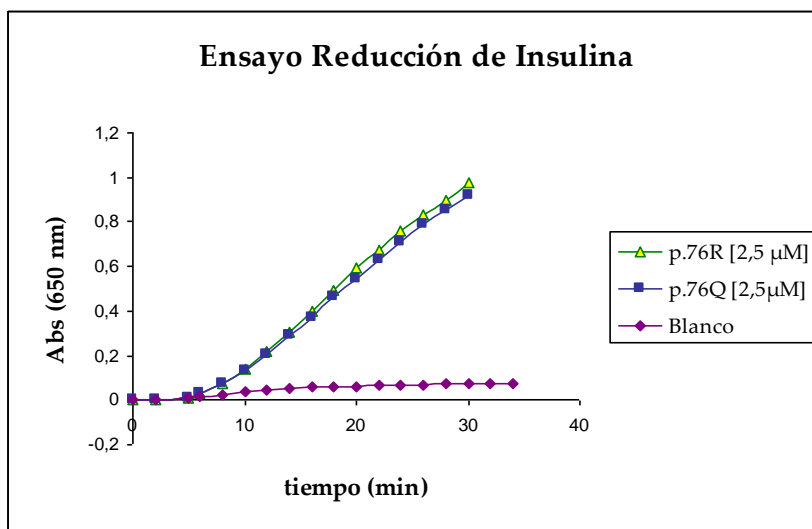


Figura IV.13. Medida del incremento de la absorbancia por reducción de insulina.

Como medida de la actividad, se trazaron las rectas de regresión a partir de las pendientes obtenidas en ensayos realizados a distintas concentraciones. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de dichas rectas (Figura IV.14).

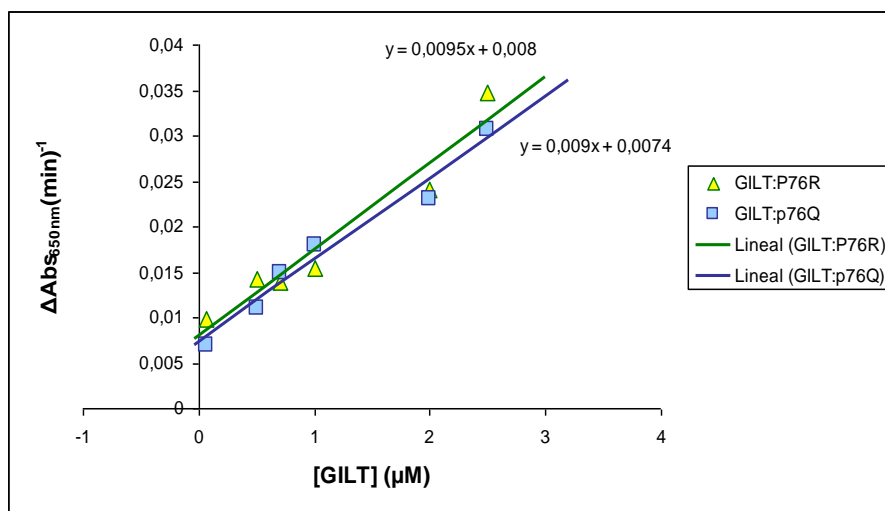


Figura IV.14. Medida de la actividad de ambas variantes de GILT.

4.3 Análisis de GILT en biopsias humanas

Con el fin de detectar posibles cambios en los niveles de expresión de GILT, se procedió al análisis de muestras de biopsias humanas. Se dispuso de 7 biopsias pertenecientes a individuos sanos a los que se les había realizado la prueba de la ureasa para la detección de *Helicobacter pylori* y 18 biopsias de pacientes celíacos. En todos los casos, se había realizado el análisis histológico de la muestra.

Las biopsias se dividieron en dos fragmentos, uno para análisis de DNA y otro para extracción de proteínas y análisis de expresión. Se realizó el estudio genético del conjunto de biopsias analizándose el polimorfismo GILT:c.227G>A y el genotipo HLA para su clasificación en grupos de riesgo genético.

4.3.1 Estudio genético

Para la caracterización del genotipo HLA, se procedió al análisis de los genes *DQA1* y *DQB1*. En estos últimos años se han llevado a cabo estudios en poblaciones de origen europeo que señalan la importancia de la combinación de los haplotipos HLA por su efecto sinérgico en el riesgo de padecer la enfermedad celíaca (Bourgey et al. 2007; Margaritte-Jeannin et al. 2004). Estos estudios se han replicado en nuestra población obteniéndose resultados muy similares (Donat et al. 2009). En base a estos trabajos, hemos clasificado las biopsias en tres grupos de riesgo genético principales reflejados en la figura IV.15.

- Grupo 1: Individuos homocigotos para el haplotipo DQ2.5, heterocigotos DQ2.5/DQ2.2 y heterocigotos DQ2.2/DQ7. Probabilidad superior a un 20% de desarrollar la enfermedad.
- Grupo 2: Individuos portadores del haplotipo DQ2.5 junto con cualquier otro haplotipo, individuos homocigotos para el haplotipo DQ8, individuos heterocigotos DQ2.2/DQ8 e individuos homocigotos DQ2.2. Probabilidad superior a un 8% de desarrollar la enfermedad.
- Grupo 3: El resto de genotipos. Probabilidad inferior a un 1% de desarrollar la enfermedad.

IV. Resultados

	DQ2.5	DQ2.2	DQ7	DQ8	DQ5	DQ6	DQ6
DQA1*	05:01	02:01	05:05	03:01	01:01	01:03	01:02
DQB1*	02:01	02:02	03:01	03:02	05:01	06:03	06:02

Grupo 1: DQ2.5/DQ2.5, DQ2.5/DQ2.2, DQ2.2/DQ7

Grupo 2: DQ2.5/X, DQ2.2/DQ2.2, DQ8/DQ8, DQ2.2/DQ8

Grupo 3: el resto de combinaciones

Figura IV.15 Haplotipos HLA clase II compuestos por variantes alélicas de los genes *DQA1* y *DQB1* que representan el conjunto de haplotipos de mayor frecuencia en nuestra población, en la parte superior aparece la nomenclatura DQ con la que se denomina a cada haplotipo. En la parte inferior, clasificación en grupos de riesgo genético en función del genotipo HLA.

Los resultados del estudio genético de las biopsias de individuos control así como de los pacientes se reflejan en las tablas IV.18 y IV.19 respectivamente:

Biopsia	Genotipo HLA	Grupo de riesgo HLA	GILT:c.227G>A
1	DQ6/DQ8	3	AG
2	DQ6/DQ6	3	AG
3	DQ6/DQ7	3	GG
4	DQ2.5/DQ2.5	1	GG
5	DQ6/DQ8	3	GG
6	DQ6/DQ7	3	AG
7	DQ2.5/DQ6	2	GG

Tabla IV.18. Estudio genético a partir de biopsias de individuos sanos. Caracterización del genotipo HLA, clasificación en grupos de riesgo genético y genotipo del polimorfismo de GILT:c.227G>A

La histología de los 7 individuos pertenecientes al grupo control resultó ser normal en todos los casos, independientemente del genotipo HLA. En el caso del grupo de 18 pacientes, todas las biopsias excepto tres, presentaban una histología muy comprometida. En función de la lesión, se catalogaron según la clasificación de Marsh descrita en el apartado de introducción de esta memoria. Las tres biopsias que presentaban una histología normal pertenecían a pacientes diagnosticados como celíacos debido a los elevados niveles que habían alcanzado los anticuerpos antigliadina y antitransglutaminasa.

IV. Resultados

Biopsia	Histología	Genotipo HLA	Grupo de riesgo HLA	GILT:c.227G>A
1	Marsh 3b	DQ2.5/DQ6	2	AA
2	Marsh 3c	DQ2.5/DQ2.5	1	GG
3	Marsh 3c	DQ2.5/DQ7	2	AA
4	Marsh 2	DQ2.2/DQ8	2	GG
5	Marsh 3c	DQ2.5/DQ5	2	AG
6	Marsh 3c	DQ2.5/DQ5	2	GG
7	Marsh 3b	DQ2.5/DQ7	2	GG
8	Normal	DQ2.5/DQ2.5	1	GG
9	Marsh 3c	DQ2.5/DQ6	2	AG
10	Marsh 3b	DQ2.5/DQ5	2	AG
11	Marsh 3c	DQ2.5/DQ2.5	1	AG
12	Marsh 3b	DQ2.5/DQ2.5	1	AG
13	Marsh 3b	DQ2.5/DQ2.5	1	GG
20	Normal	DQ2.5/DQ2.5	1	GG
21	Marsh 3a	DQ2.5/DQ2.5	1	AG
22	Marsh 3c	DQ2.2/DQ7	1	GG
23	Marsh 3b	DQ2.5/DQ7	2	AG
24	Normal	DQ2.2/DQ6	2	GG

Tabla IV.19. Estudio genético de biopsias de pacientes. Genotipo HLA, clasificación en grupos de riesgo genético y genotipo del polimorfismo GILT:c.227G>A.

Los resultados del análisis genético del polimorfismo GILT:c.227G>A se reflejan en la tabla IV.20:

c.227G>A	Pacientes (%) n=18	Controles (%) n=7	X² (p-valor)
GG	50%	57,14%	0,95 (0,33)
GA	38,39%	42,85%	
AA	11,11%	0%	

Tabla IV.20. Estudio de la distribución genotípica del polimorfismo GILT:c.227G>A. Dado que el genotipo AA no aparece en el grupo de individuos control, el análisis X² se realizó agrupando los valores del genotipo AG y AA.

El análisis de la distribución genotípica no muestra diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles. En éste último no encontramos ningún individuo homocigoto para el alelo AA, por lo que tuvimos que agrupar los valores de los genotipos AG y AA.

4.3.2 Niveles de expresión de GILT en biopsias humanas

Los niveles de expresión de GILT se midieron mediante western blot con el anticuerpo anti-GILT. De todas las biopsias del grupo control, sólo pudimos utilizar la perteneciente al individuo 4 para los análisis de expresión. Todas las biopsias control mostraban la banda perteneciente a GILT, pero sólo la correspondiente al individuo 4 tenía la banda de actina utilizada como proteína control de carga. Cada muestra se testó por triplicado en western blot distintos empleándose, para la normalización y relativización de los niveles de expresión, el control 4 o el paciente 1 como muestra de referencia según el tipo de análisis. En la figura IV.16 aparece el ejemplo de uno de los análisis.

IV. Resultados

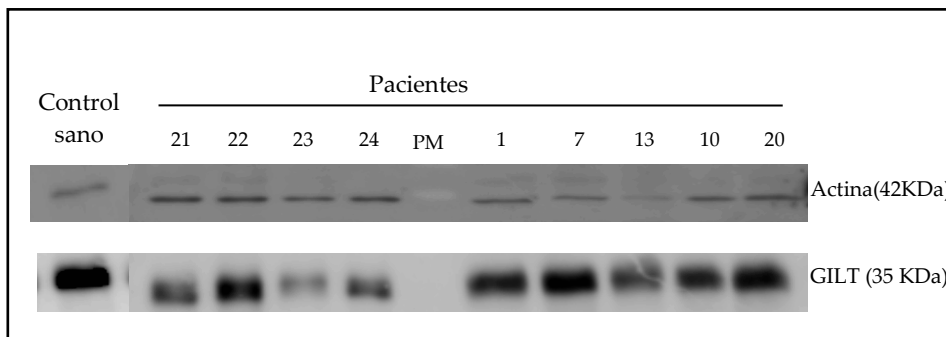


Figura IV.16. Ejemplo de análisis por Western Blot de los niveles de expresión de GILT en biopsias humanas. PM: patrón de pesos moleculares.

El análisis de expresión de GILT en las biopsias se llevó a cabo teniendo en cuenta diferentes parámetros para comprobar si el nivel de expresión estaba afectado por las distintas condiciones:

A. Niveles de expresión de GILT pacientes *vs* control 4:

A pesar del tamaño muestral del grupo control, se compararon los niveles de expresión entre el grupo de pacientes y el control 4, no apreciándose diferencias significativas (p -valor > 0,05) (figura IV.17):

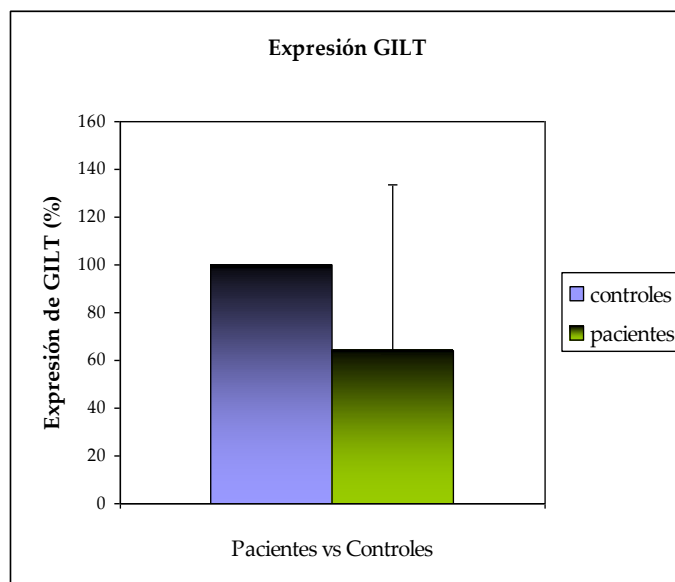


Figura IV.17
Gráfico correspondiente al estudio de los niveles de expresión de GILT en pacientes y el control 4.

B. Niveles de expresión de GILT en función de la histología:

Las biopsias se agruparon teniendo en cuenta la clasificación histológica de Marsh. Algunos pacientes aún presentando una biopsia normal, estaban diagnosticados como enfermos celíacos, dado el elevado nivel de anticuerpos anti-gliadina y anti-tTG presentes en sangre. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (p-valor > 0,05) (figura IV.18).

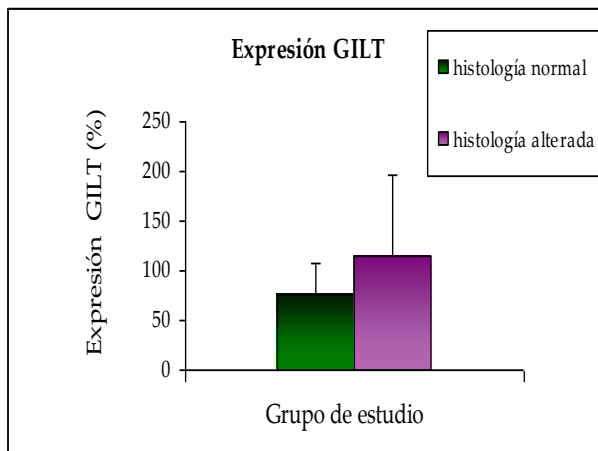


Figura IV.18 Gráfico correspondiente al estudio de los niveles de expresión de GILT en función de la histología de la biopsia.

C. Niveles de expresión de GILT en función del genotipo c.227G>A:

Las biopsias de los pacientes se agruparon en función del genotipo del polimorfismo c.227G>A, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos (p-valor > 0,05) (figura IV.19).

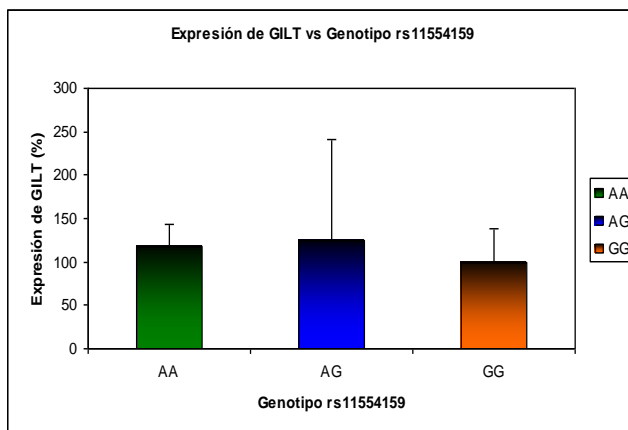


Figura IV.19 Gráfico correspondiente al estudio de los niveles de expresión de GILT en función del genotipo c.227G>A de los pacientes.

D. Niveles de expresión de GILT en función del genotipo HLA:

Se compararon los niveles de expresión de GILT en las biopsias teniendo en cuenta el grupo de riesgo genético en el que se encontraban los pacientes. Entre éstos, ninguno se encontraba en el grupo de menor riesgo, de ahí que en el gráfico se vean representados únicamente dos grupos. Los resultados del análisis estadístico revelaron diferencias significativas en la expresión de GILT (**p-valor = 0,021**), viéndose disminuida en aquellos individuos portadores del genotipo HLA altamente asociado a la EC (figura IV.19).

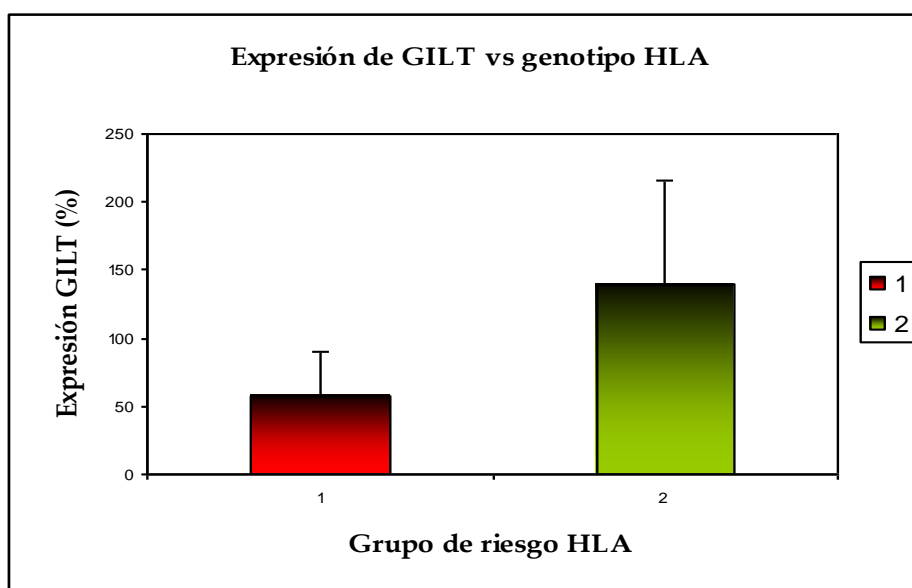


Figura IV.19 Representación gráfica de la expresión de GILT en función del genotipo HLA de los pacientes.

Estos datos sugieren una relación entre GILT y el sistema HLA. En este análisis, los niveles de expresión de GILT se encuentran disminuidos en individuos portadores del haplotipo DQA1*05:01-DQB1*02:01 (DQ2.5), estos alelos se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el alelo DRB1*03 y forman en conjunto, parte del haplotipo extendido AH 8.1, altamente conservado en los pacientes celíacos.

V. DISCUSIÓN

1. Análisis Genético Comparativo de la Enfermedad Celíaca

El determinante genético de la enfermedad celíaca se puso de manifiesto hacia los años 60 con la descripción del carácter familiar de la enfermedad (Carter et al. 1959; David and Ajdukiewicz 1975; Macdonald et al. 1965) y el descubrimiento de su asociación a los genes del sistema HLA (Falchuk et al. 1972; Keuning et al. 1976). La identificación de los alelos HLA-DQ y en concreto la combinación DQA1*05-DQB1*02 fue fundamental para entender la susceptibilidad genética y la comprensión, a nivel inmunológico, de la implicación de este heterodímero en el desarrollo de la patología (Sollid et al. 1989). El modelo complejo de herencia que presenta la enfermedad celíaca es indicativo de la interacción de más de un gen de susceptibilidad. Hoy en día, gracias a los estudios familiares llevados a cabo en hermanos monozigóticos, sabemos que los genes del sistema HLA aportan el 40% de la carga genética o heredabilidad pero hay otros genes no HLA que constituyen el determinante genético global de la enfermedad (Bevan et al. 1999; Houlston and Ford 1996; Petronzelli et al. 1997; Sollid and Thorsby 1993).

La enfermedad celíaca tiene un componente genético mayor que el de muchas enfermedades complejas conocidas, siendo múltiples las variantes genéticas que ejercen efectos de pequeña magnitud (Hunt and van Heel 2009). Desde que se describiera la importancia de la aportación genética de los genes no HLA, se ha realizado estudios de ligamiento y asociación a lo largo del genoma en distintas poblaciones de origen caucásico que nos han llevado a la identificación de regiones cromosómicas que pudieran albergar genes de susceptibilidad no ligados al sistema HLA. A éstas se les ha denominado regiones CELIAC (Djilali-Saiah et al. 1998; Greco et al. 2001; Houlston et al. 1997; Monsuur et al. 2005; Van Belzen et al. 2003; Zhong et al. 1996, Greco, 1998 #130).

En el presente trabajo se ha abordado el estudio genético de la enfermedad celíaca con el fin de conocer la implicación de genes no HLA de susceptibilidad en relación con el fondo genético de la población de la Comunidad Valenciana. Nuestro estudio se ha

basado en el análisis de genes candidatos, bien por su localización en las principales regiones CELIAC descritas, o bien por su relación funcional con la etiopatogenia de la enfermedad.

1.1 Poder estadístico del estudio

Cuando se lleva a cabo el estudio genético de una enfermedad compleja, bien sea por análisis de ligamiento o de asociación, hay que tener en cuenta que las variantes o polimorfismos estudiados pueden encontrarse bajo un umbral de detección y por lo tanto, el diseño del estudio va a ser la clave para la fiabilidad del mismo.

El poder de un estudio de asociación depende de un conjunto de variables como son: el tamaño muestral, el número de SNPs analizados, el OR (*Odds Ratio*) atribuido a cada SNP asociado, el modelo de herencia (dominante, recesivo...) o las frecuencias alélicas de un determinado marcador. El tamaño muestral requerido para detectar la asociación gen-enfermedad dependerá de la frecuencia de la enfermedad y del riesgo del genotipo asociado (Hirschhorn and Daly 2005).

Dadas las características de nuestra serie clínica y los objetivos de este trabajo de tesis, se ha llevado a cabo estudios de asociación de genes candidatos. Realizar un análisis de ligamiento no era viable debido a limitaciones como no disponer de familias con varias generaciones en las que la enfermedad se transmitiera con un patrón mendeliano y al tamaño muestral de la serie.

Teniendo en cuenta el tamaño muestral de nuestra serie clínica, debemos establecer el poder estadístico. El poder de un estudio es la probabilidad de detectar con éxito un efecto genético dado un tamaño muestral determinado. Este análisis también puede aclarar el porqué de los resultados negativos (Purcell et al. 2003).

Para calcular el poder estadístico hemos empleado la herramienta "*Genetic Power Calculator*" considerando el carácter no paramétrico del estudio y asumiendo una serie de parámetros teóricos como la prevalencia de la enfermedad en nuestra población,

el valor D' entre los marcadores estudiados, la frecuencia del alelo marcador y el riesgo relativo del alelo asociado hipotéticamente a la enfermedad.

Así, hemos comprobado que el poder del estudio caso-control llevado a cabo en nuestra serie es de 94%, 89% ó 31% si la frecuencia del alelo asociado a la enfermedad es de 0,5%, 0,25% y 0,1% respectivamente. Si por el contrario realizamos un estudio familiar empleando el análisis TDT, el poder será un 76%, 68% y 20% respectivamente para las frecuencias alélicas anteriores.

De una forma global, teniendo en cuenta el valor de las frecuencias alélicas de los marcadores estudiados, hemos visto que, a excepción del polimorfismo analizado en *TNF α* (rs1800629) y el polimorfismo CT61 (rs11571319) de *CTLA4*, todos los alelos posiblemente asociados a la enfermedad tienen una frecuencia en población caucásica superior al 25% (www.hapmap.org). En base a este dato, el poder estadístico de nuestros análisis tiene un valor, para estos dos marcadores, del 31% en el caso del estudio caso-control y 20% en el estudio familiar, mientras que para el resto de marcadores tendría un valor entre el 89 y 94% para el estudio caso-control y entre 68-76% para el estudio familiar. Por otro lado, a pesar de contar con una serie clínica bien definida, hemos de considerar que el tamaño muestral puede variar en función del éxito de genotipado para cada marcador (que puede depender de la pureza y buen estado del DNA, de la PCR que amplifica el fragmento de interés o de la técnica de genotipado empleada) o, en el caso del análisis TDT, del número de familias informativas, lo que puede ocasionar que estos porcentajes varíen.

Con estas estimaciones podemos considerar que, a pesar de trabajar con un tamaño muestral modesto, los resultados o las afirmaciones que deriven de ellos son fiables.

1.2 Análisis de la región CELIAC1

1.2.1 Análisis de los genes *TNF α* y *LT α*

Los genes *TNF α* y *LT α* se localizan en la región HLA de clase III, entre los genes HLA de clase I y clase II, en el cromosoma 6p21.31-6p21.32. Codifican citoquinas que, junto con sus respectivos receptores, tienen un papel determinante en el sistema inmunológico regulando la respuesta inmune, la inflamación y la autoinmunidad. Se han vinculado a diversas enfermedades de carácter autoinmune (McDevitt et al. 2002).

La inhibición de *TNF α* es una herramienta terapéutica en enfermedades como la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y la psoriasis (Chaudhari et al. 2001; Feldmann and Maini 2001; Sandborn and Hanauer 1999). Los niveles de *TNF α* afectan de manera inversamente proporcional a los niveles de reactividad de los linfocitos T y a la transducción de señales por parte del receptor de los linfocitos T (*TCR*; *T cell receptor*) dando lugar a la disminución de la proliferación, producción de citoquinas y flujo de calcio en las células T, activación de p21, p23 y ZAP70 así como a la inhibición de la activación nuclear de NF- κ B (Cope 1998). *LT α* actúa en la regulación, mantenimiento de la integridad estructural y la interacción de las células T con otras células T así como células B y células presentadoras de antígeno en la respuesta inmune controlada y el desarrollo de autoinmunidad.

La región CELIAC1 alberga, por tanto, factores genéticos no HLA característicos que afectan a la susceptibilidad de las enfermedades autoinmunes, más allá de los genes *DQ*.

Desde los años 80 se han analizado polimorfismos en el brazo corto del cromosoma 6 que pudieran estar relacionados con enfermedades del sistema inmunológico, encontrándose una asociación más fuerte por la combinación de alelos localizados en múltiples loci, que por el efecto individual de cada uno de ellos (Dawkins et al. 1999). Así, llegaron a identificarse una serie de haplotipos extendidos en esta región cromosómica que están muy

conservados por lo que se consideran ancestrales. Estos haplotipos estaban contruidos por alelos de los genes *HLA-B*, *BF*, *C2*, *C4A*, *C4B* y *HLA-DR* aunque se esperaba que abarcaran una región cromosómica más grande. Determinadas combinaciones alélicas se han relacionado con enfermedades como la artritis reumatoide o la diabetes autoinmune (Alper et al. 1983(Alper et al. 1992; Alper et al. 1983).

En particular, el haplotipo HLA-A1-B8-DRB1*03 (8.1 AH; *Ancestral Haplotype*) es uno de los haplotipos DRB1*03 más comunes, con una frecuencia del 10% en poblaciones de origen caucásico. Está formado por los genes/alelos HLA-A*01-C*07-B*08-MICA5.1-DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 y se ha asociado con numerosas enfermedades como diabetes tipo 1, enfermedad celíaca, lupus eritematoso sistémico, inmunodeficiencias y miastenia grave (Aly et al. 2006).

En este trabajo se ha abordado el estudio genes no HLA de la región CELIAC1 mediante el análisis de los polimorfismos rs1800629 (-308A>G) y rs909253 (*Nco*IA>G), localizados en los genes *TNF α* y *LT α* respectivamente. El polimorfismo -308A está implicado en un aumento de la secreción de *TNF α* (Wilson et al. 1997), mientras que el polimorfismo *Nco*IG ha sido asociado con un aumento en la secreción de *LT α* (Messer et al. 1991). El haplotipo formado por la combinación alélica -308A- *Nco*IG ha sido vinculado a enfermedades de carácter autoinmune (Bouma et al. 1996). El polimorfismo -308A forma parte del haplotipo 8.1 AH: HLA-A1-B8-*TNF α* -308A-DRB1*03-DQ2.5 (Lio et al. 2001), por lo que la conservación de este haplotipo parece evidente en los individuos afectados por la enfermedad celíaca.

Los resultados del estudio caso-control muestran la existencia de asociación entre la enfermedad celíaca y los alelos *TNF α* :-308A y *LT α* :*Nco*IG tanto si comparamos las frecuencias alélicas como las frecuencias genotípicas de ambos marcadores (p-valor<0,01 en todos los casos). Sin embargo, al realizar el estudio familiar mediante el análisis TDT, vemos que sólo el alelo -308A se trasmite con mayor frecuencia a la descendencia afectada de una manera estadísticamente significativa.

Son bien conocidas las controversias que existen en cuanto a la verdadera asociación de polimorfismos en *TNF α* y la enfermedad celíaca ya que, hay autores que afirman que esta asociación se debe al desequilibrio de ligamiento que existe entre los genes de esta región (Polvi et al. 1998), mientras que otros autores defienden la postura de que se trata de un marcador adicional de la enfermedad (Garrote et al. 2002). Con el fin de ahondar en el conocimiento de esta región, realizamos el análisis TDT considerando, esta vez, el genotipo DQ de los pacientes. Realizando por separado el análisis en individuos portadores del haplotipo DQ2.5 (DQA1*05:01-DQB1*02:01) y en individuos no portadores de dicho haplotipo, comprobamos que la asociación sólo se mantenía si los individuos analizados eran portadores del haplotipo DQ2.5. Probablemente, esta asociación se deba a un fenómeno de desequilibrio de ligamiento, ya que el haplotipo DQ2.5 se encuentra, junto con el polimorfismo -308A, dentro del haplotipo extendido 8.1 (Lio et al. 2001). Sin embargo, estos resultados no restan valor al hecho de que el polimorfismo -308A está relacionado con un aumento en la secreción de *TNF α* . En este sentido, nuestros resultados apoyan la teoría de que los individuos portadores del haplotipo extendido HLA-A1-B8-TNF α -308A-DRB1*03-DQ2.5, tienen un riesgo adicional a ser DQ2, lo que se correlacionaría con un riesgo de padecer la enfermedad mayor en individuos homocigotos DQ2 codificado en cis (DQ2.5), que en individuos DQ2 codificado en trans (DQ2.2) (Bourgey et al. 2007; Donat et al. 2009; Margaritte-Jeannin et al. 2004).

1.3 Análisis de la región CELIAC3

Diversos estudios de ligamiento han revelado la existencia de un locus de susceptibilidad en el cromosoma 2q33, centrándose en un segmento de 300 Kb donde se localizan los genes *CD28/CTLA4/ICOS*. La función de este grupo de genes es regular la respuesta de las células T, lo que los convierte en candidatos a estar asociados a la enfermedad celíaca por su función inmunológica (Holopainen et al. 1999; Naluai et al. 2000; Popat et al. 2002; Rioux et al. 2004).

La activación de los linfocitos T se basa en interacciones múltiples entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno (APC; *antigen presenting cell*) (Schwartz 1992). Las moléculas CD28 e ICOS son las encargadas de desencadenar una señal coestimuladora mediante la unión a sus respectivos ligandos, B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) en el caso de CD28, y CD275 en el caso de ICOS (Hutloff et al. 1999). La unión activará la proteína quinasa PI3K originando la transducción de señales por sucesivas fosforilaciones, completando así, la activación de la célula T y dando lugar a la producción de citoquinas efectoras como IL-4 e IL-10 y, en menor medida, IL-2, INF γ y TNF α (Beier et al. 2000). Estos receptores ejercen un efecto sinérgico entre ellos. CD28 se expresa en células T tanto activadas como en reposo, mientras que ICOS sólo se induce tras la activación celular. Al contrario que CD28, que actúa principalmente durante la respuesta primaria, ICOS participa en la re-estimulación y expansión clonal de células T y B efectoras durante una respuesta secundaria. ICOS también puede interactuar con su ligando en células epiteliales o endoteliales presentadoras de antígeno (Fos et al. 2008). Por otro lado, CTLA4 se expresa en las células T activadas y tiene justo el efecto opuesto. Está implicada en la regulación negativa de la activación de las células T compitiendo con CD28 por los ligandos CD80/CD86 con una afinidad superior y proporcionando una señal inhibidora mediante la activación de la proteinfosfatasa SHP2 (Karandikar et al. 1996). De esta forma, los tres genes controlan distintos aspectos de la respuesta de las células T y su proximidad genética permite un control integrado de su expresión.

La región CD28/CTLA4/ICOS se ha descrito en diversos estudios por estar asociada a la susceptibilidad genética de padecer diabetes tipo I, enfermedad de Graves, artritis reumatoide o enfermedad celíaca (Djilali-Saiah et al. 1998; Donner et al. 1997; Kotsa et al. 1997; Nistico et al. 1996; Seidl et al. 1998). Los resultados de asociación más importantes se han obtenido respecto al gen *CTLA4*, en el que se ha demostrado que los polimorfismos de la región 3' pueden influir en el tipo de respuesta inmune en las enfermedades antes mencionadas (Ueda et al. 2003). Diversos estudios han analizado polimorfismos relacionados con *CTLA4* generando resultados ambiguos (Clot et al. 1999; Djilali-Saiah et al. 1998; Haimila et al. 2004; Holopainen et al. 1999; King et al. 2003; King et al. 2002; Martin-Pagola et al. 2003; Mora et al. 2003; Naluai et al. 2000; Popat et al. 2002; Rioux et al. 2004; van Belzen et al. 2004a).

En nuestra serie clínica hemos analizado cuatro polimorfismos de *CTLA4*: -1147C>T, rs231775A>G, rs3087243A>G, rs11571319A>G, comúnmente conocidos como -1147, c.49, CT60 y CT61 respectivamente. Tras comprobar que se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población, llevamos a cabo el estudio caso-control encontrando una distribución uniforme en las frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes e individuos sanos. Sin embargo, cuando aplicamos el análisis S-TDT en 70 familias que resultaron ser informativas, observamos que el alelo c.49A se transmitía a la descendencia afectada con una frecuencia estadísticamente superior a la esperada ($Z' = 2,28$; p-valor= 0,01). Al aplicar el análisis TDT obtuvimos resultados similares ($\chi^2 = 6,37$; p-valor= 0,016). La asociación con el alelo c.49A coincide con la descrita en poblaciones como la francesa y la finlandesa (Djilali-Saiah et al. 1998; Holopainen et al. 1999; Mora et al. 2003) pero difiere de otras como la inglesa en la que la asociación de *CTLA4* viene dada por el SNP CT60 (Hunt et al. 2005). Estos resultados contradictorios podrían representar la evidencia indirecta de que ninguno de los polimorfismos estudiados constituye un cambio etiológico asociado a la enfermedad. De hecho, en otras enfermedades autoinmunes, el alelo c.49G es el que aparece como asociado, e incluso se ha

relacionado con una glicosilación incompleta del péptido señal de CTLA4, alterándose su procesamiento en el retículo endoplásmico y dando lugar a niveles más bajos de expresión en la superficie celular (Naluai et al. 2000).

Para estudiar la asociación putativa entre el alelo c.49A y la enfermedad celíaca en nuestra población realizamos el análisis de haplotipos considerando los polimorfismos previamente estudiados (cen_-1147C>T-c.49A>G-CT60A>G-CT61A>G_tel) en un total de 84 familias mediante dos aproximaciones, TDTPHASE y Haploview v3.2. Aplicando el análisis TDTPHASE, vimos que el haplotipo cen_-1147T-c.49A-CT60G-CT61A_tel se transmitía con una frecuencia mayor estadísticamente significativa a la descendencia afectada (p-valor= 0,04). En una segunda aproximación, aplicamos el programa Haploview v3.2. A diferencia de los resultados obtenidos en la primera aproximación, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la transmisión de ninguno de los haplotipos. Nuestros resultados se aproximan a los obtenidos por Amundsen y colaboradores (Amundsen et al. 2004), cuyo trabajo refleja la asociación y el aumento de riesgo de padecer la enfermedad celíaca en aquellos individuos portadores del haplotipo -1147T-c.49A-CT60G-CT61A; sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante la segunda aproximación, no podemos concluir que los resultados sean coincidentes. Otros autores, en el marco de los polimorfismos c.49A>G-CT60A>G, han encontrado resultados contradictorios, como es la asociación con el haplotipo c.49G-CT60G (Hunt et al. 2005) o, por el contrario, con el haplotipo c.49A-CT60A (Brophy et al. 2006). Considerando que no podemos realizar comparaciones directas porque el diseño de los estudios no es idéntico, a nivel global, los haplotipos más representativos en nuestra población coinciden con los asociados a la enfermedad en otras poblaciones.

En nuestra serie clínica hemos evaluado, dos a dos, el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos analizados mediante los programas Haploview v3.2 y PyPopWin 32-0.6.0 encontrando resultados similares en ambos casos: los valores D' eran

cercanos a 1, excepto entre los marcadores -1147C>T y CT60A>G ($D'=0.59$ con Haploview y $D'=0.81$ con PyPop). Cabe destacar que existen tres bloques de ligamiento diferentes dentro de la región CELIAC3 y cada bloque incluye uno de los genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS* (Ihara et al. 2001).

Profundizando en la región CELIAC3, hemos analizado un SNP diana localizado en *ICOS*, el polimorfismo rs10183087 (c.602A>C). Este marcador no está en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos de *CTLA4* y, en este sentido, podemos generar un haplotipo extendido que nos proporcione más información sobre esta región. Tras comprobar que las frecuencias alélicas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, realizamos el estudio caso-control encontrando diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica ($p\text{-valor}=0.026$); sin embargo, los análisis TDT y S-TDT descartan la asociación ($p\text{-valor}>0,05$).

Procedimos al estudio de la distribución haplotípica extendida de los marcadores -1147C>T-c.49A>G-CT60A>G-CT61A>G-c.602A>C y la asociación resultó negativa en todos los haplotipos observados, difiriendo, una vez más, con los resultados obtenidos en otras poblaciones donde se ha comprobado que el alelo c.602C forma parte de un haplotipo con preferencia de transmisión en niños afectados por la enfermedad celíaca (Haimila et al. 2004). Llegar a conclusiones definitivas a partir de los resultados globales del estudio de la región CELIAC3 resulta una tarea cuanto menos, difícil, destacando, en estos casos, la necesidad de estudios funcionales para la obtención de información más concluyente.

1.4 Análisis de la región CELIAC4

El polimorfismo rs2305764A se ha descrito en la población holandesa como un factor capaz de incrementar 2,3 veces el riesgo de padecer la enfermedad celíaca (Monsuur et al. 2005). Previamente, un estudio de ligamiento llevado a cabo en la misma población señalaba un ligamiento positivo en el cromosoma 19p13.1 con un valor *lod* de 4.31 para el marcador microsatélite *D19S899* (Van Belzen et al. 2003).

Los marcadores analizados se localizan en regiones intrónicas del gen *Myosin IXB* (*MYO9B*), que codifica una miosina no convencional implicada en movimientos intracelulares, exhibiendo un movimiento progresivo y polarizado a lo largo del filamento de actina y que podría estar involucrada en el ensamblaje de las uniones estrechas (*tight junctions*) que controlan la permeabilidad paracelular (Matter and Balda 2003); (Bruewer et al. 2004). La proteína Myo9b presenta, además, actividad rho-GTPasa, necesaria para la transducción de señales que participan en la remodelación del citoesqueleto. Tiene múltiples transcritos que dan lugar a isoformas diferentes (Post et al. 2002).

Aunque las investigaciones se han centrado en polimorfismos de genes implicados en la activación y regulación de los linfocitos T, el gen *MYO9B* resulta un buen candidato desde la perspectiva de la desestabilización que sufre la barrera intestinal de los pacientes celíacos, lo que permite el paso de péptidos de gliadina demasiado grandes y representando, así, el primer paso de la patogénesis temprana de la enfermedad (van Elburg et al. 1993).

En nuestra serie clínica hemos estudiado la posible asociación entre tres polimorfismos de *MYO9B*: *D19S899*, rs2305767 y rs2305764, localizados en los intrones 1, 14 y 28 respectivamente. En un primer momento tuvimos que descartar el SNP rs2305764, por no encontrarse en equilibrio Hardy-Weinberg en nuestra población. En el estudio del marcador microsatélite *D19S899* encontramos ocho variantes alélicas distribuidas en un rango de 15 a 25 repeticiones del dinucleótido CA. Los alelos más frecuentes fueron (CA)₁₈ y (CA)₁₉ pero no encontramos resultados positivos de asociación ni en el

estudio caso-control ni en el análisis S-TDT. Respecto al SNP rs2305767, las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes e individuos sanos mostraron distribuciones similares sin diferencias estadísticamente significativas. El análisis S-TDT tampoco mostró desviaciones en la transmisión a la descendencia afectada.

Nuestros resultados coinciden con el resto de trabajos publicados en relación a este locus (Amundsen et al. 2004; Giordano et al. 2006; Hunt et al. 2006; Nunez et al. 2006). Lo que *a priori* representaba un gen prometedor tanto por su función como por los resultados obtenidos en los estudios de ligamiento y asociación, no ha podido ser corroborado en otros estudios poblacionales, a excepción de uno llevado a cabo en población del sur de la península Ibérica, (Sanchez et al. 2007). En el trabajo presentado por Sánchez y colaboradores argumentan que esta divergencia en los resultados podría deberse a la heterogeneidad alélica poblacional ya que las poblaciones italiana, inglesa, noruega y del norte de España presentan una distribución de las frecuencias alélicas de los marcadores diferente a la de la población holandesa y el sur de la Península Ibérica. Otra de las causas podría ser el efecto fundador a escala regional que pudiera subyacer entre poblaciones europeas de distinto origen ancestral y que éste diera lugar a las diferencias entre las frecuencias de los alelos de riesgo tal y como se ha descrito en relación al gen *NOD2* en la enfermedad de Crohn (Arnott et al. 2004; Cavanaugh 2006).

Lo cierto es que existe una evidencia mucho mayor de que las variantes de *MYO9B* no ejercen ninguna influencia en la susceptibilidad a la enfermedad celíaca y así lo demuestra el reciente estudio de Wolters y colaboradores en el que, mediante ensayos funcionales, descartan cualquier implicación por parte de los polimorfismos descritos en *MYO9B* en el aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal (Wolters et al. 2010). Cabe destacar que la región CELIAC4 no sólo está restringida a *MYO9B*. Se ha postulado que podría albergar más de 140 genes que resultarían ser buenos candidatos por la función de la proteína que codifican.

1.5 Divergencias en los estudios de asociación

La reproducibilidad de los resultados representa el "talón de Aquiles" en los estudios de asociación. Esto puede deberse a dos tipos de errores:

▪ Errores de tipo I: los falsos positivos. Las posibles causas y herramientas estadísticas para minimizarlos son:

-Estratificación poblacional: casos y controles son reclutados de grupos poblacionales distintos y presentan frecuencias alélicas distintas estadísticamente significativas en un polimorfismo neutral que acaba siendo considerado como alelo de riesgo (o protección) en el estudio de asociación.

-Diferencias en la prevalencia de la enfermedad entre los 2 grupos poblacionales.

-Uso inapropiado del p -valor < 0.05 como criterio de presencia/ausencia de asociación.

-Errores de genotipado: si se ha llevado a cabo en distintos laboratorios o en momentos diferentes o con distintas técnicas.

▪ Errores de tipo II: los falsos negativos, que pueden estar causados por:

- Baja potencia de la prueba estadística por un tamaño muestral insuficiente.

- Problemas en la determinación del fenotipo: que éste no tenga una base genética sino fundamentalmente ambiental. Estos problemas conducen a una pérdida del poder de detección o que por error se consideren como controles a pacientes mal diagnosticados.

-Interacción gen-gen y gen ambiente: fenómenos de epistasia o que una variante de riesgo sólo se manifieste en poblaciones con un determinado componente genético poblacional o bajo determinadas condiciones ambientales.

Así pues, las asociaciones poblacionales entre un alelo A y una enfermedad pueden surgir por tres razones:

- Que el alelo A sea la causa directa de la susceptibilidad a la enfermedad. Aunque ser portador no sea necesario ni suficiente para desarrollar la enfermedad, sí aumenta de manera considerable la probabilidad. En este caso cabría esperar que el alelo A estuviera asociado a la enfermedad en cualquier población estudiada.
- Que un fenómeno de desequilibrio de ligamiento sea la causa de la asociación. Siendo así, un gen en la cercanía de dicho locus estaría mutado en los individuos afectados por la enfermedad. El alelo particular que estuviera asociado, podría ser diferente en función de la población de estudio.
- Que los individuos afectados pertenezcan a un subgrupo de la población distinto genéticamente al de los individuos no afectados, que por coincidencia difieran también en la frecuencia del alelo A, con lo cual estaríamos ante un problema de estratificación poblacional.

Es posible que muchas asociaciones hoy descritas en relación a la enfermedad celíaca sean reales pero no reproducibles debido a la contribución al fenotipo de la variable de riesgo. Por ello, cualquier estudio de replicación debería incluir un número de pacientes lo suficientemente elevado como para detectar el verdadero efecto de una variante considerada como “de riesgo”. Del mismo modo, el no detectar el efecto de una determinada magnitud en un primer estudio de asociación no debería considerarse suficiente como para rechazar la asociación de una variante.

En este apartado hemos presentado el conjunto de resultados obtenidos en el estudio genético comparativo de las regiones CELIAC, considerándolo representativo del fondo genético de la población del área mediterránea española. En relación a la región CELIAC3, nuestros resultados se corresponden con los obtenidos en poblaciones europeas cercanas como la italiana y la francesa (Djilali-Saiah et al. 1998; Mora et al. 2003), mientras que en la región CELIAC4, concuerdan con el total de poblaciones europeas al coincidir unánimemente en la ausencia de asociación con *MYO9B*. Paradójicamente, ha sido otra población española la única que ha obtenido resultados similares a los de la población holandesa,

posiblemente debido al tamaño muestral (n=90) o la similitud en la distribución de las frecuencias alélicas entre ambas poblaciones (Sanchez et al. 2007).

2. Análisis de Nuevos Genes Candidatos

Continuando con los estudios de asociación como estrategia para abordar el análisis de nuevos factores genéticos asociados a la EC, nos centramos en la selección de genes candidatos en base a la función de la proteína codificada o la posición en el genoma, esto es, genes que por estudios de expresión, interacciones proteicas o rutas metabólicas, encajaran en el modelo fisiopatológico (presentación, reconocimiento o procesamiento de antígenos, alteración de la permeabilidad intestinal...) de la enfermedad celíaca o bien, genes cercanos a las regiones CELIAC descritas o en localizaciones cromosómicas que hayan dado recientemente resultados de ligamiento o asociación positivo aunque aún no se hayan considerado como regiones CELIAC.

2.1 Estudio del gen *FOXP3*

Diversos estudios reflejan el predominio de la enfermedad celíaca en las mujeres (aproximadamente un ratio de 2:1 frente a los afectos varones) (Bardella et al. 2005; Green et al. 2001). Estos datos, junto con el ligamiento descrito por Babron y colaboradores entre el cromosoma Xp11.3 (*DXS6810*) y la enfermedad celíaca (valor *lod* aproximado a 3) justifican el considerar la existencia de genes candidatos en el cromosoma X.

FOXP3 se localiza en el cromosoma Xp11.23. El estudio de este gen se llevó a cabo por su relación funcional con CTLA4 y por su asociación, en estudios previos, a enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo I (Bassuny et al. 2003). La deficiencia de *FOXP3* provoca diarrea, eczemas, anemia hemolítica, diabetes *mellitus* o tiroiditis autoinmune en humanos (Patel 2001). *FOXP3* codifica una proteína de unión al DNA que se denomina "Escurfina" y tiene una función

reguladora-represora de la transcripción, esencial para la función y el desarrollo de las células T reguladoras que expresan el receptor de interleukina- 2 (IL2; CD25) (Hori et al. 2003). La función de la IL-2 es el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico y la tolerancia hacia el propio organismo. Se ha descrito que mutaciones en *FOXP3* dan lugar a un exceso de proliferación de linfocitos CD4+CD8-, infiltración linfocitaria multiorgánica e incremento de la liberación de citoquinas, fenotipo similar al que presentan animales K.O. (*knock Out*) para *CTLA4* (Kanangat et al. 1996; Tivol et al. 1995).

En este estudio se ha analizado el polimorfismo microsatélite (GT)_n localizado en la región promotora de *FOXP3*, previamente asociado a la diabetes tipo 1 (Bassuny et al. 2003). Éste es un polimorfismo con carácter funcional posiblemente implicado en potenciar su actividad. Tiene 6 alelos diferentes en función del número de repeticiones del dinucleótido GT: (GT)₁₄ – (GT)₁₉.

En nuestra serie clínica hemos encontrado dos alelos mayoritarios, (GT)₁₆ y (GT)₁₇ pero tanto la distribución de las frecuencias alélicas como las genotípicas fueron similares entre pacientes y controles. En el estudio familiar que se realizó aplicando el análisis TDT no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la transmisión de ninguno de los alelos a la descendencia afectada. Estos resultados no nos permiten, aún así, descartar la posible implicación de *FOXP3* en la enfermedad celíaca ya que, en el análisis familiar, el número de familias informativas, incluso en el caso de los alelos que aparecían con mayor frecuencia, era inferior a 30 y esto disminuye significativamente el poder del estudio para detectar asociación genética. Además, al tratarse de un gen localizado en el cromosoma X, no podíamos contar con padres o hermanos varones informativos, dada la imposibilidad de que fueran heterocigotos.

La primera asociación descrita de este marcador microsatélite en relación con una enfermedad autoinmune fue en población japonesa, en un estudio sobre diabetes tipo I (Bassuny et al. 2003). Estudios posteriores, incluido éste, llevados a cabo en enfermedades

como diabetes autoinmune tipo I, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn muestran que en las poblaciones de origen caucásico no se da esta asociación, prueba de un fondo genético divergente (Bjornvold et al. 2006; Sanchez et al. 2005; Zavattari et al. 2004) o de que, dada una enfermedad compleja, las variantes de riesgo genético difieren entre los distintos grupos poblacionales.

Los resultados de un estudio de ligamiento llevado a cabo en poblaciones de origen caucásico por Cucca y colaboradores (Cucca et al. 1998), muestra una interacción potencial entre FOXP3 y el sistema HLA. Este trabajo proporciona la evidencia de genes de susceptibilidad localizados en esta región cromosómica en relación con la diabetes tipo 1, donde el efecto depende de la coexistencia con la variante HLA-DRB1*03, aunque no se ha llegado a obtener resultados concluyentes acerca de que *FOXP3* fuera uno de estos genes (Bjornvold et al. 2006).

Se ha demostrado la presencia de células T reguladoras con el fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ en sangre periférica y en biopsias intestinales de pacientes con enfermedad celíaca, lo que estaría indicando, de alguna manera, la participación de Foxp3 en la respuesta inmunológica de estos pacientes, pero no se ha demostrado funcionalmente la implicación de este fenotipo celular en la enfermedad (Frisullo et al. 2009; Gianfrani et al. 2006).

2.2 Estudio del gen *GILT*

A raíz de la descripción de la región CELIAC4 y la posible implicación del gen *MYO9B* en alteraciones del citoesqueleto, las nuevas teorías etiopatogénicas sobre la enfermedad celíaca evolucionaron hacia los cambios incontrolados de la permeabilidad intestinal como el primer factor desencadenante. Estas ideas se vieron reforzadas con el descubrimiento de la **zonulina** como modulador de las *tight junctions* (TJ) intestinales (Wang et al. 2000).

La zonulina fue descrita en el año 2000 tras unos experimentos que se llevaron a cabo con la enterotoxina ZOT (*Zonula Occludens Toxin*) de *Vibrio cholerae* (Fasano et al. 1995). Esta toxina, cuando se une a un receptor específico de la superficie celular, es capaz de activar una cascada de señalización intracelular que implica la activación de las enzimas fosfolipasa C y proteinquinasa C y como consecuencia, da lugar al reordenamiento de la actina, alteraciones en la estructura de las TJ y cambios en la permeabilidad intestinal. La toxina ZOT es específica de tejido (células epiteliales del intestino y endoteliales) y el gen que la codifica también ha sido identificado en otros patógenos entéricos como *Salmonella*.

Se postuló entonces que esta toxina podría estar mimetizando inmunológica y funcionalmente a un modulador endógeno de las TJ del epitelio intestinal y para confirmar esta hipótesis, incubaron un extracto lisado de mucosa intestinal humana con un anticuerpo policlonal para la toxina ZOT, así consiguieron detectar una proteína humana reconocida por este anticuerpo, la purificaron y la denominaron "Zonulina" (Wang et al. 2000). Comprobaron que ambas proteínas actuaban por igual en las TJ intestinales de manera reversible y que los niveles de expresión de la zonulina en lisados de biopsia intestinal eran mucho más elevados en los pacientes celíacos que en individuos sanos (Fasano et al. 2000). ZOT era capaz de interferir en la supresión de la inmunidad mediada por células Th1 específicas e interfería también, en la inducción vía nasal de tolerancia a la gliadina (Rossi et al. 2002). Posteriormente, concluyeron que la gliadina era capaz de inducir la liberación de

zonulina en el epitelio intestinal dando lugar a la apertura de las TJ y aumentando drásticamente la permeabilidad (Clemente et al. 2003).

Así, el gen que codifica la zonulina era un candidato perfecto para el estudio de polimorfismos (regiones promotoras, de *splicing* alternativo o codificantes) que pudieran dar lugar a una secreción incontrolada de la misma sobre todo, tras la exposición a determinados patógenos o moléculas antigénicas, dando lugar a una alteración de la permeabilidad tal, que pudiera ser la causa de que una molécula del tamaño de la gliadina (~33KDa) atravesara la barrera intestinal. Sin embargo, acceder a información acerca de la secuencia del gen, de la proteína o la región cromosómica en la que se encontraba es totalmente imposible ya que es información patentada y no aparece en las bases de datos públicas. Por ello, realizamos una búsqueda bibliográfica de genes cuya expresión se viera afectada por toxinas relacionadas con *Vibrio cholerae* y otras enterotoxinas implicadas en permeabilidad epitelial por alteraciones en las TJs.

Los experimentos con *microarrays* señalaban una proteína implicada en el procesamiento de antígeno que, tras la exposición del epitelio intestinal a la toxina de *Vibrio cholerae* disminuía 6 veces su expresión (Royae et al. 2006). Esta proteína se llama IFI30 (*Interferon- γ Inducible Protein-30*), también conocida como GILT (*Gamma Interferon-inducible Lysosomal Thiol reductase*). GILT es una tiol-reductasa lisosomal que a pH < 7 es capaz de reducir los puentes disulfuro de las proteínas. Se expresa constitutivamente en las células presentadoras de antígeno y en otros tipos celulares cuando son inducidos por interferón gamma (IFN γ) (Luster et al. 1988). Esta enzima tiene un papel fundamental en el procesamiento de antígenos restringidos a las moléculas HLA de clase II (figura V.1) pero más importante todavía es su localización en el locus CELIAC4, a 1,1 Mb de *MYO9B*.

Así pues, abordamos el estudio de GILT mediante el análisis de asociación de los dos SNPs diana principales de la región genómica que ocupa (www.hapmap.org), rs273266 y rs11554159 y por la cercanía de éstos con *MYO9B*. El SNP rs273266 se localiza en la

región no codificante cercana al extremo 5' de *GILT* y rs11554159, en el exón 2 de *GILT*. Éste último provoca el cambio de aminoácido p.Arg76Gln adyacente al centro activo de la proteína.

Los resultados obtenidos en el estudio caso-control mostraron que el polimorfismo rs273266 tenía una distribución alélica y genotípica similar entre pacientes y controles, sin embargo, el marcador rs11554159 mostró diferencias estadísticamente significativas tanto en la distribución de las frecuencias alélicas como en las genotípicas (p-valor < 0,05 en ambos casos). Aunque, posteriormente el estudio de transmisión familiar no coincidió con estos resultados, el hecho de: (i) haber encontrado indicios de asociación en un gen nunca antes relacionado con la enfermedad celíaca; (ii) su localización junto a *MYO9B* en el locus *CELIAC4*; (iii) su implicación en el procesamiento de antígenos y (iv) la escasa reproducibilidad de los estudios de asociación llevados a cabo en distintas poblaciones europeas con otros muchos marcadores, nos llevó a la necesidad de demostrar la implicación real de este cambio de aminoácido adyacente al centro activo de *GILT* mediante la realización de análisis funcionales concretos.

2.3 Estudios funcionales

2.3.1 *GILT* y HLA

En las células presentadoras de antígeno, las moléculas HLA de clase II se ensamblan en el retículo endoplásmico formando, con la ayuda de chaperonas, un nonámero consistente en tres dímeros alfa-beta asociados con un trímero compuesto por una cadena invariable (Ii) (Cresswell 1994; Jensen 1991). Este complejo se transporta a través del aparato de Golgi hacia la ruta endocítica donde Ii será eliminada de manera secuencial, quedando unida únicamente la porción C-terminal (*Class II-associated Ii Peptide*; CLIP), que se encargará de evitar la unión de cualquier péptido a la hendidura de la molécula HLA II fuera del compartimiento especializado para ello. La unión de las moléculas HLA de clase II al péptido antigénico se da en

compartimentos lisosomales específicos denominados MIICs (*MHC class II Compartments*) (Tulp et al. 1994), donde tiene lugar el procesamiento, reducción de puentes disulfuro y desplegamiento de los antígenos exógenos internalizados por las APCs. Tras esta degradación, los péptidos generados se unirán a la molécula HLA II (Jensen 1995). Previamente, las moléculas HLA-DM han interactuado con el complejo HLA II-CLIP para intercambiar CLIP por un péptido (figura V.1). La asociación a las moléculas HLA II puede proteger al segmento proteico que han unido, de la degradación proteolítica (Deng et al. 1993; Mouritsen et al. 1992).

GILT se localiza en los MIICs y facilita el procesamiento de antígenos que contienen puentes disulfuro. Se sintetiza como un precursor catalíticamente activo de 35 KDa que será dirigido hacia la ruta endocítica mediante el receptor de manosa-6-fosfato (M6PR; *Mannose 6 Phosphate Receptor*) (Maric et al. 2001). Durante la ruta endocítica las catepsinas eliminarán los propéptidos N- y C-terminal para generar, finalmente, una proteína madura de 30 KDa en los MIICs donde participará en el procesamiento de antígenos (Arunachalam et al. 2000; Haque et al. 2002). Una porción de proteína precursora (10-20%) se secretará al medio extracelular como un dímero unido por puentes disulfuro. En el interior celular, GILT puede unirse a determinadas variantes de la molécula HLA-DR para ser expuesto por ésta en la superficie celular, aunque la finalidad exacta de este proceso se desconoce (Arunachalam et al. 1998).

Tanto la forma madura como la proforma presentan actividad tiol-reductasa. El centro activo de GILT lo constituye un dominio CXXC (Cisteína-X-X-Cisteína) característico de la familia de las tiorredoxinas (Phan et al. 2000).

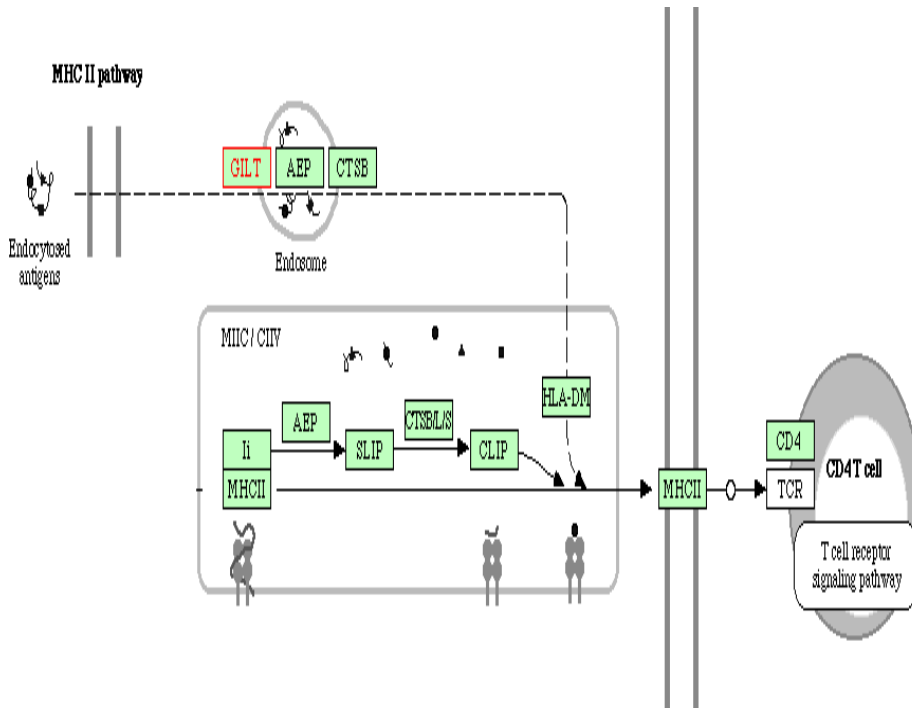


Figura V.1 GILT participa en el procesamiento de antígenos en la ruta endocítica endosomal. (Tomado de <http://www.genome.ucsc.edu/>)

2.3.2 Estudio funcional del polimorfismo rs11554159

Los resultados del estudio de asociación llevado a cabo en nuestra población muestran la posible implicación por parte del polimorfismo rs11554159 (c.227G>A; p.R76Q) en la enfermedad celíaca. Recientemente Ban y colaboradores lo han asociado con esclerosis múltiple, destacando la necesidad de los estudios funcionales que corroboren sus resultados (Ban et al. 2009). El SNP rs11554159 provoca un cambio de aminoácido arginina>glutamina en la posición adyacente al centro activo de GILT (CGGCR/Q).

Con el fin de comprobar el verdadero efecto de esta asociación genética, hemos llevado a cabo la caracterización celular y funcional de este polimorfismo. Para ello se ha clonado, por separado, el cDNA que codifica las variantes p.76R y p.76Q obtenidas a partir las líneas

celulares 293T y adipocitos humanos respectivamente, en distintos vectores de expresión tanto para células de mamífero como para células procariotas.

2.3.2.1 Análisis de la expresión de GILT:p.76R y GILTp.76Q

La transfección de células cos-7 da lugar a la expresión de la proteína GILT humana, no habiendo expresión de proteína endógena. Al testar la expresión de ambas variantes, tanto en el extracto celular como en el medio extracelular se aprecia, mediante western blot, que las células cos-7 son capaces de secretar la proteína al exterior tal como había descrito Phan y colaboradores (Phan et al. 2002) y, en nuestro caso, que eran capaces de expresar la proforma de ambas variantes de GILT.

GILT presenta distintos puntos de glicosilación en su extremo N-terminal (Arunachalam et al. 2000). Las distintas bandas que observamos en cada muestra, confirman que tanto p.76R como p.76Q exhiben las mismas formas de glicosilación, no apreciándose diferencia alguna en las bandas originadas por este procesamiento en ambos casos. En los extractos de proteínas obtenidas a partir del medio extracelular, observamos una forma de glicosilación predominante e idéntica para ambas variantes. Cabe destacar que, a medida que GILT circula por la ruta endocítica, se van eliminando los puntos de glicosilación, suceso que no ocurre si la proteína es secretada al exterior (Arunachalam et al. 2000); así, en los extractos de ambas variantes de la proteína obtenidos a partir del medio extracelular, observamos una banda predominante, de mayor peso molecular que las demás que correspondería a la proteína GILT con mayor glicosilación. Podemos decir que el polimorfismo p.R76Q no causa alteraciones en la transcripción, traducción y glicosilación posterior de GILT.

2.3.2.2 Localización subcelular de GILT: p.76R y GILTp.76Q

Una vez comprobada que la expresión no se veía alterada, se procedió a comprobar la posible influencia del polimorfismo en la localización subcelular de GILT. Los experimentos de inmunofluorescencia indirecta en células cos-7 transfectadas y marcadas con anticuerpos específicos tanto para GILT como para distintos marcadores celulares, confirman que GILT se localiza en los orgánulos que participan en la ruta endocítica (Arunachalam et al. 1998). Gracias a la localización interna del péptido reconocido por el anticuerpo anti-GILT es posible detectar tanto la proforma como la forma madura. Ambas variantes exhiben un patrón de localización celular similar, encontrándose tanto en estructuras perinucleares como punteadas, características de compartimentos vesiculares. Los experimentos de colocalización con marcadores específicos de orgánulo nos muestra que ambas se localizan parcialmente en el retículo endoplásmico y en endosomas tempranos pero principalmente en endosomas tardíos, donde vimos la mayor evidencia de colocalización entre marcadores. Considerando los resultados obtenidos en el análisis por western blot, donde únicamente hemos podido constatar la presencia de la proforma de GILT, podríamos considerar que su procesamiento hacia la forma madura no se da por el hecho de alcanzar estructuras lisosomales, sino que podría depender de la exposición a $INF\gamma$, antígenos exógenos o la presencia de moléculas HLA de clase II.

Los siguientes experimentos de localización subcelular llevados a cabo se basaron en la cotransfección de GILT:p.76R y GILT:p.76Q, ambas clonadas en vectores de expresión que contenían proteínas fluorescentes diferentes para poder visualizarlos individualmente. Así, se han detectado ambas formas por separado pero en la misma célula, mostrando que la proteína se localiza simultáneamente en los mismos orgánulos y no pudiendo apreciarse pequeñas diferencias.

2.3.2.3 Análisis funcional de GILT: p.76R y GILT_{p.76Q}

Tal como hemos comentado, el cambio p.R76Q (SNP rs11554159) se localiza junto a la secuencia que da lugar al centro activo. La arginina se caracteriza por su carga positiva mientras que la glutamina es un aminoácido de carga neutra. Para comprobar el efecto de este cambio, procedimos a la purificación de la forma madura de la proteína en sus dos variantes. Para ello, se clonó el cDNA de GILT sin las secuencias correspondientes a los propéptidos en N- y C-terminal, en vectores específicos de expresión en procariotas.

Tras el proceso purificación de ambas variantes de GILT obtuvimos los extractos de GILT con un 60% de pureza, donde GILT constituía la proteína mayoritaria y el resto lo constituían trazas de otras proteínas apenas apreciables con tinción de Coomassie. El peso molecular de la banda observada en el gel de acrilamida correspondía al tamaño de la proteína madura pero la confirmación de que se trataba de GILT se obtuvo mediante su detección por western blot con el anticuerpo anti-GILT.

La secuencia de aminoácidos que constituyen el centro activo de GILT, hace suponer que su función sea la característica de la familia de las tiorredoxinas (Phan et al. 2000). La función de las tiorredoxinas radica en su capacidad de romper puentes disulfuro. En 1979, Holmgren describía la propiedad intrínseca que exhiben las tiorredoxinas para catalizar la reducción por DTT de los puentes disulfuro que unen las cadenas alfa y beta de la insulina (Holmgren 1979). Hasta el momento en que se realizaron estos experimentos, los ensayos de actividad llevados a cabo con GILT se basaban en experimentos de radiactividad que suponían la función tiorreductasa por la secuencia de dicho centro activo (Phan et al. 2000). Con el fin de comprobar la función tiorredoxina de GILT, así como detectar posibles cambios en la actividad como consecuencia del polimorfismo p.R76Q, llevamos a cabo experimentos de reducción de insulina por DTT a distintas concentraciones de GILT y a pH 7, observando el

aumento de la absorbancia en el tiempo a una longitud de onda de 650 nm.

Teniendo en cuenta la forma p.76R como la forma silvestre de la proteína, por tratarse c.227G del alelo ancestral, se procedió al estudio de la cinética de la reducción de los puentes disulfuro de la insulina y posteriormente, se realizaron los ensayos con las dos variantes de GILT a distintas concentraciones. Para el estudio de actividad, se estimó una recta construida a partir de los valores de las pendientes de los distintos ensayos llevados a cabo. Las pendientes de dichas rectas no mostraron diferencias estadísticamente significativas, demostrando que en efecto, el polimorfismo p.R76Q o rs11554159 no supone una alteración en la actividad de la proteína GILT y que su asociación a la enfermedad celíaca no se deba, probablemente, a cuestiones de cambios en la funcionalidad de la proteína.

El ensayo empleado para la medición de la actividad de GILT siendo válido, presenta una limitación y es el hecho de que, para evitar la precipitación de la insulina, el ensayo debe llevarse a cabo a pH 7. GILT es catalíticamente activa tanto como proforma como proteína madura procesada. Para la proforma, el pH óptimo descrito, es el neutro, pero en este caso hemos hecho el ensayo con la proteína madura, de la que se ha descrito su funcionalidad a distintos pH. Dado que su función se lleva a cabo en compartimentos lisosomales, su pH óptimo es 4,5, con el que presenta valores de máxima actividad (Phan et al. 2000). Así que, probablemente, la actividad estimada para GILT sea menor a la real ya que los requerimientos experimentales impiden un ensayo en las condiciones más óptimas.

2.3.2.4 Análisis de la expresión de GILT en biopsias humanas

Como última aproximación, quisimos estudiar los niveles de expresión de GILT en muestras de biopsias humanas que nos fueron cedidas amablemente por el Dr. Miguel Calabuig, del Hospital General Universitario de Valencia y la Dra. Gemma Castillejo, del Hospital Sant Joan de Reus.

Se realizó el tipaje de cada individuo para los genes HLA *DQA1*, *DQB1* y el polimorfismo rs11554159 de *GILT*. Se clasificaron, tanto los pacientes como los controles, en grupos de riesgo genético en función de su genotipo HLA. Éstos se habían establecido previamente en base a los estudios llevados a cabo en poblaciones del sur de Europa, con las que se ha comprobado que, respecto al genotipo HLA, nuestra población sigue una distribución similar (Bourgey et al. 2007; De Palma et al. 2009; Donat et al. 2009; Margaritte-Jeannin et al. 2004).

Posteriormente, se extrajeron las proteínas intestinales y se testaron los niveles de *GILT*. Detectamos la proteína *GILT* tanto en las biopsias de los pacientes como en los controles, pero, en estos últimos no había expresión de las proteínas utilizadas como control de carga (actina o tubulina), por lo que tuvimos que desechar todas las muestras menos una, en la que sí se detectaba la banda de actina y que empleamos como muestra control. Con cada muestra realizamos repetidas veces el western blot junto con la muestra control o en su defecto, con el mismo paciente para normalizar los niveles de expresión en función de la banda de actina y relativizar estos niveles siempre con la misma muestra.

Con los valores obtenidos se llevaron a cabo 4 tipos de análisis distintos: en el primero se compararon los niveles de expresión de *GILT* entre pacientes y la muestra control, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. En el segundo, teniendo en cuenta que 3 de las biopsias de los pacientes presentaban una histología normal, se compararon los niveles de expresión de *GILT* según la histología normal/alterada de las biopsias y tampoco se hallaron diferencias. En el tercer análisis se compararon los niveles de expresión de *GILT* en función del genotipo de rs11554159 de los pacientes y tampoco se hallaron evidencias acerca de diferencias en la expresión. Por último, se comparó la expresión de *GILT* en función del genotipo HLA y, sorprendentemente, vimos que en aquellos individuos pertenecientes al grupo de mayor riesgo genético, la expresión de *GILT* estaba disminuida de una manera estadísticamente significativa. Todos los individuos pertenecientes al

grupo de mayor riesgo, a excepción de uno de ellos, eran homocigotos DQ2.5, el otro individuo era DQ2.2/DQ7, es decir, DQ2 en trans. Estos resultados sugieren la existencia de diferencias en la expresión de GILT dependiendo del genotipo HLA de los pacientes, confirman alteraciones de GILT relacionadas con la enfermedad celíaca y determinan que el efecto que GILT pudiera estar causando podría relacionarse, más con defectos en su expresión que con el polimorfismo rs11554159.

Un estudio llevado a cabo en población inglesa sobre esclerosis múltiple, muestra la asociación de esta enfermedad con el SNP rs11554159. La serie en la que se han basado estaba compuesta por 4234 pacientes, 2983 controles y 2053 conjuntos de padre-madre-hijo (Ban et al. 2009). El p-valor alcanzado en el estudio es de 0,00022, inferior al obtenido en nuestros análisis, lo que hace suponer que el tamaño de nuestra serie probablemente haya sido la causa principal de la detección de una asociación débil, aunque lo suficientemente grande como para tener un poder que aporta credibilidad a nuestro estudio. Aún así, funcionalmente, este polimorfismo no ha mostrado en nuestros experimentos, ser la causa de la asociación de GILT con la enfermedad celíaca.

GILT interacciona, en los MIICs, con determinadas variantes de las moléculas HLA-DR y en concreto con el alelo HLA-DRB1*03 con la que se une específicamente por su extremo N-terminal (Arunachalam et al. 1998). El alelo HLA-DRB1*03 forma parte del haplotipo DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (DRB1*03-DQ2.5), fuertemente conservado y presente en los pacientes celíacos, lo que concuerda con las observaciones de la expresión de GILT en biopsias de pacientes con este genotipo.

¿Qué implicación tendría GILT en la enfermedad celíaca?

GILT y la respuesta inmune innata:

La función tiol-reductasa es esencial para la presentación de determinados epítomos restringidos a moléculas HLA de clase II. La expresión de GILT se induce tras la diferenciación, dependiente de los TLR4 (*toll-like receptor 4*), de células promonocíticas en macrófagos

(Hastings et al. 2006). TLR4 es el receptor principal desencadenante de la respuesta innata hacia las proteínas de los cereales y está vinculado a MyD88, el transductor de señales que provoca la síntesis de zonulina (Schuppan et al. 2009; Thomas et al. 2006). La inducción de GILT depende de citoquinas proinflamatorias como TNF (*tumor necrosis factor*) e IL-1B (interleuquina-1B), sugiriendo un papel de GILT en la respuesta inmune innata (Lackman et al. 2007), con lo que GILT podría estar participando en la respuesta innata que se da en la enfermedad celíaca.

GILT y la respuesta inmune adquirida:

Existe la teoría de que la unión gliadina-transglutaminasa forma neoepítomos responsables de la aparición de los anticuerpos anti-transglutaminasa. Se sabe que los péptidos inmunogénicos de la gliadina se unen a la enzima transglutaminasa formando fuertes complejos covalentes que podrían explicar la aparición de estos anticuerpos en los pacientes celíacos (Sollid et al. 1997), pero para ello, el péptido deamidado e inmunogénico debería haber seguido, formando parte del complejo gliadina-transglutaminasa, la ruta endocítica y aquí sería donde intervendría GILT. En un primer momento, pensamos en GILT como un gen candidato por los cambios en su expresión inducidos por la toxina del cólera tal y como sucediera en el caso de la zonulina (Royae et al. 2006) y por su implicación en el procesamiento de antígenos. Pensamos que de alguna manera, los pacientes celíacos tendrían mermada la actividad de GILT o eran portadores de algún polimorfismo en su secuencia que hiciera que el procesamiento de antígenos estuviera alterado, por lo que no podría procesar bien el complejo gliadina-transglutaminasa, ocasionando péptidos antigénicos altamente reactivos.

En este sentido, estudiamos dos polimorfismos diana de GILT, encontrando una débil asociación genética con una mutación no sinónima adyacente a su centro activo. Profundizando en la naturaleza de GILT, hemos comprobado que está muy relacionado con la molécula DRB1*03. ¿Qué importancia tiene esta relación?

Las células epiteliales de la mucosa intestinal tienen un papel fundamental en el transporte de la gliadina hacia compartimentos HLA-DR positivos donde será procesada, lo que precede a la presentación de los péptidos antigénicos a los linfocitos T específicos (Zimmer et al. 1995). Los enterocitos tienen la capacidad de procesar y permitir el paso transcelular de los antígenos alimentarios hacia el espacio paracelular. Un estudio muy reciente ha demostrado que las moléculas HLA-DR, al contrario que las HLA-DQ, son necesarias en el proceso de inducción a la tolerancia alimentaria y que son capaces de presentar péptidos de gliadina procesados en el enterocito por la ruta de los endosomas tardíos (Zimmer et al. 2010). GILT, por su localización en endosomas HLA-DR positivos, podría estar implicado en el procesamiento del péptido de gliadina. Una alteración en la producción de GILT podría ser la causa de que los péptidos no fueran correctamente procesados o de la acumulación de gliadina en compartimentos subcelulares de los enterocitos de pacientes celíacos, tal como se ha descrito (Zimmer et al. 1995). En este trabajo de tesis se ha demostrado que GILT se encuentra disminuida en individuos HLA-DRB1*03.

Conocemos cómo actúa la molécula DQ en los pacientes celíacos, pero habría que plantearse cuestiones como: cuál es el verdadero efecto de ser portador DRB1*03; si es ésta la molécula causante de la disminución de la concentración de GILT; si es la responsable de la intolerancia alimentaria de los pacientes celíacos o si el pequeño efecto genético causado por otros genes en los pacientes celíacos, tendría sentido si no estuvieran relacionados, de alguna manera, con las moléculas del sistema HLA.

VI. CONCLUSIONES

1. Los polimorfismos rs1800629, localizado en la región promotora de *TNF α* y rs909253 localizado en *LT α* , incluidos ambos en la región CELIAC1, están asociados a la enfermedad celíaca en la población de la Comunidad Valenciana. Sin embargo, es muy probable que esta asociación se deba al desequilibrio de ligamiento existente entre éstos y los genes HLA localizados en la misma región.
2. La presencia del alelo rs1800629A (-308A), asociado a alteraciones en la secreción de *TNF α* , en el haplotipo ancestral 8.1, altamente conservado en los pacientes celíacos, podría ser la causa del aumento del riesgo genético a padecer la enfermedad en los individuos DQ2 codificado en *cis* frente a los individuos DQ2 codificado en *trans*.
3. El polimorfismo rs231775A (c.49A) de *CTLA4* de la región CELIAC3 está asociado a la enfermedad celíaca en la población de la Comunidad Valenciana, al igual que sucede en otras poblaciones de origen europeo.
4. El estudio de los polimorfismos -1147, rs3087243 (CT60), rs11571319 (CT61), en el gen *CTLA4* y rs10183087 (c.602) en el gen *ICOS*, localizados en la región CELIAC3 confirma, en población de la Comunidad Valenciana, la ausencia de asociación con la enfermedad celíaca en todos ellos, así como de los haplotipos en los que se transmiten.
5. Los polimorfismos *D19S899* y rs2305767 localizados en el gen *MYO9B*, incluido en la región CELIAC4, no están asociados a la enfermedad celíaca en la población de la Comunidad Valenciana.
6. El polimorfismo microsatélite de la región promotora de *FOXP3* no está asociado a la enfermedad celíaca en la población de la Comunidad Valenciana, coincidiendo con otras poblaciones de origen caucásico y al contrario de lo que sucede en población asiática, por lo que dicha asociación está marcada por las diferencias genéticas poblacionales.
7. Por primera vez se ha descrito la relación del gen *GILT* con la enfermedad celíaca. *GILT* se localiza en la región CELIAC4. El

VI. Conclusiones

polimorfismo rs11554159 localizado en el segundo exón de *GILT* provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Este polimorfismo muestra una débil asociación a la enfermedad celíaca en nuestra población.

8. El cambio R76Q de *GILT* no provoca alteraciones en la localización de la proteína, de modo que ésta sigue la ruta endocítica y de secreción al medio extracelular independientemente del polimorfismo.
9. Los estudios funcionales indican que el polimorfismo R76Q no da lugar a cambios en la función de la proteína, no influyendo el cambio de carga del aminoácido en el centro activo de *GILT* y no alterando su capacidad de reducción de puentes disulfuro.
10. Los estudios de expresión en biopsias humanas apoyan la interacción de *GILT* con las moléculas HLA de clase II. *GILT* tiene disminuida su expresión en individuos de elevado riesgo genético de enfermedad celíaca, concretamente en individuos portadores del haplotipo DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01. La disminución de la expresión de *GILT* condicionada por el genotipo HLA implicaría una alteración en la capacidad del procesamiento de antígeno que podría estar vinculada a todas las enfermedades autoinmunes asociadas a este genotipo.
11. Los estudios genéticos en la enfermedad celíaca muestran una discreta asociación en las regiones CELIAC no HLA, CELIAC3 y CELIAC4, si bien en genes distintos a los descritos en otras poblaciones. El efecto de estos genes en la heredabilidad de la EC está aún por confirmar y determinar.

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

- Achkar JP, Duerr R (2008) The expanding universe of inflammatory bowel disease genetics. *Curr Opin Gastroenterol* 24: 429-34
- Alper CA, Awdeh Z, Yunis EJ (1992) Conserved, extended MHC haplotypes. *Exp Clin Immunogenet* 9: 58-71
- Alper CA, Raum D, Karp S, Awdeh ZL, Yunis EJ (1983) Serum complement 'supergenes' of the major histocompatibility complex in man (complotypes). *Vox Sang* 45: 62-7
- Aly TA, Eller E, Ide A, Gowan K, Babu SR, Erlich HA, Rewers MJ, Eisenbarth GS, Fain PR (2006) Multi-SNP analysis of MHC region: remarkable conservation of HLA-A1-B8-DR3 haplotype. *Diabetes* 55: 1265-9
- Amundsen SS, Naluai AT, Ascher H, Ek J, Gudjonsdottir AH, Wahlstrom J, Lie BA, Sollid LM (2004) Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens* 64: 593-9
- Antunes H (2002) First study on the prevalence of celiac disease in a Portuguese population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34: 240
- Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM (2002) Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123: 803-9
- Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J (2004) NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 5: 417-25
- Arunachalam B, Pan M, Cresswell P (1998) Intracellular formation and cell surface expression of a complex of an intact lysosomal protein and MHC class II molecules. *J Immunol* 160: 5797-806
- Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P (2000) Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 745-50

B

- Babron MC, Nilsson S, Adamovic S, Naluai AT, Wahlstrom J, Ascher H, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J, Greco L, Clerget-Darpoux F (2003)

VII. Bibliografia

- Meta and pooled analysis of European coeliac disease data. *Eur J Hum Genet* 11: 828-34
- Ban M, Goris A, Lorentzen AR, Baker A, Mihalova T, Ingram G, Booth DR, Heard RN, Stewart GJ, Bogaert E, Dubois B, Harbo HF, Celius EG, Spurkland A, Strange R, Hawkins C, Robertson NP, Dudbridge F, Wason J, De Jager PL, Hafler D, Rioux JD, Ivinson AJ, McCauley JL, Pericak-Vance M, Oksenberg JR, Hauser SL, Sexton D, Haines J, Sawcer S, Compston A (2009) Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet* 17: 1309-13
- Baranzini SE (2009) The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective. *Curr Opin Immunol* 21: 596-605
- Bardella MT, Fredella C, Saladino V, Trovato C, Cesana BM, Quatrini M, Prampolini L (2005) Gluten intolerance: gender- and age-related differences in symptoms. *Scand J Gastroenterol* 40: 15-9
- Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T (2003) A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 55: 149-56
- Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA (2000) Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 30: 3707-17
- Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Ferguson A, Godkin A, Hogberg L, Holmes G, Hosie KB, Howdle PD, Jenkins H, Jewell D, Johnston S, Kennedy NP, Kerr G, Kumar P, Logan RF, Love AH, Marsh M, Mulder CJ, Sjoberg K, Stenhammer L, Walker-Smith J, Marossy AM, Houlston RS (1999) Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet* 36: 687-90
- Bingley PJ, Williams AJ, Norcross AJ, Unsworth DJ, Lock RJ, Ness AR, Jones RW (2004) Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study. *Bmj* 328: 322-3
- Bjornvold M, Amundsen SS, Stene LC, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Njolstad PR, Ek J, Ascher H, Gudjonsdottir AH, Lie BA, Skinningsrud B, Akselsen HE, Ronningen KS, Sollid LM, Undlien DE (2006) FOXP3 polymorphisms in type 1 diabetes and coeliac disease. *J Autoimmun* 27: 140-4
- Bonamico M, Mariani P, Danesi HM, Crisogianni M, Failla P, Gemme G, Quartino AR, Giannotti A, Castro M, Balli F, Lecora M, Andria G,

- Guariso G, Gabrielli O, Catassi C, Lazzari R, Balocco NA, De Virgiliis S, Culasso F, Romano C (2001) Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients: a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33: 139-43
- Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS (1996) Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 43: 456-63
- Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C, Troncone R, Spampinato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L (2007) HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut* 56: 1054-9
- Brophy K, Ryan AW, Thornton JM, Abuzakouk M, Fitzgerald AP, McLoughlin RM, O'Morain C, Kennedy NP, Stevens FM, Feighery C, Kelleher D, McManus R (2006) Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. *Genes Immun* 7: 19-26
- Bruewer M, Hopkins AM, Hobert ME, Nusrat A, Madara JL (2004) RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C327-35.

C

- Capilla A, Donat E, Planelles D, Espinos C, Ribes-Koninckx C, Palau F (2007) Genetic analyses of celiac disease in a Spanish population confirm association with CELIAC3 but not with CELIAC4. *Tissue Antigens* 70: 324-9
- Cario E, Podolsky DK (2003) Role of the toll like receptors in innate immunity of the intestine. In: Hecht A (ed) *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cells*
- Carlsson AK, Axelsson IE, Borulf SK, Bredberg AC, Ivarsson SA (2001) Serological screening for celiac disease in healthy 2.5-year-old children in Sweden. *Pediatrics* 107: 42-5
- Carter C, Sheldon W, Walker C (1959) The inheritance of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 23: 266-78
- Casellas F (2006) Enfermedad Celíaca. *Med Clin (Barc.)* 126: 137-42

VII. Bibliografia

- Catassi C, Abu-Zakry M, Kryszak D, Fasano A (2004) Celiac disease among school children in Egypt: Results of a Pilot study. Proceedings of the eleventh international symposium on coeliac disease
Belfast, Northern Ireland
- Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, Alessandrini S, Iwanejko G, Domenici R, Mei E, Miano A, Marani M, Bottaro G, Spina M, Dotti M, Montanelli A, Barbato M, Viola F, Lazzari R, Vallini M, Guariso G, Plebani M, Cataldo F, Traverso G, Ventura A, et al. (1996) The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl* 412: 29-35
- Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL (1994) Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 343: 200-3
- Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, Frijia M, Bearzi I, Vizzoni L (1999) Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 354: 647-8
- Cavanaugh J (2006) NOD2: ethnic and geographic differences. *World J Gastroenterol* 12: 3673-7
- Cilleruelo ML, Román E, Jiménez J, Rivero MJ, Barrio J, Castaño A, Campelo O, Fernández A (2002) Enfermedad celíaca silente: explorando el iceberg en población escolar. *An Esp pediatr* 57: 321-6
- Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 52: 218-23
- Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Renoux C, Percopo S, Bouguerra F, Babron MC, Djilali-Saiah I, Caillat-Zucman S, Clerget-Darpoux F, Greco L, Serre JL (1999) Linkage and association study of the CTLA-4 region in coeliac disease for Italian and Tunisian populations. *Tissue Antigens* 54: 527-30
- Collin P, Maki M, Keyrilainen O, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A (1992) Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 27: 367-71
- Cope AP (1998) Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol* 10: 669-76
- Corazza GR, Andreani ML, Biagi F, Corrao G, Pretolani S, Giulianelli G, Ghironzi G, Gasbarrini G (1997) The smaller size of the 'coeliac iceberg' in adults. *Scand J Gastroenterol* 32: 917-9

- Couignoux S, Ocmant A, Cotel D (2000) Prevalence of adult coeliac disease in Northern France. *Gut* 47: (suppl III):A196.
- Counsell CE, Taha A, Ruddell WS (1994) Coeliac disease and autoimmune thyroid disease. *Gut* 35: 844-6
- Cresswell P (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12: 259-93
- Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C (1997) High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol* 92: 2210-2
- Cucca F, Goy JV, Kawaguchi Y, Esposito L, Merriman ME, Wilson AJ, Cordell HJ, Bain SC, Todd JA (1998) A male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome Xp in MHC HLA-DR3-positive patients. *Nat Genet* 19: 301-2
- Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB (2001) Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 357: 1842-7
- Christen U, von Herrath MG (2004) Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol* 40: 1113-20

D

- David TJ, Ajdukiewicz AB (1975) A family study of coeliac disease. *J Med Genet* 12: 79-82
- Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, Tay G, Hui J, Cattley S, Martinez P, Kulski J (1999) Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev* 167: 275-304
- De Palma G, Capilla A, Nadal I, Nova E, Pozo T, Varea V, Polanco I, Castillejo G, Lopez A, Garrote JA, Calvo C, Garcia-Novo MD, Cilleruelo ML, Ribes-Koninckx C, Palau F, Sanz Y (2009) Interplay Between Human Leukocyte Antigen Genes and the Microbial Colonization Process of the Newborn Intestine. *Curr Issues Mol Biol* 12: 1-10
- Dema B, Martinez A, Fernandez-Arquero M, Maluenda C, Polanco I, de la Concha EG, Urcelay E, Nunez C (2009) Association of IL18RAP and CCR3 with coeliac disease in the Spanish population. *J Med Genet* 46: 617-9
- Deng H, Apple R, Clare-Salzler M, Trembleau S, Mathis D, Adorini L, Sercarz E (1993) Determinant capture as a possible mechanism of

VII. Bibliografia

- protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease. *J Exp Med* 178: 1675-80
- Dicke W (1950) Coeliac Disease. Investigations of the harmful effects of certain types of cereal on celiac diseases, Utrecht University
- Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH (1953) Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr* 42: 34-42
- Ding YC, Weizman Z, Yerushalmi B, Elbedour K, Garner CP, Neuhausen SL (2008) An autosomal genome-wide screen for celiac disease in Bedouin families. *Genes Immun* 9: 81-6
- Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougnot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S (1998) CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut* 43: 187-9
- Donat E, Planelles D, Capilla-Villanueva A, Montoro JA, Palau F, Ribes-Koninckx C (2009) 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* 73: 255-61
- Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, Herwig J, Usadel KH, Badenhop K (1997) CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 143-6
- Dudbridge F (2003) Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25: 115-21

F

- Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W (1972) Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Invest* 51: 1602-5
- Farrell RJ, Kelly CP (2001) Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol* 96: 3237-46
- Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K (2003) Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 163: 286-92
- Fasano A, Fiorentini C, Donelli G, Uzzau S, Kaper JB, Margaretten K, Ding X, Guandalini S, Comstock L, Goldblum SE (1995) Zonula occludens

- toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. *J Clin Invest* 96: 710-20
- Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE (2000) Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 355: 1518-9
- Fasano A, Shea-Donohue T (2005) Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2: 416-22
- Feldmann M, Maini RN (2001) Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 19: 163-96
- Fos C, Salles A, Lang V, Carrette F, Audebert S, Pastor S, Ghiotto M, Olive D, Bismuth G, Nunes JA (2008) ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* 181: 1969-77
- Franco JL (2009) Instituto Nacional de Investigaciones del Genoma Humano. Wikipedia
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, , Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-61
- Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Assunta B, Plantone D, Cammarota G, Tonali PA, Batocchi AP (2009) Increased CD4+CD25+Foxp3+ T cells in peripheral blood of celiac disease patients: correlation with dietary treatment. *Hum Immunol* 70: 430-5

G

- Garcia Novo MD, Garfia C, Acuna Quiros MD, Asensio J, Zancada G, Barrio Gutierrez S, Manzanares J, Solis Herruzo JA (2007) [Prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors in the autonomous community of Madrid]. *Rev Esp Enferm Dig* 99: 337-42
- Garner CP, Ding YC, Steele L, Book L, Leiferman K, Zone JJ, Neuhausen SL (2007) Genome-wide linkage analysis of 160 North American families with celiac disease. *Genes Immun* 8: 108-14

VII. Bibliografia

- Garner CP, Murray JA, Ding YC, Tien Z, van Heel DA, Neuhausen SL (2009) Replication of celiac disease UK genome-wide association study results in a US population. *Hum Mol Genet* 18: 4219-25
- Garrote JA, Arranz E, Telleria JJ, Castro J, Calvo C, Blanco-Quiros A (2002) TNF alpha and LT alpha gene polymorphisms as additional markers of celiac disease susceptibility in a DQ2-positive population. *Immunogenetics* 54: 551-5
- Gee S (1888) On the coeliac affection. *St. Bartholomew's Hosp Rep* 24: 17-20
- Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG (2006) Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol* 177: 4178-86
- Giordano M, Marano C, Mellai M, Limongelli MG, Bolognesi E, Clerget-Darpoux F, Momigliano-Richiardi P, Greco L (2006) A family-based study does not confirm the association of MYO9B with celiac disease in the Italian population. *Genes Immun* 7: 606-8
- Goddard CJ, Gillett HR (2006) Complications of coeliac disease: are all patients at risk? *Postgrad Med J* 82 (973): 705-12. 82: 705-12
- Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S, Castelletto R, Echeverria R, Sugai E, Vazquez H, Maurino E, Bai JC (2001) Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 96: 2700-4
- Greco L, Babron MC, Corazza GR, Percopo S, Sica R, Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Zavattari P, Momigliano-Richiardi P, Casari G, Gasparini P, Tosi R, Mantovani V, De Virgiliis S, Iacono G, D'Alfonso A, Selinger-Leneman H, Lemainque A, Serre JL, Clerget-Darpoux F (2001) Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families. *Ann Hum Genet* 65: 35-41
- Greco L, Corazza G, Babron MC, Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Percopo S, Zavattari P, Bouguerra F, Dib C, Tosi R, Troncone R, Ventura A, Mantavoni W, Magazzu G, Gatti R, Lazzari R, Giunta A, Perri F, Iacono G, Cardi E, de Virgiliis S, Cataldo F, De Angelis G, Musumeci S, Clerget-Darpoux F, et al. (1998) Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet* 62: 669-75
- Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA (2002) The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 50: 624-8

- Green PHR, Stavropoulos SN, Panagi SG, Goldstein SL, McMahon DJ, Absan H, Neugut AI (2001) Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. *Am J Gastroenterol* 96: 126-31
- Groschwitz KR, Hogan SP (2009) Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 124: 3-20; quiz 21-2

H

- Hadithi M, von Blomberg BM, Crusius JB, Bloemena E, Kostense PJ, Meijer JW, Mulder CJ, Stehouwer CD, Pena AS (2007) Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med* 147: 294-302.
- Haimila K, Einarsdottir E, de Kauwe A, Koskinen LL, Pan-Hammarstrom Q, Kaartinen T, Kurppa K, Ziberna F, Not T, Vatta S, Ventura A, Korponay-Szabo IR, Adany R, Pocsai Z, Szeles G, Dukas E, Kaukinen K, Maki M, Koskinen S, Partanen J, Hammarstrom L, Saavalainen P (2009) The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Genes Immun* 10: 151-61
- Haimila K, Smedberg T, Mustalahti K, Maki M, Partanen J, Holopainen P (2004) Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes Immun* 5: 85-92
- Haque MA, Li P, Jackson SK, Zarour HM, Hawes JW, Phan UT, Maric M, Cresswell P, Blum JS (2002) Absence of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase in melanomas disrupts T cell recognition of select immunodominant epitopes. *J Exp Med* 195: 1267-77
- Hastings KT, Lackman RL, Cresswell P (2006) Functional requirements for the lysosomal thiol reductase GILT in MHC class II-restricted antigen processing. *J Immunol* 177: 8569-77
- Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C (2002) Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G996-G1003
- Hernandez-Charro B, Donat E, Miner I, Aranburu E, Sanchez-Valverde F, Ramos-Arroyo MA (2008) Modifying effect of HLA haplotypes located trans to DQB1*02-DRB1*03 in celiac patients of Southern Europe. *Tissue Antigens* 71: 213-8

VII. Bibliografia

- Hirschhorn JN, Daly MJ (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6: 95-108
- Holmgren A (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 254: 9627-32
- Holopainen P, Arvas M, Sistonen P, Mustalahti K, Collin P, Maki M, Partanen J (1999) CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens* 53: 470-5
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-61
- Houlston RS, Ford D (1996) Genetics of coeliac disease. *QJM* 89: 737-43
- Houlston RS, Tomlinson IP, Ford D, Seal S, Marossy AM, Ferguson A, Holmes GK, Hosie KB, Howdle PD, Jewell DP, Godkin A, Kerr GD, Kumar P, Logan RF, Love AH, Johnston S, Marsh MN, Mitton S, O'Donoghue D, Roberts A, Walker-Smith JA, Stratton MF (1997) Linkage analysis of candidate regions for coeliac disease genes. *Hum Mol Genet* 6: 1335-9
- Hovell CJ, Collett JA, Vautier G, Cheng AJ, Sutanto E, Mallon DF, Olynyk JK, Cullen DJ (2001) High prevalence of coeliac disease in a population-based study from Western Australia: a case for screening? *Med J Aust* 175: 247-50
- Hunt KA, McGovern DP, Kumar PJ, Ghosh S, Travis SP, Walters JR, Jewell DP, Playford RJ, van Heel DA (2005) A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur J Hum Genet* 13: 440-4
- Hunt KA, Monsuur AJ, McArdle WL, Kumar PJ, Travis SP, Walters JR, Jewell DP, Strachan DP, Playford RJ, Wijmenga C, van Heel DA (2006) Lack of association of MYO9B genetic variants with coeliac disease in a British cohort. *Gut* 55: 969-72
- Hunt KA, van Heel DA (2009) Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut* 58: 473-6
- Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, Romanos J, Dinesen LC, Ryan AW, Panesar D, Gwilliam R, Takeuchi F, McLaren WM, Holmes GK, Howdle PD, Walters JR, Sanders DS, Playford RJ, Trynka G, Mulder CJ, Mearin ML, Verbeek WH, Trimble V, Stevens FM, O'Morain C, Kennedy NP, Kelleher D, Pennington DJ, Strachan DP, McArdle WL, Mein CA, Wapenaar MC, Deloukas P, McGinnis R, McManus R, Wijmenga C, van Heel DA (2008) Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet* 40: 395-402

- Huppa JB, Davis MM (2003) T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3: 973-83
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397: 263-6

I

- Ihara K, Ahmed S, Nakao F, Kinukawa N, Kuromaru R, Matsuura N, Iwata I, Nagafuchi S, Kohno H, Miyako K, Hara T (2001) Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. *Immunogenetics* 53: 447-54
- Iltanen S, Collin P, Korpela M, Holm K, Partanen J, Polvi A, Maki M (1999) Celiac disease and markers of celiac disease latency in patients with primary Sjogren's syndrome. *Am J Gastroenterol* 94: 1042-6

J

- Jensen PE (1991) Reduction of disulfide bonds during antigen processing: evidence from a thiol-dependent insulin determinant. *J Exp Med* 174: 1121-30
- Jensen PE (1995) Antigen unfolding and disulfide reduction in antigen presenting cells. *Semin Immunol* 7: 347-53
- Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, Ueda H, Cordell HJ, Eaves IA, Dudbridge F, Twells RC, Payne F, Hughes W, Nutland S, Stevens H, Carr P, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gough SC, Clayton DG, Todd JA (2001) Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 29: 233-7

K

- Kanangat S, Blair P, Reddy R, Daheshia M, Godfrey V, Rouse BT, Wilkinson E (1996) Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol* 26: 161-5
- Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA (1996) CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 184: 783-8

VII. Bibliografia

- Keuning JJ, Pena AS, van Leeuwen A, van Hooff JP, va Rood JJ (1976) HLA-DW3 associated with coeliac disease. *Lancet* 1: 506-8
- Khoury MJ (1994) Case-parental control method in the search for disease-susceptibility genes. *Am J Hum Genet* 55: 414-5
- King AL, Moodie SJ, Fraser JS, Curtis D, Reid E, Dearlove AM, Ciclitira PJ (2003) Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA4 gene region. *Eur J Immunogenet* 30: 427-32
- King AL, Moodie SJ, Fraser JS, Curtis D, Reid E, Dearlove AM, Ellis HJ, Ciclitira PJ (2002) CTLA-4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. *J Med Genet* 39: 51-4
- Korponay-Szabo IR, Kovacs JB, Czinner A, Goracz G, Vamos A, Szabo T (1999) High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28: 26-30
- Kosaki K, Udaka T, Okuyama T (2005) DHPLC in clinical molecular diagnostic services. *Mol Genet Metab* 86: 117-23
- Koskinen LL, Einarsdottir E, Dukes E, Heap GA, Dubois P, Korponay-Szabo IR, Kaukinen K, Kurppa K, Zibera F, Vatta S, Not T, Ventura A, Sistonen P, Adany R, Pocsai Z, Szeles G, Maki M, Kere J, Wijmenga C, van Heel DA, Saavalainen P (2009a) Association study of the IL18RAP locus in three European populations with coeliac disease. *Hum Mol Genet* 18: 1148-55
- Koskinen LL, Einarsdottir E, Korponay-Szabo IR, Kurppa K, Kaukinen K, Sistonen P, Pocsai Z, Szeles G, Adany R, Maki M, Kere J, Saavalainen P (2009b) Fine mapping of the CELIAC2 locus on chromosome 5q31-q33 in the Finnish and Hungarian populations. *Tissue Antigens* 74: 408-16
- Kotsa K, Watson PF, Weetman AP (1997) A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46: 551-4
- Kunkel LM, Tantravahi U, Eisenhard M, Latt SA (1982) Regional localization on the human X of DNA segments cloned from flow sorted chromosomes. *Nucleic Acids Res* 10: 1557-78
- Kupper C (2005) "Dietary guidelines and implementation for celiac disease". *Gastroenterology* 128 (4 Suppl 1): S121-7 128: S:121-7

L

- Lackman RL, Jamieson AM, Griffith JM, Geuze H, Cresswell P (2007) Innate immune recognition triggers secretion of lysosomal enzymes by macrophages. *Traffic* 8: 1179-89
- Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A (2008) Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135: 194-204 e3
- Lancaster A, Nelson MP, Meyer D, Thomson G, Single RM (2003) PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput*: 514-25
- Lio D, Candore G, Colombo A, Colonna Romano G, Gervasi F, Marino V, Scola L, Caruso C (2001) A genetically determined high setting of TNF-alpha influences immunologic parameters of HLA-B8,DR3 positive subjects: implications for autoimmunity. *Hum Immunol* 62: 705-13
- Liu J, Juo SH, Holopainen P, Terwilliger J, Tong X, Grunn A, Brito M, Green P, Mustalahti K, Maki M, Gilliam TC, Partanen J (2002) Genomewide linkage analysis of celiac disease in Finnish families. *Am J Hum Genet* 70: 51-9
- Lundin KE, Sollid LM, Qvigstad E, Markussen G, Gjertsen HA, Ek J, Thorsby E (1990) T lymphocyte recognition of a celiac disease-associated cis- or trans-encoded HLA-DQ alpha/beta-heterodimer. *J Immunol* 145: 136-9
- Luster AD, Weinshank RL, Feinman R, Ravetch JV (1988) Molecular and biochemical characterization of a novel gamma-interferon-inducible protein. *J Biol Chem* 263: 12036-43

M

- Macdonald WC, Dobbins WO, 3rd, Rubin CE (1965) Studies of the Familial Nature of Celiac Sprue Using Biopsy of the Small Intestine. *N Engl J Med* 272: 448-56
- Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Hopfl P, Knip M (2003) Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 348: 2517-24

VII. Bibliografía

- Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, Coto I, Hugot JP, Ascher H, Sollid LM, Greco L, Clerget-Darpoux F (2004) HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 63: 562-7
- Maric M, Arunachalam B, Phan UT, Dong C, Garrett WS, Cannon KS, Alfonso C, Karlsson L, Flavell RA, Cresswell P (2001) Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science* 294: 1361-5
- Marsh MN (1992) Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102: 330-54
- Martin-Pagola A, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Bilbao JR, Ortiz L, Zubillaga P, Castano L (2003) No association of CTLA4 gene with celiac disease in the Basque population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37: 142-5
- Matter K, Balda MS (2003) Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30: 228-34
- McDevitt H, Munson S, Ettinger R, Wu A (2002) Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S141-52
- Mearin ML, Biemond I, Pena AS, Polanco I, Vazquez C, Schreuder GT, de Vries RR, van Rood JJ (1983) HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut* 24: 532-7
- Méndez V, González MV, Velázquez S, Misa A, Jasinski C, Pigni S, Caballero G, Tanzi MN, Rodríguez A (2004) Prevalence of coeliac disease in Uruguayan children: preliminary report. *Proceedings of the eleventh International symposium on Coeliac Disease, Belfast, Northern Ireland*
- Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH (1991) Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 173: 209-19
- Miller A, Lider O, Weiner HL (1991) Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 174: 791-8

- Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zhernakova A, Bevova MR, Strengman E, Franke L, van't Slot R, van Belzen MJ, Lavrijsen IC, Diosdado B, Daly MJ, Mulder CJ, Mearin ML, Meijer JW, Meijer GA, van Oort E, Wapenaar MC, Koeleman BP, Wijmenga C (2005) Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet* 37: 1341-4
- Mora B, Bonamico M, Indovina P, Megiorni F, Ferri M, Carbone MC, Cipolletta E, Mazzilli MC (2003) CTLA-4 +49 A/G dimorphism in Italian patients with celiac disease. *Hum Immunol* 64: 297-301
- Mouritsen S, Meldal M, Werdelin O, Hansen AS, Buus S (1992) MHC molecules protect T cell epitopes against proteolytic destruction. *J Immunol* 149: 1987-93
- Mustalahti K (2006) Unusual manifestations of celiac disease. *Indian J Pediatr* 73: 711-6

N

- Naluai AT, Nilsson S, Gudjonsdottir AH, Louka AS, Ascher H, Ek J, Hallberg B, Samuelsson L, Kristiansson B, Martinsson T, Nerman O, Sollid LM, Wahlstrom J (2001) Genome-wide linkage analysis of Scandinavian affected sib-pairs supports presence of susceptibility loci for celiac disease on chromosomes 5 and 11. *Eur J Hum Genet* 9: 938-44
- Naluai AT, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjonsdottir AH, Ascher H, Ek J, Hallberg B, Kristiansson B, Martinsson T, Nerman O, Sollid LM, Wahlstrom J (2000) The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens* 56: 350-5
- Neuhausen SL, Feolo M, Farnham J, Book L, Zane JJ (2001) Linkage analysis of HLA and candidate genes for celiac disease in a North American family-based study. *BMC Med Genet* 2: 12
- Newton-Cheh C, Hirschhorn JN (2005) Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res* 573: 54-69
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome

VII. Bibliografia

2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* 5: 1075-80

Nistico L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzu G, Momigliano-Richiardi P, Greco L, Stazi MA (2006) Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 55: 803-8

Nunez C, Marquez A, Varade J, Martinez A, Polanco I, Maluenda C, Fernandez-Arquero M, de la Concha EG, Urcelay E (2006) No evidence of association of the MYO9B polymorphisms with celiac disease in the Spanish population. *Tissue Antigens* 68: 489-92

O

Oefner PJ (2000) Allelic discrimination by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 739: 345-55

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2766-70

P

Patel DD (2001) Escape from tolerance in the human X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome and the Scurfy mouse. *J Clin Invest* 107: 155-7

Perl A (2004) Pathogenesis and spectrum of autoimmunity. *Methods Mol Med* 102: 1-8

Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, Apollonio I, Gemme G, Mazzilli MC (1997) Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 61: 307-17

Phan UT, Arunachalam B, Cresswell P (2000) Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Maturation, activity, and mechanism of action. *J Biol Chem* 275: 25907-14

Phan UT, Lackman RL, Cresswell P (2002) Role of the C-terminal propeptide in the activity and maturation of gamma -interferon-inducible

- lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12298-303
- Polanco I (2008) Grupo-de-Trabajo: Diagnóstico Precoz de la Enfermedad Celíaca
- Polanco I, Ribes-Koninckx C (1999) Enfermedad Celíaca. *Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Pediatría. Gastroenterología, Hepatología y Nutrición*, vol 5, pp 47-54
- Polvi A, Maki M, Collin P, Partanen J (1998) TNF microsatellite alleles a2 and b3 are not primarily associated with celiac disease in the Finnish population. *Tissue Antigens* 51: 553-5
- Popat S, Hearle N, Hogberg L, Braegger CP, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Holmes GK, Howdle PD, Jenkins H, Johnston S, Kennedy NP, Kumar PJ, Logan RF, Marsh MN, Mulder CJ, Torinsson Naluai A, Sjoberg K, Stenhammar L, Walters JR, Jewell DP, Houlston RS (2002) Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 66: 125-37
- Post PL, Tyska MJ, O'Connell CB, Johung K, Hayward A, Mooseker MS (2002) Myosin-IXb is a single-headed and processive motor. *J Biol Chem* 277: 11679-83
- Purcell S, Cherny SS, Sham PC (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19: 149-50

Q

- Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM (2004) Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol* 173: 1757-62

R

- Rioux JD, Karinen H, Kocher K, McMahon SG, Karkkainen P, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, Pihlajamaki J, Naukkarinen A, Kosma VM, Daly MJ, Lander ES, Laakso M (2004) Genomewide search and association studies in a Finnish celiac disease population: Identification of a novel locus and replication of the HLA and CTLA4 loci. *Am J Med Genet A* 130A: 345-50

VII. Bibliografia

- Romanos J, Barisani D, Trynka G, Zhernakova A, Bardella MT, Wijmenga C (2009) Six new coeliac disease loci replicated in an Italian population confirm association with coeliac disease. *J Med Genet* 46: 60-3
- Rossi M, Maurano F, Luongo D, Fasano A, Uzzau S, Auricchio S, Troncone R (2002) Zonula occludens toxin (Zot) interferes with the induction of nasal tolerance to gliadin. *Immunol Lett* 81: 217-21
- Royae AR, Jong L, Mendis C, Das R, Jett M, Yang DC (2006) Cholera toxin induced novel genes in human lymphocytes and monocytes. *Mol Immunol* 43: 1267-74

S

- Sanchez E, Alizadeh BZ, Valdigem G, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, de Ramon E, Garcia A, Lopez-Nevot MA, Wijmenga C, Martin J, Koeleman BP (2007) MYO9B gene polymorphisms are associated with autoimmune diseases in Spanish population. *Hum Immunol* 68: 610-5
- Sanchez E, Rueda B, Orozco G, Oliver J, Vilchez JR, Paco L, Lopez-Nevot MA, Callejas JL, Sabio JM, Gomez-Garcia M, Nieto A, Delgado M, Martin J (2005) Analysis of a GT microsatellite in the promoter of the foxp3/scurfin gene in autoimmune diseases. *Hum Immunol* 66: 869-73
- Sandborn WJ, Hanauer SB (1999) Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis* 5: 119-33
- Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, Fasano A, Ventura A, Not T (2000) Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 95: 1253-7
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1213-28
- Schuppan D, Junker Y, Barisani D (2009) Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology* 137(6): 1912-33
- Schwartz RH (1992) Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71: 1065-8
- Seidl C, Donner H, Fischer B, Usadel KH, Seifried E, Kaltwasser JP, Badenhoop K (1998) CTLA4 codon 17 dimorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 51: 62-6

- Shamir R, Lerner A, Shinar E, Lahat N, Sobel E, Bar-or R, Kerner H, Eliakim R (2002) The use of a single serological marker underestimates the prevalence of celiac disease in Israel: a study of blood donors. *Am J Gastroenterol* 97: 2589-94
- Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297: 2275-9
- Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, Stuge TB, Gray GM, Lee PP, Khosla C (2006) Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol* 13: 649-58
- Sierra-Pérez E (2003) Epidemiología de la Enfermedad Celíaca. *Bol Pediatr* 43: 317-20
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E (1989) Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 169: 345-50
- Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE (1997) Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase--guilt by association? *Gut* 41: 851-2
- Sollid LM, Thorsby E (1993) HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 105: 910-22
- Sood A, Midha V, Sood N, Avasthi G, Sehgal A (2006) Prevalence of celiac disease among school children in Punjab, North India. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1622-5
- Spielman RS, Ewens WJ (1998) A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 62: 450-8
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506-16
- Stiles LN, Hosking MP, Edwards RA, Strieter RM, Lane TE (2006) Differential roles for CXCR3 in CD4+ and CD8+ T cell trafficking following viral infection of the CNS. *Eur J Immunol* 36: 613-22
- Strachan T, Read AP (1999) *Genética Molecular Humana*. BIOS Scientific publishers Limited
- Sudo N, Yu XN, Aiba Y, Oyama N, Sonoda J, Koga Y, Kubo C (2002) An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clin Exp Allergy* 32: 1112-6

VII. Bibliografia

T

- Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN (2006) Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol* 176: 2512-21
- Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3: 541-7
- Tosi R, Vismara D, Tanigaki N, Ferrara GB, Cicimarra F, Buffolano W, Follo D, Auricchio S (1983) Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clin Immunol Immunopathol* 28: 395-404
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4
- Tulp A, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, Pieters J (1994) Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369: 120-6

U

- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423: 506-11

V

- Van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, Bardoel AF, Mulder CJ, Pearson PL, Houwen RH, Wijmenga C (2003) A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology* 125: 1032-41
- van Belzen MJ, Mulder CJ, Zhernakova A, Pearson PL, Houwen RH, Wijmenga C (2004a) CTLA4 +49 A/G and CT60 polymorphisms in Dutch coeliac disease patients. *Eur J Hum Genet* 12: 782-5

- van Belzen MJ, Vrolijk MM, Meijer JW, Crusius JB, Pearson PL, Sandkuijl LA, Houwen RH, Wijmenga C (2004b) A genomewide screen in a four-generation Dutch family with celiac disease: evidence for linkage to chromosomes 6 and 9. *Am J Gastroenterol* 99: 466-71
- van Elburg RM, Uil JJ, Mulder CJ, Heymans HS (1993) Intestinal permeability in patients with coeliac disease and relatives of patients with coeliac disease. *Gut* 34: 354-7
- van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Barnardo MC, Bethel G, Holmes GK, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JR, Sanders DS, Howdle P, Swift J, Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P, Wijmenga C (2007) A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 39: 827-9
- van Heel DA, West J (2006) Recent advances in coeliac disease. *Gut* 55: 1037-46
- Volta U, Lenzi M, Lazzari R, Cassani F, Collina A, Bianchi FB, Pisi E (1985) Antibodies to gliadin detected by immunofluorescence and a micro-ELISA method: markers of active childhood and adult coeliac disease. *Gut* 26: 667-71

W

- Walker-Smith JA (1990) Management of infantile gastroenteritis. *Arch Dis Child* 65: 917-8
- Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A (2000) Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 113 Pt 24: 4435-40
- Weile B, Grodzinsky E, Skogh T, Jordal R, Cavell B, Krasilnikoff PA (1996) Screening Danish blood donors for antigliadin and antiendomysium antibodies. *Acta Paediatr Suppl* 412: 46
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3195-9
- Wolters VM, Alizadeh BZ, Weijerman ME, Zhernakova A, van Hoogstraten IM, Mearin ML, Wapenaar MC, Wijmenga C, Schreurs MW (2010) Intestinal barrier gene variants may not explain the increased levels

VII. Bibliografia

of antigliadin antibodies, suggesting other mechanisms than altered permeability. *Hum Immunol* 71: 392-6

Woolley N, Holopainen P, Ollikainen V, Mustalahti K, Maki M, Kere J, Partanen J (2002) A new locus for coeliac disease mapped to chromosome 15 in a population isolate. *Hum Genet* 111: 40-5

Z

Zavattari P, Deidda E, Pitzalis M, Zoa B, Moi L, Lampis R, Contu D, Motzo C, Frongia P, Angius E, Maioli M, Todd JA, Cucca F (2004) No association between variation of the FOXP3 gene and common type 1 diabetes in the Sardinian population. *Diabetes* 53: 1911-4

Zhong F, McCombs CC, Olson JM, Elston RC, Stevens FM, McCarthy CF, Michalski JP (1996) An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western counties of Ireland. *Nat Genet* 14: 329-33

Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, Buning J, Lerch MM, Ciclitira PC, Weber P, Naim HY (2010) Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut* 59: 300-10

Zimmer KP, Poremba C, Weber P, Ciclitira PJ, Harms E (1995) Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes. *Gut* 36: 703-9

Zipser RD, Farid M, Baisch D, Patel B, Patel D (2005) Physician awareness of celiac disease: a need for further education. *J Gen Intern Med* 20: 644-6

Publicaciones relacionadas con la Tesis

- **Capilla A**, Donat E, Planelles D, Espinós C, Ribes-Koninckx C, Palau. Genetic analyses of celiac disease in a Spanish population confirm association with CELIAC3 but not with CELIAC4. *Tissue Antigens*. 2007 Oct;70(4):324-9
- 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):255-61
- De Palma G, **Capilla A**, Nadal I, Nova E, Pozo T, Varea V, Polanco I, Castillejo G, López A, Garrote JA, Calvo C, García-Novo MD, Cilleruelo ML, Ribes-Koninckx C, Palau F, Sanz Y. Interplay between human leukocyte antigen genes and the microbial colonization process of the newborn intestine. *Curr Issues Mol Biol*. 2010;12(1):1-10

Esta Tesis ha sido financiada por:

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III.
Proyecto de Investigación PI020573

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ministerio de Educación y Ciencia
Proyecto Intramural de Frontera PROFICEL 200520F0092 y AGL2007-
66126-C03-03

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ministerio de Ciencia e Innovación
Proyecto SAF2006-01147