

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Estudios moleculares en enfermedad celíaca: hacia un mejor diagnóstico y conocimiento de la enfermedad

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Virginia Pascual Pascual

Directora

María Concepción Núñez Pardo de Vera

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Microbiología I

**ESTUDIOS MOLECULARES EN ENFERMEDAD CELÍACA: HACIA UN MEJOR
DIAGNÓSTICO Y CONOCIMIENTO DE LA ENFERMEDAD**

Memoria presentada por

Virginia Pascual Pascual

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Microbiología I

**ESTUDIOS MOLECULARES EN ENFERMEDAD CELÍACA: HACIA UN MEJOR
DIAGNÓSTICO Y CONOCIMIENTO DE LA ENFERMEDAD**

Memoria presentada por

Virginia Pascual Pascual

Bajo la dirección de la doctora

María Concepción Núñez Pardo de Vera

Madrid, 2016

ÍNDICE

Índice	5
Abreviaturas	9
Resumen/Summary	15
1) Resumen	17
2) Summary.....	23
Introducción	27
1) Definición y prevalencia	29
2) Etiología	29
1. Factores ambientales.....	30
2. Factores genéticos	31
3) Diagnóstico	45
1. Clínica.....	46
2. Serología	47
3. Genética HLA	49
4. Biopsia.....	51
5. Inmunofenotipaje de LIEs	53
6. Provocación con gluten	54
4) Inmunopatología	57
5) Tratamiento	61
Objetivos.....	63
Materiales y métodos.....	67
1) Sujetos de estudio	69
1. Estudios de expresión génica	69
2. Estudio de interacción génica.....	73
3. Estudio de provocación	74
2) Preparación de las muestras	79
1. Aislamiento de DNA de sangre periférica.....	79
2. Aislamiento de RNA de biopsias intestinales.	79
3. Aislamiento de LIEs de biopsias duodenales.	80
4. Suero de sangre periférica.....	80
3) Determinación de anticuerpos específicos en suero	80
4) Genotipado HLA.....	81
5) Genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)	81
6) Estudios de expresión génica	83

1. Genes seleccionados para el estudio de niños y adultos con EC y comparación con CU	84
2. Genes seleccionados para el estudio de pacientes EMA negativos.....	87
7) Estudios con citometría de flujo.....	87
1. Citometría de sangre periférica: estudio de provocación	87
2. Citometría de biopsia duodenal: inmunofenotipo de LIEs.....	88
8) Análisis estadísticos	88
1. Comparación de variables cuantitativas: estudios de expresión génica.....	88
2. Comparación de variables categóricas: estudio de expresión y estudio de interacción génica.	91
Resultados	93
1) Expresión génica en niños y adultos con EC.....	95
2) Expresión génica en pacientes celíacos EMA negativos.....	105
3) Estudio comparativo de la expresión génica intestinal entre EC y CU.....	109
1. Regiones de riesgo genético compartido entre EC y CU	109
2. Regiones de riesgo genético a EC	114
4) Estudio de interacción entre <i>C1orf106</i> y <i>TEC</i> en EC, CU y ECr.	117
1. Validación de la interacción entre los SNP rs7522462 y rs11945978.	117
2. Estudio de nuevas interacciones genéticas entre <i>C1orf106</i> y <i>TEC</i>	120
3. Estudio de expresión intestinal de <i>C1orf106</i> y <i>TEC</i>	122
5) Aumento de activación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ y T CD8 intestinales: utilidad como método diagnóstico en enfermedad celiaca.	123
1. Validez del método diagnóstico	123
2. Utilización del método diagnóstico en pacientes con sospecha de EC.....	129
Discusión.....	135
1) Diferente perfil de expresión en niños y adultos con EC.	137
2) Perfil de expresión intestinal en pacientes EMA negativos.	144
3) Estudio comparativo de la expresión intestinal entre EC y CU.	146
4) Estudio de interacción génica entre <i>C1orf106</i> y <i>TEC</i> en EC, ECr y CU.....	152
5) Aumento de activación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ y T CD8 intestinales: utilidad como método diagnóstico en enfermedad celiaca.	154
6) Discusión general.....	160
Conclusiones.....	163
Bibliografía.....	167
Artículos.....	181

ABREVIATURAS

AGA	<i>American Gastroenterological Association</i>
APC	<i>Aloficocianina (Allophycocyanin)</i>
ARHGAP31	<i>Rho GTPase activating protein 31</i>
ATXN2	<i>Ataxin 2</i>
BACH2	<i>BTB domain and CNC homolog 2</i>
BV421	<i>Brilliant Violet 421nm</i>
C1orf106	<i>Chromosome 1 open reading frame 106</i>
C2orf74	<i>Chromosome 2 open reading frame 74</i>
CCR1/ CCR2/ CCR3/ CCR4/ CCR6	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 1/2/3/4/6</i>
CIITA	<i>MHC class II transactivator</i>
CLK	<i>Cdc2-like kinase</i>
CSK	<i>C-src tyrosine kinase</i>
CTL	<i>Linfocitos T citotóxicos (Cytolytic T Lymphocyte)</i>
DDX6	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Helicase 6</i>
DSG	<i>Dieta sin gluten</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
DUSP10	<i>Dual specificity phosphatase 10</i>
EC	<i>Enfermedad celíaca</i>
ECr	<i>Enfermedad de Crohn</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EII	<i>Enfermedad Inflamatoria Intestinal</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay</i>
ELMO1	<i>Engulfment and cell motility 1</i>
EMA	<i>Anticuerpos anti-endomisio (endomysial antibody)</i>
ESPGHAN	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition</i>
ETS1	<i>V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1</i>
FAM	<i>6- carboxifluoresceína</i>
FASLG	<i>Fas ligand</i>
FBXO48	<i>F-box only protein 48</i>
FITC	<i>Fluorescein Isotiocyanate</i>
GLB1	<i>Galactosidase β 1</i>
GWAS	<i>Estudios de asociación de barrido genómico (genome wide association studies)</i>
HCFC1	<i>Host cell factor C1</i>
HLA	<i>Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen)</i>
ICOSLG	<i>Inducible T-cell co-stimulator ligand</i>
IFI	<i>Inmunofluorescencia indirecta</i>
IFN γ	<i>Interferón γ</i>
Ig	<i>Inmunoglobulina</i>
IL-10	<i>Interleucina 10</i>
IL-12A	<i>Interleucina12A</i>
IL-15	<i>Interleucina 15</i>
IL-17F	<i>Interleucina17F</i>

Abreviaturas

IL-18	Interleucina 18
IL-18R1	Receptor 1 de interleucina 18 (<i>Interleukin 18 Receptor 1</i>)
IL-18RAP	<i>Interleukin 18 receptor accessory protein</i>
IL-1RL1	<i>Interleukin 1 receptor like 1</i>
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23A	Interleucina 23 subunidad alfa
IL-23R	Receptor de Interleucina 23
IL-6	Interleucina 6
<i>IRAK1</i>	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 1</i>
<i>IRF4</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
<i>ITGA4</i>	<i>Integrin, Alpha 4</i>
<i>JAK2</i>	<i>Janus kinase 2</i>
LIEs	Linfocitos intraepiteliales
<i>LPP</i>	<i>LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
<i>MMEL1</i>	<i>Membrane metallo-endorpeptidase-like 1</i>
<i>NCF2</i>	<i>Neutrophil Cytosolic Factor 2</i>
<i>NFIA</i>	<i>Nuclear Factor I A</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
<i>OLIG3</i>	<i>Oligodendrocyte transcription factor 3</i>
<i>PFKFB3</i>	<i>6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PerCP	Proteína clorofila peridinina (<i>Peridinin chlorophyll protein</i>)
<i>PLEK</i>	<i>Pleckstrin</i>
<i>POU2AF1</i>	<i>POU Class 2 Associating Factor 1</i>
<i>PRKCQ</i>	<i>Protein Kinase C, Theta</i>
<i>PRM1/PRM2</i>	<i>Protamine 1/2</i>
<i>PTPN2</i>	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2</i>
<i>PTPRK</i>	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K</i>
<i>PUS10</i>	<i>Pseudouridylate synthase 10</i>
<i>PVT1</i>	<i>Pvt1 Oncogene</i>
<i>RPLP0</i>	<i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
<i>REL</i>	<i>Proto-oncogene, NF-κB</i>
<i>RHBDD3</i>	<i>Rhomboid domain containing 3</i>
<i>RORγt</i>	<i>Related orphan receptor gamma T</i>
<i>RUNX3</i>	<i>Runt-Related Transcription Factor 3</i>
<i>SCHIP1</i>	<i>Schwannomin interacting protein 1</i>
<i>SH2B3</i>	<i>SH2B adaptor protein 3</i>

SMAD3	<i>SMAD family member 3</i>
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SOSC1	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAGAP	<i>T-cell activation RhoGTPase activating protein</i>
TCR	Receptor del linfocito T (<i>T cell receptor</i>)
TEC	<i>Transient erythroblastopenia of childhood</i>
TG	Transglutaminasa
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	T cooperador (<i>T helper</i>)
THEMIS	<i>Thymocyte expressed molecule involved In selection</i>
TMEM187	<i>Transmembrane protein 187</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TNFAIP3	<i>TNF alpha induced protein 3</i>
TNFRSF14	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14</i>
TNFSF18	<i>Tumor necrosis factor superfamily member 18</i>
TREH	<i>Trehalase</i>
TYK2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
UBASH3A	<i>Ubiquitin associated and SH3 domain containing A</i>
UBE2L3	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2L 3</i>
CU	Colitis ulcerosa
ULK3	<i>Unc-51 like kinase 3</i>
VAMP3	<i>Vesicle associated membrane protein 3</i>
VIC	4, 7, 2', 5', 7', -hexaclaro-6- carboxifluoresceína
YDJC	<i>YdjC homolog</i>
ZFP36L1	<i>ZFP36 ring finger protein-like 1</i>
ZMIZ1	<i>Zinc finger, MIZ-type containing 1</i>

RESUMEN / SUMMARY

1) Resumen

Introducción

La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad sistémica mediada por el sistema inmune y provocada por el gluten que se puede desarrollar en individuos de cualquier edad, aunque presenta bastantes diferencias según el debut se produzca en la infancia o en la edad adulta. Es una enfermedad poligénica, con la principal asociación genética en la región HLA y numerosas variantes de bajo riesgo distribuidas por todo el genoma descritas gracias a los estudios de barrido genómico (GWAS). La mayor parte de estas variantes se encuentran en regiones no codificantes del genoma, muchas de ellas se cree que afectando a la expresión génica. Los GWAS han puesto además de manifiesto la existencia de una base genética compartida entre enfermedades autoinmunes.

El diagnóstico de EC se basa en criterios clínicos, histológicos, serológicos y genéticos bien establecidos, que en su mayoría necesitan que el paciente esté en dieta con gluten. A pesar de ello, muchos pacientes presentan un diagnóstico complejo. Debido a esto, se hace necesario profundizar en el estudio de estos pacientes, así como desarrollar nuevos métodos diagnósticos.

Objetivos

1. Estudiar la expresión intestinal en pacientes de EC de genes localizados en loci de riesgo a la enfermedad, así como de genes relacionados con la respuesta inmune Th17, en pacientes con debut pediátrico y adulto.

2. Conocer si existen diferencias a nivel de expresión génica entre pacientes con EC con serología específica positiva y negativa, mediante el estudio en ambos grupos de pacientes de genes relacionados previamente con EC.
3. Avanzar en el conocimiento de la base genética compartida entre EC y CU, mediante el estudio de la expresión de genes localizados en regiones de riesgo compartido a ambas enfermedades, así como en regiones de riesgo a EC, en pacientes de EC y CU.
4. Estudiar si la interacción génica descrita entre los genes *C1orf106* y *TEC* en la susceptibilidad a ECr, también influye en el riesgo a presentar EC y CU.
5. Estudiar la validez del aumento de linfocitos T CD8⁺ y TCRγδ⁺ activados dirigidos al intestino que aparecen en sangre periférica tras una corta provocación con gluten como posible método diagnóstico de EC en individuos en DSG.

Materiales y Métodos

Para los estudios de expresión génica se recogieron 22 biopsias duodenales de pacientes de EC con diagnóstico pediátrico, 13 positivos y 9 negativos para anticuerpos frente a EMA, y 6 con diagnóstico adulto (todos EMA positivos); biopsias de colon de 19 pacientes con CU; y 12 biopsias de duodeno y 4 de colon de individuos control. La expresión génica se analizó por PCR cuantitativa a tiempo real empleando ensayos TaqMan.

El estudio de interacción génica incluyó el análisis de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el gen *C1orf106* (rs7522462) y tres SNPs en el gen *TEC* (rs11945978, rs11725773 y rs11912525) en 995 pacientes con EC, 337 con CU, 256 con ECr y 637 controles.

El abordaje de un nuevo método diagnóstico se llevó a cabo estudiando 10 pacientes con EC confirmada, 19 controles sanos y 38 individuos con sospecha de EC, tras su provocación con gluten durante tres días, analizando la presencia de dos poblaciones linfocitarias concretas a días 0 y 6 del inicio de la provocación.

Resultados y discusión

El estudio de la expresión intestinal de 38 genes en pacientes de EC con debut pediátrico y adulto mostró una alteración semejante en ambos grupos en 7 de los genes: *C2orf74*, *CCR6*, *FASLG*, *IL23A*, *JAK2*, *TAGAP* y *UBE2L3*. Además se observó una expresión diferencial en 13 genes en función de la edad de debut del paciente: 2 exclusivos de niños (*ICOSLG* y *TNFSF18*), 1 de adultos (*IL1RL1*), 1 con mayor alteración en niños (*C1orf106*) y 9 con mayor alteración en adultos (*CCR4*, *CD28*, *IL18RAP*, *IL6*, *PLEK*, *STAT3*, *TMEM187*, *VAMP3* y *ZFP36L1*). Este es el primer estudio en que se evidencian diferencias de expresión génica entre pacientes con debut pediátrico y adulto.

Al analizar la expresión intestinal de 7 de esos genes cuya expresión había sido previamente descrita en EC, en niños celíacos EMA-negativos, observamos resultados concordantes con lo observado en niños celíacos EMA positivos en 6 de los genes. Estos resultados muestran que algunos procesos de la patogénesis que acontece en estos pacientes de difícil diagnóstico, son al menos parcialmente similares a los encontrados en pacientes seropositivos.

El análisis de la expresión intestinal en EC y CU, mostró una alteración semejante en 8 genes, *C1orf106*, *C2orf74*, *IL18RAP*, *CD28*, *FASLG*, *PLEK*, *CCR4* y *TAGAP*, a pesar de que 4 de ellos no estaban asociados a CU. Además, ciertas regiones a pesar de estar

asociadas al riesgo en ambas enfermedades parecen estar influenciadas por genes diferentes.

Por otro lado, la interacción descrita entre los genes *C1orf106* y *TEC* en pacientes de ECr, parece afectar también al riesgo a EC, pero no a CU.

La detección mediante citometría de flujo de subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ y TCRγδ⁺ activadas dirigidas al intestino se observa de manera específica en pacientes celíacos sometidos a una provocación con gluten de tres días, de acuerdo con lo descrito en la literatura. Esta determinación implica una metodología sencilla y de fácil implementación en la práctica clínica que parece ser útil para el diagnóstico de EC en individuos en DSG.

Conclusiones

1. Existen diferencias en la expresión génica intestinal entre pacientes celíacos con debut adulto y pediátrico, tanto al considerar los genes concretos alterados como al tener en cuenta el grado de alteración.
2. La respuesta inmune Th17 parece implicada en la patogénesis de EC de acuerdo a la alteración observada en la expresión de diversos genes implicados. Su impacto podría ser mayor en pacientes adultos.
3. Los pacientes de EC que carecen de anticuerpos frente a EMA al diagnóstico, muestran una expresión similar en los genes estudiados a la encontrado en pacientes EMA positivos, lo que sugiere que en ambos grupos tienen lugar procesos inmunopatológicos comunes.

4. La existencia de regiones de riesgo asociadas a EC y CU no siempre implica los mismos genes en ambas enfermedades, como muestra la expresión diferencial de algunos genes en una y otra enfermedad.
5. Los genes en loci de riesgo a EC: *FALSG*, *PLEK*, *CCR4*, *TAGAP* y *HCFC1*, deberían ser objeto de nuevos estudios en CU por su posible implicación en el riesgo a desarrollar esta enfermedad.
6. La interacción génica descrita entre los genes *C1orf106* y *TEC* en la susceptibilidad a ECr, parece influir en el riesgo a presentar EC, pero no CU.
7. La determinación en sangre periférica de linfocitos T CD8⁺ y TCRγδ⁺ caracterizados por la expresión de los marcadores CD103, β7 y CD38 en individuos sometidos a provocación con gluten de tres días, parece ser un método válido para el diagnóstico de EC en pacientes en DSG.

2) Summary

Introduction

Celiac disease (CD) is a systemic immune-mediated disease triggered by gluten that can be developed in individuals of any age, although there are several differences depending on a childhood or adulthood onset exists. It is a polygenic disease, being the strongest genetic association with the HLA region, and existing numerous low-risk variants distributed throughout the genome and described by genome wide association studies (GWAS). Most of these variants are in non-coding regions of the genome and many of them are believed to affect gene expression. Furthermore, GWAS have revealed the existence of a shared genetic basis among autoimmune diseases.

CD diagnosis is based on well-established clinical, histological, serological and genetic criteria, most of them needing that patients follow a gluten containing diet. Despite that, many patients present a complex diagnosis. Therefore, it is necessary to deepen on the study of these patients, as well as develop new diagnostic tools.

Objectives

1. To study the intestinal expression of genes located in CD risk loci as well as of Th17-related, in patients with a pediatric and adult onset.
2. To determine the possible differences in gene expression levels between CD patients with positive and negative specific serology, by studying the expression of different CD-related genes in both groups of patients.

3. To advance into the knowledge of the genetic basis shared between CD and ulcerative colitis (UC), by studying the expression of genes located in regions associated to both diseases as well as in CD risk loci, in patients with CD and UC.

4. To study whether the gene interaction described between *C1orf106* and *TEC* genes in Crohn disease (CrD) susceptibility also influences CD and UC risk.

5. To study the validity of the increase of gut-homing activated CD8⁺ and TCRγδ⁺ T cells in peripheral blood after a short gluten challenge as a possible CD diagnostic tool in individuals on a gluten free diet.

Materials and methods

For gene expression studies, 22 duodenal biopsies from pediatric CD patients, 13 from EMA-positive and 9 from EMA negative patients; 6 from adult CD patients (all EMA-positive); colon biopsies from 19 UC patients; and 12 duodenal biopsies and 4 colon biopsies from control individuals were collected. Gene expression was measured by quantitative real time PCR using TaqMan assays.

For studying gene interaction, one single nucleotide polymorphism (SNP) on the *C1orf106* gene (rs7522462) and three SNPs on *TEC* (rs11945978, rs11725773 and rs11912525) were analyzed in 995 patients with EC, 337 patients with CU, 256 with CrD and 637 controls.

The study of a new diagnostic tool included 10 patients with confirmed CD, 19 healthy controls and 38 individuals with suspected CD. A three-day gluten challenge was performed to analyze the presence of two specific lymphocyte populations on days 0 and 6 from first challenge.

Results and discussion

The study of the intestinal expression of 38 genes in CD patients with pediatric and adult onset showed a similar alteration in both groups in 7 of those genes: *C2orf74*, *CCR6*, *FASLG*, *IL23A*, *JAK2*, *TAGAP* and *UBE2L3*. A differential expression was observed in 13 additional genes: 2 specific of children (*ICOSLG* and *TNFSF18*), 1 of adults (*IL1RL1*), 1 with higher alteration in children (*C1orf106*) and 9 with higher alteration in adults (*CCR4*, *CD28*, *IL18RAP*, *IL6*, *PLEK*, *STAT3*, *TMEM187*, *VAMP3* and *ZFP36L1*). This is the first study evidencing gene expression differences between CD patients depending on time of onset.

When analyzing the intestinal expression of 7 genes previously described as altered in CD in EMA-negative CD children, we showed concordant results with the observed in EMA-positive CD children in 6 of those genes. These results show that the pathogenesis in these patients with complex diagnosis are at least partially similar to those found in seropositive patients.

The analysis of the intestinal expression in CD and UC showed a similar alteration in 8 genes, *C1orf106*, *C2orf74*, *IL18RAP*, *CD28*, *FASLG*, *PLEK*, *CCR4* y *TAGAP*, even though four of them were not associated to CU. In addition, certain regions seem to be influenced by different genes despite being associated to both diseases.

The described gene interaction between *TEC* and *C1orf106* related to CrD susceptibility seems to also affect CD risk, but not UC risk.

Activated gut-homing CD8⁺ and TCRγδ⁺ T lymphocyte subpopulations are specifically observed by flow cytometry in peripheral blood of CD patients after a three-day gluten

challenge, as previously described. This seems to be a valid approach for CD diagnosis in individuals on a GFD that can be easily incorporated to the laboratory routine.

Conclusions

1. There are differences in intestinal gene expression between celiac patients with pediatric and adult onset, when considering both the specific altered genes and the alteration level.

3. The Th17 immune response seems to have a role in CD pathogenesis according to the altered expression observed in several related genes. Its role could be higher in adult patients.

4. CD patients lacking EMA antibodies in blood show a similar expression of the studied genes to seropositive patients, suggesting common immunopathological processes.

5. The existence of risk regions common to CD and UC does not always involve the same genes in both diseases, as suggested by the differential gene expression observed in some cases.

6. The described gene interaction between *C1orf106* and *TEC* in CrD susceptibility seems to also influence CD risk, but not UC risk.

7. Evaluation in peripheral blood of T CD8⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells characterized by the expression of CD103, β 7 and CD38 in individuals exposed to three-day gluten challenge seems to be a valid approach to diagnose CD in people on a gluten-free diet.

INTRODUCCIÓN

1) Definición y prevalencia

La enfermedad celiaca (EC) es un trastorno sistémico mediado por el sistema inmune, provocado por el gluten y prolaminas relacionadas. Se desencadena en individuos genéticamente susceptibles y se caracteriza por una combinación de manifestaciones clínicas, enteropatía, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular tipo 2 (TG2) y HLA-DQ2/DQ8 [1].

La prevalencia en la población general es aproximadamente del 1% [2], con ligeras variaciones dependiendo del país considerado. La incidencia de la EC es mayor en mujeres que en hombres (2:1) [3, 4], aunque esta diferencia tiende a desaparecer con el aumento de la edad de diagnóstico [5]. La prevalencia aumenta en ciertos grupos de riesgo, en que se incluyen familiares de primer grado de pacientes de EC. En estos individuos el riesgo puede elevarse hasta un 38%, aunque igualmente varía en función del sexo y localización geográfica [6]. También se ha encontrado un aumento de riesgo en individuos con otras patologías autoinmunes, como déficit de IgA [7], diabetes tipo 1 [8] y tiroiditis autoinmune [9]; así como con otras enfermedades como síndrome de Down [10]. La prevalencia es mayor en niños que en adultos, detectándose un pico de diagnóstico entre uno y tres años.

2) Etiología

La EC tiene una etiología multifactorial, puesto que en su desarrollo existe tanto un componente genético como uno ambiental.

1. Factores ambientales

El gluten es el principal factor ambiental desencadenante y es necesario para desarrollar la EC, bajo este término se engloban dos tipos principales de proteínas: gliadinas y gluteninas, ambas presentes en el trigo [11, 12] y proteínas homólogas que aparecen en cebada y centeno que se denominan hordeínas y secalinas, respectivamente [13]. El elevado contenido de glutamina y prolina de estas proteínas dificulta su degradación y las hace idóneas para las modificaciones que llevan a su presentación por moléculas HLA (*Human Leukocytes antigen*).

Otro de los principales factores ambientales que actualmente se postulan es la microbiota intestinal. Diversos estudios muestran que la composición bacteriana duodenal varía considerablemente en pacientes de EC con respecto a individuos sanos [14]. Además, esta parece diferir en función del tipo [15] y la gravedad de la sintomatología [16]. Si es causa, o consecuencia de la enfermedad todavía es un tema muy controvertido.

Por otro lado, se ha hipotetizado que individuos genéticamente susceptibles pueden desarrollar EC ante un desencadenante ambiental, como una infección, lo cual ayudaría a justificar las diferencias encontradas en la edad de debut de la enfermedad [17]. En este sentido, destaca la correlación encontrada entre la incidencia de la EC y la infección por rotavirus [18].

La edad de introducción del gluten o la duración de la lactancia materna también se han postulado durante años como posibles candidatos ambientales. En este sentido, recientemente se han realizado estudios multicéntricos que evalúan la prevalencia de

EC en recién nacidos genéticamente susceptibles, tras la introducción del gluten en diferentes momentos [19, 20]. Parece que introducir el gluten a una edad más avanzada retrasa el debut de la enfermedad, pero no lo evita, puesto que la prevalencia en los distintos grupos se iguala al cabo de los años. Estos estudios también descartan la influencia de la duración de la lactancia materna en la prevalencia de la enfermedad.

2. Factores genéticos

La EC se considera una enfermedad poligénica con herencia compleja no mendeliana y una fuerte heredabilidad, como muestran los estudios realizados en gemelos, en los que la concordancia entre gemelos monocigóticos es cercana al 80%, y disminuye hasta el 20% en gemelos dicigóticos [21, 22].

Se han desarrollado un gran número de trabajos para desengranar los distintos genes y variantes que determinan la heredabilidad de esta enfermedad, describiendo la principal asociación genética con genes localizados en la región del HLA, así como un gran número de variantes génicas distribuidas por todo el genoma que parecen causar riesgo bajo.

a. Genes HLA

Los genes que codifican el HLA se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) y se extienden a lo largo de unas 4Mb. En general son altamente polimórficos, de manera que cada gen puede presentar un gran número de alelos posibles. Estos alelos se expresan en codominancia, de manera que en la superficie celular se expresan los productos proteicos de ambos cromosomas homólogos.

Introducción

Los primeros genes de susceptibilidad se detectaron por técnicas serológicas en la década de los 70, y correspondían con la región del HLA-B8 [23]. Tras esto, se observó la asociación con el HLA-DR3 [24], que posteriormente se descubrió que conformaba con HLA-B8 (entre otros alelos) el haplotipo ancestral 8.1, altamente conservado y asociado a EC en población caucásica. De forma paralela se detectó la asociación de la variante HLA-DR7 cuando se encontraba en heterocigosis con HLA-DR5 [25, 26]. Esto llevó a conocer que la asociación se establece con la molécula HLA-DQ2.

La molécula HLA-DQ2 está formada por dos subunidades: α y β , que están codificadas por dos genes diferentes de la región HLA de clase II: *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1*, respectivamente. La combinación alélica de riesgo a la enfermedad viene dada por la presencia de *HLA-DQA1*05* y *HLA-DQB1*02*, que conforman la molécula HLA-DQ2.5 [27, 28]. Dichas variantes alélicas pueden presentarse en *cis* (ambas en el mismo cromosoma), en cuyo caso el haplotipo completo incluye el alelo *HLA-DRB1*03*; o en *trans* (cada alelo heredado de un cromosoma homólogo diferente), confiriendo un riesgo similar en ambos casos. Aproximadamente, el 90% de los enfermos de celiaquía presentan la molécula HLA-DQ2, específicamente HLA-DQ2.5, ya sea en *cis* o en *trans*.

El alelo *HLA-DQB1*02* presenta un efecto de dosis génica, de manera que la presencia de dos copias aumenta entre 4 y 6 veces el riesgo a padecer la enfermedad cuando aparece al menos combinada con una copia del alelo *HLA-DQA1*05* [29]. Este efecto de dosis se explica en parte debido a la codominancia entre los alelos, ya que la cantidad de moléculas presentes en superficie aumenta en la homocigosis.

Los pacientes que carecen de la combinación alélica HLA-DQ2 presentan en su mayoría la molécula HLA-DQ8, codificada por los alelos *HLA-DQA1*03* y *HLA-DQB1*03:02* [30];

mientras que aquellos carentes de HLA-DQ2 y HLA-DQ8, presentan uno de los alelos que codifica el HLA-DQ2.5: *HLA-DQA1*05* (que forma parte de la molécula HLA-DQ7.5) o, más comúnmente, *HLA-DQB1*02* (formando la molécula HLA-DQ2.2) [31].

La razón por la que ciertas moléculas HLA confieren riesgo a padecer esta enfermedad se debe en parte a la conformación de la hendidura en que se une el péptido. Durante el procesamiento de los péptidos del gluten, sus aminoácidos de glutamina son deamidados a ácido glutámico, lo que les confiere carga negativa, haciéndolos altamente afines a las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 [32, 33], ya que estas variantes, presentan unas posiciones fijas en sus hendiduras que reconocen preferentemente aminoácidos hidrofóbicos y con carga negativa [34, 35]. La molécula HLA-DQ2.5 es capaz de presentar un mayor repertorio de péptidos y con una mayor avidéz que la molécula HLA-DQ2.2 [36]. La molécula HLA-DQ8 también presenta de manera dominante una serie de péptidos de gliadina, pero estos parecen ser más fácilmente degradados y requieren mayor deamidación, lo que disminuye el riesgo a desarrollar EC en los portadores de HLA-DQ8 [37].

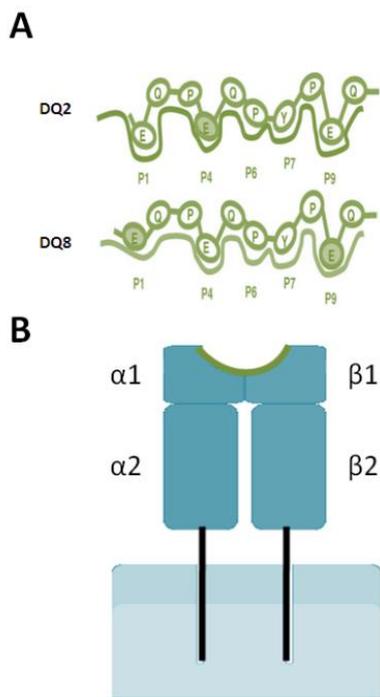


Figura 1. A: Composición de los péptidos que se alojan en la hendidura de las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8. E= Ácido glutámico, Q= Glutamina, P=Prolina, T= Tirosina. B: Estructura de la molécula HLA-DQ. Figura adaptada de Quiao *et al.* (36).

Aunque clásicamente se han relacionado estas variantes HLA con el desarrollo de la enfermedad, siendo su ausencia criterio de exclusión para el diagnóstico, estudios recientes han mostrado nuevas variantes asociadas al riesgo a padecer EC [38-40].Lenz y colaboradores [38] realizaron un estudio de interacciones no aditivas en la región HLA en cerca de 12.000 pacientes de EC, en que describen nuevas interacciones entre haplotipos HLA, como el observado entre el haplotipo asociado a la enfermedad HLA-

DQ2.5 con *HLA-DQA1*01:01-DQB1*05:01*, no descrito previamente con riesgo a padecer la enfermedad.

Por otro lado, recientemente se han relacionado variantes en otros genes de la región HLA con la EC, destacando *HLA-DPB1* (posición 9), ciertos alelos del gen *HLA-B* (*B*08* y *B*39:06*) y dos SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) con efecto *cis*-eQTL en los genes *HLA-F* y *HLA-DPB1*. La caracterización de estas variantes formó parte de un mapeo fino de la totalidad de la región del HLA [39].

También resulta interesante la relación encontrada entre el alelo *HLA-DPB1*04:01* y una reducción del riesgo a desarrollar anticuerpos anti-TG2, sugiriendo que, a diferencia de lo descrito anteriormente, ciertos alelos presentes en esta región pueden jugar un papel protector frente al desarrollo de la enfermedad [40].

Aunque durante años únicamente se apuntó a la región del *HLA* con el riesgo genético a desarrollar EC, esta región no supone más de una cuarta parte de la heredabilidad existente. Además, hay que tener en cuenta que una gran proporción de individuos sanos (aproximadamente un 35-40%) presenta los principales alelos de riesgo, pero solo el 1 % de la población general llega a manifestar la enfermedad. Estas características llevaron a pensar que otros factores genéticos tenían que estar involucrados en la susceptibilidad a EC.

b. Genes no HLA

Durante la última década, los estudios de barrido genómico (GWAS, del inglés *genome wide association studies*) han supuesto una gran revolución en el estudio de la genética de enfermedades complejas. Estos se basan en el análisis a gran escala de variantes genéticas, principalmente polimorfismos de un único nucleótido (SNPs),

Introducción

repartidas a lo largo de todo el genoma en un grupo de enfermos y controles, con el fin de encontrar aquellas que aparezcan a diferente frecuencia en ambos grupos y que, por lo tanto, se asocien a la enfermedad. Generalmente estos estudios incluyen variantes con una frecuencia mínima del 5% y requieren una gran cantidad de individuos con el fin de alcanzar la potencia estadística necesaria para llegar a encontrar asociaciones significativas.

En el caso de la EC, el primer GWAS, se llevó a cabo en población inglesa, y en él se incluyeron 778 pacientes y 1422 controles. Se describió el primer locus de riesgo genético externo a la región HLA, una región del cromosoma 4 en que se encuentran los genes *IL2* e *IL21* [41]. Posteriormente, se estudiaron en nuevas muestras las variantes que habían presentado un mayor riesgo en el análisis anterior aunque la asociación no cumplía los criterios exigentes de significación requeridos por los GWAS (estudio de “*follow up*”). En esta línea, se realizaron dos estudios que aumentaron las regiones genéticas asociadas a 15, describiendo 13 en población inglesa y una en población americana [42, 43]. La inclusión en un nuevo estudio de seguimiento de las variantes genéticas que parecían mostrar una menor asociación, permitió describir dos señales adicionales de susceptibilidad. La primera de ellas, en la secuencia del gen *REL*; y la segunda, colindante a los genes *TNFAIP3-OLIG3* [44].

En 2011, la realización de un segundo estudio de barrido genómico elevó el número de regiones génicas relacionadas con riesgo a padecer la EC a 26 [45].

Una de las principales ideas que se consolidó a raíz de los GWAS es la existencia de una genética compartida entre diferentes enfermedades de origen inmunológico; lo que supone que distintas enfermedades pueden presentar rutas moleculares comunes

alteradas. Basándose en ello se desarrolló el proyecto *ImmunoChip*, que incluyó cerca de 200.000 polimorfismos en regiones asociadas al riesgo a padecer doce enfermedades de origen inmunológico, incluida la EC [46]. Con este proyecto, se descubrieron 13 nuevas regiones asociadas con la enfermedad. Tras él surgieron trabajos de meta-análisis que permitieron incrementar este número como el caso de las variantes localizadas en los genes *ZNF335* y *NFIA*, descritas a partir de los resultados del *ImmunoChip* en población irlandesa [47] y el gen *IL18* en población italiana [48].

Es destacable que la mayoría de los genes próximos a polimorfismos asociados están involucrados en procesos inmunológicos, como activación de linfocitos T; o apuntando a otros procesos biológicos como diferenciación celular, migración e inflamación [46].

Debido a que en los GWAS no se incluyen variantes alélicas con frecuencias menores al 5%, posteriormente se han desarrollado dos estudios basados en la secuenciación masiva del exoma. Aunque en el primero, llevado a cabo por Hunt y colaboradores, revelaron otra variante de riesgo en el gen *NCF2* [49], ambos pusieron de manifiesto que el efecto de estas variantes parece ser pequeño [50].

En la tabla 1 se muestra un resumen de las regiones descritas hasta la fecha.

Tabla 1: Genes no HLA asociados al riesgo a presentar EC.

Estudio	Genes en loci asociados	
<i>van Heel et al, 2007 [41]</i>	<i>IL2, IL21</i>	
<i>Garner et al, 2009 [42]</i>	<i>ITGA4</i>	
<i>Hunt et al, 2008 [43]</i>	<i>RSG1</i> <i>IL1RL1-IL18R1-IL18RAP-SCL9A4</i> <i>CCR1-CCR2-CCR3</i> <i>SCHIP1</i>	<i>LPP</i> <i>TAGAP</i> <i>SH2B3</i> <i>ATXN2</i>
<i>Trynka et al, 2009 [44]</i>	<i>REL</i>	<i>TNFAIP3-OLIG3</i>
<i>Dubois et al, 2010 [45]</i>	<i>TNFRSF14-MMEL1</i> <i>RUNX3</i> <i>C1orf106</i> <i>PLEK-FBXO48</i> <i>CCR4</i> <i>GLB1</i> <i>ARHGAP31</i> <i>BACH2</i>	<i>PTPRKM-THEMIS</i> <i>PVT1</i> <i>ZMIZ1</i> <i>ETS1</i> <i>CIITA</i> <i>SOCS1-PRM1-PRM2</i> <i>ICOSLG</i>
<i>Festen et al, 2011 [51]</i>	<i>PTPN2</i>	<i>PUS10</i>
<i>Trynka et al, 2011 [46]</i>	<i>FASLG-TNFSF18</i> <i>STAT4</i> <i>IRF4</i> <i>ELMO1</i> <i>PFKFB3-PRKCQ</i> <i>POU2AF1</i>	<i>TREH-DDX6</i> <i>ZPF36L1</i> <i>CLK3-CSK-ULK3</i> <i>UBASH3A</i> <i>UBE2L3-YDJC</i> <i>HCFC1-TMEM187-IRAK</i>
<i>Ostensson et al, 2013 [52]</i>	<i>DUSP10</i>	
<i>Hunt et al, 2013 [49]</i>	<i>NCF2</i>	
<i>Zupin et al, 2015 [48]</i>	<i>IL18</i>	
<i>Coleman et al, 2016 [47]</i>	<i>ZNF335</i>	<i>NFIA</i>

Excepto por el MHC, las variantes genéticas asociadas a EC y en general a las enfermedades autoinmunes, muestran efectos modestos. La presencia de ciertas

variantes genéticas que interactúan con factores ambientales o epigenéticos puede tener la clave para desarrollar o no una enfermedad. De esta manera, hay ocasiones en que el efecto de una variante génica solo se pone de manifiesto bajo el efecto de determinadas condiciones genéticas o ambientales. En estos casos, algunos genes de susceptibilidad pueden escapar a su identificación bajo las condiciones de los GWAS. Algunos estudios buscan solventar este problema basándose en las interacciones entre loci, que además de ampliar la capacidad de detectar asociaciones genéticas en una enfermedad, contribuyen a dilucidar parte de las vías o rutas bioquímicas que la sustentan [53]. Además, como apuntan Manolio y colaboradores, estas interacciones genéticas pueden contribuir al estudio de la heredabilidad común de diferentes enfermedades [54]. En este sentido, destacan los estudios de Ostensson y colaboradores, que asocian el gen *DUSP10* a EC, solo tras la estratificación de la población celiaca en función de su HLA-DQ [52]. También el trabajo llevado a cabo por Liu [55], en que describen un gran número de interacciones entre polimorfismos asociados a diferentes enfermedades autoinmunes, destacando la interacción génica entre el gen *C1orf106* (rs7522462) y *TEC* (rs11945978) implicada con el riesgo a padecer enfermedad de Crohn (ECr); lo que resulta interesante ya que, el gen *C1orf106* se ha descrito también como gen de riesgo a padecer EC.

c. Genética compartida entre enfermedades autoinmunes

La existencia de una base genética compartida entre enfermedades autoinmunes se ha planteado extensamente a lo largo de los años. Esta idea se ha puesto especialmente en evidencia gracias a los GWAS, asociando un gran número de regiones génicas a

Introducción

diferentes enfermedades autoinmunes [56, 57], y en especial tras el proyecto *ImmunoChip* [46].

La colitis ulcerosa (CU) es una de las dos principales formas de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Se caracteriza por una inflamación crónica intestinal que cursa con períodos de brote y remisión, que se considera desencadenada por una respuesta inmune frente a bacterias comensales. Sin embargo, a diferencia de la EC, el componente genético parece tener una menor relevancia como desencadenante, siendo la concordancia entre gemelos monocigóticos para la CU del 15% [58]. Curiosamente, los GWAS muestran que este componente genético se explica por un mayor número de regiones, ya que, hasta la fecha, se han descrito 155 señales que explican sólo el 8.2% de la heredabilidad de esta enfermedad [59, 60].

Entre los genes localizados en las regiones asociadas a EC y CU, se incluyen algunos con funciones propias de la inmunidad innata y la adaptativa, así como otros relacionados con la integridad o mantenimiento de la barrera intestinal, tal como se muestra en la figura 2.

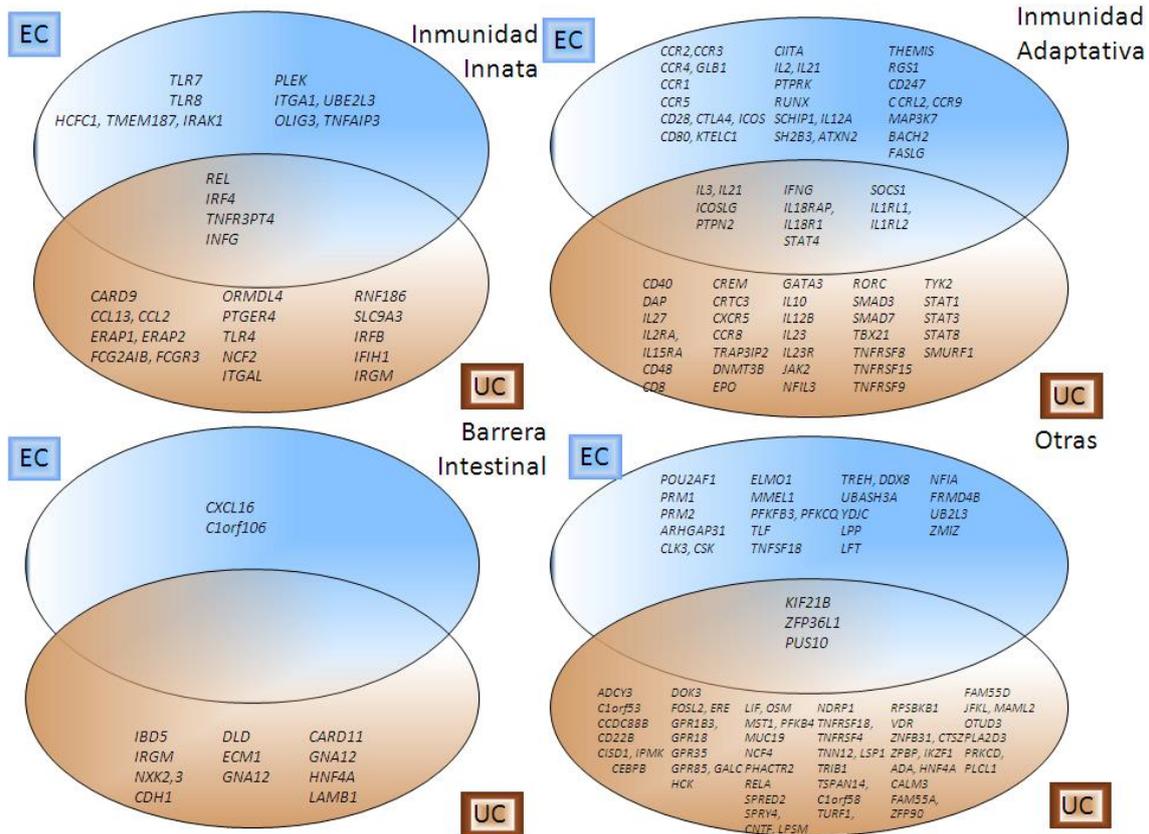


Figura 2: Relación entre los genes asociados a EC y CU descritos por los estudios de barrido genómico. Los genes se encuentran agrupados debido a su pertenencia a tres principales bloques funcionales: inmunidad innata, inmunidad adaptativa y barrera intestinal.

Sin embargo, la asociación de un loci a varias enfermedades autoinmunes no demuestra la existencia de una misma implicación funcional. En este sentido, se han descrito efectos opuestos en algunos loci, lo que implica que un alelo de una misma variante asociada a distintas enfermedades puede conferir protección a padecer una enfermedad y riesgo a padecer otra [56]. Las diferencias observadas podrían surgir de diferentes patrones de desequilibrio de ligamiento, haciendo necesario llevar a cabo estudios para verificar la implicación funcional en cada caso.

d. Estudios de expresión génica

Otra contribución relevante de los GWAS, así como de estudios posteriores, fue el hallazgo de que la gran mayoría de las variantes genéticas asociadas se localizaban en regiones no codificantes y por tanto con un posible papel regulador. Esto plantea otro problema, que es conocer a qué gen o genes concretos afectan las variantes asociadas. El efecto de estas señales sigue siendo un reto importante. Se hacen necesarios estudios funcionales para hacer frente a este problema, para intentar mediante diferentes enfoques identificar las variantes causales o definir el gen o genes implicados en cada loci de riesgo. Con este propósito, los estudios de eQTL (*expression quantitative trait loci*) han permitido asociar la expresión de un gen con variantes de riesgo concretas, reduciendo el número de genes candidatos en las regiones asociadas o incluso permitiendo identificar el gen etiológico [61, 62]. El primer gen eQTL descrito relacionado con el riesgo a padecer EC fue el *IL18RAP* [43], pero dos años más tarde, el estudio realizado por Dubois *et al* [45], expandió en gran medida este fenómeno, ya que el 53% (20/38) de los SNPs de riesgo a EC detectados presentaron efecto *cis*-eQTL. Sin embargo, el análisis eQTL realizado en este trabajo utilizó datos de expresión de muestras de sangre periférica, a pesar de que el tejido principal afectado en la EC es el intestino delgado. Esto puso de manifiesto la necesidad de estudiar diferentes tejidos para lograr una imagen más real de la influencia de los cambios en la expresión génica. Los estudios en el intestino delgado, el tejido diana en EC, también encontraron diferencias en la expresión de varios genes, algunos de ellos influenciados por SNPs de riesgo. En un estudio preliminar, Plaza-Izurieta y colaboradores realizaron el análisis de *cis*-QTL de 8 regiones descritas en los GWAS y encontraron resultados significativos

para *IL12A*, *LPP*, *SCHIP1* y *SH2B3* [63]. En un trabajo posterior, estos autores ampliaron el análisis a 45 genes y encontraron 15 de ellos expresados diferencialmente entre pacientes activos de EC y controles no celíacos, y 11 entre la EC activa y pacientes de EC en dieta sin gluten (DSG) [64]. Adicionalmente, se puso de manifiesto la influencia de ciertos SNPs sobre la expresión de genes distantes, así como, la presencia de un efecto estímulo- dependiente. De esta manera, correlacionaron la expresión de 18 genes en EC con 3 SNPs, situación no observada en controles.

Otros estudios de expresión también han puesto de manifiesto la implicación de rutas funcionales concretas en el desarrollo de la enfermedad. Fernández-Jiménez y colaboradores [65] estudiaron la expresión en las biopsias intestinales de 93 genes relacionados con la ruta NF-κB confirmando la alteración de una fracción considerable de estos genes en EC. Adicionalmente, detectaron cambios en la metilación del DNA en los promotores de 4 de los genes de la ruta estudiados, con mayor frecuencia en enfermedad activa.

Por otro lado, muy recientemente se ha puesto de manifiesto la implicación de un RNA no codificante, *Inc13*, en la regulación de la expresión de varios genes asociados a EC; así como en reprimir la expresión de ciertos genes inflamatorios en condiciones homeostáticas, sugiriendo que la baja regulación de *Inc13* puede contribuir a la inflamación que caracteriza la enfermedad [66].

La alteración en la expresión de los genes *RUNX3*, *THEMIS*, *TNFRSF14* y *ETS1*, relacionados con el desarrollo de linfocitos T [45], han mostrado la implicación de alteraciones en el timo en la aparición de la enfermedad. En esta misma línea,

Introducción

Amundsen y *colaboradores* encontraron 6 SNPs de riesgo a EC con efectos timo específicas [67].

Los estudios de expresión génica descritos hasta la fecha dan idea del gran papel de los linfocitos T CD4+ en la patogénesis de la EC, con numerosos genes asociados, implicados en la activación y diferenciación de los linfocitos T. Aunque también ponen de manifiesto una posible alteración en rutas implicadas en la coestimulación T-B; así como en la activación y maduración de los linfocitos B. De hecho, los últimos estudios genéticos sugieren un papel más relevante de los linfocitos B en la patogénesis de EC [68].

Cabe señalar que no siempre existe concordancia entre los genes con expresión alterada en EC que apuntan los distintos trabajos. La mayoría de los estudios realizados utilizan para el análisis de los datos la t de Student o el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney. Ambos tests determinan si las dos muestras observadas proceden de una misma población, siendo la hipótesis nula que la media o la mediana, según se emplee la t de Student o la U de Mann-Whitney, de las dos poblaciones son iguales. La obtención de un resultado significativo con ambos tests depende, en gran medida, del tamaño de muestra, que condiciona la potencia estadística. El test de la U de Mann-Whitney es una prueba no paramétrica y como tal, menos precisa que el test de la t de Student, pero su utilización es necesaria cuando no se cumplen las condiciones de aplicabilidad de los contrastes paramétricos como es el de la t de Student o cuando se dispone de tamaños muestrales muy pequeños.

Los métodos bayesianos constituyen una alternativa a la estadística tradicional. En esencia se diferencian en que además de la información aportada por los datos

observados, incorporan la información inicial que se tiene del efecto en estudio, para obtener una distribución de probabilidad final para dicho efecto con la que se realizará la inferencia. Consideran que los parámetros desconocidos son variables aleatorias para las cuales debe fijarse una distribución inicial, también denominada distribución *a priori*. Los métodos bayesianos hacen uso del Teorema de Bayes para obtener la distribución final o *a posteriori* de los parámetros. Esta metodología ha mostrado su utilidad en el análisis de muestras de tamaño pequeño [69].

3) Diagnóstico

El diagnóstico de la EC se establece a partir de la combinación de una serie de hallazgos tanto serológicos, como histológicos y genéticos, todo ello en combinación con criterios clínicos que incluyen una buena respuesta a la DSG. Existe un gran espectro de síntomas intestinales y/o extraintestinales que pueden presentar los pacientes. Este hecho, dificulta en gran medida el diagnóstico, especialmente en países con bajos recursos y menor conocimiento de la enfermedad. Además, la enfermedad puede aparecer de forma subclínica. En estos casos, suele ser detectada al pertenecer el paciente a un grupo de riesgo, como ser familiar de primer grado de un individuo afectado.

Esto provoca que el *ratio* de casos diagnosticados respecto a no diagnosticados sea de aproximadamente 1:3 en pacientes pediátricos, llegando a 1:5 en los adultos. Este bajo número de individuos diagnosticados provoca que la EC se compare con un iceberg, en que la superficie visible la ocupan los casos diagnosticados, quedando sin detectar el mayor número de pacientes [70].

1. Clínica

La EC se ha considerado tradicionalmente una enfermedad con debut pediátrico; sin embargo, actualmente se reconoce que puede existir un debut adulto [17, 71, 72]. Aunque inicialmente se pensó en un diagnóstico tardío como causante del incremento de prevalencia encontrado en la edad adulta, estudios de seguimiento serológico descartaron esta posibilidad [73], ya que detectaron una aparición *de novo* de anticuerpos específicos acompañados de sintomatología, en algunos casos difusa. De hecho, la forma clínica en que se presenta la enfermedad varía considerablemente en función de la edad.

a. Clínica en niños

En la edad pediátrica aparece con más frecuencia la presentación clásica de la enfermedad [74]. La principal sintomatología en estos casos es gastrointestinal, incluyendo diarrea, vómitos y falta de apetito; así como síntomas derivados de la malabsorción y la deficiencia nutricional, como cabello ralo y estancamiento pondero-estatural. Distensión abdominal y alteración del carácter son también comunes al diagnóstico. En los casos más graves puede aparecer una forma grave denominada “crisis celíaca”, con graves alteraciones digestivas.

Las formas no clásicas de la enfermedad son más frecuentes en niños escolares y adolescentes. Los síntomas pueden ser más difusos, destacando el retraso en la pubertad, estreñimiento, hipoplasia dentaria [75] e hipertransaminasemia [76].

Aunque con menos frecuencia que en adultos, la EC puede presentarse también de forma subclínica [77]. Estos casos suelen diagnosticarse de manera casual, por

despistajes familiares o poblacionales, o debido a la presencia de otras enfermedades autoinmunes.

b. Clínica en adultos

Se ha observado una tendencia hacia manifestaciones clínicas más atenuadas con el aumento de la edad [78, 79]. Es más frecuente encontrar síntomas limitados, que a menudo consisten en un aumento en el volumen de las heces o gases por la mala absorción de lactosa y el sobrecrecimiento bacteriano. La dispepsia funcional y el síndrome de intestino irritable son también dos síntomas característicos de la población adulta [80, 81]. Por otro lado, son bastante frecuentes los síntomas extraintestinales tales como astenia, ataxia, úlceras orales, la osteoporosis o lesiones en la piel [82, 83]. La presencia de patologías asociadas también es más común en adultos, encontrando trastornos autoinmunes como la tiroiditis autoinmune, diabetes tipo I o síndrome de Sjögren [84, 85].

2. Serología

La EC cursa con la formación de tres principales autoanticuerpos: anti-transglutaminasa tisular o tipo 2 (TG2) y anti-endomisio (EMA), ambos anticuerpos dirigidos contra la enzima TG2; y anti-péptidos deamidados de gliadina (PDG).

La TG2 es el principal autoantígeno que aparece en la EC y la diana de los anticuerpos de mayor sensibilidad y especificidad (anti-TG2 y EMA) [86]. Se recomienda que la positividad frente a TG2, se confirme con EMA, que posee mayor especificidad [87].

Los anticuerpos anti-PDG se generan frente a los péptidos de gluten deamidados a cargo de la TG2 [32]. Aunque presentan una menor sensibilidad y especificidad que los

Introducción

anti-TG2, se recomiendan en el cribado diagnóstico, sobre todo en casos de déficit de IgA, ya que los anticuerpos anti-PDG son de tipo IgG, mientras que los detectados frente a la TG2 son de tipo IgA.

Las características del paciente, así como la ingesta del gluten, son parámetros que condicionan la positividad de estos anticuerpos, y por tanto hay que tenerlos en cuenta en su utilización. De hecho, existen pacientes diagnosticados con anticuerpos negativos. Se han realizado diversos estudios a este respecto, sin llegar actualmente a un consenso sobre el tema. Algunos autores apuntan a una mayor prevalencia de adultos con serología negativa [88], o en etapas más avanzadas de la enfermedad [88-90]. Además se sabe que la falta de anti-TG2 en suero no implica su ausencia a nivel intestinal [89].

Anticuerpos anti-TG2 neoepítipo

Los ensayos clásicos de determinación de anticuerpos anti-TG2 han presentado siempre una buena correlación con los anticuerpos EMA. Sin embargo, recientemente se han desarrollado ensayos que afirman detectar anticuerpos dirigidos frente a antígenos considerados neo-epítipo, definiéndolos como aquellos que surgen tras el *cross-linking* de péptidos de gliadina y la enzima TG2 [91]. Estos ensayos, incluyen como antígeno la TG2 y péptidos modificados de gliadina, y no muestran una correlación tan buena con los EMA. Este hecho, pone en duda el establecimiento de los EMA como técnica de referencia o *gold standard* en el diagnóstico serológico de los pacientes de EC, y además muestra un nuevo espectro de enfermos, que, no solo presentan anticuerpos menos convencionales, sino que además acumulan otros rasgos diagnósticos más atenuados. De esta manera, se ha visto que los pacientes EMA

negativos presentan una mayor frecuencia de variantes HLA de bajo riesgo e incluso variantes de HLA sin riesgo asociado; así como un menor grado de lesión histológica [92].

Debido a esto, son pacientes que pueden escapar al diagnóstico establecido de acuerdo a las guías actuales, y que requieren una labor diagnóstica más exhaustiva. Además, estas características diferenciales incrementan la necesidad de una mejor comprensión de la inmunopatología subyacente a la enfermedad.

3. Genética HLA

Como se ha descrito anteriormente, la EC presenta una fuerte asociación genética con ciertos alelos de la región HLA. Actualmente los únicos marcadores de riesgo que tienen utilidad clínica son los alelos *HLA-DQB1*02* y *HLA-DQA1*05* necesarios para la presencia del heterodímero HLA-DQ2.5; y *HLA-DQB1*03:02* con *HLA-DQA1*03*, que implican la presencia de HLA-DQ8. La presencia de unos u otros alelos supone distinto grado de susceptibilidad. Estas diferencias se deben fundamentalmente al efecto de dosis génica y a la capacidad de presentación de los péptidos derivados del gluten por las distintas moléculas HLA-DQ que codifican. Los diferentes grados de riesgo a padecer la enfermedad se detallan en la figura 3.

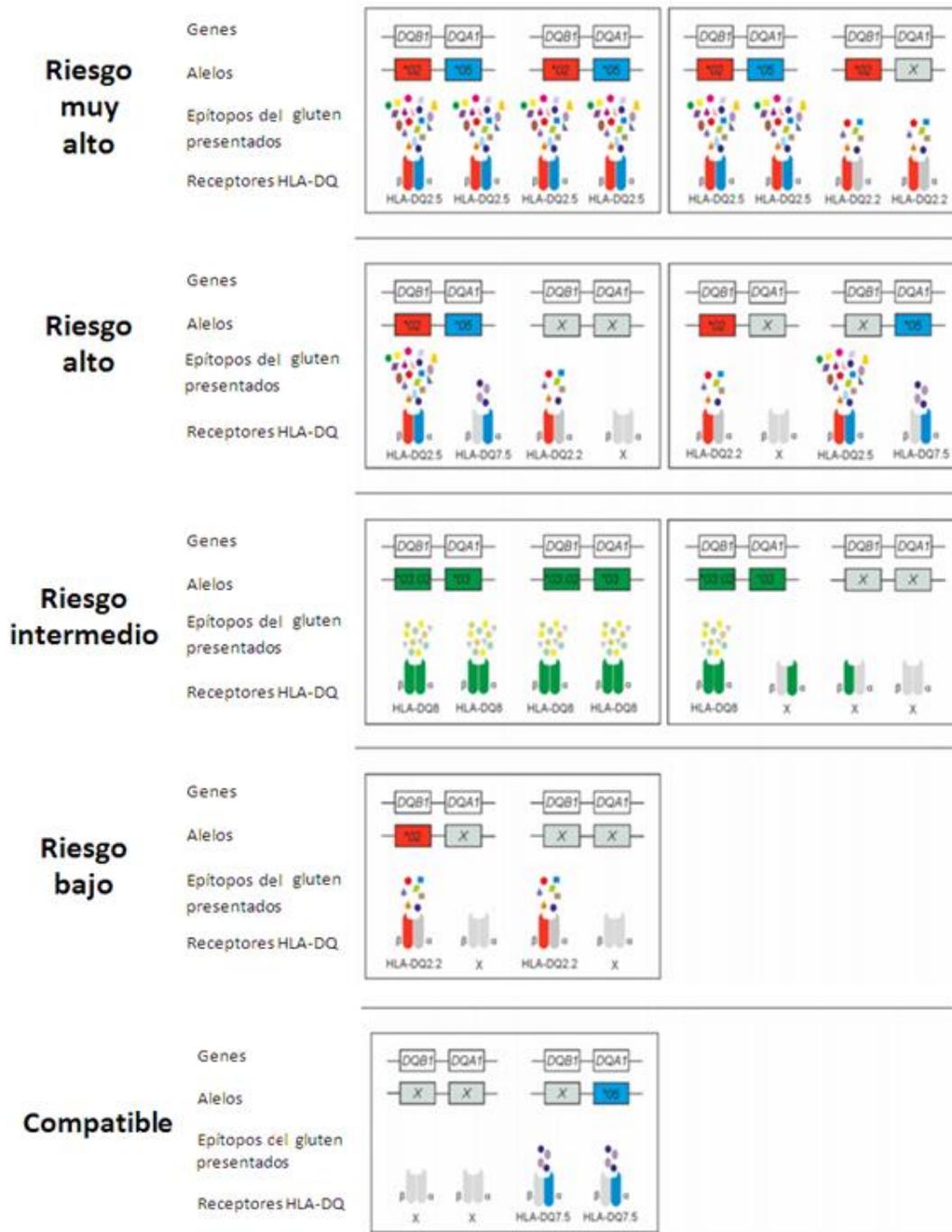


Figura 3: Moléculas HLA-DQ que confieren riesgo a presentar EC, formadas dependiendo de los alelos presentes en los genes *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1*. También se muestra la proporción de epítomos que son capaces de presentar, estableciendo en conjunto los distintos grupos de riesgo a padecer EC. Adaptada de Dieli-Crimi y colaboradores. (90).

La prueba genética presenta un elevado valor predictivo negativo, de manera que la ausencia de alelos de riesgo permite afirmar que el desarrollo de la enfermedad es muy improbable. Sin embargo su valor predictivo positivo no es tan bueno, debido a la elevada presencia de estos alelos en la población general. Debido a esto, su mayor utilidad se restringe a *screening* de familiaridad, individuos con serología negativa, o a situaciones de fuerte sospecha clínica pero patrón histológico no concluyente.

4. Biopsia

Hasta el año 2012 el hallazgo de daño histológico a nivel duodenal se consideraba fundamental para llegar al diagnóstico de EC. Aunque este daño puede variar con el estadio y severidad de la enfermedad, de manera general la enteropatía provocada por el gluten se debe a un aumento de linfocitos intraepiteliales (LIEs) acompañados de atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas [93, 94].

Aunque el aumento de LIEs se considera el primer hallazgo detectable de la EC, su presencia no es exclusiva de la enfermedad. Se considera que existe un aumento de LIEs cuando su presencia en la mucosa es superior a 25 células por cada 100 enterocitos. El grado de atrofia es variable, existiendo desde pequeños acortamientos de las vellosidades, hasta una atrofia total, con ausencia de las mismas. Esto ha llevado a que a lo largo de los años, se hayan establecido diversas clasificaciones englobando estos parámetros. Actualmente la más empleada es la clasificación modificada de Marsh-Oberhuber [95, 96], tal como se detalla en la tabla 2, aunque hay que tener en cuenta que el anterior límite de 40 se ha rebajado a 25 [97].

Tabla 2: Clasificación modificada de Marsh-Oberhuber para el diagnóstico anatomopatológico de la EC.

	Marsh 0	Marsh 1	Marsh 2	Marsh 3a	Marsh 3b	Marsh 3c
LIEs	<40	>40	>40	>40	>40	>40
Criptas	Normal	Normal	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia
Vellosidades	Normal	Normal	Normal	Atrofia parcial	Atrofia subtotal	Atrofia total

Aunque los tipos 3b y 3c son muy característicos de un proceso activo en la enfermedad; la exclusión de otras causas, así como la consideración de todos los criterios diagnósticos en conjunto, se consideran fundamentales en el estudio de la enfermedad.

El hallazgo de atrofia en biopsia duodenal se consideró el *gold standard* en el diagnóstico de la enfermedad durante muchos años, pero al ser una técnica altamente invasiva y que presenta cierta subjetividad, en muchos casos se busca llegar al diagnóstico sin este procedimiento. Diversos estudios muestran que más del 95% de los niños pero sólo el 53% de los adultos pueden llegar a diagnosticarse correctamente sin biopsia [98]. De acuerdo con esto, desde el año 2012 se permite el diagnóstico sin biopsia de niños con clínica sugerente de EC, títulos anti-TG2 10 veces mayor que el límite superior de la normalidad confirmada con EMA y genética HLA-DQ2/DQ8 [1]. En adultos, la biopsia sigue siendo necesaria para el diagnóstico en todos los casos.

5. Inmunofenotipaje de LIEs

El aumento de LIEs parece una característica constante en la enfermedad. De hecho, la presencia de linfocitos T con TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ es una de las primeras anomalías que se detecta durante el desarrollo de la enfermedad, coincidiendo con la lesión histopatológica [99]. Los LIEs representan del 5 al 15% de las células aisladas a partir del epitelio [100] y la mayoría de ellos expresan la integrina αE (CD103) $\beta 7$. La mayoría de LIEs son linfocitos T CD8⁺. Además la expresión de TCR $\alpha\beta$ es predominante, aunque aproximadamente el 10% de LIEs expresan TCR $\gamma\delta$. Existe también un subgrupo de LIEs intestinales denominados *NK-like*, caracterizados por el fenotipo CD3⁻ CD103⁺. La función del subconjunto de los LIEs TCR $\gamma\delta$ en la EC no está del todo claro, pero las recientes investigaciones realizadas por medio de citometría de flujo apuntan hacia una función reguladora [101].

El aumento de LIEs TCR $\gamma\delta$ se considera casi patognomónico de la EC [102], aunque puede hallarse en otras enteropatías como alergias a alimentos [103], criptosporidiasis [104], déficit de IgA [105] y giardiasis [106]. Sin embargo, solo en el caso de la EC este aumento se mantiene de forma permanente [107]. Además de los LIEs TCR $\gamma\delta$, la EC también se asocia con un descenso de linfocitos *NK-like* [108]. Esta población, que representa el segundo subtipo de LIEs más frecuente en un epitelio sano, llega a ser prácticamente indetectable en la EC activa. La combinación de ambos parámetros es necesaria para establecer el patrón característico de EC.

Estos linfocitos se estudian por citometría de flujo, encontrando las siguientes alteraciones en la EC:

Introducción

- Aumento porcentual total de linfocitos intraepiteliales respecto al total del epitelio. Este parámetro se corrige tras la eliminación del gluten de la dieta. Actualmente se considera que la población de LIEs es normal cuando se sitúa por debajo del 8-12 % del total del epitelio.
- Aumento porcentual de LIEs TCR $\gamma\delta$. Se mantiene casi constante independientemente de la dieta. Se considera indicativo de EC un porcentaje superior a 10% sobre el total de LIEs.
- Disminución porcentual de LIEs CD3⁻ CD103⁺ (*NK-like*). En pacientes con procesos activos de la enfermedad los valores caen por debajo del 10%, esta población se considera normal por encima del 20% de los LIEs totales.

El inmunofenotipaje de los LIEs es una determinación con parámetros de sensibilidad y especificidad muy elevados, pero su mayor utilidad se debe a que en principio mantiene su potencial diagnóstico durante la DSG. Los cambios se observan en todos los grupos de edad, pero son más marcados en niños [109].

6. Provocación con gluten

Tanto la atrofia intestinal como la presencia de anticuerpos específicos son signos que suelen desaparecer tras un periodo prolongado de DSG. En esta situación, solo la prueba genética se mantiene, teniendo en cuenta la limitación que conlleva, ya que solo tiene valor predictivo negativo. Por ello, en individuos que siguen una DSG es complicado establecer el diagnóstico. A excepción del inmunofenotipaje de los LIEs, no disponible en todos los centros y que exige la realización de una biopsia duodenal, por lo general es necesaria la reintroducción del gluten en la dieta. Actualmente, las

pruebas de provocación requieren un periodo suficiente como para causar una respuesta que incluya cambios histológicos, serológicos y/o sintomáticos lo cual puede variar enormemente de unos individuos a otros, por lo que no hay un periodo claramente establecido [110]. Estas pruebas también se aconsejan en individuos con diagnóstico incierto. La Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN, del inglés *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) establece la indicación de una provocación en niños con diagnóstico incierto como aquellos con autoanticuerpos específicos negativos o HLA DQ2/DQ8 negativo.

La presencia de parámetros diagnósticos poco claros, asociado a la creciente idea de que una DSG es signo de una alimentación más saludable, ha provocado que en los últimos años muchos individuos retiren voluntariamente el gluten de su dieta sin llevar a cabo un correcto diagnóstico de la enfermedad. En estos casos, la provocación con gluten se hace necesaria para confirmar la EC. Sin embargo, esta herramienta diagnóstica tiene algunas limitaciones, por la agresividad del desencadenante, y la necesidad de una endoscopia invasiva como prueba final. En conjunto, estos hallazgos han planteado la necesidad de alternativas, menos invasivas que contribuyan al diagnóstico de este grupo de pacientes.

En la década de 2000, Anderson y colaboradores mostraron como la administración oral de gluten (aproximadamente 200 g/día) durante tres días a los pacientes con EC en una estricta DSG provocaba una reacción específica de linfocitos T CD4 en pacientes con EC restringida a aquellos portadores de HLA-DQ2. Esta respuesta se podía visualizar en sangre periférica mediante el uso de un ensayo por inmunoadsorción

Introducción

ligado a enzimas (ELISpot, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*). Para ello se requería la recogida de muestras de sangre justo antes y seis días después de la provocación [111]. En este estudio observaron un incremento del 660% de los linfocitos productores de IFN- γ , a día 6 del inicio de la administración, determinando el origen intestinal de estos linfocitos por la expresión de la integrina $\alpha\text{E}\beta 7$ que permite a los linfocitos extravasar al epitelio intestinal [112]. Desde esta primera aplicación, varios estudios han demostrado que esta corta introducción de gluten es capaz de movilizar rápidamente linfocitos T en la sangre de pacientes celíacos en DSG, que puede revelarse mediante ensayos ELISpot o tecnología de tetrámeros para citometría de flujo, sugiriendo así su gran potencial en la práctica clínica [113-115].

Ontiveros y colaboradores desarrollaron un ensayo de sangre periférica para detectar linfocitos T específicos de gluten productores de IFN- γ después de su estimulación *in vitro* con péptidos de gluten [116].

Han y colaboradores utilizando el enfoque de la tecnología CyTOF demostraron con la misma pauta de provocación, un aumento de los linfocitos TCD8 y de linfocitos con TCR $\gamma\delta$ [117]. Estos linfocitos expresan los marcadores de migración a mucosa intestinal CD103 e integrina $\beta 7$, que constituyen la integrina $\alpha\text{E}\beta 7$. El porcentaje de células movilizado por la ingesta de gluten varía entre los pacientes individuales, desde 1% hasta 10% de las células CD8⁺ periféricas totales, pero es siempre superior al existente en individuos sin la enfermedad, en los que no se detecta este subgrupo celular o lo hace a un porcentaje muy inferior. Este estudio demostró que se trata de linfocitos T CD8 de memoria que se activan por la estimulación oral con gluten y circulan por la sangre periférica al tejido intestinal.

Este estudio resulta muy prometedor porque no restringe la observación de una respuesta a individuos con HLA-DQ2, ni limita a los epítomos de gluten más abundantes. Sin embargo, es necesaria la evaluación de su eficacia en el diagnóstico de la EC.

4) Inmunopatología

Bajo el término gluten se engloban un grupo de proteínas con alto contenido en glutamina y en prolina. La presencia de este último aminoácido hace que la digestión por endopeptidasas gástricas y pancreáticas resulte poco eficiente, llegando al intestino oligopéptidos relativamente largos, de en torno a 50 aminoácidos [118]. Estos péptidos atraviesan la barrera epitelial hasta la zona luminal, donde entran en contacto con la enzima TG2 [32], que se expresa de manera constitutiva en la lámina propia intestinal y se activa al producirse daño tisular [119, 120]. En condiciones normales contribuye principalmente al mantenimiento de la matriz extracelular, formando enlaces covalentes entre una glutamina de una proteína y una lisina de otra. Por su alto contenido en glutamina, los péptidos del gluten se convierten en diana de estas enzimas, originándose residuos de ácido glutámico. La carga negativa de este aminoácido hace que tengan gran afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8. Por tanto se convierten en péptidos inmunogénicos, susceptibles de ser reconocidos y procesados por las células presentadoras de antígenos. Estos péptidos son presentados por estas moléculas de HLA clase II a las células T CD4, desencadenándose un conjunto de reacciones en la lámina propia intestinal y conduciendo a la infiltración del epitelio por linfocitos, lo que finaliza con el daño de la mucosa intestinal característico de la enfermedad.

Introducción

La expansión de linfocitos entre los enterocitos y en la zona basolateral del epitelio intestinal incluye principalmente a los linfocitos T CD8 y linfocitos con TCR $\gamma\delta$, cuya determinación constituye la base de la prueba diagnóstica (“inmunofenotipo” de los LIEs). Dentro de los linfocitos T CD8 se ha caracterizado una subpoblación que presenta actividad citolítica independiente de su TCR, así como receptores propios de NK [121, 122]. La citotoxicidad de estos linfocitos, denominados CTLs, se activa por la citoquina IL-15 [123], la cual se ha demostrado que es producida por los enterocitos debido a la presencia de gluten [124].

Otro proceso que tiene lugar, aunque no está del todo esclarecido, es la formación de anticuerpos anti-TG2, los cuales aparecen en suero de una manera específica en los pacientes de EC. Parece que los linfocitos B, activados por linfocitos T específicos de gluten, pueden reconocer de manera cruzada el complejo formado por la TG2 y los péptidos de gluten, de manera que forman principalmente anticuerpos frente a la enzima, pese a que la reacción proviene de una respuesta estrictamente desencadenada por el gluten [125], como se muestra en la figura 4.

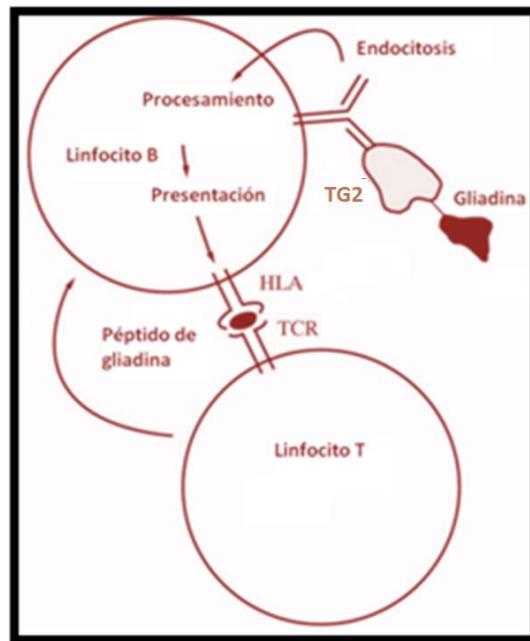


Figura 4: Producción de autoanticuerpos anti-TG2 por linfocitos B, debido a una respuesta cruzada con los péptidos de gliadina.

Respuesta inmune Th17

La EC se ha considerado tradicionalmente como una respuesta inmune tipo Th1. Sin embargo, el creciente estudio de los linfocitos Th17, cuya implicación se ha demostrado en un gran número de enfermedades autoinmunes [126-128], ha extendido el debate a su papel en la EC.

Los linfocitos Th17 proceden de linfocitos T *naïve* CD4⁺ CD161⁺, y requieren para su diferenciación la estimulación por las citoquinas IL-6, TGF- β , IL-23 e IL-1 β . Por medio del receptor de IL-23, se desencadena una respuesta a través de JAK2 y TYK2 [129], que lleva a la transcripción de las citoquinas efectoras IL-17A y IL-17F [130], a cargo de

Introducción

los factores de transcripción ROR- γ t y STAT3. Otros factores de transcripción también están implicados en el proceso, como VAMP3 y SMAD3 [131], o el regulador negativo de la diferenciación a Th17, RHBDD3 [132]. Todo esto lleva a la expresión de moléculas de membrana como CCR6; y a la producción de citoquinas solubles como IL-21, IL-22 e IL-26 [133], tal como se muestra en la figura 5.

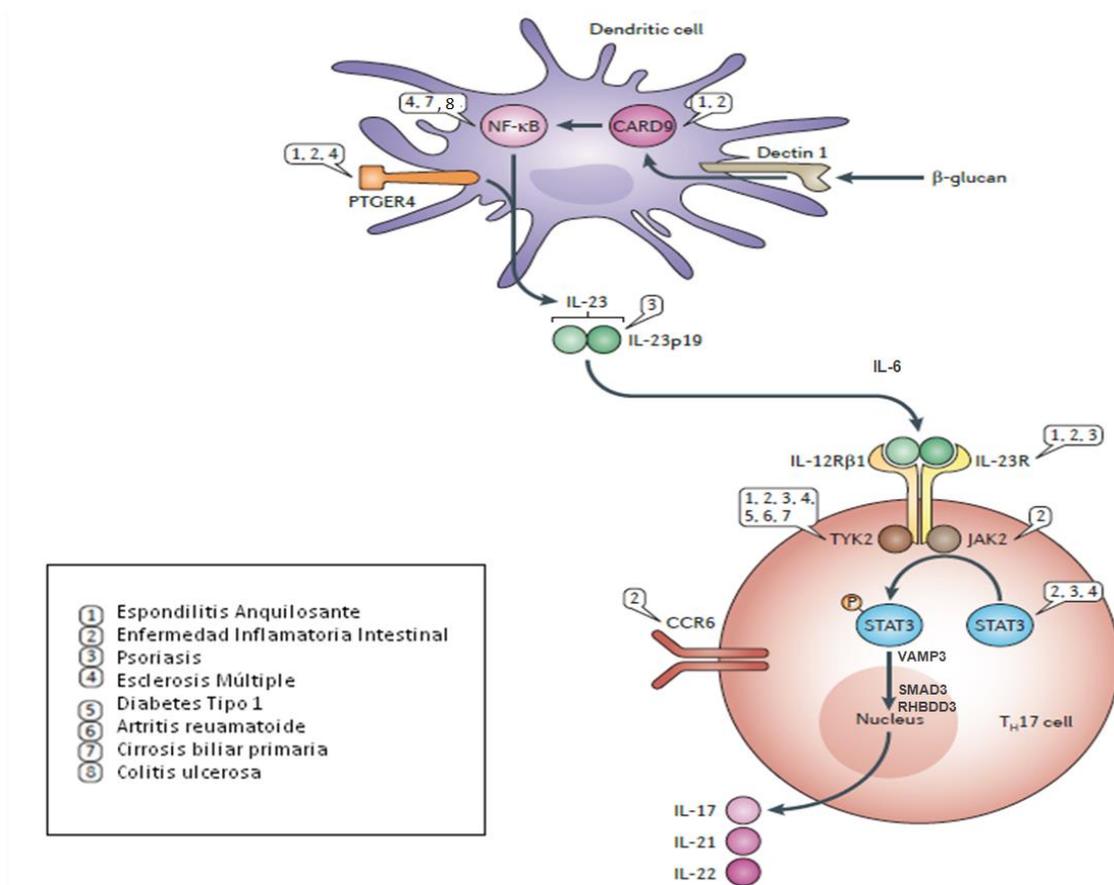


Figura 5: Principales moléculas que participan en la ruta Th17, así como, las enfermedades autoinmunes en que se ha implicado estas moléculas. Adaptada de Parkes, M. y colaboradores [56].

El debate que existe acerca de la implicación de estas células en la EC se debe, por un lado, a que los estudios genéticos no parecen asociar genes relacionados con este tipo de respuesta a su susceptibilidad [134], con la excepción de la región *IL2/IL21* [41];

pero sin embargo, sí se han encontrado niveles alterados de las citoquinas características de la ruta en pacientes con enfermedad activa, tanto a nivel de expresión de RNA [135, 136], como a nivel de proteína soluble [137, 138]. Además, un estudio de La Scaleia y colaboradores, apunta a una pérdida de la regulación de las Th17 en pacientes pediátricos con EC [139].

5) Tratamiento

El tratamiento de elección para la EC consiste únicamente en el seguimiento de una dieta estricta sin gluten a lo largo de toda la vida.

Diversos estudios ponen de manifiesto que la sintomatología mejora hasta alcanzar resultados equiparables a los de la población general cuando se sigue una DSG de forma mantenida [140], incluyendo una disminución en el riesgo a padecer otras enfermedades autoinmunes [141], así como a desarrollar linfomas asociados a la enteropatía [142]. Este hecho resalta la importancia de establecer un diagnóstico certero con poco retraso desde el debut de la enfermedad.

Existe un grupo de pacientes de EC que no responden a la retirada del gluten, estos casos se denominan pacientes refractarios y representan aproximadamente el 2% de los enfermos [143]. Se considera refractario un paciente con persistencia de la sintomatología tras un mínimo de 12 meses sin gluten [144]. Además de la persistencia de la sintomatología, este grupo de pacientes muestra un mayor riesgo de desarrollar linfoma de células T [145]. En estos casos, los tratamientos de elección se basan en inmunosupresores y antiinflamatorios, como prednisolona y azatioprina, que en ciertos estudios han mostrado una efectividad cercana al 50% [146].

Introducción

Este hecho, pone de manifiesto la necesidad de buscar terapias alternativas, así como, de incrementar el conocimiento que se tiene acerca de la inmunopatogenia de esta enfermedad. Un mayor conocimiento de los genes y procesos implicados en el desarrollo de la EC ayudará a buscar tratamientos alternativos. Del mismo modo, el conocer procesos en común con otras enfermedades autoinmunes podrá permitir establecer qué fármacos, útiles en otras enfermedades podrían resultar eficaces en EC. Actualmente existen numerosos estudios centrados en el desarrollo de nuevas terapias. En la Figura 6 se muestran las principales dianas objeto de estudio.

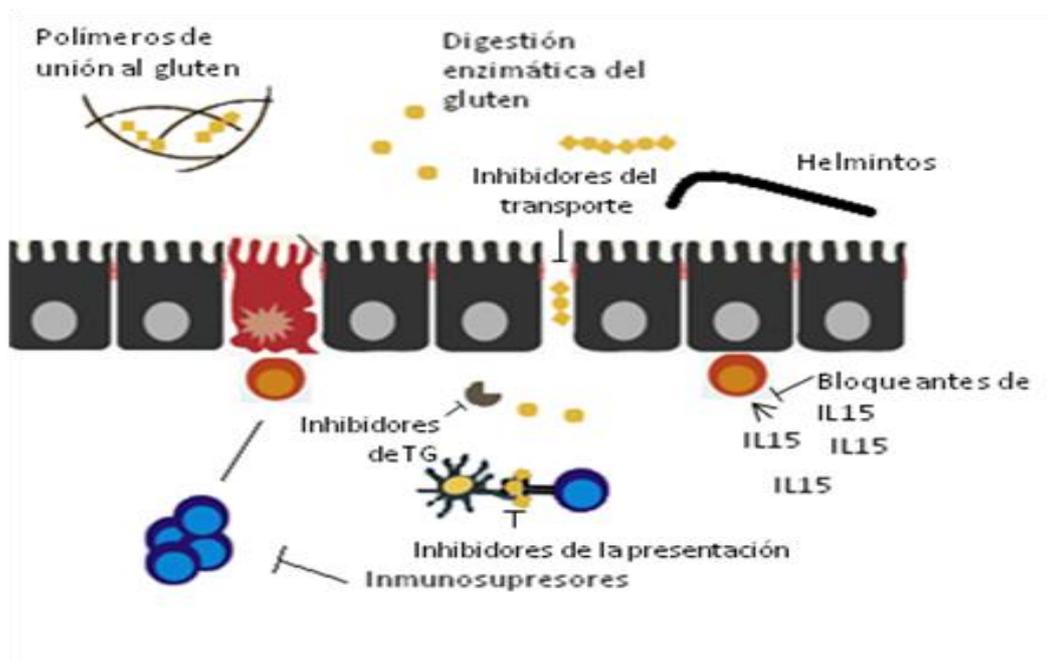


Figura 6: Resumen de las principales dianas de los tratamientos alternativos en la EC.

OBJETIVOS

1. Estudiar la expresión intestinal en pacientes de EC de genes localizados en loci de riesgo a la enfermedad, así como de genes relacionados con la respuesta inmune Th17, en pacientes con debut pediátrico y adulto.
2. Conocer si existen diferencias a nivel de expresión génica entre pacientes con EC con serología específica positiva y negativa, mediante el estudio en ambos grupos de pacientes de genes relacionados previamente con EC.
3. Avanzar en el conocimiento de la base genética compartida entre EC y CU, mediante el estudio de la expresión de genes localizados en regiones de riesgo compartido a ambas enfermedades, así como en regiones de riesgo a EC, en pacientes de EC y CU.
4. Estudiar si la interacción génica descrita entre los genes *C1orf106* y *TEC* en la susceptibilidad a ECr, también influye en el riesgo a presentar EC y CU.
5. Estudiar la validez del aumento de linfocitos T CD8⁺ y TCRγδ⁺ activados dirigidos al intestino que aparecen en sangre periférica tras una corta provocación con gluten como posible método diagnóstico de EC en individuos en DSG.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Sujetos de estudio

Se obtuvo el consentimiento informado firmado de los sujetos incluidos en los estudios, los cuales habían sido previamente aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos. Las características de los sujetos estudiados se detallan a continuación para cada estudio.

1. Estudios de expresión génica

a. Pacientes de EC

El diagnóstico de EC se llevó a cabo siguiendo las guías recomendadas, que varían en función del rango de edad. Para el diagnóstico pediátrico se siguieron los criterios de la ESPGHAN [1, 147], y en adultos el diagnóstico se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la *American Gastroenterological Association (AGA)* [148] y la regla 4 de 5 descrita por Fasano y Catassi [149]. De esta manera, se seleccionaron 20 pacientes de EC: 14 con diagnóstico pediátrico y 6 con diagnóstico adulto. Por otro lado, se incluyeron un total de 8 pacientes con anticuerpos EMA negativos pero anti-TG2 neoepítipo positivo, todos ellos con diagnóstico pediátrico.

En la tabla 3 se muestran los datos demográficos de cada uno de los grupos.

Tabla 3: Datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio de expresión intestinal.

	Niños EMA + (n= 14)	Niños EMA – (n= 8)	Adultos (n= 6)
Edad media ± ES	6±3	6±5	39±5
Rango Edad	1-15	1-15	28-52
Ratio Mujer: Hombre	1.7: 1	0.6: 1	4.0: 1

Todos los pacientes EMA positivos eran HLA-DQ2.5 y mostraban atrofia de vellosidades. Entre los pacientes EMA negativos la genética era más diversa, incluyendo dos individuos no HLA-DQ2/DQ8. El grado de lesión histológica era menor que el observado en los pacientes EMA positivos. Los diversos parámetros de los pacientes obtenidos en las pruebas diagnósticas se detallan en la tabla 4.

Tabla 4: Parámetros diagnósticos de los pacientes incluidos en el estudio de expresión.

Sintomatología Clínica	HLA	Biopsia	Respuesta a DSG
Niños EMA+			
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3b	Incompleta*
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Asintomático	DQ2.5	M3b	-
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3c	Sí
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Asintomático	DQ2.5	M3b	-
Dermatitis herpetiforme	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Niños EMA-			
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3a	Sí
Clásica	No DQ2/DQ8	M3a	Sí

Sintomatología Clínica	HLA	Biopsia	Respuesta a DSG
Clásica	DQ2.5	M2	Sí
Clásica	DQ2.5	M2	Sí
Clásica	No DQ2/DQ8	M3c	Incompleta*
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.2	M3a	Sí
Clásica	DQ2.2	M3a	Sí
Adultos EMA+			
Clásica	DQ2.2	M3a	Sí
Clásica	DQ2.5	M3b	Sí
Clásica	DQ2.5	M3a	Sí
Asintomática	DQ2.5	M3b	-
Anemia ferropénica	DQ2.5	M3a	Sí
Familiaridad	DQ2.5	M3b	-

**mantiene los anticuerpos ligeramente positivos. – Respuesta a DSG no evaluada.*

DSG: dieta sin gluten; M: Marsh

b. Pacientes de CU.

Se estudiaron 19 muestras de colon/recto correspondientes a 13 pacientes adultos con CU: 12 que corresponden a tejido inflamado y no inflamado del mismo paciente, 6 a tejido no inflamado y 1 a tejido inflamado. La inflamación de la mucosa se identificó por la presencia de signos endoscópicos de actividad de la enfermedad y se corroboró con el aumento de expresión de *S100A9* [150].

La CU se diagnosticó de acuerdo con los hallazgos clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos según los criterios aceptados [151]. En la tabla 5 se detallan los datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 5: Datos demográficos de los pacientes de CU incluidos en el estudio de expresión intestinal.

	CU inflamado (n= 12)	CU no inflamado (n= 7)
Edad media ± ES	56±11	53±12
Rango Edad	45-72	28-72
Ratio Mujer: Hombre	0.75:1	1:1

c. Pacientes de ECr.

Se recogieron 7 muestras de colon/recto correspondientes a pacientes adultos con ECr, 4 correspondientes a tejido inflamado y 3 de tejido no inflamado (Tabla 6).

De igual manera que en los pacientes de CU, la inflamación de la mucosa se identificó por la presencia de signos endoscópicos de actividad de la enfermedad y el aumento de expresión de *S100A9* [150]. El diagnóstico se llevó a cabo de acuerdo con los hallazgos clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos según los criterios aceptados [151].

Tabla 6: Datos demográficos de los pacientes de ECr incluidos en el estudio de expresión intestinal.

	ECr inflamado (n= 4)	ECr no inflamado (n= 3)
Edad media ± ES	43±16	42±15
Rango Edad	20-55	26-56
Ratio Mujer: Hombre	0.5:1	0.3:1

d. Controles

Como controles para el estudio de EC se emplearon muestras duodenales de individuos con histología normal, anticuerpos específicos de EC negativos y ausencia de enfermedades autoinmunes. Se obtuvieron muestras de 7 controles pediátricos y 5 controles adultos.

Para el estudio en CU y ECr se seleccionaron 4 muestras de colon de individuos con histología normal y ausencia de enfermedades autoinmunes como controles. Los datos demográficos de los controles se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Datos demográficos de los controles utilizados en los estudios de expresión intestinal.

	Controles de duodeno pediátricos (N=7)	Controles de duodeno adultos (N=5)	Controles de colon (N=4)
Edad media \pm ES	8 \pm 6	51 \pm 24	58 \pm 13
Rango Edad	2-15	22-75	40-72
Ratio Mujer: Hombre	1.3: 1	1.5: 1	1:1

2. Estudio de interacción génica

Para este estudio se incluyeron 995 pacientes de EC, 256 pacientes de ECr, 337 de CU y 637 controles. En EC el *ratio* mujer: hombre fue 1.6:1; en ECr 1.1:1; en UC 1.5:1 y en controles 1.3:1.

3. Estudio de provocación

Se incluyeron 3 grupos de individuos: pacientes de EC con diagnóstico previo, individuos con sospecha de EC y controles; cuyos datos demográficos se muestran en la tabla 8. Después de al menos un mes en DSG, cada participante consumió 160-200g de pan blanco de molde con gluten por día durante tres días consecutivos (días 1, 2 y 3). Se realizó una extracción de sangre antes de comenzar la prueba (día 0) y otra seis días después (día 6). En algunos individuos se realizó también la extracción a día 3 con el fin de evaluar una posible respuesta más rápida.

Tabla 8: Datos demográficos de los sujetos incluidos en el estudio de provocación.

	Pacientes EC (n=10)	Sospecha de EC (n=40)	Controles (n=19)
Edad media ± ES	31±16	41±15	36±6
Rango Edad	9-67	10-68	27-51
Ratio Mujer: Hombre	1.5:1	4.3:1	2.7:1

a. Pacientes de EC

Todos los pacientes celíacos tuvieron un diagnóstico basado en serología específica positiva e histología compatible (todos presentaron atrofia de las vellosidades en la biopsia duodenal, excepto uno que presentó linfocitosis intraepitelial, M1). Todos eran HLA-DQ2.5. Se estudiaron 8 pacientes adultos y 2 niños. A uno de los pacientes se le realizó el estudio dos veces con un año en DSG entre muestras (Id 5). Los datos demográficos, tiempo en DSG y parámetros diagnósticos se detallan en la tabla 9.

Tabla 9: Características de los pacientes con EC del estudio.

ID	EDAD	Edad debut	DSG	Clínica	Biopsia
1	35	33	2 años	Ferropenia	M3b
2	34	33	5 meses	Subclínica, familiaridad	M3b
3	67	62	1 año	Ferropenia	M3a
4	42	36	8 años	Subclínica, familiaridad	M3
5	26	26	1 mes	Ferropenia	M3b
5*	27	26	1 año	Ferropenia	M3b
6	36	33	2 años	Clásica	M3b
7	25	24	8 meses	Ferropenia	M3b
8	32	26	6 años	Clásica	M1
9	11	11	10 meses	Subclínica	M3c
10	9	8	11 meses	Subclínica	M3c

*segunda provocación del paciente 5. EC= enfermedad celíaca, M= Marsh.

b. Pacientes con sospecha de EC

Se estudiaron 40 individuos con sospecha de EC que estaban siendo evaluados en consultas específicas de nuestro hospital, tanto del Servicio de Aparato Digestivo como de Pediatría. Algunos de ellos mantenían una DSG debido a un diagnóstico incierto anterior, mientras que otro grupo había comenzado una DSG antes de realizar las pruebas de diagnóstico. Por esta razón, hay que tener en cuenta que algunos pacientes solo tienen estudiados los anticuerpos específicos en DSG. Los datos de los pacientes incluidos en el estudio se detallan en la tabla 10.

Tabla 10: Parámetros diagnósticos de los pacientes incluidos en el estudio de provocación por sospecha de EC.

ID	Clínica	Ac	HLA	Biopsia duodeno	LIEs		Tiempo en DSG
					TCR $\gamma\delta$	iNK	
S1	Clásica	Negativos	DQ8	M1	1,7	8,9	3 m
S2	Clásica	Negativos	DQ2.2	-	-	-	1 mes
S3	Clásica	Negativos	DQ2.2	-	-	-	1 mes
S4	Ferropenia	Negativos	DQ2.5	M3A	-	-	10 m
S5	Clásica	Anti-TG2+ EMA-	NO DQ2/DQ8	-	-	-	3 a
S6	Clásica y astenia	Negativos	DQ2.5/ DQ8	-	-	-	6 m
S7	Clásica y astenia	Negativos	DQ2.5/ DQ2.5	M0	-	-	6 m
S8	Ferropenia e hipertiroidismo	Anti-TG2+ EMA-	DQ2.5	-	-	-	1 a
S9	Subclínica, familiaridad	Negativos	DQ2.5	M1	2,5	12,2	7 m
S10	No clásica	Negativos	DQ2.2	-	-	-	9 m
S11	Clásica	Anti-TG2+ EMA-	DQ7.5	M1	-	-	3 a
S12	Ferropenia	Negativos	DQ2.5/ DQ2.5	Duodenitis crónica	-	-	2 a
S13	Ferropenia	Negativos	DQ7.5	Duodenitis crónica	-	-	2,5 a
S14	Clásica	Negativos	NO DQ2/DQ8	M0	-	-	1,5 a
S15	Ferropenia	Negativos	DQ7.5	M1	-	-	3,5 a
S16	Ferropenia e hiperprolactinemia	Negativos	DQ2.5	M0	-	-	3 a
S17	Clásica	Negativos	DQ8	-	-	-	1,5 m
S18	Clásica	Negativos	DQ8	M0	1,8	18,1	5 a
S19	Bajo peso y aftas orales	Anti-TG2+ EMA-	DQ7.5	M0	6,1	7,4	3 a

S20	Clásica, infertilidad	Negativos	DQ2.2	Duodenitis crónica	3,8	11	1 a
S21	Clásica	Anti-TG2+ EMA+	DQ2.5	Cápsula Crosb negativa	22,3	1	6,5 a
S22	Clásica	Anti-TG2+ EMA-	DQ8	M3B	-	-	10 m
S23	Clásica	Negativos	DQ7.5	Duodenitis crónica	5,6	2,4	5 a
S24	Clásica	Negativos	NO DQ2/DQ8	M3b	18,8	42,2	6 m
S25	Epigastralgia	Negativos	DQ8	M0	2,7	12,6	10 a
S26	Clásica	Anti-TG2	DQ2.5	M0	1,3	23,5	1,5 m
S27	Clásica	Negativos	DQ2.5/DQ7.5	M0	2,2	12	1,5 m
S28	Clásica	Negativos	NO DQ2/DQ8	M3c	-	-	8 a
S29	Clásica	Negativos	DQ8	M1	3	10	4 m
S30	Disfagia intermitente, migraña	Negativos	NO DQ2/DQ8	Duodenitis crónica	-	-	2 a
S31	Ferropenia, déficit vitaminas B12 y D	Negativos	DQ2.5	M0	-	-	5 a
S32	Clásica	Negativos	NO DQ2/DQ8	-	-	-	4,5 a
S33	No clásica	Anti-TG2+ EMA-	DQ7.5	M0	-	-	6 a
S34	Clásica	Negativos	DQ2.5	-	-	-	2 m
S35	Clásica	Negativos	DQ7.5	-	-	-	1 m
S36	Clásica	Negativos	DQ2.2	-	-	-	1 a
S37	Clásica y astenia	-	-	-	-	-	1 m
S38	Clásica	Anti-TG2+ EMA-	NO DQ2/DQ8	M3a	-	-	3a
S39	Clásica	Anti-TG2+ EMA-	DQ2.5/DQ7.5	M1	3,7	22,5	4 a
S40	Clásica	Negativos	DQ2.5	M0	-	-	1,5 m

a: años; Ac: Anticuerpos; EC: enfermedad celíaca; EMA: anti-endomisio; - no realizado. TG2: transglutaminasa; m: meses.

c. Controles

Los sujetos empleados como control corresponden a padres o amigos de personas con EC o a personal del Hospital Clínico San Carlos. Todos ellos clínicamente sanos, siguieron al menos un mes de DSG justo antes de comenzar el estudio. La EC se descartó serológicamente en todos los voluntarios. El HLA de los controles mostró una gran diversidad, incluyendo cinco individuos HLA-DQ2.5. La genética específica, considerando las distintas categorías de riesgo a EC se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Genética de los controles incluidos en el estudio de provocación.

HLA	Controles (n=19)
DQ2.5	5
DQ8	4
DQ2.2	2
DQ7.5	3
Sin riesgo	5

2) Preparación de las muestras

1. Aislamiento de DNA de sangre periférica.

El DNA genómico se obtuvo de leucocitos procedentes de muestras de 10 ml de sangre periférica. La extracción del DNA se llevó a cabo mediante el método “*Salting out*”, previamente descrito en la literatura [152].

La concentración y pureza del DNA aislado se determinaron por espectrofotometría (*Nanodrop, Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA*), midiendo la absorbancia a 260 nm, siendo una unidad de densidad óptica (DO) correspondiente a una concentración de 50 ng/ μ l. La pureza del DNA se estimó mediante el *ratio* de absorbancia 260/280 nm, aceptando como adecuados valores superiores a 1.7. Todas las muestras se estandarizaron a diluciones de trabajo a una concentración de 10 ng/ μ l.

2. Aislamiento de RNA de biopsias intestinales.

Todas las biopsias se recogieron simultáneamente a la obtención de biopsias con fines diagnósticos (EC, CU y ECr) o de seguimiento de la enfermedad (CU y ECr). Las muestras de tejido se introdujeron inmediatamente en *RNAlater* y se mantuvieron a 4°C 24-48 horas, tras lo cual se introdujeron a -70°C hasta su uso.

El RNA se aisló con el kit *RNeasy* (*Qiagen, Westburg, Leuden, Países Bajos*). La cuantificación y pureza del RNA se determinó por espectrofotometría, de manera similar a lo descrito para el DNA. La calidad del RNA se evaluó con el ensayo cualitativo (RQ1 y RQ2) (*BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA*). El cDNA se obtuvo mediante RT-

Materiales y métodos

PCR utilizando el kit *High-Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3. Aislamiento de LIEs de biopsias duodenales.

Los LIEs se aislaron a partir de biopsias intestinales obtenidas por endoscopia gastrointestinal de la porción anterior del duodeno. Las biopsias se recogieron en suero fisiológico y posteriormente fueron introducidas en medio completo RPMI 1640, 10% de suero de ternera fetal, glutamina 2mM, penicilina y estreptomina (10000 U/ml). La liberación de LIEs del resto de epitelio intestinal se llevó a cabo incubando durante 45 minutos en agitación con el medio completo suplementado con EDTA 1mM y DTT 1mM.

4. Suero de sangre periférica

Se recogió el suero de pacientes de EC y controles para el estudio de los anticuerpos específicos de EC. La sangre periférica recogida en tubo seco se centrifugó 10 minutos a 3500 rpm, tras lo cual se recogió el sobrenadante, que se congeló inmediatamente a -40°C hasta su utilización.

3) Determinación de anticuerpos específicos en suero

Se determinaron los anticuerpos anti-TG2 de tipo IgA y la positividad de estos se confirmó mediante determinación de EMA de tipo IgA. Los kits empleados para cada determinación corresponden a:

TG2 IgA: “Aeskulisa tTg-A *New generation*” (Aesku. Diagnostics Wendelsheim, Alemania), que utiliza como antígenoTG2 recombinante humana y péptidos específicos de gliadina.

EMA (IgA): IFI a una dilución 1:5 en porta-objetos con tejido de esófago de mono como antígeno substrato (ImmcoDiagnostics, Buffalo, Nueva York, USA).

4) Genotipado HLA

El genotipado HLA se realizó mediante PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide*) con tecnología Luminex para *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* (*Tepnel Lifecodes Corp, Stamford, Connecticut, USA*). El *HLA-DQA1* se infirió de la combinación de *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*.

5) Genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

El análisis de SNPs se llevó a cabo mediante sondas específicas de alelo marcadas con fluorescencia empleando la tecnología TaqMan (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Se utilizaron sondas marcadas en sus extremos 5' con un fluoróforo diferente para cada una de las posibilidades alélicas: FAM (6-carboxifluoresceína) o VIC (4, 7, 2', 5', 7', -hexaclaro-6-carboxifluoresceína). En ambos casos, en su extremo 3' presentan un *quencher* con actividad “secuestradora” de la fluorescencia. En la técnica PCR a tiempo real, la sonda se une específicamente a su secuencia complementaria en función del polimorfismo que presente la secuencia de DNA. Ante la presencia de este híbrido, una enzima DNA polimerasa (*Taq Gold*) mediante su actividad exonucleasa 5' → 3' degrada la sonda, provocando la liberación del *quencher* y permitiendo la

Materiales y métodos

emisión de fluorescencia, que será diferente en función del alelo presente y por tanto de la sonda hibridada.

El equipo utilizado para el análisis de los ensayos TaqMan fue un ABI PRISM 7900HT de *Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)*.

Se estudiaron dos polimorfismos previamente descritos en el gen *C1orf106* y el gen *TEC*. Tras lo cual realizamos una selección de polimorfismos mediante un *tagging*, empleando los datos disponibles en la base de datos HapMap. Este modo de selección permite estudiar el número mínimo de SNPs necesarios para detectar la casi totalidad de la variabilidad genética en una región cromosómica, en este caso lo empleamos en la región donde se localiza el gen *TEC*. Este análisis derivó en la inclusión de dos nuevos polimorfismos al estudio. La posición de todos ellos se muestra en la figura 7.

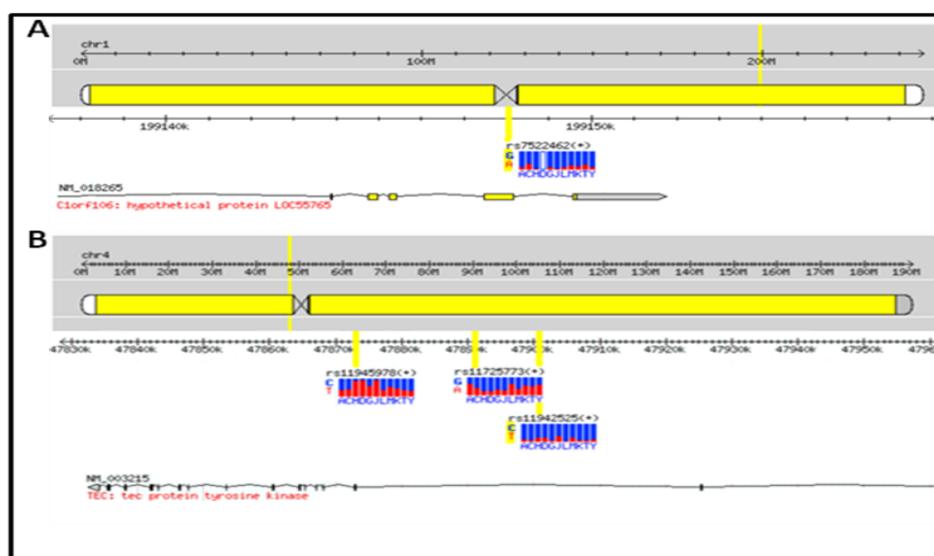


Figura 7: Polimorfismos estudiados en los genes a) *C1orf106* y b) *TEC*

(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los ensayos utilizados para el genotipado de cada SNP se detallan en la tabla 12.

Tabla 12: Sondas utilizadas para el genotipado en los SNPs de *TEC* y *C1orf106*.

Gen	SNP	Ensayo Taqman
<i>C1orf106</i>	rs7522462	C__3030178_10
<i>TEC</i>	rs11725773	C__30971954_10
<i>TEC</i>	rs11912525	C__2479094_10
<i>TEC</i>	rs11945978	C__1557335_10

Calidad del genotipado

Para la evaluación del genotipado, se exigió una tasa de éxito (número de muestras genotipadas con éxito/número de muestras totales*100) superior al 95%. Por otro lado, se comprobó que las frecuencias alélicas de los SNPs estudiados se ajustaran en todos los casos a las proporciones esperadas bajo el equilibrio de *Hardy-Weinberg*. Estas proporciones fueron exigidas a la población control en todos los casos.

6) Estudios de expresión génica

La expresión génica se cuantificó por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), utilizando ensayos TaqMan de *Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)* y el autoanalizador ABI PRISM 7900HT.

La expresión del mRNA de cada gen se calculó mediante el valor delta- Ct ($\Delta Ct = Ct \text{ gen de estudio} - Ct \text{ gen de referencia}$), donde valores menores de ΔCt representan un mayor número de copias del mRNA amplificado. Para la representación gráfica de los niveles de expresión, se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Control de calidad de los estudios de expresión.

Para la evaluación de la calidad de los estudios de expresión se duplicó el análisis por PCR a tiempo real de muestras aleatoriamente seleccionadas, exigiendo una replicabilidad de las mismas de máximo un Ct en cada gen (cada Ct corresponde con un ciclo de amplificación que implica la duplicación de la cantidad inicial de RNA).

1. Genes seleccionados para el estudio de niños y adultos con EC y comparación con CU

En el estudio de expresión intestinal de pacientes celíacos adultos y pediátricos se cuantificó la expresión de 48 genes mediante placas de 384 pocillos *Custom TaqMan Array Cards (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*. Treinta y uno de estos genes estaban localizados en 18 regiones asociadas con riesgo genético a padecer EC y 13 genes estaban funcionalmente relacionados con la respuesta inmune Th17.

El conjunto de estos genes, así como el ensayo específico utilizado en cada caso se muestran en la tabla 13. Para uno de los genes analizados *IL1RL1*, se incluyeron dos sondas diferentes permitiendo discriminar las dos isoformas en que se presenta la proteína, una forma unida a membrana y una forma soluble.

Tabla 13: Genes incluidos en los estudios de expresión y grupo de estudio al que pertenecen. Se muestran los ensayos comerciales que se utilizaron en cada caso.

Gen	Ensayo Taqman	Grupo de estudio
<i>18s</i>	Hs99999901_s1	Gen de referencia
<i>BACH2</i>	Hs00222364_m1	Loci de riesgo (6q15)
<i>C1orf106</i>	Hs01009089_m1	Loci de riesgo (1q32.1)
<i>C2orf74</i>	Hs01376007_m1	Loci de riesgo (2p16.1)
<i>CCR4</i>	Hs99999919_m1	Loci de riesgo (3p22.3)
<i>CCR6</i>	Hs01890706_s1	Th17

Gen	Ensayo Taqman	Grupo de estudio
<i>CD28</i>	Hs01007422_m1	Loci de riesgo (2q33.2)
<i>FASLG</i>	Hs00181225_m1	Loci de riesgo (1q24.3)
<i>FBXO48</i>	Hs01043600_m1	Loci de riesgo (2p13.3)
<i>GLB1</i>	Hs01035168_m1	Loci de riesgo (3p22.3)
<i>HCFC1</i>	Hs00232039_m1	Loci de riesgo (Xq28)
<i>HPRT1</i>	Hs99999909_m1	Gen de referencia
<i>ICOSLG</i>	Hs00323621_m1	Loci de riesgo (21q22.3)
<i>IL17F</i>	Hs00369400_m1	Th17
<i>IL18R1</i>	Hs00977691_m1	Loci de riesgo (2q12.1)
<i>IL18RAP</i>	Hs00977695_m1	Loci de riesgo (2q12.1)
<i>IL1RL1</i>	Hs01073297_m1*	Loci de riesgo (2q12.1)
<i>IL1RL1</i>	Hs01073300_m1#	Loci de riesgo (2q12.1)
<i>IL2</i>	Hs00174114_m1	Loci de riesgo (4q27)
<i>IL21</i>	Hs00222327_m1	Loci de riesgo (4q27) y Th17
<i>IL22</i>	Hs01574154_m1	Loci de riesgo (12q15)
<i>IL23A</i>	Hs00372324_m1	Th17
<i>IL23R</i>	Hs00332759_m1	Th17
<i>IL6</i>	Hs00985639_m1	Th17
<i>IRAK1</i>	Hs01018347_m1	Loci de riesgo (Xq28)
<i>JAK2</i>	Hs00234567_m1	Th17
<i>OLIG3</i>	Hs00703087_s1	Loci de riesgo (6q23)
<i>PLEK</i>	Hs00950975_m1	Loci de riesgo (2p14)
<i>PTPN2</i>	Hs00959896_m1	Loci de riesgo (18p11.21)
<i>PUS10</i>	Hs00328708_m1	Loci de riesgo (2p16.1)
<i>REL</i>	Hs00968440_m1	Loci de riesgo (2p16.1)
<i>RHBDD3</i>	Hs00202161_m1	Th17
<i>RPLP0</i>	Hs99999902_m1	Gen de referencia
<i>SH2B3</i>	Hs00193878_m1	Loci de riesgo (12q24.12)
<i>SMAD3</i>	Hs00969210_m1	Th17
<i>STAT3</i>	Hs00374280_m1	Th17
<i>TAGAP</i>	Hs01097874_m1	Loci de riesgo (6q25.3)
<i>TEC</i>	Hs00938888_m1	Loci de riesgo (4p11)
<i>TMEM187</i>	Hs01920894_s1	Loci de riesgo (Xq28)
<i>TNFAIP3</i>	Hs00234713_m1	Loci de riesgo (6q23.3)
<i>TNFSF18</i>	Hs00183225_m1	Loci de riesgo (1q24.3)
<i>TYK2</i>	Hs01105959_g1	Th17
<i>UBE2L3</i>	Hs01062161_g1	Loci de riesgo (22q11.21)
<i>VAMP3</i>	Hs00922166_m1	Th17
<i>YDJC</i>	Hs00419215_g1	Loci de riesgo (22q11.21)
<i>ZFP36L1</i>	Hs00245183_m1	Loci de riesgo (14q24.1)
<i>ZMIZ1</i>	Hs00393480_m1	Loci de riesgo (10q22.3)

*isoforma que codifica la proteína soluble.

isoforma que codifica tanto la proteína soluble como la de membrana.

Materiales y métodos

En el estudio comparativo con CU se incluyeron los 31 genes pertenecientes a las 18 regiones asociadas con riesgo a padecer EC, 13 de ellas de susceptibilidad también a CU. Las regiones con susceptibilidad común a ambas enfermedades se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Regiones de susceptibilidad genética comunes a EC y CU y principales genes candidatos.

Región cromosómica	Genes
1q32.1	<i>C1orf106</i>
2p16.1	<i>C2orf74, PUS10, REL</i>
2q12.1	<i>IL18R1, IL18RAP, IL1RL1</i>
2q33.2	<i>CD28, CTLA4, ICOS</i>
4q27	<i>ADAD1, KIAA1109, IL2, IL21</i>
6q15	<i>BACH2</i>
6q23	<i>OLIG3, TNFAIP3</i>
10q22.3	<i>ZMIZ1</i>
12q24.12	<i>SH2B3, ATXN2</i>
14q24.1	<i>ZFP36L1</i>
18p11.21	<i>PTPN2</i>
21q22.3	<i>ICOSLG</i>
22q11.21	<i>UBE2L3, YDJC</i>

En el estudio se incluyeron 3 genes de referencia (*RPLP0*, *HPRT1* y *18s*), pero ninguno de ellos presentó las características requeridas para ser utilizado en el análisis de los datos. Debido a esto, se analizaron los genes de estudio utilizando dos algoritmos: *geNorm* versión 3.5 [153] y *NormFinder* versión 0.953 [154]. Los genes *PUS10* y *GLB1*

presentaron alta estabilidad en tejido duodenal y por tanto fueron utilizados como genes de referencia en el estudio de EC. Para las muestras de colon el gen *TYK2* mostró alta estabilidad.

2. Genes seleccionados para el estudio de pacientes EMA negativos

En niños EMA-negativos se estudió la expresión de 8 genes relacionados con el sistema inmune (*C1orf106*, *CD28*, *FASLG*, *IL18RAP*, *IL21*, *TAGAP*, *PLEK* y *ZFP36L1*), los cuales fueron elegidos por presentar una expresión alterada en EC de acuerdo a la literatura previa. Como genes de referencia se incluyeron los genes *PUS10* y *GLB1*.

7) Estudios con citometría de flujo

Todos los estudios de citometría se procesaron con el citómetro de flujo FACSCanto II (*BD Biosciences, San Diego, CA*). Los datos se procesaron con el software FACS Diva (*BD Biosciences, San Diego, CA*).

1. Citometría de sangre periférica: estudio de provocación

Se utilizaron 250 µl de sangre completa. Las muestras se marcaron con 3 µl de los siguientes anticuerpos monoclonales: *FITC anti-human CD103* (clon Ber-ACT8) de Becton Dickinson (BD) Biosciences (San José, California, USA); *PE anti-human/mouse integrin β7* (clon FIB504), *PerCP- Cy5.5 anti-human CD38* (clon HIT2), *BV421 anti-human TCRγδ* (clon B1) y *APC anti-human CD8* (clon SK1), todos ellos de BioLegend (San Diego, CA, USA). Tras el marcaje, las muestras se incubaron 20 minutos en oscuridad a 4°C, tras lo cual se lisaron los eritrocitos con 3 ml del reactivo *FACSLysing* de *BD Biosciences*.

Materiales y métodos

En todos los casos, de forma paralela a la muestra se analizó un tubo como control negativo (sin ningún marcaje) y un control de isotipo con los anticuerpos: *FITC mouse IgG1 κ* de BD Biosciences; *PE rat IgG2a κ* (clon RTK2758) y *BV421 mouse IgG1 κ* (clon MOPC-21) de BioLegend; y *mouse APC IgG1* de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany).

2. Citometría de biopsia duodenal: inmunofenotipo de LIEs

Tras el aislamiento de los LIEs, se marcaron 150 µl de la suspensión obtenida con los siguientes anticuerpos conjugados con fluorocromos para su utilización por citometría de flujo: *FITC anti-human CD103* (clon Ber-ACT8), *PE anti-TCR γ/δ* (clon 11F2), *PerCP-Cy5.5 anti-CD3* (clon SK7) y *APC anti-human CD45* (clon HI30). Todos ellos de *BD Biosciences, San Diego, CA*.

Para el análisis de los datos, los LIEs fueron seleccionados por su expresión de CD45 y su menor complejidad.

8) Análisis estadísticos

1. Comparación de variables cuantitativas: estudios de expresión génica

El análisis de los datos de expresión génica se llevó a cabo mediante dos metodologías diferentes.

a. Test de la U de Mann-Whitney

En una primera aproximación, se utilizó el test U de Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre los enfermos celíacos, tanto adultos como pediátricos, comparados

con sus respectivos controles. Es una prueba no paramétrica que se aplica a muestras independientes y comprueba la heterogeneidad de las medianas de dos grupos. Para ello se calcula un estadístico para cada conjunto de datos, que depende tanto de los tamaños muestrales, como de la dispersión de los datos. Estos análisis se realizaron con el programa SPSS v.15.0.1 (SPSS, Chicago, IL, USA). Dado el elevado número de genes analizados se aplicó la corrección de Bonferroni a los resultados obtenidos, de manera que el punto de corte que consideramos para la significación estadística en el análisis de 38 genes en EC pasa de 0.05 a 0.0013.

b. Método bayesiano

El análisis de datos también se llevó a cabo mediante la aplicación de la metodología Bayesiana tal como se describe en el artículo de Ausín y colaboradores [155]. Es un test de múltiples hipótesis que permite el análisis de muestras pequeñas. Para ello, se consideran dos matrices de datos, una para pacientes, y otra para los controles, en que cada fila corresponde a un gen, como se muestra en la figura 8.

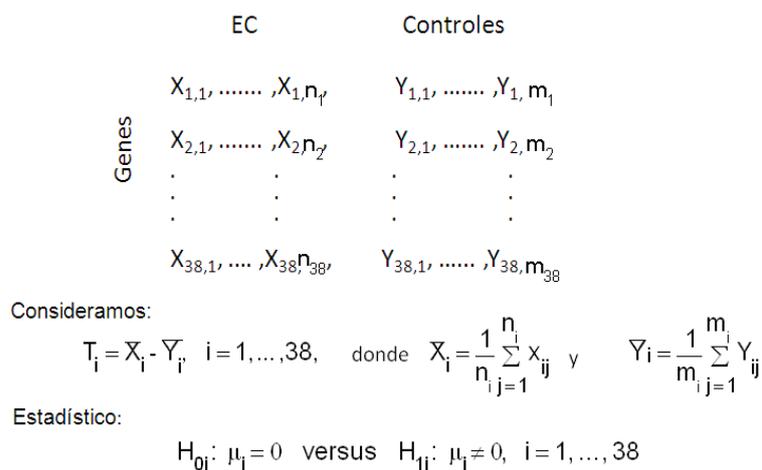


Figura 8: Procedimiento estadístico de la metodología Bayesiana aplicada.

Materiales y métodos

Se calcula el estadístico T a partir de la diferencia de medias entre pacientes y controles para cada gen basándose en que pacientes y controles tienen media similar.

De esta manera se llevaron a cabo tantos análisis como número de genes incluidos, de manera simultánea para cada gen de estudio. Para determinar si dichas hipótesis nulas serán aceptadas o rechazadas, se considera el teorema de Bayes como se describe en Gómez-Villegas y colaboradores. [69], con el mismo coste de un falso positivo y un falso negativo para todos los genes. De este modo, cada hipótesis nula será rechazada si la probabilidad *a posteriori* de la hipótesis nula ($\mu_i = 0 | t_1, \dots, t_{38}$) es menor o igual que 0.5, o equivalentemente si la probabilidad *a posteriori* de la hipótesis alternativa ($\mu_i \neq 0 | t_1, \dots, t_{38}$) es mayor de 0.5. Este análisis se llevó a cabo para cada grupo de estudio de manera separada.

c. Coeficiente de correlación de Pearson

El coeficiente de correlación de Pearson permite la cuantificación de la magnitud de la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Este coeficiente oscila entre -1 y $+1$. Un valor de ± 1 indica una relación lineal perfecta. Una correlación próxima a cero indica que no hay relación lineal entre las dos variables. Es un coeficiente independiente de unidades y se altera por valores extremos. Se utilizó este coeficiente en el estudio de interacción génica entre la expresión de los genes *C1orf106* y *TEC*.

2. Comparación de variables categóricas: estudio de expresión y estudio de interacción génica.

a. Test exacto de Fisher

La comparación de variables categóricas se llevó a cabo mediante la aplicación de los tests χ^2 o el test exacto de Fisher (si los valores esperados eran menores de 0,5) empleando el programa StatCalc (EpiInfo v6).

Su aplicación se llevó a cabo en genes con una escasa o nula expresión en alguno de los grupos de estudio. Así mismo, la comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre enfermos (EC, ECr o CU) y controles se realizó mediante estos tests aplicados a tablas de contingencia 3x2 para el estudio de las frecuencias genotípicas y a tablas 2x2 para la comparación de frecuencias alélicas y de portadores o *carrier* de un alelo. En todos los casos se consideraron como estadísticamente significativas aquellas comparaciones con un valor de probabilidad menor de 0.05.

En los casos oportunos, la magnitud de la asociación se calculó con la *odds ratio* (OR).

b. Test de Cochran-Mantel-Haenszel

El test de Cochran- Mantel Haenszel es un contraste de hipótesis para contrastar la igualdad de OR entre k tablas de contingencia 2x2. Es una forma de evaluar la posible influencia que pueda tener, sobre la relación entre esas variables cualitativas dicotómicas, una tercera variable también cualitativa con k valores posibles.

RESULTADOS

1) Expresión génica en niños y adultos con EC.

Se estudió la expresión de un total de 45 genes (excluyendo los 3 genes de referencia) en 18 pacientes de EC (14 con debut pediátrico y 6 con debut adulto), así como en 12 controles (7 pediátricos y 5 adultos). Dos de los genes seleccionados, *ADAD1* y *OLIG3*, fueron excluidos del análisis debido a que se encontraron por debajo del límite de detección en todas las muestras. Por otro lado, tampoco se pudo evaluar la expresión de *IL17F*, *IL21* e *IL22*, ya que no se detectaron en la mayoría de las muestras. Sin embargo, la expresión de *IL21* se observó más frecuentemente en pacientes, siendo detectada en 8 de las 13 muestras de pacientes de EC con debut pediátrico frente a solo 2 de los 7 controles pediátricos ($p=0.17$). De una manera similar, en pacientes adultos se detectó la expresión de *IL21* en 3 del total de 6, mientras que en controles adultos ninguna de las muestras se situó por encima del límite de detección ($p=0.12$).

Tras la exclusión de estos genes, así como de los genes de referencia, se procedió al análisis de los niveles de expresión de 38 genes.

- **Comparación del método de análisis estadístico: U de Mann-Whitney y metodología Bayesiana**

Inicialmente se analizaron los datos con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Se realizó la comparación de los valores de ΔC_t de cada grupo de pacientes de EC respecto a sus controles, así como entre pacientes pediátricos y adultos. Los resultados derivados de este análisis se muestran en la tabla 15 para los genes que ofrecieron al menos un resultado con significación nominal en alguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 15: Resultados significativos tras el análisis de los datos de expresión intestinal en pacientes con EC mediante el test U de Mann-Whitney.

	EC A vs. Control A	EC P vs. Control P	EC A vs. EC P
BACH2	0,3810	0,7732	0,0220*
C1orf106	0,0159*	0,0097*	0,4439
CCR4	0,0952	0,0379*	0,0700
CCR6	0,0556	0,0309*	1,0000
FASLG	0,0079*	0,0005*	0,8932
IL1RL1	0,0317*	0,0938	0,0759
JAK2	1,0000	0,2872	0,0047*
PLEK	0,0079*	0,0023*	0,1299
PTPN2	0,0159*	0,0056*	0,5593
TAGAP	0,0317*	0,1101	0,8230
TEC	0,2222	0,0023*	0,8230
TNFAIP3	0,0952	0,2545	0,0007*
TNFSF18	1,0000	0,0011*	0,4439
TYK2	0,5476	0,0111*	0,9644
UBE2L3	0,0079*	0,0040*	0,2075
VAMP3	0,0317*	0,0793	0,0673
YDJC	0,0159*	0,2245	0,8230
ZMIZ1	0,0317*	0,9131	0,6235

***Resultados con significación nominal.**

EC= Enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos

Dado que llevamos a cabo múltiples comparaciones, tras la realización de esta prueba aplicamos la corrección de Bonferroni. Con este procedimiento, solo dos de los genes muestran diferencias significativas, *FASLG* y *TNFSF18*, siendo la diferencia de expresión solo significativa en pacientes pediátricos con respecto a sus controles (Tabla 15).

Los resultados derivados del análisis por metodología Bayesiana amplían este número a 20 genes, con diferente implicación en pacientes con debut pediátrico y adulto, tal como se muestra en la tabla 16.

Tabla 16: Probabilidad *a posteriori* de los genes significativamente alterados tras el análisis de los datos mediante estadística Bayesiana.

	EC A vs. Control A	EC P vs. Control P	EC A vs. EC P
<i>C1orf106</i>	0,57	0,51	0,52
<i>C2orf74</i>	0,58	0,73	-
<i>CCR4</i>	0,58	0,79	0,72
<i>CCR6</i>	0,68	0,62	-
<i>CD28</i>	-	0,55	-
<i>FASLG</i>	0,72	0,63	-
<i>ICOSLG</i>	0,59	-	0,57
<i>IL18RAP</i>	0,54	0,60	0,51
<i>IL1RL1 soluble</i>	-	0,72	0,70
<i>IL23A</i>	0,70	0,69	-
<i>IL6</i>	0,50	0,63	0,91
<i>JAK2</i>	0,65	0,65	-
<i>PLEK</i>	0,52	0,61	0,51
<i>STAT3</i>	-	0,56	-
<i>TAGAP</i>	0,56	0,52	-
<i>TMEM187</i>	-	0,62	-
<i>TNFSF18</i>	0,73	-	0,54
<i>UBE2L3</i>	0,52	0,77	-
<i>VAMP3</i>	-	0,55	-
<i>ZFP36L1</i>	-	0,57	-

EC= Enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos

Tras la utilización del procedimiento bayesiano, distinguimos dos grupos de genes con expresión alterada en función de su grado de significación. Por un lado, genes con una expresión claramente alterada en pacientes con EC, como muestra su elevada probabilidad *a posteriori*, y por otro, aquellos que por su menor probabilidad *a*

Resultados

posteriori tienen mayor probabilidad de ser resultados falsos positivos y que, en cualquier caso, tendrían menor impacto en la enfermedad.

Con respecto a los genes con una mayor alteración, encontramos 4 de ellos con una mayor expresión tanto en enfermos pediátricos como adultos: *C2orf74*, *CCR6*, *FASLG* y *JAK2* (Figura 9).

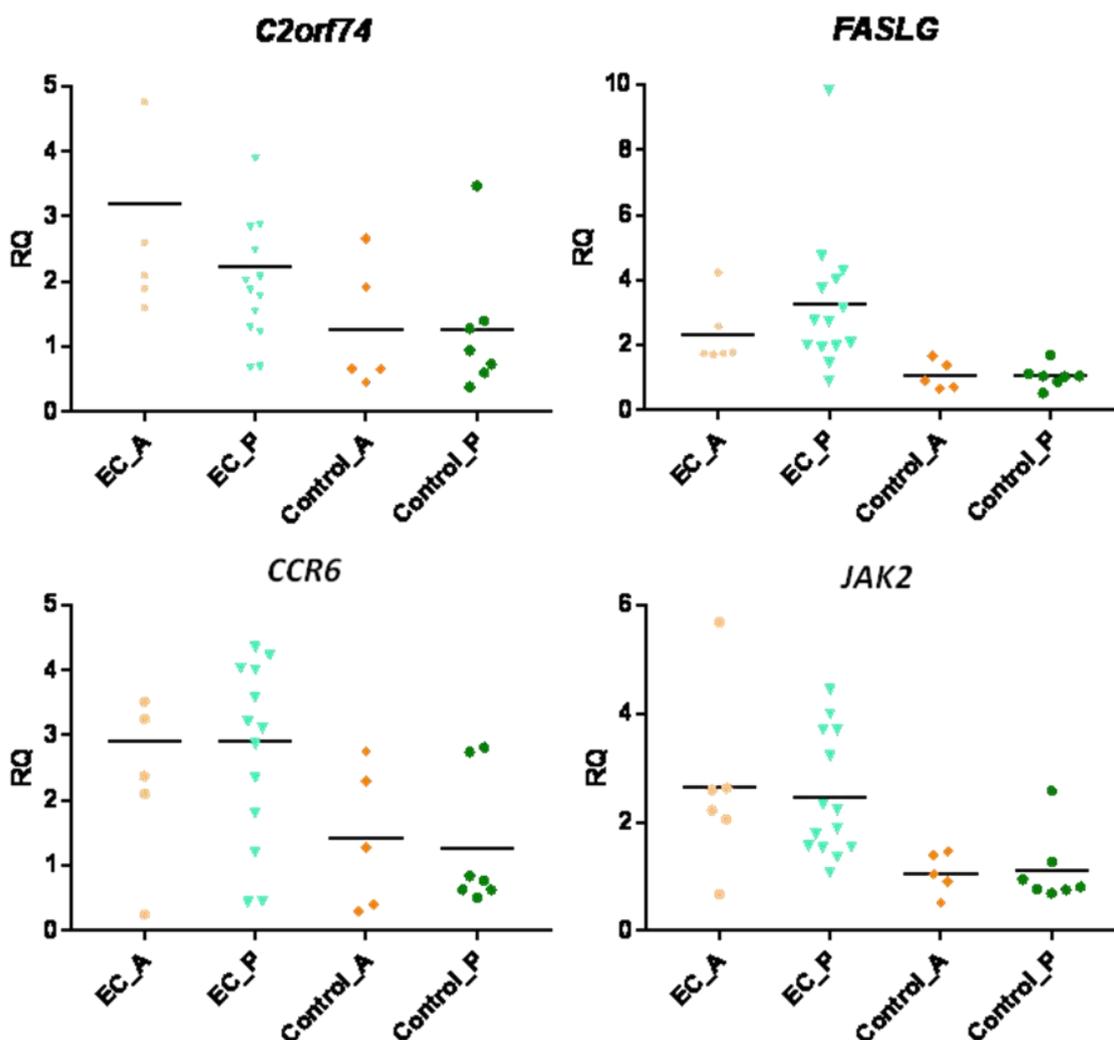


Figura 9: Expresión relativa en biopsias intestinales de niños y adultos con EC, de los genes con expresión claramente alterada en ambos grupos. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

Por otro lado, *TNFSF18* presentó una expresión claramente superior solo en enfermos celíacos con debut pediátrico; y la forma soluble de *IL1RL1*, estaba sobreexpresada solo en enfermos con debut adulto (Figura 10).

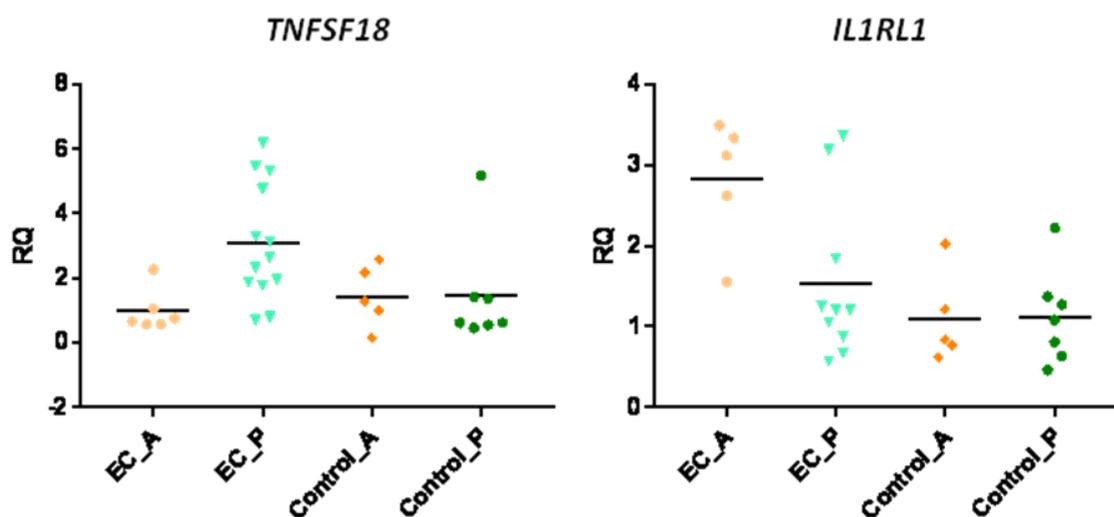


Figura 10: Expresión relativa en biopsias intestinales de niños y adultos con EC de los genes cuya expresión está solo alterada en uno de los grupos de edad. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

La expresión de *CCR4* e *IL6* se encontró así mismo incrementada en ambos grupos, pero ambos genes parecen tener un mayor efecto en enfermos con debut adulto. *IL6* mostró una muy incrementada expresión en el grupo de adultos con EC, pero su expresión se detectó en un bajo número de muestras, las cuales fueron utilizadas para el análisis estadístico. En el caso de los niños, la *IL6* se detectó en 10 de los 13 enfermos, frente a 3 de 7 controles ($p=0,15$), lo que sugiere un incremento de expresión también en este grupo (Figura 11).

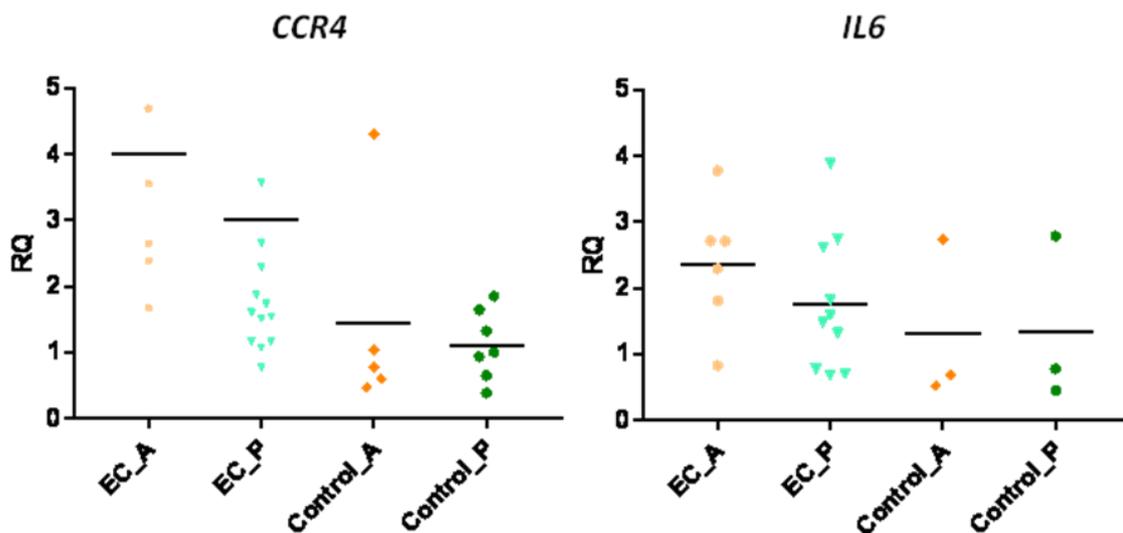


Figura 11: Expresión relativa en biopsias intestinales de niños y adultos con EC de los genes cuya expresión está significativamente alterada en ambos grupos, pero con un efecto mayor en adultos. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

El grupo de genes que mostró diferencias menores, aunque igualmente estadísticamente significativas, engloba 5 genes con una expresión alterada en ambos grupos de enfermos: *IL18RAP*, *IL23A*, *PLEK*, *TAGAP* y *UBE2L3*. Dos de ellos, *IL18RAP* y *PLEK*, sobreexpresados en mayor medida en enfermos con debut adulto (Figura 12).

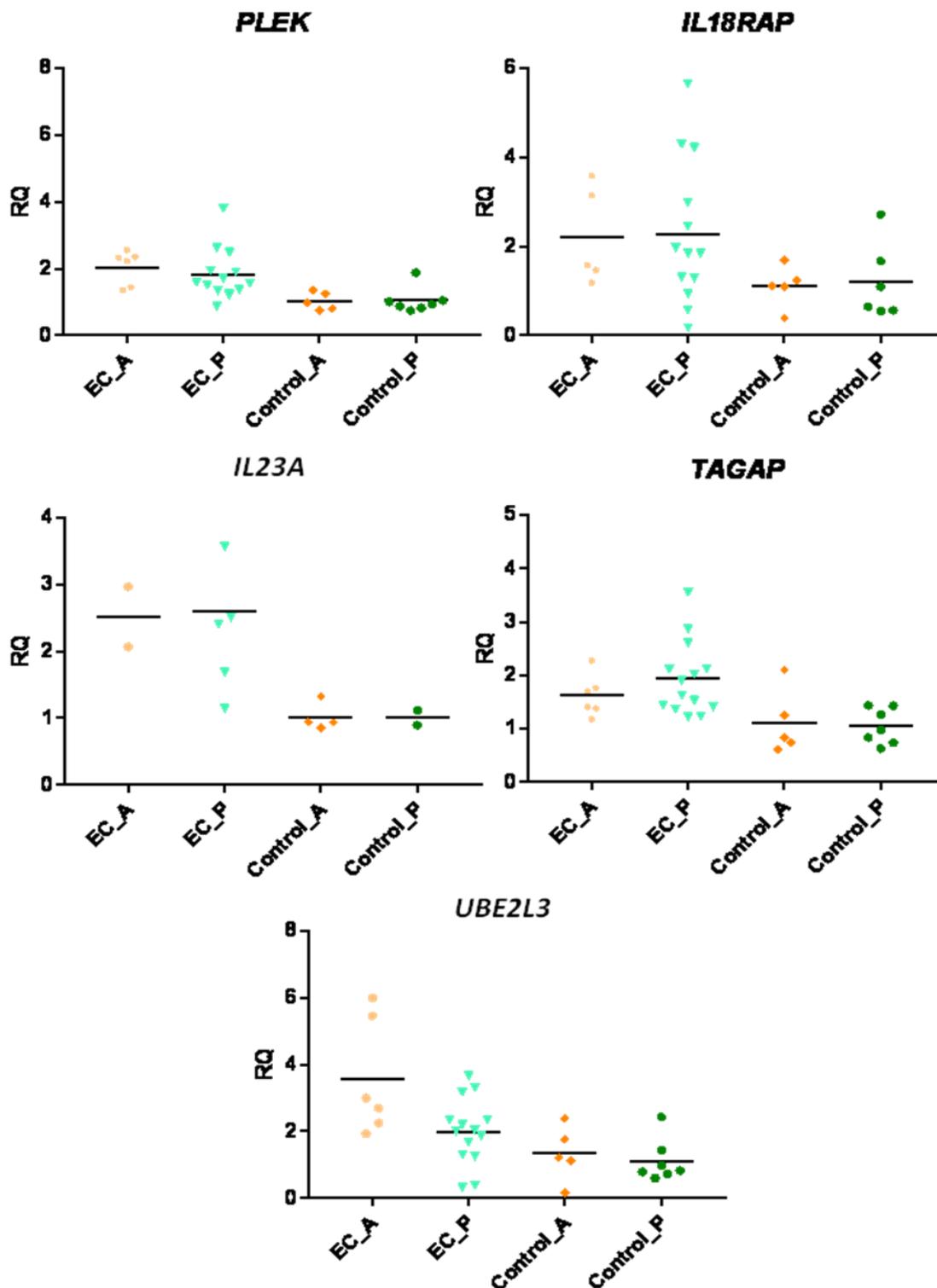


Figura 12: Expresión relativa en biopsias intestinales de niños y adultos con EC de los genes cuya expresión está significativamente aumentada en ambos grupos de edad con menores diferencias. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

Resultados

Los genes *C1orf106* e *ICOSLG* mostraron una expresión disminuida EC, con un efecto mayor (*C1orf106*) o exclusivo (*ICOSLG*) en niños (Figura 13).

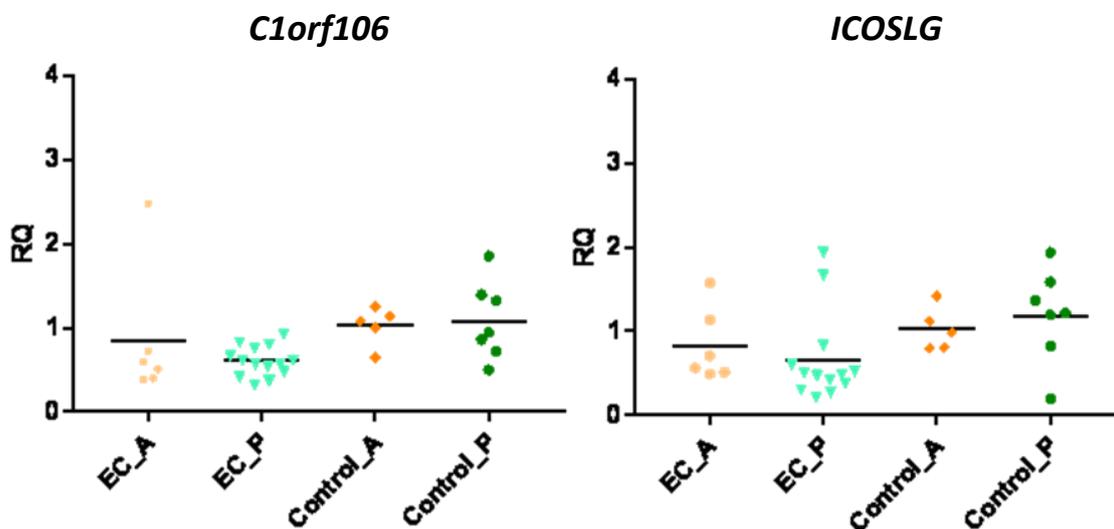


Figura 13: Expresión relativa en biopsias intestinales de niños y adultos con EC de genes cuya expresión está significativamente disminuida en ambos grupos de edad, con menores diferencias. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

El gen *ZFP36L1* mostró una menor expresión intestinal en pacientes de EC con debut adulto, como se muestra en la Figura 14.

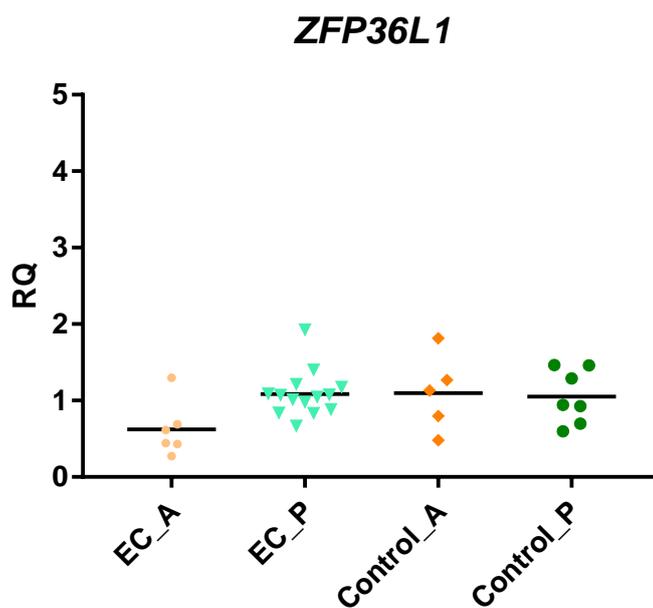


Figura 14: Expresión relativa en biopsias intestinales de niños y adultos con EC del gen *ZFP36L1*. Muestra una menor expresión intestinal solo en pacientes con debut adulto, con menor probabilidad. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

Por otro lado, encontramos cuatro genes con una expresión incrementada en EC con debut adulto: *CD28*, *STAT3*, *TMEM187* y *VAMP3* (Figura 15).

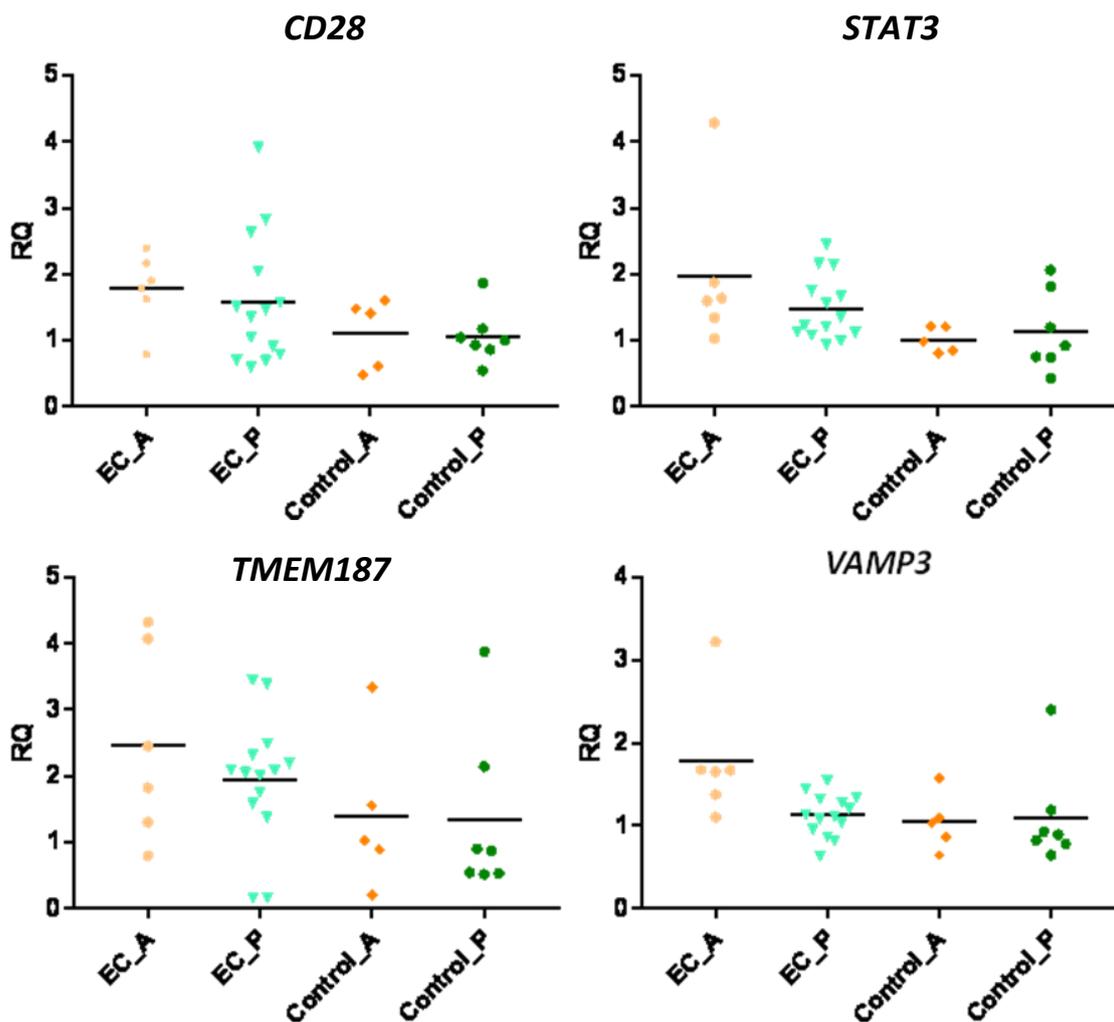


Figura 15: Expresión relativa en biopsias intestinales de niños y adultos con EC de los genes sobreexpresados en pacientes con debut adulto con menores diferencias. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

Se estudió la posible correlación entre los niveles de expresión génica y la edad de los sujetos, así como con el grado de atrofia vellositaria, no encontrándose en ningún caso resultados significativos.

2) Expresión génica en pacientes celíacos EMA negativos.

Analizamos la expresión intestinal de 8 genes descritos en la literatura como alterados en EC (*C1orf106*, *CD28*, *IL21*, *FASLG*, *IL18RAP*, *TAGAP*, *PLEK*, *ZFP36L1*) en pacientes de EC EMA negativos en comparación con controles duodenales. En las figuras derivadas de este estudio se muestran adicionalmente los pacientes de EC adultos y pediátricos incluidos en el estudio anterior.

El gen *IL21* se encontró bajo el límite de detección en 2 de 7 pacientes con EMA negativo, mientras que la expresión en los controles no se detectó en 5 de 7 individuos, por lo tanto, no se incluyó en los análisis bayesianos, pero el análisis de estos valores mediante el test exacto de Fisher mostró un valor próximo a la significación ($p=0.14$).

Los 7 genes restantes se analizaron con metodología Bayesiana, comparando la expresión intestinal de los 8 pacientes EMA negativos pediátricos con 7 controles duodenales también pediátricos. Observamos que 5 genes presentaban diferencias significativas respecto a los controles. Estos resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Probabilidad *a posteriori* resultante de comparar la expresión de pacientes EMA negativos y controles mediante estadística Bayesiana.

Gen	p
CD28	0,56
FASLG	0,72
IL18RAP	0,62
TAGAP	0,55
PLEK	0,58

En todos los casos, las desviaciones en la expresión de los pacientes EMA negativos fueron concordantes con las obtenidas en los pacientes pediátricos EMA positivos.

Se encontró una expresión aumentada en los pacientes de EC, tanto con anticuerpos EMA negativos como los pacientes con anticuerpos positivos, en los genes *PLEK*, *FASLG*, *IL18RAP* y *TAGAP* (Figura 16). El gen *CD28* se encontró aumentado en el grupo de adultos y pediátricos EMA negativos, situándose su expresión al borde de la significación estadística en el grupo de pacientes pediátricos con anticuerpos EMA positivos (*p a posteriori*=0,44).

Resulta interesante que los individuos no DQ2/DQ8 incluidos, indicados en la figura 16 como 1 y 2, mostraron los mayores niveles de expresión en los genes alterados, resultando en las mayores diferencias respecto a la media de los controles.

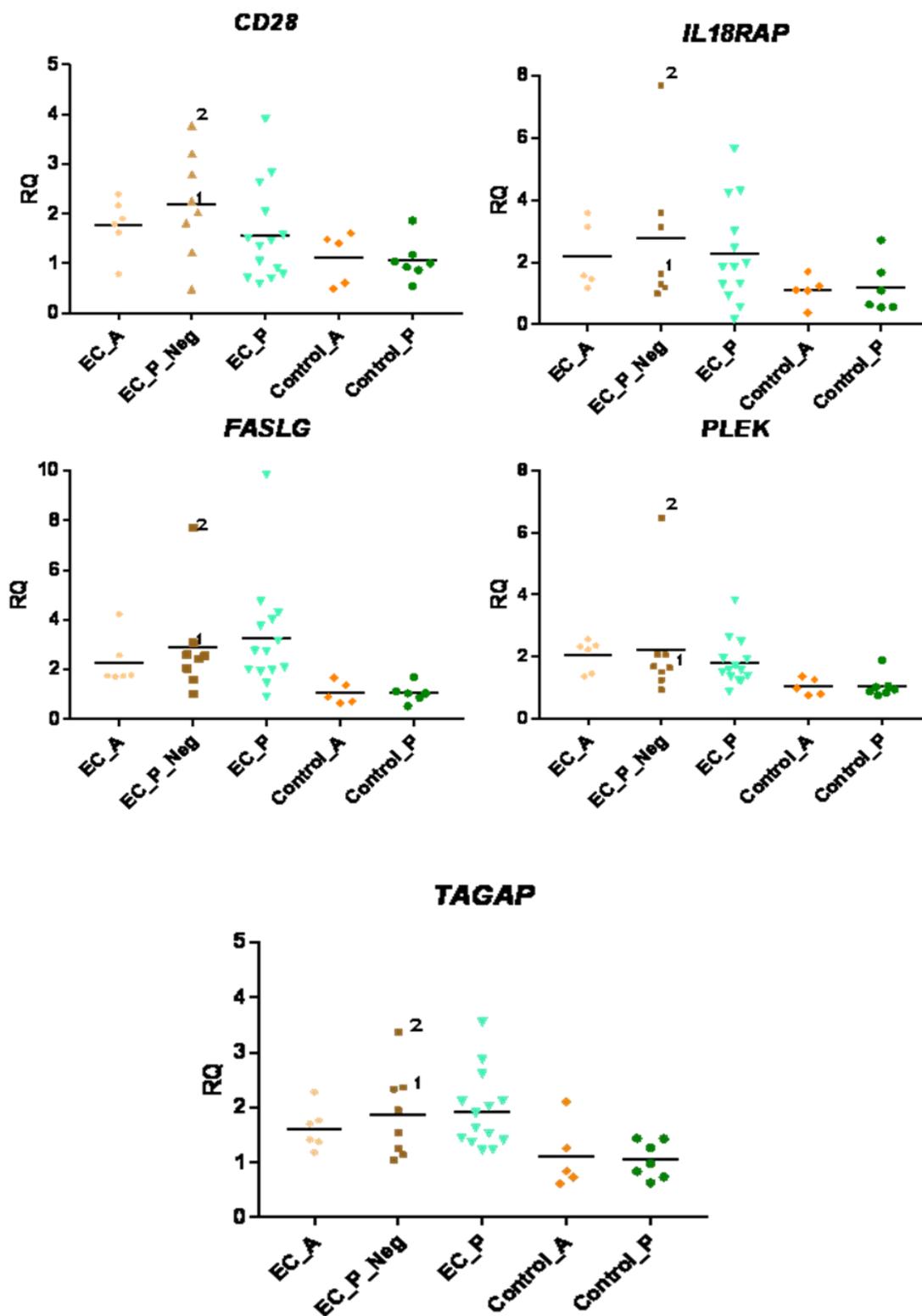


Figura 16: Expresión relativa de cinco genes descritos previamente como alterado en pacientes con EC. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

Resultados

El gen *ZFP36L1* no mostró diferencias significativas entre EC y controles, resultado que concuerda con el obtenido en nuestros pacientes con anticuerpos EMA positivos (Figura 17).

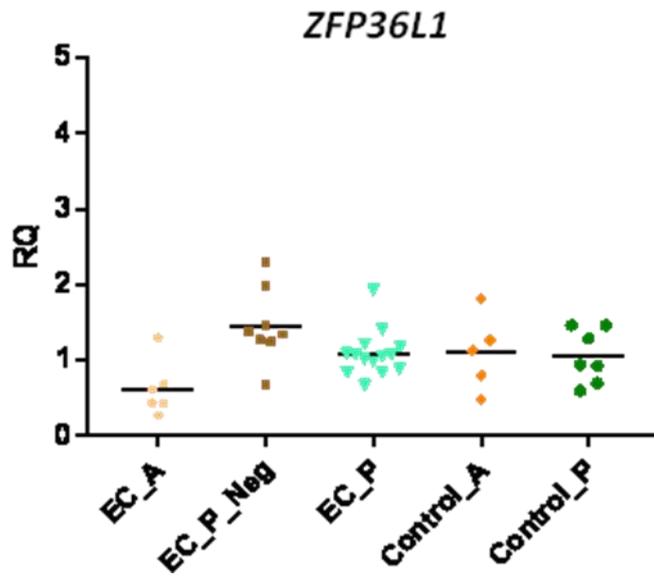


Figura 17: Expresión relativa del gen *ZFP36L1* en los diferentes grupos de estudio. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos.

3) Estudio comparativo de la expresión génica intestinal entre EC y CU.

Se estudió la expresión intestinal de 31 genes pertenecientes a 18 regiones asociadas con riesgo a padecer EC, 13 de ellas de susceptibilidad también a CU. Incluimos 20 pacientes de EC, 19 de CU, 12 controles de duodeno y 4 controles de colon.

Los genes *ADAD1* y *OLIG3* no pudieron analizarse por encontrarse su expresión por debajo del límite de detección.

1. Regiones de riesgo genético compartido entre EC y CU

Se analizaron 19 genes localizados en 13 regiones. En la figura 18 se muestra la expresión relativa de cada uno de estos genes con respecto a sus controles en el contexto de la región cromosómica en que se encuentran. Algunos resultados apuntan como gen causal de la asociación a uno de los genes estudiados de igual manera en ambas enfermedades, mientras otros parecen indicar efectos diferentes de algunos genes en cada una.

Resultados

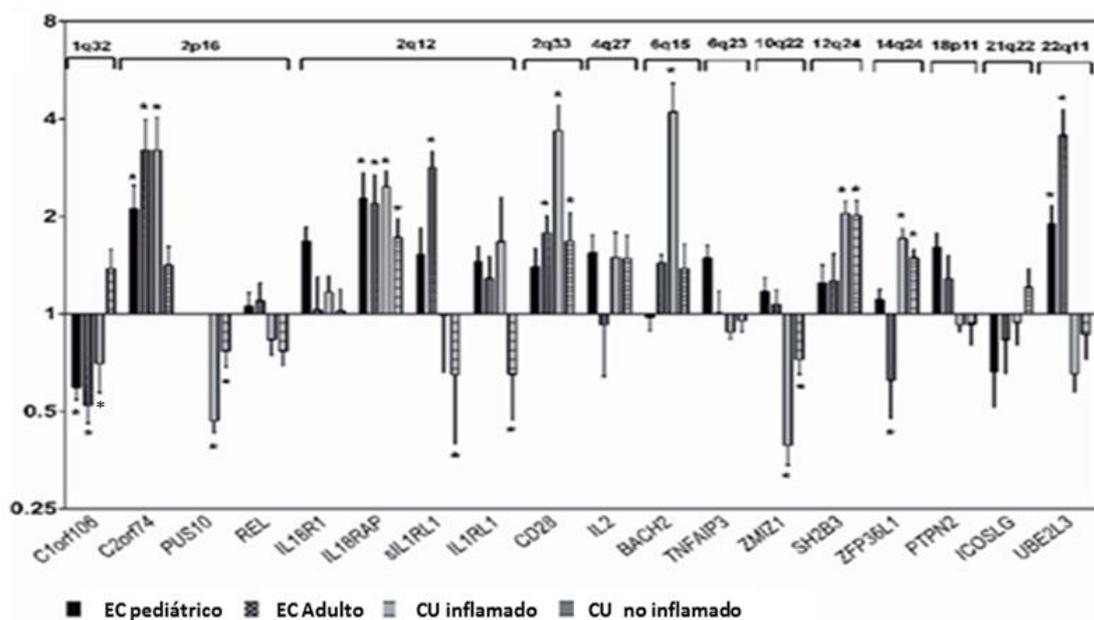


Figura 18: Expresión relativa de cada grupo de pacientes para los genes localizados en las regiones asociadas al riesgo a padecer EC y CU. EC= enfermedad celíaca, CU= colitis ulcerosa.

Se encontró una alteración concordante en 4 de los genes analizados: *C1orf106*, con una menor expresión en enfermos de EC y CU inflamado respecto a sus controles; y los genes *C2orf74*, *IL18RAP* y *CD28*, que presentaron una mayor expresión en enfermos de EC y CU inflamado respecto a sus controles. El gen *ZFP36L1* mostró una alteración significativa en enfermos pero opuesta en ambas enfermedades, disminución en EC y aumento en CU (Figura 19). Adicionalmente, los genes localizados en las regiones 6q23, 18p11.21, 21q22.3 (*TNFAIP3*, *PTPN2*, *ICOSLG*, respectivamente) mostraron también resultados concordantes, ya que en ninguno de los grupos se vio una alteración de la expresión génica relativa a sus respectivos controles.

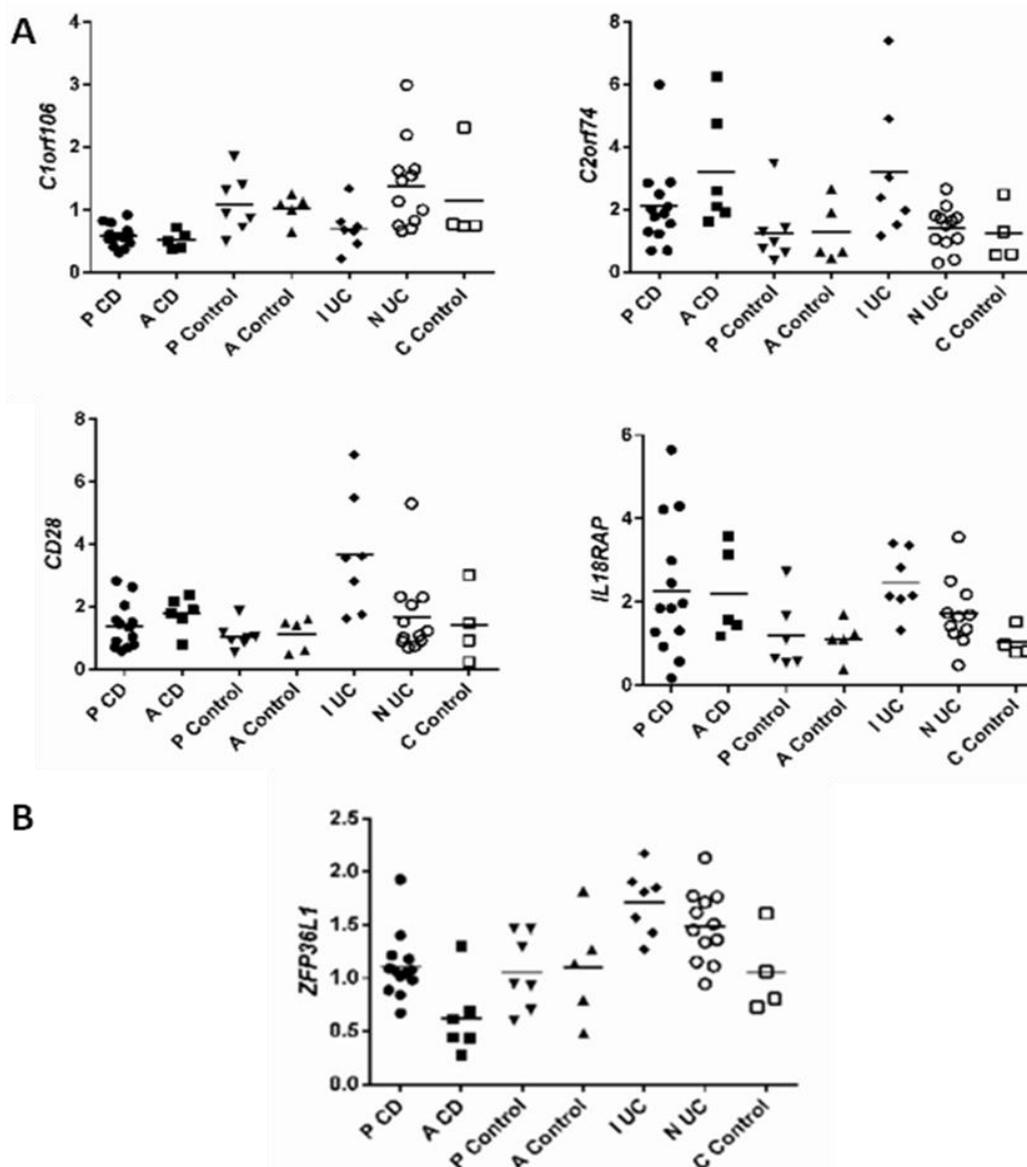


Figura 19: Expresión relativa de los genes localizados en regiones comunes de riesgo y que mostraron diferencias significativas tanto en EC como en UC siendo, a) la alteración similar en ambas enfermedades y b) la alteración opuesta. EC=enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos, CU= colitis ulcerosa, I= inflamado, N= normal, C= colon.

Por otro lado, continuando con las regiones de riesgo común en ambas enfermedades, se encontraron regiones en que los genes alterados parecían ser diferentes

Resultados

dependiendo del grupo de enfermos considerado (Figura 20). De esta forma, el gen *BACH2* se encontró solo aumentado en tejido inflamado de CU y el gen *ZMIZ1* solo alterado en pacientes con CU, tanto en tejido normal como inflamado, observándose un descenso progresivo de su expresión de controles a CU no inflamada y finalmente a CU inflamada. El gen *SH2B3*, sin embargo, mostró una expresión alterada solo en los pacientes de CU independientemente del nivel de inflamación. Además, en la región 2q11 nuestro estudio parece apuntar a distintos genes causales en las dos enfermedades: *UBE2L3* en EC e *YDJC* en CU. Con respecto a *YDJC*, no se pudieron establecer comparaciones con los controles mediante métodos bayesianos debido a los niveles indetectables en tres de los cuatro controles estudiados, pero las pruebas de chi-cuadrado sugieren una diferencia significativa de cada grupo en relación con los controles: se detectó en 7 de las 8 muestras de tejido inflamado de CU, $p=0,067$ vs. controles; y en 11 de las 12 muestras de tejido no inflamado de CU, $p=0,027$ vs. controles).

Tanto la forma soluble como la unida a la membrana codificada por *IL1RL1* mostraron una expresión significativamente reducida en el tejido normal de CU en comparación con el tejido inflamado y con controles. Sin embargo, en EC solo la fracción soluble mostró diferencias en su expresión, concretamente en pacientes adultos.

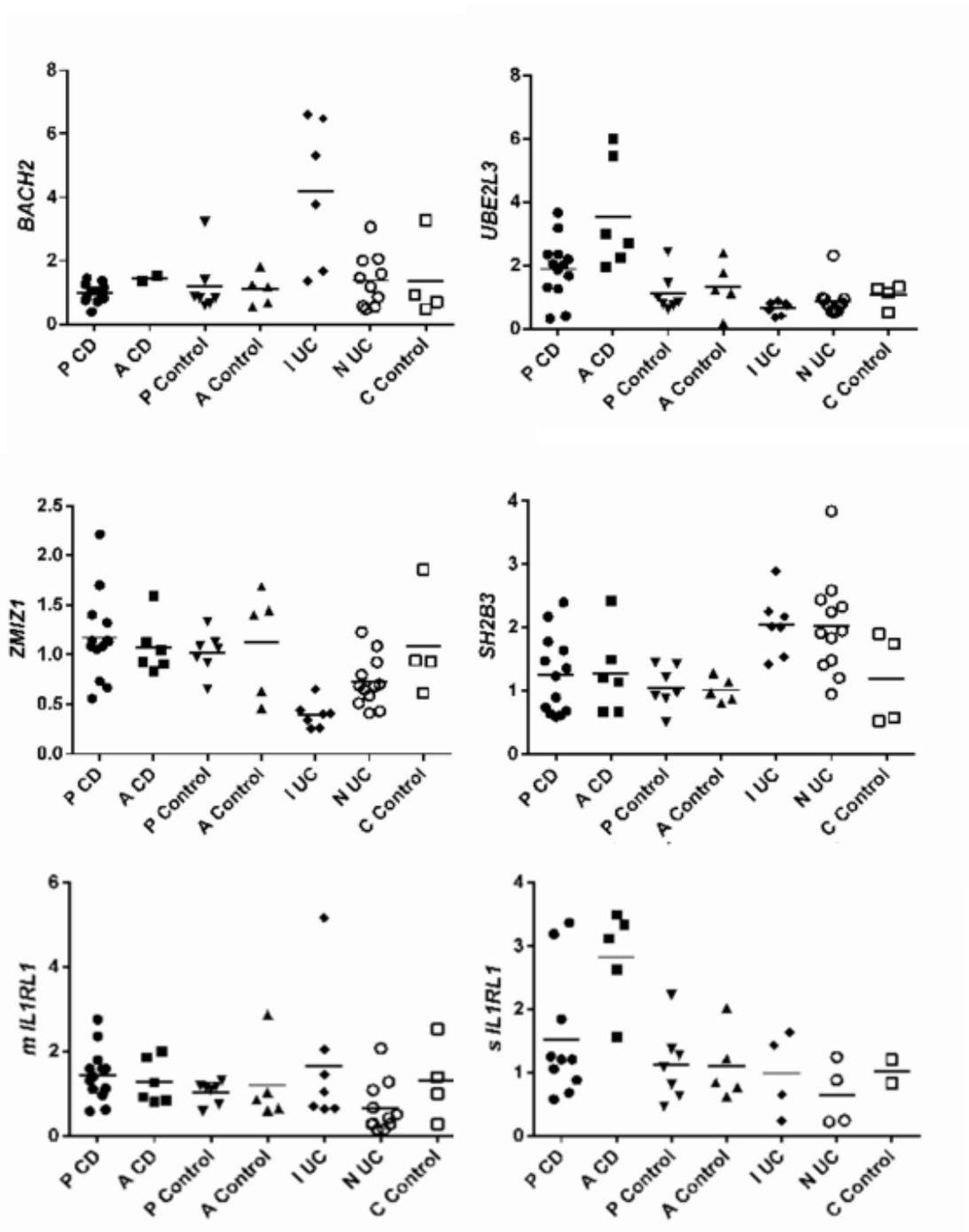


Figura 20: Expresión relativa de los genes localizados en regiones de riesgo común diferencialmente expresados en enfermedad celíaca y colitis ulcerosa. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos, CU= colitis ulcerosa, I= inflamado, N= normal, C= colon.

2. Regiones de riesgo genético a EC

Se estudiaron 10 genes localizados en 5 regiones asociadas a padecer EC. La figura 21 muestra los niveles de expresión encontrados en cada grupo de pacientes para los genes estudiados distribuidos de acuerdo a las regiones génicas que los incluyen.

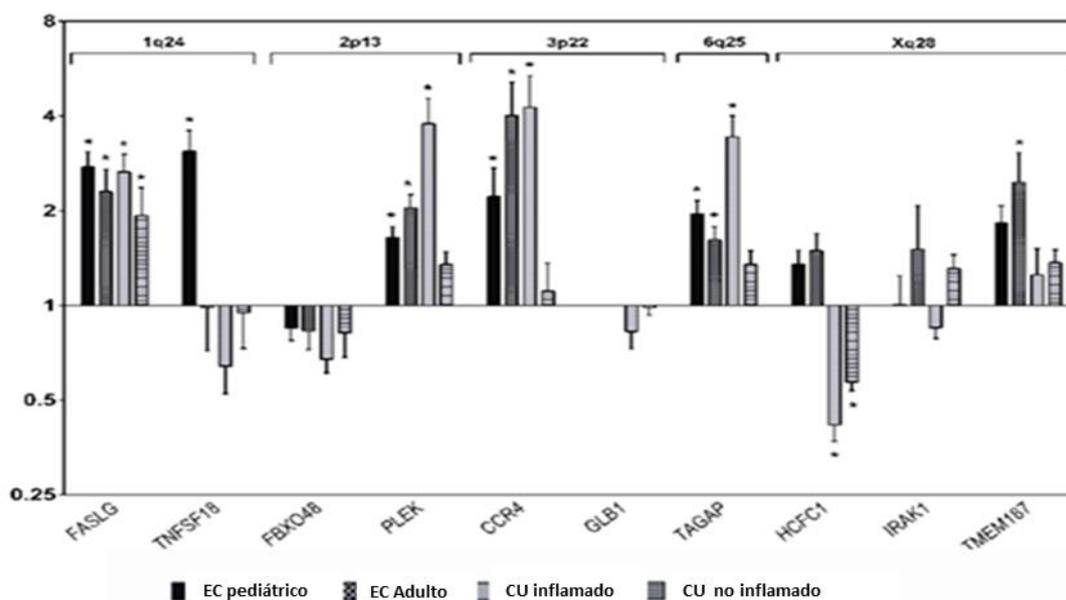


Figura 21: Niveles de expresión de cada grupo de pacientes estudiados, analizados por la metodología Bayesiana, para los genes asociados a riesgo a padecer EC. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos, CU= colitis ulcerosa, I= inflamado, N= normal, C= colon.

Observamos 4 genes sobreexpresados significativamente en los pacientes con EC (*FASLG*, *PLEK*, *CCR4* y *TAGAP*) que también estaban alterados en el tejido inflamado de pacientes con CU. Además, el gen *HCFC1* mostró menor expresión tanto en tejido normal como en tejido inflamado de CU, a diferencia del aumento de expresión encontrado en EC (Figura 22). En CU, no se observaron cambios en *TNFSF18* y *TMEM187*, descritos como alterado en niños y adultos con EC, respectivamente.

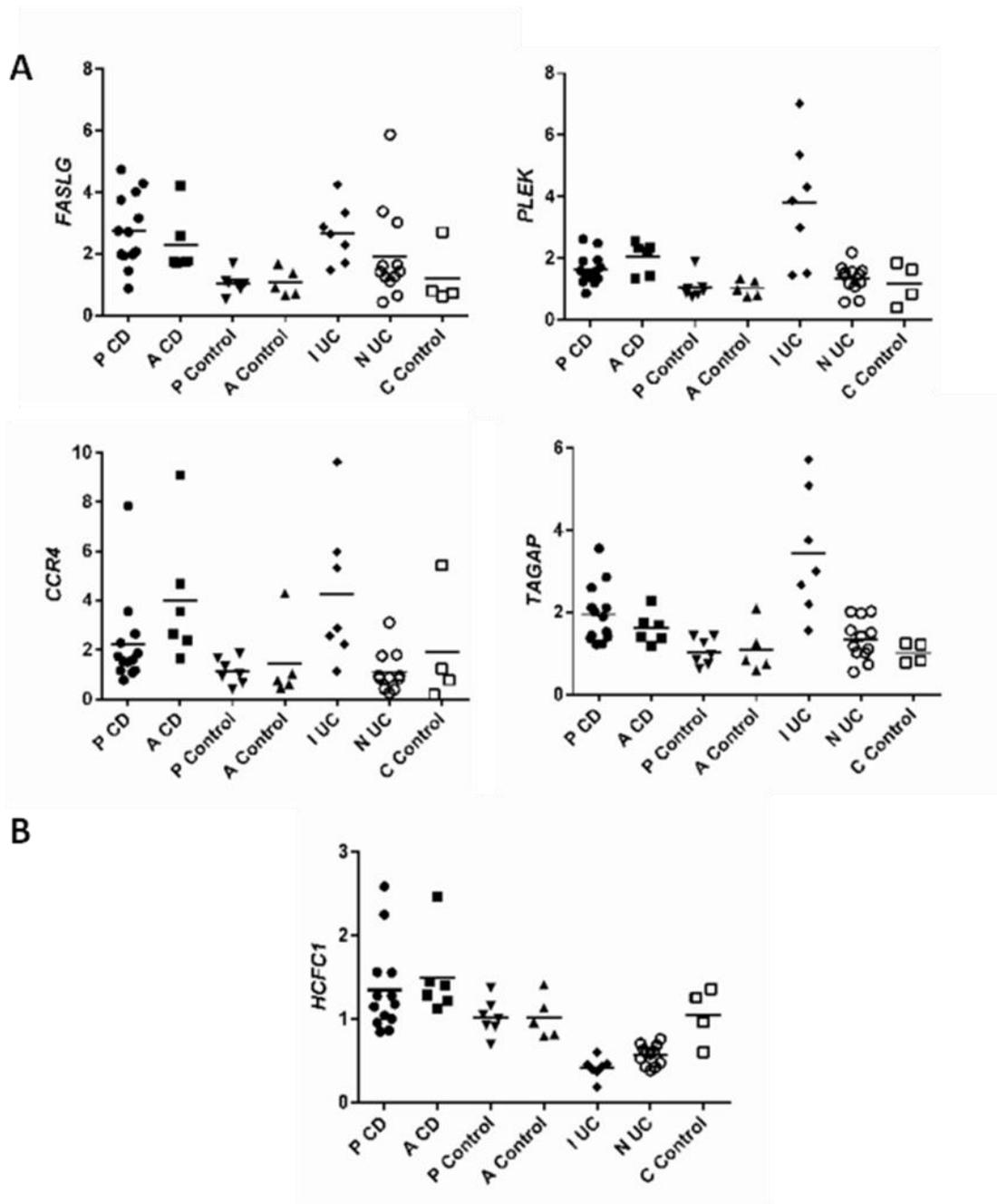


Figura 22: Expresión relativa de los genes localizados en regiones de riesgo a EC y que mostraron diferencias significativas tanto en EC como en CU, siendo a) la alteración similar en ambas enfermedades y b) la alteración opuesta. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos, CU= colitis ulcerosa, I= inflamado, N= normal, C= colon.

Resultados

En algunos genes, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes (adultos vs. niños con EC o tejido inflamado vs. normal de los pacientes de CU), pero se observaron valores significativos (*probabilidad a posteriori* superior a 0,5) en un grupo único (0,53 en *IL2*; 0,51 en *REL* y 0,54 en *FBXO48* en la CU no inflamado, 0,51 *PTPN2* en EC, 0,59 en *ICOSLG* y 0,51 en *IL18R1* en EC). Estos casos no se consideraron como significativos debido a la mayor probabilidad de ser resultados falsos positivos.

IL21 apenas se detectó en los controles, apareciendo en solo 1 de cada 4 controles de colon y 2 de cada 12 controles duodeno, y tampoco en tejido no inflamado, detectado en 2 de cada 12 muestras. El análisis de este gen en tablas de contingencia 2*2 mostró una sobreexpresión significativa en el tejido inflamado de CU ($p_{\text{test exacto de Fisher}}=0,047$) y en EC ($p_{\chi^2}=0,011$).

4) Estudio de interacción entre *C1orf106* y *TEC* en EC, CU y ECr.

1. Validación de la interacción entre los SNP rs7522462 y rs11945978.

Estudiamos el SNP rs7522462 en el gen *C1orf106* y el SNP rs11945978 situado en el gen *TEC*, cuya interacción se ha descrito como implicada en el riesgo a padecer ECr, en un total de 2225 individuos divididos en 4 grupos: EC, ECr, CU y controles. En todos los casos la población control se ajustó a las proporciones esperadas bajo el equilibrio de Hardy Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados se muestran en la tabla 17.

Tabla 10: Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados.

	EC		ECr		CU		Controles	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>TEC</i>								
rs11945978								
CC	418	42	103	40	127	38	246	39
CT	451	45	112	44	158	47	288	45
TT	126	13	41	16	52	15	103	16
C	1287	65	318	62	412	61	780	61
T	703	35	194	38	262	39	494	39
<i>C1orf106</i>								
rs7522462								
GG	604	61	162	63	214	64	365	57
GA	339	34	78	30	109	32	230	36
AA	52	5	16	6	14	4	42	7
G	1547	78	402	79	537	80	960	75
A	443	22	110	21	137	20	314	25

Resultados

Se observan diferencias significativas en el análisis caso-control del polimorfismo rs7522462 del gen *C1orf106* en CU ($p=0,032$; OR= 0,78 IC 95% 0,72-0,98). En ECr la diferencia está muy próxima a la significación ($p=0,16$; OR= 0,84 IC 95% 0,65-1,08), al igual que en EC ($p= 0,12$; OR=0,88 IC 95% 0,74-1,04). Por otro lado, el polimorfismo rs11945978 del gen *TEC* muestra una diferencia significativa en pacientes de EC, con un efecto protector del alelo T ($p=0,046$; OR=0,86 95% IC 0,74-1) y del *carrier* de T ($p=0,047$ OR=0,75 95% IC 0,56-1,01).

Los datos estratificados del polimorfismo rs11945978 del gen *TEC* en función a los genotipos del rs7522462 del gen *C1orf106* se muestran en la tabla 18.

Tabla 11: Datos de C1orf106 y TEC en los diferentes grupos de estudio.

<i>C1orf106</i> rs7522462	<i>TEC</i> rs11945978	EC	ECr	CU	Controles
GG	TT	81	27	31	51
	TC	269	69	102	174
	CC	254	66	81	140
GA	TT	36	33	20	44
	TC	153	34	51	98
	CC	150	33	38	88
AA	TT	9	3	1	8
	TC	29	9	5	16
	CC	14	4	8	18

EC= Enfermedad celíaca, ECr= enfermedad de Crohn, CU= colitis ulcerosa.

El estudio de interacciones se llevó a cabo comparando el efecto de los distintos genotipos del rs7522462 del gen *C1orf106* en función de portar o no el alelo C del polimorfismo rs11945978 del gen *TEC* (Tabla 19). El efecto protector del alelo A del polimorfismo estudiado en *C1orf106* parece ser más acusado en presencia del

genotipo CC de rs11945978 del gen *TEC* tanto en EC como ECr. Aunque el mayor efecto no llega a ser significativo al tener en cuenta cada enfermedad de manera individual, ese efecto parece similar entre EC y ECr, obteniéndose un valor significativo al ser analizadas de manera conjunta (p homogeneidad=0,90, p_{M-H} =0,042).

Tabla 12: Análisis estadístico caso- control de la susceptibilidad a padecer cada una de las enfermedades en presencia del genotipo CC del rs11945978 localizado en el gen *TEC* en combinación con cada uno de los genotipos del rs7522462 del gen *C1orf106*.

	EC	ECr	CU
GG	1,17 (0,89-1,54) P=0,26	1,10 (0,74-1,64) P=0,60	0,98 (0,68-1,41) P=0,90
GA	1,28 (0,9-1,83) P=0,15	0,67 (0,40-1,13) P=0,11	0,86 (0,52-1,43) P=0,55
AA	0,49 (0,19-1,27) P=0,10	0,44 (0,10-1,85) P=0,21	1,78 (0,45-7,2) P=0,35

Se muestran los valores de OR (IC 95%) y probabilidad

2. Estudio de nuevas interacciones genéticas entre *C1orf106* y *TEC*.

Tras la realización de un *tagging* en el gen *TEC*, el estudio de interacciones incluyó dos nuevos SNPs: rs11725773 y rs11942525. Las frecuencias alélicas y las genotípicas de cada uno de estos polimorfismos para las diferentes enfermedades se detallan en la tabla 20.

Tabla 13: Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *TEC* rs11725773 y rs11942525.

<i>TEC</i>	<i>EC</i>		<i>ECr</i>		<i>CU</i>		Controles	
	n	%	n	%	n	%	n	%
rs11725773								
GG	264	27	74	29	96	28	168	26
GA	496	50	123	48	167	50	318	50
AA	235	24	59	23	74	22	151	24
G	1024	51	271	53	359	53	654	51
A	966	49	241	47	315	47	620	49
rs11942525								
TT	0	0.1	1	0.4	3	1	2	0.3
TC	105	11	33	12.9	35	10	69	11
CC	889	89	222	86.7	299	89	566	89
T	105	5	35	7	41	6	73	6
C	1883	95	477	93	633	94	1132	94

En todos los casos la población control se ajustó a las proporciones esperadas bajo el equilibrio de Hardy Weinberg. Las diferencias entre las frecuencias alélicas y

genotípicas entre cada una de las enfermedades y los controles no resultaron significativas.

Los datos estratificados de los polimorfismos de *TEC* rs11725773 y rs11942525 con respecto al rs7522462 del gen *C1orf106* se muestran en la tabla 21. En ningún caso se obtienen resultados significativos al analizar su posible efecto en la susceptibilidad a presentar las diferentes enfermedades estudiadas.

Tabla 14: Datos de *C1orf106* y *TEC* en los diferentes grupos de estudio.

<i>C1orf106</i> rs7522462	<i>TEC</i> rs11725773	EC	ECr	CU	Controles
GG	GG	156	43	63	87
	GA	306	82	107	183
	AA	142	37	44	95
GA	GG	90	26	29	70
	GA	166	36	54	116
	AA	83	16	26	44
AA	GG	10	5	4	11
	GA	24	5	6	19
	AA	10	6	4	12

<i>C1orf106</i> rs7522462	<i>TEC</i> rs11942525	EC	ECr	CU	Controles
GG	TT	1	0	1	2
	TC	65	21	20	44
	CC	538	162	193	319
GA	TT	0	1	1	0
	TC	32	9	15	19
	CC	307	68	93	211

Resultados

	<i>TEC</i> rs11942525	EC	ECr	CU	Controles
<i>C1orf106</i> rs7522462					
AA	TT	0	0	1	0
	TC	8	3	0	6
	CC	44	13	13	36

3. Estudio de expresión intestinal de *C1orf106* y *TEC*.

Se estudió la expresión intestinal de los genes *C1orf106* y *TEC*, con objeto de evaluar posibles alteraciones en las mismas o una correlación entre ellas, dada la interacción génica encontrada. Para ello, se incluyeron 20 biopsias duodenales de pacientes de EC, 12 controles duodenales, 7 biopsias de colon de pacientes con ECr, 20 procedentes de pacientes con CU y 4 controles de colon. No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *TEC* en ninguno de los grupos estudiados. La expresión de *C1orf106* se encontró disminuida en los pacientes de EC y CU respecto a sus controles, según lo descrito en apartados anteriores.

En la figura 23 se muestra la expresión relativa en cada grupo de estudio, para los genes estudiados.

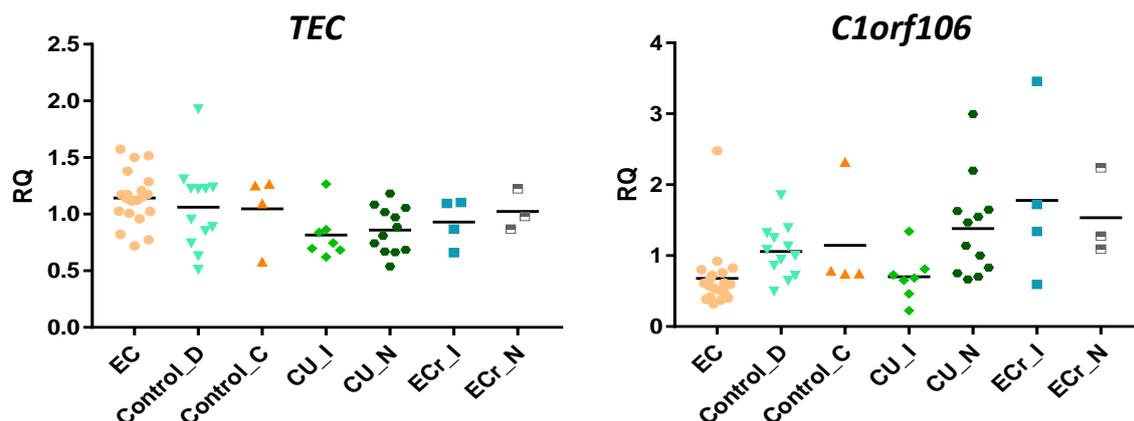


Figura 23: Expresión relativa de los genes *TEC* y *C1orf106*. EC= enfermedad celíaca, A= adultos, P= pediátricos, = colon, I= inflamado, N= normal, CU= colitis ulcerosa, ECr= enfermedad de Crohn.

El estudio de la posible correlación entre la expresión de los genes *C1orf106* y *TEC* utilizando el coeficiente de correlación de *Pearson*. No se encontró correlación en ninguno de los grupos.

5) Aumento de activación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ y T CD8 intestinales: utilidad como método diagnóstico en enfermedad celiaca.

1. Validez del método diagnóstico

Se estudiaron 10 pacientes con EC confirmada y 19 controles a días 0 y 6 desde el inicio de la provocación. En todos los pacientes se observó una población de linfocitos T CD103⁺ β 7^{hi+} CD38⁺ a día 6 de la provocación, estando ausente a día 0 en todos ellos salvo en uno. El paciente que mostró la población a día 0 la mantuvo a día 3 con una disminución porcentual (EC adulto 5); lamentablemente, no se pudo analizar su muestra a día 6. La provocación de este paciente se repitió tras un año en DSG, en este

Resultados

caso sus resultados fueron semejantes al resto de pacientes incluidos en el estudio. Los resultados se muestran en la tabla 22.

Todos los pacientes mostraron de igual manera la población CD103⁺ CD38⁺ en los linfocitos CD8 y en los linfocitos TCR $\gamma\delta$. Resulta interesante que los pacientes en que el aumento porcentual resulta más significativo son los EC pediátricos, aunque son también los únicos con una alteración M3c en la biopsia.

En los 19 controles estudiados la población CD103⁺ β 7^{hi+} CD38⁺ no se observó en ninguno de los casos. Adicionalmente, se incluyó una determinación de las subpoblaciones a día 3, en 3 pacientes de EC y 10 controles.

Tabla 15: Porcentajes de las poblaciones estudiadas a días 0 y 6, en los individuos celíacos.

	Día 0		Día 6	
	CD103 ⁺ β7 ^{hi+} CD38 ⁺ CD8 ⁺ /CD8 ⁺	CD103 ⁺ β7 ^{hi+} CD38 ⁺ TCRγδ ⁺ /TCRγδ ⁺	CD103 ⁺ β7 ^{hi+} CD38 ⁺ CD8 ⁺ /CD8 ⁺	CD103 ⁺ β7 ^{hi+} CD38 ⁺ TCRγδ ⁺ /TCRγδ ⁺
EC 1	0.00%	0.25%	0.24%	1.14%
EC 2	0.01%	0.04%	0.24%	0.34%
EC 3	0.01%	0.04%	0.60%	0.46%
EC 4	0.01%	0.01%	0.06%	0.18%
EC 5	0.62%	0.55%	0.27% ⁺	0.16% ⁺
EC 5*	0.04%	0.03%	0.20%	0.10%
EC 6	0.00%	0.00%	0.09%	0.03%
EC 7	0.04%	0.02%	0.27%	0.15%
EC 8	0.00%	0.00%	0.11%	0.03%
EC 9	0.06%	0.02%	2.85%	1.06%
EC 10	0.06%	0.02%	0.73%	0.46%

⁺ Resultados del estudio a día 3. *Segunda provocación del paciente 5.

La representación de la población estudiada por citometría de flujo en linfocitos T CD8⁺ y TCRγδ⁺ se muestra en la figura 24. Se presentan los resultados del estudio realizado a un paciente en edad pediátrica (11 años) y a un paciente adulto (36 años).

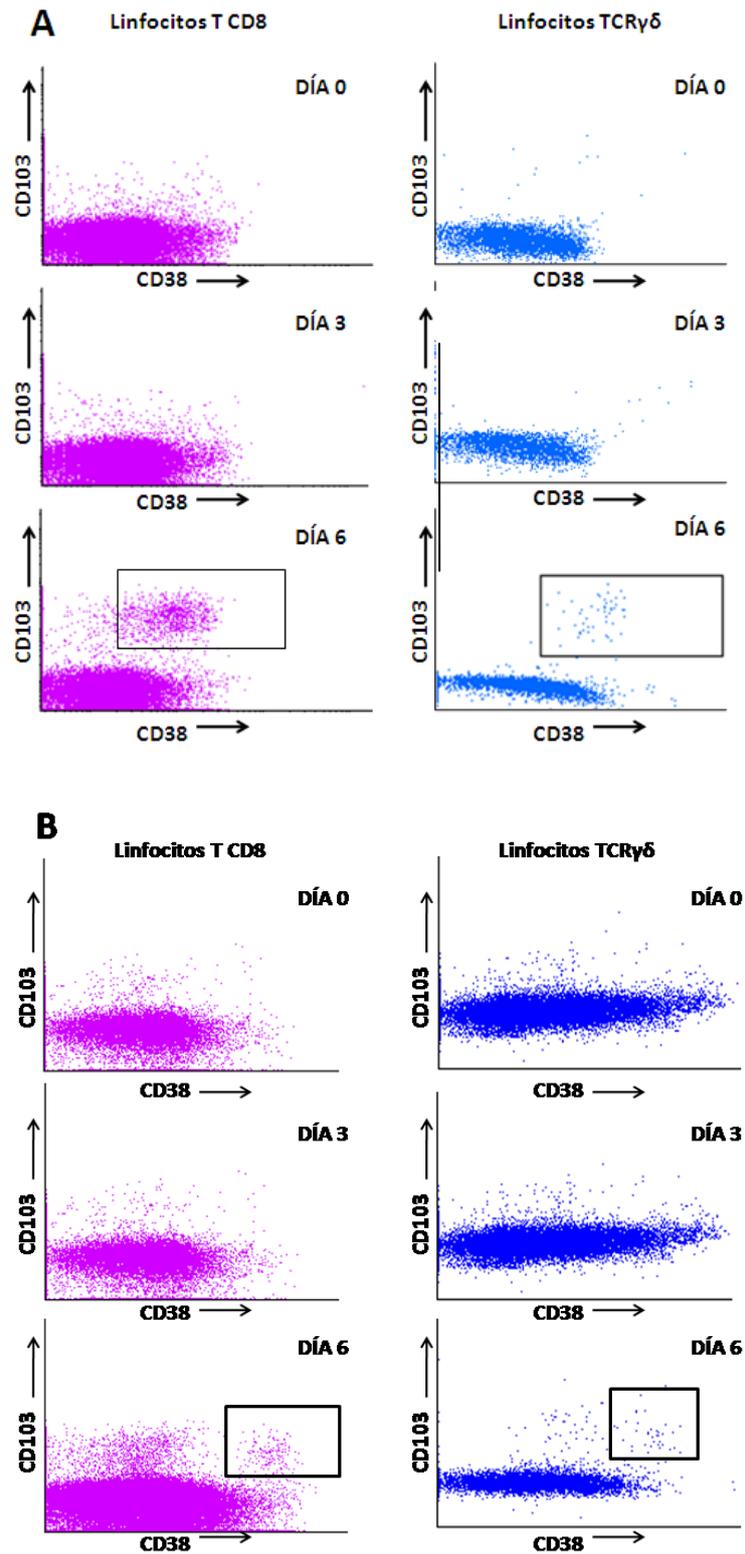


Figura 24: Imagen de citometría de flujo en un paciente de EC A) pediátrico y B) adulto. Se muestra la población CD103⁺ CD38⁺ a días 0, 3 y 6 para las subpoblaciones linfocitarias CD8⁺ y TCR $\gamma\delta$ ⁺.

En la figura 25 se muestran los resultados de citometría de flujo a día 0 y 6 de un control.

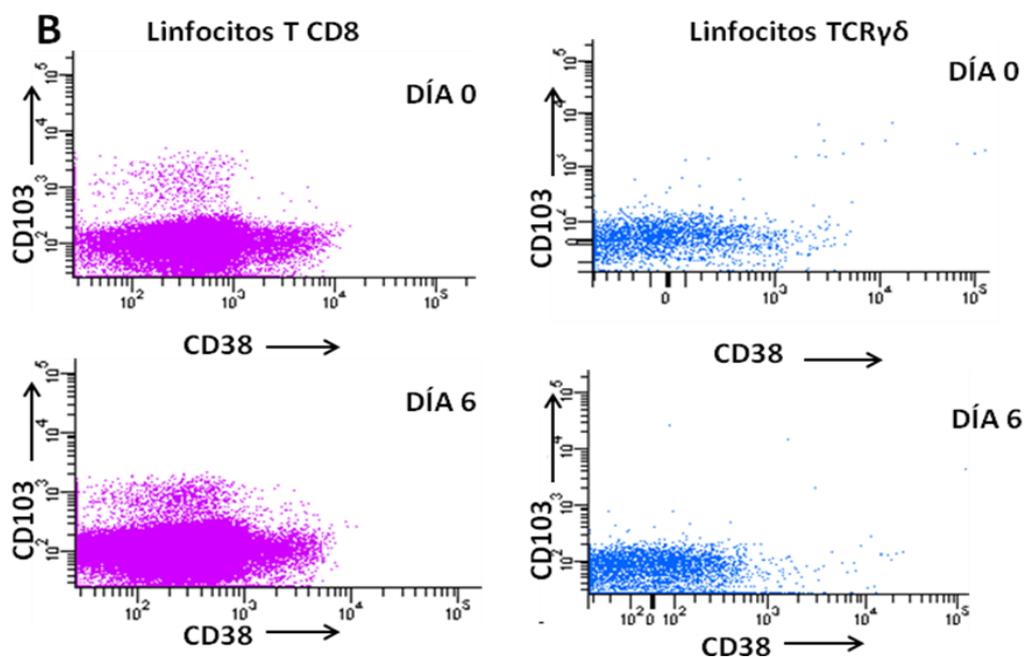


Figura 25: Imagen de citometría de flujo en un individuo control. Se muestra la población $CD103^+ CD38^+$ a día 0 y 6 para las subpoblaciones linfocitarias $CD8^+$ y $TCR\gamma\delta^+$.

Durante el estudio de citometría se incluyeron los marcadores superficiales descritos previamente: CD8, $TCR\gamma\delta$, CD38, CD103 y $\beta 7$. Estos dos últimos marcajes se dirigen a las subunidades α y β de la integrina intestinal $\alpha E\beta 7$. El incremento de activación en esta población se asocia a una mayor intensidad en el marcaje con $\beta 7$, como se muestra en la figura 26, en cuya parte inferior se muestran los linfocitos que expresan CD103 y $\beta 7^{hi}$ seleccionados previamente por expresar CD38.

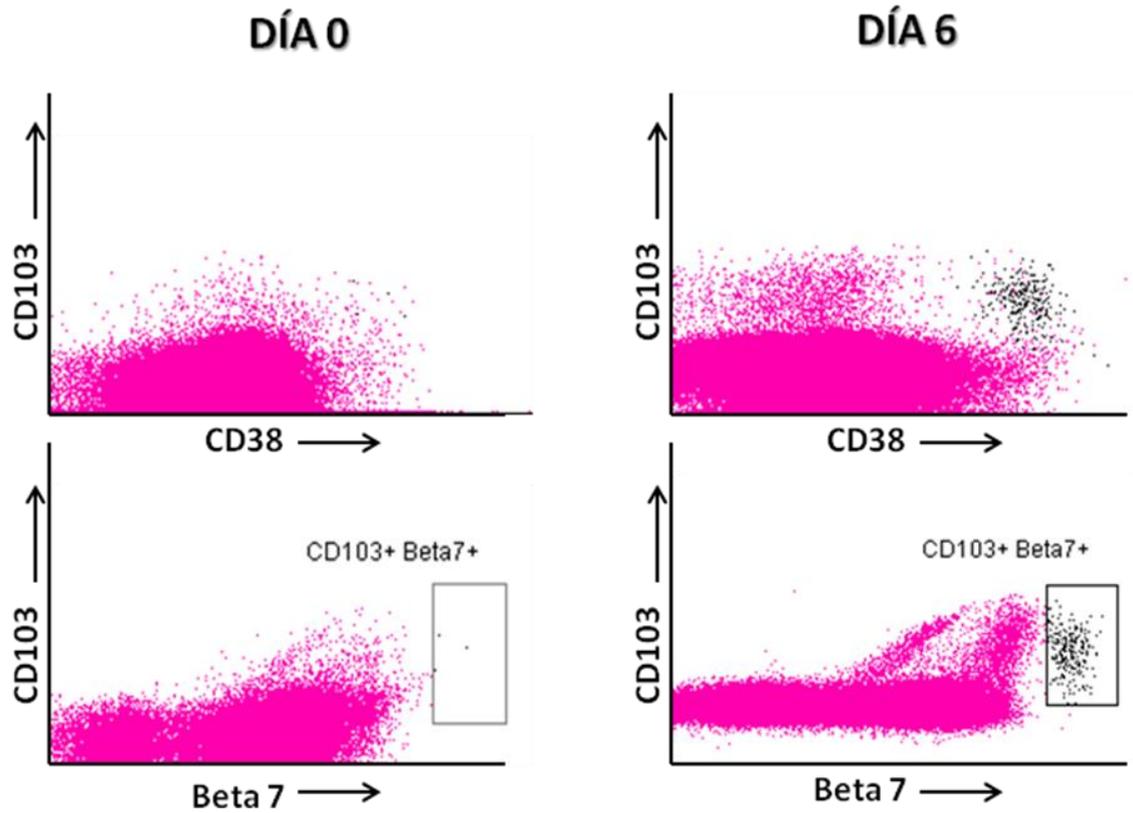


Figura 26: Imagen de citometría de flujo en un paciente de EC adulto. Se muestra en negro la población característica de la enfermedad dentro de los linfocitos TCD8⁺ a días 0 y 6, así como la expresión de integrina $\beta 7$ en dicha población.

2. Utilización del método diagnóstico en pacientes con sospecha de EC.

Se realizó la prueba de provocación en 36 pacientes que acudieron a la consulta especializada de EC, dentro del servicio de Aparato Digestivo de nuestro hospital; y en cuatro niños con sospecha de EC. Esta prueba se llevó a cabo de forma paralela a las que se emplean para el diagnóstico en la práctica clínica actualmente.

En la tabla 23 se muestran la sintomatología que presentaron los pacientes con sospecha de EC.

Tabla 16: Sintomatología de los pacientes incluidos en el estudio por sospecha de EC, durante el estudio de provocación.

ID	Sintomatología en provocación
S1	Día 3: digestiva leve
S2	Día 2: digestiva leve
S3	Días 1-3: digestiva leve
S4	Ninguno
S5	Días 1-3: digestiva leve
S6	Días 1-6: digestiva leve astenia
S7	Días 1-6: digestiva leve astenia
S8	Ninguno
S9	Ninguno
S10	Días 1-3: artralgia
S11	Ninguno
S12	Ninguno
S13	Ninguno
S14	Días 3-4: digestiva leve
S15	Días 1-3: digestiva leve Día 4: cefalea
S16	Ninguno
S17	Días 1-3: digestiva leve

Resultados

ID	Sintomatología en provocación
	Días 3-4: astenia
S18	Ninguno
S19	Día 6: estomatitis
S20	Ninguno
S21	Ninguno
S22	Días 1-6: digestiva leve
S23	Ninguno
S24	Ninguno
S25	Días 1-6: digestiva leve
S26	Ninguno
S27	Días 1-5: digestiva leve, astenia
S28	-
S29	Ninguno
S30	Días 1-5: digestiva leve, cefalea
S31	Días 1-2: digestiva leve Días 3-6: mialgia
S32	Días 1-5: digestiva leve
S33	Días 1-3: digestiva leve
S34	Día 5: digestiva leve
S35	Días 1-6: digestiva leve, astenia
S36	Día 1-3: digestiva leve
S37	Días 1-6: digestiva leve
S38	Ninguno
S39	Ninguno
S40	Día 1-4: digestiva leve

En ninguno de los cuatro niños estudiados se observaron las poblaciones específicas de EC.

De todos los pacientes adultos la prueba resultó positiva en 6 individuos, cuyos parámetros diagnósticos de muestran en la tabla 24.

Tabla 24: Parámetros diagnósticos de los sujetos incluidos con resultado positivo en el estudio.

Edad	Sexo	Ac	HLA	Biopsia	Día 0:		Día 6:		LIEs		
					CD103 ⁺ CD38 ⁺		CD103 ⁺ CD38 ⁺		TCRγδ	iNK	
					CD8	TCRγδ	CD8	TCRγδ			
S1	28	M	Negativos	DQ2.2	NR	0.00%	0.00%	0.14%	0.02%	-	-
S2	67	H	TG2+ EMA-	DQ2.5	NR	0.11%	0.91%	0.14%	0.93%	-	-
S3	49	M	Negativos	DQ8	NR	0.00%	0.00%	0.14%	0.15%	7.1%	19.0%
S4	43	H	TG2+ EMA-	DQ7.5	M0	0.00%	0.00%	0.55%	0.01%	6.1%	7.4%
			TG2+								
S5	39	M	EMA+	DQ2.5	*	0.01%	0.04%	0.12%	0.21%	22.3%	1.0%
				No DQ2							
S6	32	M	Negativos	DQ8	NR	0.01%	0.03%	0.05%	0.09%	-	-

*Cápsula Crosby negativa. NR= no realizada en dieta con gluten

En uno de estos pacientes la población linfocitaria CD103⁺ β7^{hi+} CD38⁺ solo se observó en los linfocitos T CD8⁺ y no en el estudio de los linfocitos con TCRγδ⁺, como se muestra en la figura 27.

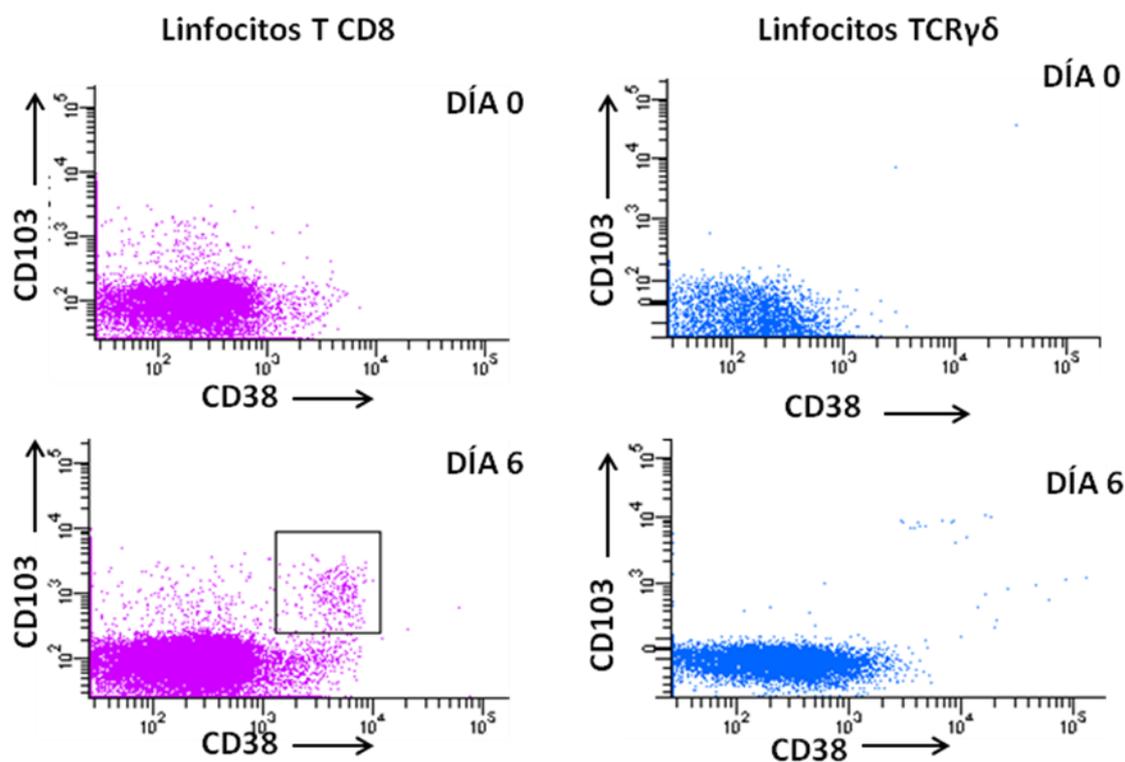


Figura 27: Imagen de citometría de flujo de un sujeto con sospecha de EC. Se muestra la población CD103⁺ CD38⁺ a días 0 y 6 para las subpoblaciones linfocitarias CD8⁺ y TCRγδ⁺.

En la figura 28 se muestra gráficamente el incremento porcentual en la población de estudio tanto en los enfermos de EC (líneas continuas) como en los pacientes de la consulta con resultado positivo en nuestro estudio (líneas punteadas). Se observa como los pacientes con sospecha muestran valores concordantes con los presentes en los celíacos.

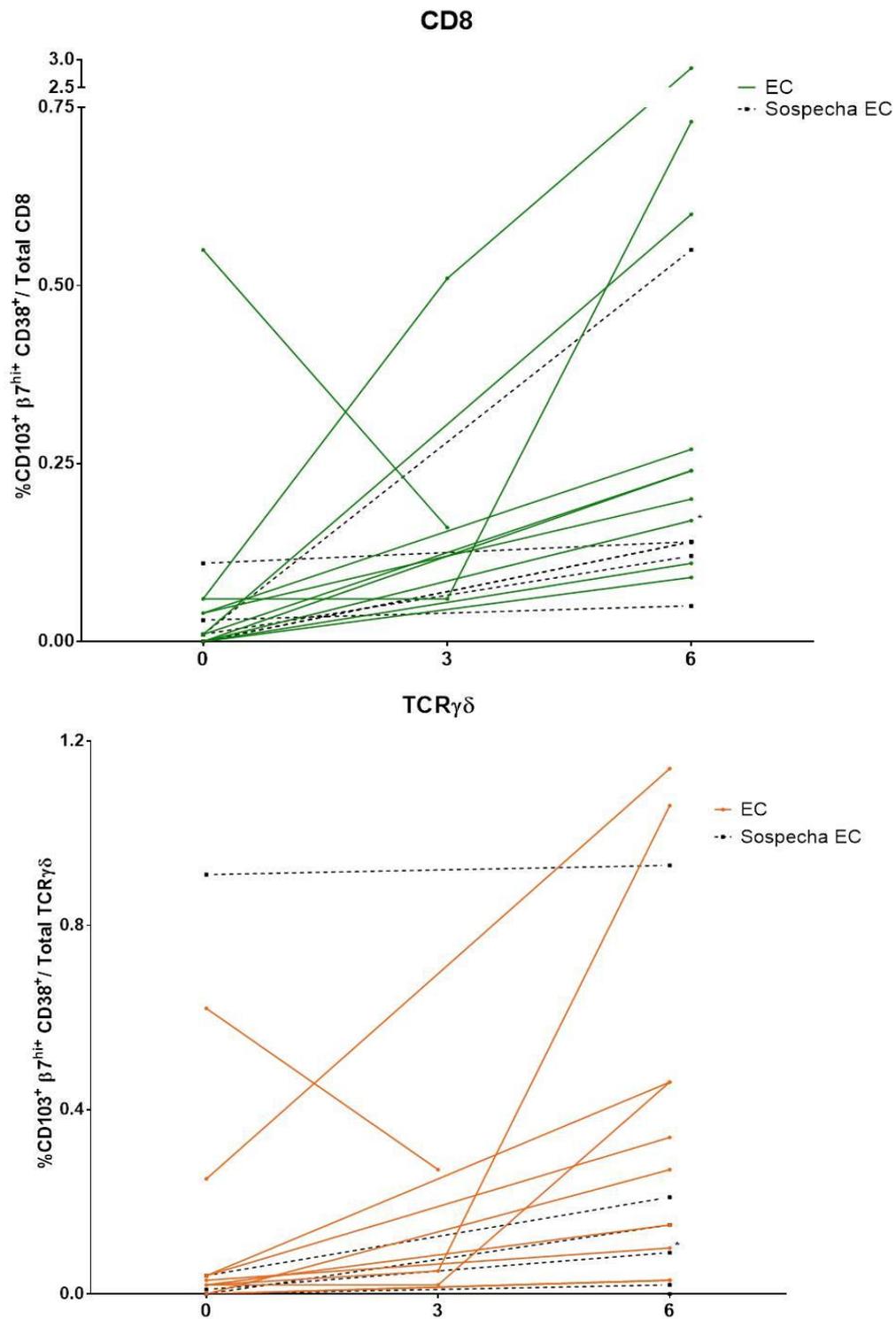


Figura 28: Porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias estudiadas a días 0, 3 (en los casos disponibles) y 6 en los pacientes de EC previamente diagnosticada (líneas continuas) y en los derivados de la consulta por sospecha de EC en que aparecen (líneas punteadas).

DISCUSIÓN

1) Diferente perfil de expresión en niños y adultos con EC.

La EC puede desarrollarse en individuos de cualquier edad, en ocasiones con grandes diferencias dependiendo del período de la vida en que surge el debut. Con el objetivo de investigar la posible base genética y molecular de estas diferencias, seleccionamos niños y adultos con EC y comparamos la expresión génica a nivel intestinal de cada uno de los grupos con respecto a individuos control del mismo grupo de edad.

Dado que trabajamos con tamaños de muestra relativamente bajos, lo que puede afectar a la potencia estadística para obtener un resultado significativo, analizamos los datos mediante dos métodos de inferencia estadística: el enfoque clásico o frecuentista mediante el uso del test de la U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni, y la metodología Bayesiana.

La aplicación del enfoque clásico al análisis de los datos limita el número de genes con expresión alterada en la EC a dos. Sin embargo, ocho de los genes estudiados ya estaban descritos como implicados en EC en la literatura. La corrección de Bonferroni se utiliza para reducir los resultados falsos positivos que pueden aparecer tras el análisis de múltiples variables, pero supone un análisis muy conservador, como consecuencia del cual se pueden perder resultados positivos existentes. Los genes derivados del análisis de Bonferroni (*FASLG* y *TNSFS18*) se corroboran en la estadística Bayesiana. Sin embargo, la estadística Bayesiana utilizada permite la detección de un mayor número de genes con probabilidad de estar alterados en la EC. De los 38 genes estudiados, 20 aparecen como alterados en EC. Dentro de ellos, distinguimos dos grupos basándonos en la probabilidad *a posteriori* obtenida. Por un lado, ocho genes

Discusión

mostraron una expresión claramente alterada en pacientes con EC, y por otro, 12 genes presentaron menor probabilidad *a posteriori* y algunos podrían ser resultados falsos positivos, en cualquier caso, tendrían menor impacto en la enfermedad.

Los genes claramente alterados son *C2orf74*, *CCR6*, *FASLG*, *JAK*, *TNFSF18*, *IL1RL1*, *CCR4* e *IL6*. De ellos, *FASLG* se ha relacionado previamente con EC [147]. De los 12 genes con menor efecto, seis se ha descrito previamente: *C1orf106*, *CD28*, *IL18RAP*, *PLEK*, *TAGAP* y *ZFP36L1* [63, 64, 156, 157]. En todos los casos, la literatura previa coincide con nuestros resultados, en cuanto al aumento o disminución de la expresión de cada gen con respecto a la población control. Los genes *C2orf74*, *CCR6*, *JAK*, *TNFSF18*, *IL1RL1*, *CCR4* e *IL6* se describieron por primera vez en este trabajo.

Así mismo, nuestros resultados muestran que *IL21* está sobre expresado en pacientes de EC, de acuerdo con la literatura [63, 64]. También *IL6* e *IL23A* se han descrito como genes con mayor expresión en EC [138], lo que coincide con nuestras observaciones, aunque, quizá debido al método utilizado previamente, las diferencias previas no llegaban a ser estadísticamente significativas. Por otro lado, genes como *IRAK1*, *HCFC1*, *PTPN2*, *REL*, *TNFAIP3* y *ZMIZ1*, con expresión similar entre enfermos y controles en nuestro estudio, tampoco se han relacionado previamente con la enfermedad [44, 64]. Todos estos datos, validan la aplicación del método Bayesiano para llevar a cabo este tipo de análisis.

El gen *SH2B3*, previamente descrito como aumentado en EC [63, 157], muestra una expresión similar a controles en nuestra muestra. Además, nuestro estudio muestra un gran número de genes con expresión alterada en la enfermedad que no estaban previamente descritos. Hay que resaltar que algunas de estas discrepancias coinciden

con genes que solo observamos alterados en pacientes adulto, siendo que la literatura recoge solo estudios en niños.

La principal aportación de nuestro estudio se basa en la diferente regulación génica encontrada entre adultos y niños. Encontramos los genes *TNFSF18* e *ICOSLG* con una expresión alterada solo en pacientes con debut pediátrico; e *IL1RL1*, *CD28*, *STAT3*, *TMEM187*, *VAMP3* y *ZFP36L1* solo alterados en pacientes con debut adulto. Sin embargo, los cinco últimos genes no muestran diferencias estadísticamente significativas entre pacientes adultos y pediátricos; este hecho puede ser debido a la presencia de falsos positivos en el grupo de adultos, o a la existencia de un menor efecto en niños, lo que dificulta obtener un resultado significativo. Debido a que *CD28* y *ZFP36L1* se han descrito previamente con expresión alterada en niños [64], la segunda explicación parece la más plausible.

Estas diferencias observadas a nivel de expresión génica en función de la edad de debut pueden contribuir a entender por qué la enfermedad muestra diferencias en estos dos períodos de la vida. Resulta muy interesante que los adultos parecen mostrar alterada la expresión de un mayor número de genes. Este hecho podría indicar que un menor número de cambios desencadena el desarrollo de la EC en niños, pero son necesarias más alteraciones para el desarrollo de la enfermedad en adultos, lo cual iría en concordancia con la menor incidencia de la enfermedad en adultos.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los marcadores serológicos e histológicos suelen presentar valores más atenuados en adultos, lo cual en muchos casos retrasa el diagnóstico. Para este estudio, se seleccionaron pacientes con serología positiva y HLA-

Discusión

DQ2 (mayor riesgo genético). Podrían encontrarse mayores diferencias si la selección de los pacientes adultos se ampliara a casos con un diagnóstico más complicado.

Las implicaciones clínicas de estos hallazgos deben investigarse más a fondo, aunque como se ha sugerido anteriormente, pequeños cambios en la expresión de genes de susceptibilidad pueden tener un alto impacto cuando varios genes implicados en la misma vía se ven afectados simultáneamente [156]. Como ejemplo de este efecto encontramos siete genes alterados en EC de los 11 analizados por participar en la respuesta inmune Th17 (*CCR6*, *JAK2*, *IL21*, *IL6*, *IL23A*, *STAT3* y *VAMP3*). Esto sugiere la participación de una respuesta inmune Th17 en la patogénesis de la EC, con una mayor contribución a la enfermedad de adultos.

Para profundizar en las posibles diferencias funcionales entre los niños y adultos con la enfermedad, se realizó un análisis mediante el uso de la base de datos STRING (herramienta de búsqueda para el estudio de la interacción de genes y proteínas) [158]. No se observaron diferencias entre estos dos grupos de pacientes (Figura 29). Las principales funciones en que estos genes se encuentran implicadas se basan en la regulación de la respuesta a procesos inflamatorios, así como funciones implicadas en la barrera intestinal. Hay que tener en cuenta, que todavía no se conoce el papel funcional de alguno de los genes estudiados, como el caso de *C2orf74*.

Resulta interesante que los dos genes que muestran una expresión alterada sólo en los niños, *TNFSF18* e *ICOSLG* se agrupan en la misma red de genes, ya que actúan en vías de señalización compartidas.

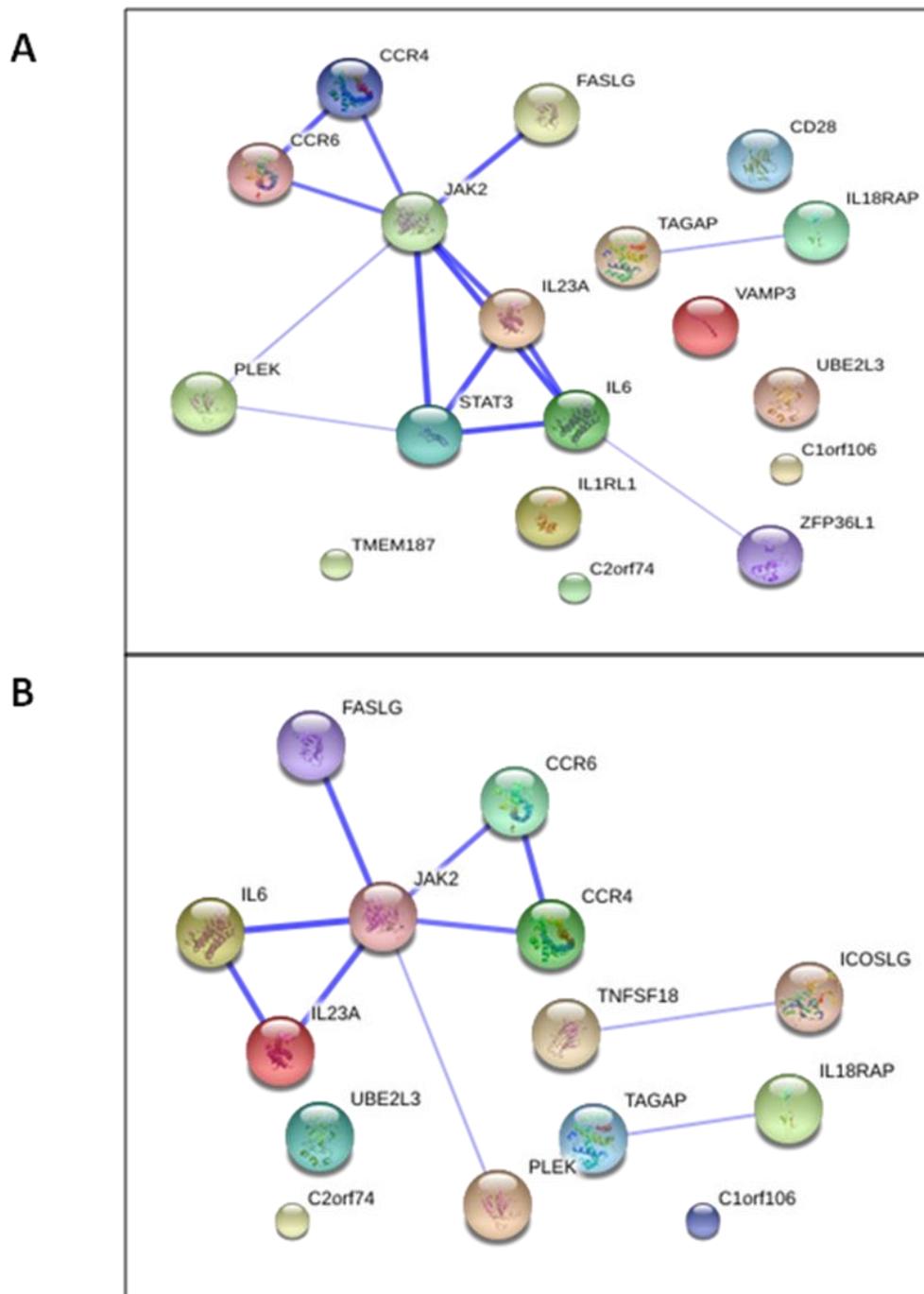


Figura 29: Relaciones funcionales de los genes alterados en pacientes A) adultos y B) pediátricos.

Estos resultados podrían estar indicando que niños y adultos responden de manera diferente en determinadas circunstancias, lo que podría contribuir a algunas de las diferencias observadas.

Discusión

Por último, hay que resaltar que los genes incluidos en este trabajo constituyen sólo un subconjunto reducido de posibles genes relacionados con la enfermedad. Nuevos estudios, que incluyan una batería de genes adicionales, podrá revelar mayores diferencias entre estos grupos de pacientes.

Cabe destacar que los programas de estudio de interacción funcional solo establecen relaciones directas entre los genes seleccionados. Este hecho limita el hallazgo de relaciones entre aquellos que dependan de proteínas intermediarias, que hayan quedado fuera del estudio o que, aun estando en el estudio, no vean su expresión alterada a causa de la enfermedad. Esta situación se muestra en la figura 30, en que se analizan los genes *UBE2L3* y *CD28*, alterados en los pacientes con debut adulto. Aunque aparentemente no presentan relaciones directas con el resto del conjunto, puede establecerse una relación funcional con otros genes alterados a través de proteínas no estudiadas, que por esta razón podrían resultar un interesante objeto de nuevos estudios.

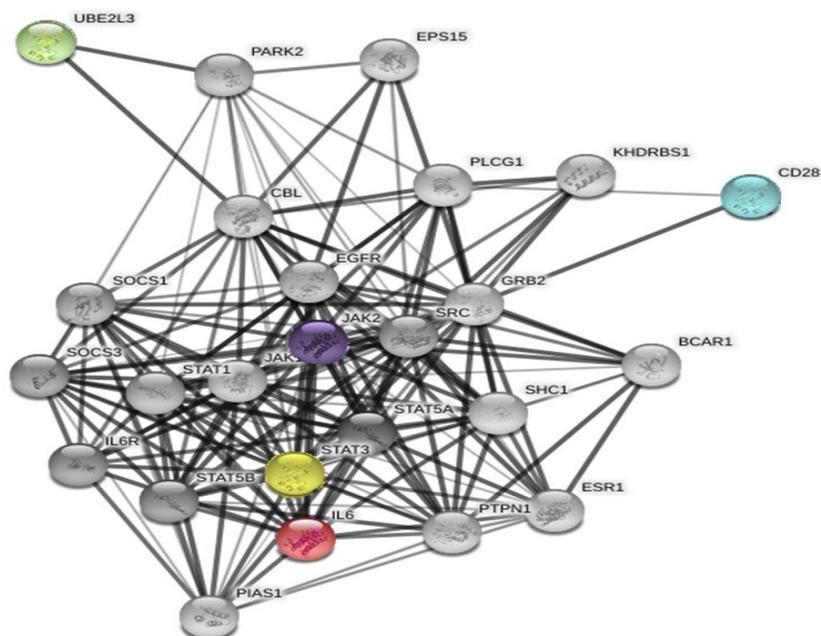


Figura 30: relación funcional entre genes estudiados (se muestran a color) a través de otras proteínas intermedias no estudiadas.

Las diferencias encontradas entre niños y adultos pueden repercutir en otros campos del estudio de la enfermedad como la respuesta a terapias. En la actualidad se están realizando un gran número de estudios en este contexto y resultaría interesante evaluar la respuesta diferencial de los pacientes debido a su edad de debut. También podría ser aconsejable reanalizar los datos de GWAS de acuerdo con la edad de debut de los pacientes, lo cual podría facilitar la identificación de nuevas variantes de susceptibilidad y podría contribuir a reducir la fracción de heredabilidad aún desconocida, la denominada "heredabilidad perdida". Además, podría ayudar a encontrar nuevos marcadores genéticos con fines diagnósticos, especialmente útiles en adultos, que han sido escasamente representados en los GWAS y que con frecuencia muestran un diagnóstico más difícil.

2) Perfil de expresión intestinal en pacientes EMA negativos.

Los anticuerpos frente a EMA se consideran altamente específicos de EC, sin embargo, se sabe que su sensibilidad es ligeramente inferior. Los individuos que carecen de estos anticuerpos suponen un importante reto diagnóstico, puesto que requieren resultados muy concluyentes en el resto de las pruebas e incluso llevar a cabo un diagnóstico diferencial con otras patologías.

En este trabajo, seleccionamos un grupo de 9 niños con EC con anticuerpos EMA negativos con el objetivo de conocer si se comportaban con respecto a la expresión génica de manera similar a los pacientes seropositivos. Para ello se incluyeron 8 genes descritos en la literatura como alterados en EC (*C1orf106*, *CD28*, *IL21*, *FASLG*, *IL18RAP*, *TAGAP*, *PLEK* y *ZFP36L1*).

Encontramos que seis de estos genes mostraron resultados similares a los obtenidos en la serie de pacientes pediátricos con EMA positivo: *C1orf106*, *CD28*, *FASLG*, *IL18RAP*, *PLEK* y *TAGAP*. Además, *IL21* mostró de nuevo una expresión muy baja o indetectable en este grupo, pero al igual que en el resto de celíacos analizados, parecía presentar mayor expresión que en controles. En comparación a la literatura previa, *ZFP36L1* no mostró diferencias significativas, a diferencia de lo publicado [64], pero ello concuerda con lo observado en nuestro niños con EC EMA positivos. Esto puede deberse al pequeño efecto del gen, que dificulta su detección dado el menor número de muestras respecto a la literatura que lo describe.

Un efecto parecido parece ocurrir en el gen *C1orf106*. En este caso, en la serie de pacientes pediátricos con EMA positivo, en concordancia con la literatura, las diferencias sí resultan significativas, aunque con una probabilidad *a posteriori* baja

(muy próxima a 0.5). Un efecto algo menor en la serie de los pacientes EMA negativos, llevaría a que esta diferencia no se aprecie.

Una de las conclusiones de los GWAS alude al efecto pequeño y acumulativo de un gran número de alteraciones génicas como desencadenantes de la enfermedad. Esto se hace patente en los estudios de expresión génica, en que, aunque su utilidad se basa en la tendencia global de cada grupo, es difícil detectar un perfil atribuible al conjunto de todos los enfermos.

Este grupo de pacientes EMA negativos estudiados, presenta además la característica de presentar anticuerpos frente a TG2 con ensayos no convencionales que supuestamente pueden detectar también neoepítomos que surgen del entrecruzamiento entre la TG2 y péptidos modificados de gluten. En un estudio previo de nuestro grupo, observamos que estos pacientes presentan en general mayor frecuencia de genética HLA de bajo riesgo y menor grado de lesión histológica [92], pero aquí vemos que parecen mostrar un patrón de expresión génica similar al resto de pacientes estudiados.

Actualmente, es conocida la gran variabilidad que muestran los pacientes de EC que acuden a las consultas de EC. Los clínicos se encuentran con frecuencia individuos que no cumplen todos los criterios necesarios para el correcto diagnóstico de la EC pero que sin embargo, se benefician enormemente de la retirada del gluten de su dieta. Este es el caso de los pacientes que se muestran en este estudio, todos ellos con sintomatología clásica que revierte tras el mantenimiento de una estricta DSG. No obstante, son pacientes con característica serología negativa para los epítomos que comúnmente se consideran específicos de la enfermedad. La creciente necesidad de

Discusión

eliminar la endoscopia del diagnóstico sobre todo en niños pequeños, otorga cada vez más importancia a la presencia de anticuerpos en sangre periférica. Esto supone un problema en el diagnóstico de pacientes como los que aquí se presentan que sin embargo, demostraron que presentan alteraciones similares a pacientes con serología positiva en genes implicados en la patogénesis. Resulta especialmente interesante el caso de los pacientes que carecen de HLA-DQ2/DQ8, que sin duda con serología negativa, escaparían al diagnóstico con las actuales guías en pediatría y sin embargo en nuestro estudio muestran las mayores alteraciones de expresión. Todo ello demuestra la necesidad de ampliar el estudio en la inmunopatología de este tipo de pacientes, lo que podría ayudar a desarrollar nuevos métodos diagnósticos que permitan rescatar pacientes con características poco frecuentes.

3) Estudio comparativo de la expresión intestinal entre EC y CU.

En los últimos años se ha realizado un gran avance en el estudio de los mecanismos que subyacen a la genética de enfermedades autoinmunes, aun así numerosos aspectos siguen sin esclarecerse. Nosotros seleccionamos una enfermedad seropositiva y una seronegativa de origen inmunológico, EC y CU, las cuales pese a presentar una baja comorbilidad comparten diversas variantes de susceptibilidad genética y analizamos la expresión diferencial de diversos genes en el principal tejido afectado en cada enfermedad. Concretamente, analizamos la expresión intestinal de 29 genes pertenecientes a 18 regiones asociadas con riesgo a padecer EC, 13 de ellas de susceptibilidad también a CU.

Nuestros resultados muestran que la existencia de loci de riesgo comunes no implican de manera inequívoca las mismas consecuencias funcionales en todas las enfermedades. Al evaluar los 19 genes localizados en regiones de susceptibilidad comunes, observamos que las regiones cromosómicas 6q23, 18p11 y 21q22, mostraron resultados similares en ambas enfermedades, sin cambios en la expresión de los tres genes estudiados (*TNFAIP3*, *PTPN2* e *ICOSLG*). Ello concuerda con la falta de efecto *cis-eQTL* de los SNPs asociados en los GWAS en esas regiones. En dos loci, 1q32.1 y 4q27, se observó una disminución de expresión de *C1orf106* y un aumento de *IL21*, respectivamente, en EC y al considerar tejido inflamado de CU. El aumento de la IL-21 en la patogénesis de la EC y CU es bien conocido [159, 160]. En cuanto a *C1orf106*, codifica una proteína con función no bien definida, pero se ha postulado su implicación en la permeabilidad de la barrera intestinal [156], proceso relacionado tanto con la patogénesis de EC como de CU. En esa región, *GPR25*, no incluido en este trabajo, parece ser también responsable de la señal de asociación en 1q32.1 en CU [161].

En la región común 12q24.12, nuestros resultados muestran una alteración diferencial en el gen estudiado *SH2B3*, ya que se observó únicamente el aumento de expresión en tejido inflamado y tejido no inflamado de CU. Sin embargo, esto resulta concordante con estudios previos realizados en pacientes de EC, que describieron mayor expresión de este gen en pacientes con enfermedad activa (dieta con gluten) y tratados (sin gluten) [63]. Aunque la expresión de *SH2B3* no se observa alterada en nuestro grupo de EC, debe tenerse en cuenta que la variante génica localizada en este locus no se ha asociado con el riesgo a desarrollar EC en población española [46].

Discusión

Las regiones compartidas restantes mostraron resultados diferentes dependiendo de la enfermedad considerada. En 2p16, se observó un aumento de los niveles de expresión de *C2orf74* de manera común en EC y tejido inflamado de CU, pero, en CU, también se encontró alterado *PUS10*, con una disminución de los niveles en tejido inflamado y no inflamado de estos pacientes. La región 2q12.1 también mostró una regulación similar de *IL18RAP* en la EC y CU, pero una expresión diferente en relación con *IL1RL1*. La literatura muestra efecto eQTL relacionado tanto con *IL18RAP* como con *IL1RL1*, y muy recientemente también se ha ligado esta región con el RNA no codificante, *Inc13*, que regula la expresión de varios genes con papel inflamatorio asociados a EC [66]. En la región 22q11.21, *YDJC* mostró una mayor expresión en el tejido inflamado que en el no inflamado de pacientes con CU, sin cambios en los pacientes con EC, que sin embargo, presentaron un aumento en la expresión del gen *UBE2L3* localizado en esa misma región. A pesar de esto, se ha descrito un uso diferencial de los exones entre los pacientes de EC y controles en el transcrito del gen *YDJC* al estimular las células T CD4 de sangre periférica [162]. La diferencia más notable entre las dos enfermedades consideradas se refiere al gen *ZFP36L1* (14q24.1), que mostró una alteración opuesta en la EC y CU, disminuyendo en EC, concordante con los estudios previos [64], y aumentando en el tejido inflamado de pacientes con CU. La alteración de los niveles de expresión de *BACH2* (6q15) y *ZMIZ1* (10q22.3), sólo se detectó en la CU.

Por otro lado, obtuvimos resultados muy interesantes al estudiar los niveles de expresión en pacientes de CU de los genes situados en regiones de riesgo para EC. Observamos resultados similares en *FASLG*, *PLEK*, *CCR4* y *TAGAP*, los cuales mostraron una mayor expresión en ambos grupos de pacientes. En CU, estos cambios se

observaron sólo en tejido inflamado, con la excepción de *FASLG*, que mostró un aumento progresivo de expresión desde controles a tejido no inflamado e inflamado. Sin embargo, la región cromosómica Xq28 difirió entre los pacientes con CU, que mostraron alteración en la expresión del gen *HCFC1*, mientras que los pacientes con EC, mostraron un aumento de *TMEM187*. En estos casos, de genes no asociados a CU pero con expresión alterada en esta enfermedad, no puede descartarse la existencia de asociaciones génicas aún por descubrir. *CD28* y *SH2B3* constituyen dos ejemplos de este tipo, ya que se han asociado recientemente con la susceptibilidad a padecer EI [59].

Sin embargo, también hay que considerar que la selección de los genes se basó en aquellos localizados en regiones asociadas cuya función apuntaba un papel en la respuesta inmune. Esto podría introducir algún sesgo. De hecho, cuando se mira en términos de GO (*Gene Ontology Consortium*), que es una base de datos acerca de las funciones y relaciones entre los genes, 14 de los genes estudiados pertenecen a la categoría "proceso del sistema inmunológico" y 11 a la de "regulación de la transducción de señales intracelulares" o "regulación positiva de respuesta a estímulos". Todos estos procesos están relacionados con enfermedades autoinmunes y probablemente se alteran durante la desregulación inmune que caracteriza a estas enfermedades. Los cambios en la expresión génica son, en parte, una consecuencia de la condición inflamatoria presente en los pacientes con enfermedad activa, y la expresión de numerosos genes implicados en una vía funcional se pueden alterar de forma coordinada como consecuencia de la enfermedad. Por lo tanto, no es posible concluir que los cambios de expresión génica observados en los celíacos con enfermedad activa o en tejido inflamado de pacientes con CU estén directamente

Discusión

relacionados con la constitución genética. En la sangre periférica de controles, se describió un efecto *eQTL* para los SNPs de susceptibilidad en las regiones que incluyen *IL1RL1*, *IL18RAP*, *TAGAP*, *SH2B3*, *CD28*, *C1orf106*, *BACH2*, *ZMIZ1* y *UBE2L3* [161]. Concordante con ello, encontramos que *IL18RAP*, *SH2B3* y *ZMIZ1* están alterados tanto en tejido inflamado como normal de pacientes con CU, lo que sugiere una importante contribución de las variantes genéticas a nivel de expresión, ya que la alteración parece ser constitutiva. A la inversa, es decir, la discordancia entre el tejido inflamado y normal no se puede utilizar para descartar el efecto genético, ya que ciertas células específicas proliferan en un medio inflamatorio, lo que puede favorecer la detección de cambios en la expresión génica cuando predominan esos tipos celulares en el tejido estudiado.

En cualquier caso, nuestros datos sugieren nuevos genes que podrían estar implicados en CU, debiendo ser por tanto priorizados en nuevos estudios que se realicen en la enfermedad, al igual que probablemente en la enfermedad de Crohn, debido a la elevada genética de riesgo común entre ambas.

Nuestro estudio también muestra como la asociación de una misma región a dos enfermedades no implica que la señal sea la misma, como ocurre en el gen *ZFP36L1*, en que las variantes genéticas asociadas a la EC y CU son independientes, lo que podría explicar las discrepancias encontradas entre ambos grupos de pacientes. En *BACH2* y *ZMIZ1*, genes sólo alterados en CU inflamado, el desequilibrio de ligamiento (r^2) entre los SNPs de riesgo descritos en la EC y CU fue de 0,53 y 0,65, respectivamente.

La mayoría de las variantes genéticas asociadas se encuentran en las regiones no codificantes, algunos de ellos en las regiones intergénicas. Esto implica que su efecto

puede no limitarse a los genes colindantes. Por otro lado, el efecto de una variante génica puede ser específico de tejido o de estímulo. La era post-GWAS está dominada por el estudio de estos SNPs que pueden influir en genes alejados en el cromosoma o afectar a tipos celulares específicos. Como ejemplos de esto, se ha descrito que variantes génicas localizadas en la región del gen *SH2B3* pueden modular de la expresión de varios genes, entre ellos *TAGAP* [59]. Además, Plaza-Izurrieta y colaboradores, encontraron que los efectos *trans-eQTL* eran frecuentes y, en ciertos casos, dependientes de estímulo [64].

La elevada concordancia de nuestros resultados con la literatura sugiere que los patrones de expresión de los genes seleccionados en EC y en CU no siempre se correlacionan con los esperados atendiendo a la genética subyacente aparente. En concordancia con la alta complejidad puesta de manifiesto en estudios genéticos recientes, la correcta interpretación de las señales de asociación tendría que integrar la compleja interacción con la epigenética y con factores ambientales, considerando de igual forma su impacto múltiple en otros genes a través de efectos *trans-eQTL*. Nuestro trabajo prioriza algunos genes que merecen una mayor investigación en la EII y probablemente en otras enfermedades autoinmunes. Por otra parte, se identifican algunos genes, como *ZFP36L1*, *PUS10* y *BACH2*, todos ellos asociados a diversas enfermedades autoinmunes, que se podrían explorar con el fin de buscar posibles mecanismos diferenciales que conducen a una enfermedad específica.

4) Estudio de interacción génica entre *C1orf106* y *TEC* en EC, ECr y CU.

La EC necesita de la confluencia de diversas alteraciones genéticas unido a desencadenantes ambientales para su desarrollo, de lo que todavía queda mucho por descubrir. En este sentido, se sabe que muchas de las variantes genéticas asociadas a la enfermedad afectan solo a un relativamente bajo número de pacientes, hecho que necesita ser estudiado. Los estudios de interacción génica resultan una buena herramienta para este fin, ya que parten de la base de que una alteración génica lleva a la enfermedad únicamente cuando se da en combinación con otra.

Los resultados derivados de este trabajo, sugieren que el efecto protector a presentar EC y ECr conferido por el alelo A del polimorfismo rs7522462 del gen *C1orf106* ocurre únicamente, o en mayor medida, en presencia del alelo C del polimorfismo rs11945978 del gen *TEC*. Esta interacción va en concordancia con lo previamente descrito en ECr [55]. La falta de significación estadística cuando se analiza cada enfermedad por separado puede ser debida a la baja frecuencia en que aparecen los genotipos implicados en la interacción, lo cual disminuye la potencia estadística para su detección.

Analizamos la expresión intestinal de los genes *C1orf106* y *TEC* en muestras de ECr, CU y EC, con objeto de analizar las implicaciones funcionales de esta interacción encontrada. Sin embargo, dada la baja frecuencia de la interacción entre los polimorfismos de riesgo, entre 1,4% y 2,8% en las distintas series de pacientes estudiados, no se pudo analizar la correlación entre la presencia de la interacción y los niveles de expresión de cada gen. No obstante, estudiamos la correlación entre la

expresión de los genes *C1orf106* y *TEC* y los genotipos aislados de cada gen pero no se obtuvieron resultados significativos en ningún caso.

La presencia de esta interacción en una mayor frecuencia en los pacientes de EC y ECr va en concordancia con múltiples estudios genéticos que apoyan la presencia de una herencia común entre diferentes patologías [163, 164]. Esta idea, que representa la base del proyecto Immunochip, adquiere mayor fuerza en patologías complejas, en que un gran número de factores tanto genéticos como ambientales actúan como desencadenantes, y más aún cuando una desregulación del sistema inmune representa una característica común en ambas [165, 166]. Sin embargo, la genética subyacente a diferentes enfermedades debe ser siempre estudiada de manera individual, ya que, como se observa en los resultados obtenidos, la población con CU no presenta la interacción descrita.

En este contexto, resultaría muy interesante realizar estudios que profundicen en la funcionalidad de estos genes, ya que la diferente influencia que presentan estas variantes génicas en enfermedades tan relacionadas como la CU y ECr, podría ofrecer pistas que ayuden a conocer los distintos procesos patológicos que tienen lugar en ambas. Recientemente el gen *C1orf106* se ha asociado con el mantenimiento de la barrera intestinal [156]. Por otro lado, *TEC* presenta una función inmunoreguladora, ya que inhibe la expresión de CD25 en los linfocitos T, atenuando con ello, su activación por IL-2 [167]. Dada la funcionalidad de estos genes podría resultar interesante profundizar en el papel que desempeña su regulación conjunta en estas enfermedades, con el fin de utilizar su inmunomodulación enfocada a estudios terapéuticos.

5) Aumento de activación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ y T CD8 intestinales: utilidad como método diagnóstico en enfermedad celiaca.

La provocación con gluten es una aproximación clínica ampliamente utilizada en el diagnóstico de casos inciertos de EC. Consiste en la reintroducción del gluten en sujetos previamente en una dieta libre de gluten, durante un período de tiempo necesario para provocar una respuesta. Sin embargo, este tiempo varía considerablemente de unos individuos a otros [110]. Las limitaciones de este procedimiento, como el riesgo a inducir una sintomatología severa y la necesidad de una endoscopia invasiva como prueba final, han planteado la necesidad de buscar alternativas menos agresivas. En este sentido, los hallazgos inmunológicos encontrados en sangre periférica en individuos sometidos a provocaciones cortas suponen una interesante vía de estudio. Los estudios recientes que muestran la presencia de células T activadas dirigidas al intestino en sangre periférica 6 días más tarde de comenzar una provocación con gluten de 3 días [117], han puesto de manifiesto la necesidad de poner a punto métodos diagnósticos que estudien la efectividad de la presencia de esta población en el ya comentado *pool* de enfermos de celiaquía, con tan diversas características.

Nosotros estudiamos 10 pacientes con EC confirmada y 19 controles sin la enfermedad y corroboramos la respuesta celular descrita de manera específica en pacientes de EC por Han y colaboradores [117], detectando la presencia de las poblaciones CD103⁺ β 7^{hi+} CD38⁺ CD8⁺ y CD103⁺ β 7^{hi+} CD38⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ únicamente en los pacientes de EC sometidos a una corta provocación con gluten. Resulta notable que en los pacientes encontramos una enorme variabilidad respecto al número de linfocitos CD8 y TCR $\gamma\delta$

obtenida tras el procesamiento de una cantidad fija de sangre periférica. Estas diferencias muestran la necesidad de establecer unos valores mínimos de estas subpoblaciones para poder descartar la presencia de la población CD103⁺ β7^{hi} CD38⁺. Nuestros resultados parecen indicar que una población mínima de 30.000 linfocitos CD8 es suficiente para observar la presencia de las subpoblaciones celulares activadas.

Tras esta validación, quisimos conocer la utilidad de esta metodología como herramienta de diagnóstico complementaria a las actualmente empleadas en la práctica clínica. Para ello, estudiamos 40 individuos procedentes de las consultas específicas de EC de nuestro hospital. Estos individuos mantenían una DSG debido a un diagnóstico incierto previo o por propia iniciativa. Encontramos que seis de estos pacientes estudiados por posible EC presentaban las poblaciones celulares específicas.

Diversos estudios apuntan a que el inmunofenotipaje de LIEs resulta útil para el diagnóstico [168] en DSG, ya que tras la retirada del gluten, los celíacos mantienen tanto los valores aumentados de linfocitos TCRγδ como un porcentaje de *iNK* menores a los encontrados en individuos sin EC, aunque estos últimos aumentan ligeramente con la retirada del gluten. Obtuvimos el inmunofenotipo de LIEs en 15 individuos con sospecha de EC: 12 de ellos mostraron resultado negativo en esta prueba y en el estudio de provocación; uno fue positivo en ambas pruebas; y los dos restantes, positivos en la prueba de provocación, presentaron un porcentaje de *iNK* por debajo de los límites normales (*iNK* ≥20%), situándose en valores esperables para pacientes de EC en DSG, pero porcentajes de linfocitos TCRγδ sobre el total de LIEs cercanos al 7%. Curiosamente, en uno de estos dos individuos la población intestinal activada solo se

Discusión

observó en la subpoblación CD8, quizás el menor porcentaje de linfocitos TCR $\gamma\delta$ dificultó la detección de esta segunda subpoblación.

El punto de corte para el diagnóstico de EC de acuerdo al inmunofenotipo de los LIEs se establece generalmente en el aumento de linfocitos TCR $\gamma\delta$ por encima del 10% [169, 170], sin embargo algunos autores rebajan el punto de corte a 8.5% [171]. Estos mismos autores apuntan a un porcentaje más bajo de linfocitos TCR $\gamma\delta$ en el inmunofenotipo de los LIEs en pacientes seronegativos que en pacientes seropositivos con un mismo grado de atrofia intestinal. Además, encontraron que pacientes de EC con Marsh 1 mostraron menores porcentajes de CD3⁻CD103⁺ que los controles, pero superiores a los de los pacientes con EC con Marsh 3. Estos resultados, en concordancia con los obtenidos en nuestros pacientes, podrían apuntar a la existencia de un grupo de pacientes de EC en los que se necesitan “relajar” los criterios diagnósticos para evitar el descarte erróneo de la enfermedad.

En cuanto al empleo de la provocación corta en cuatro niños, parece que es una aproximación válida para descartar la EC en niños seronegativos con alteraciones histológicas (S24, S28 y S38, con atrofia el momento del diagnóstico, y S39, con Marsh 1). Por lo tanto, se podría evitar el período más largo en dieta con gluten que estos niños necesitarían, especialmente relevante si se considera que una provocación con gluten a largo plazo no se recomienda en niños muy pequeños o durante la pubertad, y que, finalmente, se requiere una biopsia duodenal.

Resulta curioso el mayor aumento en la activación de los linfocitos estudiados encontrado en pacientes en edad pediátrica, este hecho podría ir en concordancia con los resultados aquí descritos en relación a las diferencias en la expresión de ciertos

genes a nivel intestinal acorde a la edad de debut. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los pacientes pediátricos incluidos en este estudio presentaron atrofia total (Marsh 3c) al diagnóstico, lesión mayor que cualquier paciente adulto. Se ha descrito que el número de células T reactivas al gluten en sangre periférica y en el intestino delgado se correlaciona positivamente con el grado de daño histológico [172], lo que podría explicar la mayor respuesta celular observada en estos niños.

En nuestro estudio, encontramos un paciente de EC con la población activada tanto a día 0 como a día 3. Debido a esto, lo sometimos a una segunda provocación tras un año en DSG, y observamos que la población a día 0 estaba presente a porcentajes bajos y mostraba el aumento característico a día 6. Una posibilidad que explica la primera observación es que alguna transgresión en la dieta activara estos linfocitos días previos al inicio del primer estudio, desapareciendo este efecto en la segunda provocación.

La subunidad $\beta 7$ que forma parte de la integrina $\alpha E\beta 7$, presenta una elevada intensidad muy característica en la subpoblación de estudio ($CD103^+ CD38^+$), la cual no se observa en linfocitos intestinales no activados ($CD103^+ CD38^-$). Debido a esto, la determinación de esta molécula superficial en el estudio aporta mayor seguridad a la hora de identificar la población específica. La integrina $\alpha E\beta 7$ facilita la retención de linfocitos efectores y de memoria en el epitelio intestinal [173].

Los LIEs expresan en su mayoría la integrina $\alpha E\beta 7$ [100]. La mayoría de LIEs (>70%) son linfocitos T $CD8^+$, además la mayoría expresa $TCR\alpha\beta$. No obstante, existe un porcentaje de LIEs que presentan $TCR\gamma\delta$, cuyo número aumenta en gran medida en individuos con EC. Resulta lógico que la movilización de linfocitos $CD8^+$ tras el consumo de gluten sea

Discusión

más fácilmente visualizable que la movilización de TCR $\gamma\delta$, dada su mayor abundancia. En concordancia con esto, consideramos que la prueba diagnóstica de provocación por citometría de flujo se puede establecer atendiendo a la presencia de los marcadores CD8, CD103, $\beta 7$ y CD38.

Este método parece tener una alta sensibilidad, ya que cuando se miran los seis individuos estudiados por sospecha de EC que muestran las subpoblaciones características de EC, nos encontramos con una amplia diversidad de resultados en cuanto a las pruebas diagnósticas empleadas en la práctica clínica. Los 40 pacientes incluidos son una muestra bastante representativa de los casos complejos con sospecha de EC que reciben en las consultas: pacientes EMA-negativos (como cuatro de los seis identificados), individuos con histología no concluyente (como tres de los nuevamente identificados) o con genética HLA de bajo riesgo o incluso sin riesgo (sólo dos de los individuos recién diagnosticados eran HLA-DQ2.5). Este método es capaz de identificar a los individuos con todas estas singularidades, que de otro modo tendrían un diagnóstico muy difícil. Por esto, esta determinación representa un complemento interesante al diagnóstico de los pacientes de EC. Nuestros resultados muestran que puede resultar efectiva en individuos que retiran el gluten de su dieta sin un diagnóstico concreto, pero además puede suponer una herramienta útil para esclarecer casos con un diagnóstico complejo de acuerdo a las pruebas diagnósticas actuales.

La amplia gama de síntomas observados en el grupo de sospecha de EC es probablemente debido al enriquecimiento de este grupo con individuos que sufren de

la sensibilidad al gluten no celíaca, que no son identificados por este método, como se indicó originalmente [117].

Este método podría tener la limitación de que la estimulación con gluten no se puede ofrecer a todos los pacientes y el clínico debe evaluar previamente sus posibles consecuencias clínicas. Se ha publicado recientemente que se pueden observar ex vivo células T reactivas al gluten sin estimulación previa del paciente con gluten oral [174]. Aunque esto implica una tecnología más compleja, sigue siendo una posibilidad para los individuos con alta sospecha de EC, pero resultados no concluyentes con las pruebas diagnósticas actualmente disponibles. Sin embargo, hay que destacar que la ingesta de gluten durante tres días fue bastante bien tolerada por todos los participantes.

Es necesario evaluar un mayor número de pacientes con este método para evaluar sus valores concretos de especificidad y sensibilidad, pero parece una herramienta válida como apoyo al diagnóstico. Podría evitar una errónea interpretación de las lesiones histológicas y confirmar el diagnóstico en pacientes con genética HLA de bajo riesgo o sin riesgo.

6) Discusión general

La EC es una de las intolerancias alimentarias más comunes, afecta a casi el 1% de la población en todo el mundo. Sin embargo, los casos diagnosticados representan un porcentaje mucho menor, estimándose de 1:3 en pacientes pediátricos (diagnosticados: no diagnosticados), *ratio* que llega a 1:5 en los adultos. Entre las causas de este bajo diagnóstico se ha postulado principalmente la falta de recursos diagnósticos en muchas regiones, así como la enorme variabilidad en la sintomatología entre los pacientes. Existe además gran variabilidad en la edad de aparición.

Adicionalmente, la creciente moda de retirar el gluten como práctica saludable ha provocado que un gran número de individuos comiencen una DSG sin contar con un diagnóstico previo. En estos casos, es necesaria la reintroducción del gluten durante un largo periodo de tiempo seguido de una prueba invasiva como es la biopsia, lo que a menudo frena a estos pacientes en su búsqueda de un diagnóstico.

La EC sólo se desencadena en individuos predispuestos genéticamente. Además de la fuerte influencia de variantes genéticas en la región HLA, que se consideran necesarias para el desarrollo de la EC, se sabe que existen numerosas variantes asociadas de bajo riesgo. Sin embargo, el papel específico de estas variantes, así como el gen al que afectan no se conoce en la mayoría de los casos. En este trabajo realizamos un estudio de expresión intestinal de genes localizados en loci asociados a la enfermedad, con el fin de identificar los genes causales. Lo llevamos a cabo comparando niños y adultos con EC para evaluar el comportamiento diferencial de ambos grupos de cara a justificar parte de las diferencias encontradas entre ellos. Nuestros resultados suponen

el primer estudio que analiza las diferencias en la expresión génica debidas a la edad de diagnóstico en la EC. Encontramos algunos genes alterados específicamente en uno de los grupos y mostramos que los adultos presentan mayores cambios de expresión tanto en número como en magnitud. Esto podría indicar que a edades más avanzadas se necesitan más alteraciones para que se desencadene la enfermedad que en edad pediátrica, lo cual explicaría que haya menos casos. Resultaría interesante ampliar el estudio de las diferencias de expresión observadas considerando tipos celulares concretos, para avanzar en la patología.

Por otro lado, también realizamos un estudio que evalúa la expresión intestinal de pacientes con características poco frecuentes, como son aquellos seronegativos, demostrando que su perfil de expresión se asemeja a lo descrito en la literatura, de manera similar a nuestros pacientes EMA positivos.

Se necesitan nuevos estudios para confirmar nuestros resultados y evaluar la posible influencia genética que subyace a estos cambios, así como las consecuencias funcionales de las diferencias encontradas.

También quisimos profundizar en la base genética compartida entre EC y CU, como ejemplo de la implicación real de la genética compartida entre diversas enfermedades autoinmunes. Este concepto se basa principalmente en la asociación de loci de susceptibilidad comunes. Observamos una alta complejidad subyacente a este concepto. Nuestros resultados muestran que la existencia de loci de riesgo comunes entre dos enfermedades no implica necesariamente la existencia de una consecuencia funcional equivalente. Adicionalmente, apuntamos algunos genes que deberían ser estudiados de manera más exhaustiva en CU por su posible implicación en la

Discusión

enfermedad. Genes como *ZFP36L1*, *ZMIZ1*, *PUS10* y *BACH2* podrían ayudar a ampliar el conocimiento de la patogénesis de distintas enfermedades complejas con una base inmunológica.

Por último, la existencia de pacientes con características no estrictamente contempladas en las actuales guías diagnósticas supone un gran problema tanto a médicos como a pacientes. En muchos casos supone el abandono de las consultas con el inicio del tratamiento sin un diagnóstico definitivo y en otros supone un continuo peregrinaje por diferentes especialistas médicos. Esta situación crea la necesidad de desarrollar nuevos métodos diagnósticos con mayor sensibilidad, es decir, adaptados a un mayor espectro de individuos. El estudio de provocación que en este trabajo se evalúa supone una herramienta útil y sencilla para el diagnóstico de estos pacientes. Por un lado, corroboramos la presencia específica de linfocitos T CD8⁺ intestinales activados en pacientes que siguen una DSG estricta y son provocados tres días con gluten, y adicionalmente evaluamos su uso a las consultas de EC de adultos y niños, centrándonos en pacientes de difícil diagnóstico. Este método permite llegar al diagnóstico de pacientes en DSG, además parece tener alta sensibilidad, lo que permitía ampliar el espectro de casos diagnosticados. Nuestros resultados indican su utilidad en las consultas como prueba complementaria a las actuales y que en algunos casos podría evitar la realización de una prueba invasiva como es la biopsia duodenal. Resultaría interesante aplicar este método diagnóstico a un mayor número de pacientes con el fin de establecer su eficacia para el diagnóstico, de acuerdo principalmente a su especificidad y sensibilidad.

CONCLUSIONES

1. Existen diferencias en la expresión génica intestinal entre pacientes celíacos con debut adulto y pediátrico, tanto al considerar los genes concretos alterados como al tener en cuenta el grado de alteración.
2. La respuesta inmune Th17 parece implicada en la patogénesis de EC de acuerdo a la alteración observada en la expresión de diversos genes implicados. Su impacto podría ser mayor en pacientes adultos.
3. Los pacientes de EC que carecen de anticuerpos frente a EMA al diagnóstico, muestran una expresión similar en los genes estudiados a la encontrada en pacientes EMA positivos, lo que sugiere que en ambos grupos tienen lugar procesos inmunopatológicos comunes.
4. La existencia de regiones de riesgo asociadas a EC y CU no siempre implica los mismos genes en ambas enfermedades, como muestra la expresión diferencial de algunos genes en una y otra enfermedad.
5. Los genes en loci de riesgo a EC: *FALSG*, *PLEK*, *CCR4*, *TAGAP* y *HCFC1*, deberían ser objeto de nuevos estudios en CU por su posible implicación en el riesgo a desarrollar esta enfermedad.
6. La interacción génica descrita entre los genes *C1orf106* y *TEC* en la susceptibilidad a EC_r, parece influir en el riesgo a presentar EC, pero no CU.
7. La determinación en sangre periférica de linfocitos T CD8 y TCR $\gamma\delta$ caracterizados por la expresión de los marcadores CD103 β 7 y CD38 en individuos sometidos a provocación con gluten de tres días, parece ser un método válido para el diagnóstico de EC en pacientes en DSG.

BIBLIOGRAFÍA

1. Husby, S., et al., *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. 54(1): p. 136-60.
2. Catassi, C., S. Gatti, and E. Lionetti, *World perspective and celiac disease epidemiology*. Dig Dis, 2015. 33(2): p. 141-6.
3. Whitacre, C.C., *Sex differences in autoimmune disease*. Nat Immunol, 2001. 2(9): p. 777-80.
4. Ivarsson, A., et al., *The Swedish coeliac disease epidemic with a prevailing twofold higher risk in girls compared to boys may reflect gender specific risk factors*. Eur J Epidemiol, 2003. 18(7): p. 677-84.
5. Hin, H., et al., *Coeliac disease in primary care: case finding study*. Bmj, 1999. 318(7177): p. 164-7.
6. Singh, P., et al., *Risk of Celiac Disease in the First- and Second-Degree Relatives of Patients With Celiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Am J Gastroenterol, 2015. 110(11): p. 1539-48.
7. Korponay-Szabo, I.R., et al., *Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency*. Gut, 2003. 52(11): p. 1567-71.
8. Salardi, S., et al., *Prevalence of celiac disease in children with type 1 diabetes mellitus increased in the mid-1990 s: an 18-year longitudinal study based on anti-endomysial antibodies*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008. 46(5): p. 612-4.
9. Valentino, R., et al., *Prevalence of coeliac disease in patients with thyroid autoimmunity*. Horm Res, 1999. 51(3): p. 124-7.
10. Nowak, T.V., F.K. Ghishan, and K. Schulze-Delrieu, *Celiac sprue in Down's syndrome: considerations on a pathogenetic link*. Am J Gastroenterol, 1983. 78(5): p. 280-3.
11. van de Wal, Y., et al., *Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response*. Eur J Immunol, 1999. 29(10): p. 3133-9.
12. Dewar, D.H., et al., *The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006. 18(5): p. 483-91.
13. Vader, L.W., et al., *Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains*. Gastroenterology, 2003. 125(4): p. 1105-13.
14. Nistal, E., et al., *Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients*. Biochimie, 2012. 94(8): p. 1724-9.
15. Wacklin, P., et al., *The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease*. Inflamm Bowel Dis, 2013. 19(5): p. 934-41.

16. Wacklin, P., et al., *Altered duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet.* Am J Gastroenterol, 2014. 109(12): p. 1933-41.
17. Freeman, H.J., *Adult celiac disease in the elderly.* World J Gastroenterol, 2008. 14(45): p. 6911-4.
18. Stene, L.C., et al., *Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study.* Am J Gastroenterol, 2006. 101(10): p. 2333-40.
19. Vriezinga, S.L., et al., *Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease.* N Engl J Med, 2014. 371(14): p. 1304-15.
20. Lionetti, E., et al., *Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children.* N Engl J Med, 2014. 371(14): p. 1295-303.
21. Greco, L., et al., *The first large population based twin study of coeliac disease.* Gut, 2002. 50(5): p. 624-8.
22. Nistico, L., et al., *Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins.* Gut, 2006. 55(6): p. 803-8.
23. Falchuk, Z.M., G.N. Rogentine, and W. Strober, *Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy.* J Clin Invest, 1972. 51(6): p. 1602-5.
24. Keuning, J.J., et al., *HLA-DW3 associated with coeliac disease.* Lancet, 1976. 1(7958): p. 506-8.
25. DeMarchi, M., et al., *Two HLA-D and DR alleles are associated with coeliac disease.* Tissue Antigens, 1979. 14(4): p. 309-16.
26. Betuel, H., et al., *Adult celiac disease associated with HLA-DRw3 and -DRw7.* Tissue Antigens, 1980. 15(3): p. 231-8.
27. Congia, M., et al., *A high frequency of the A30, B18, DR3, DRw52, DQw2 extended haplotype in Sardinian celiac disease patients: further evidence that disease susceptibility is conferred by DQ A1*0501, B1*0201.* Tissue Antigens, 1992. 39(2): p. 78-83.
28. Sollid, L.M., et al., *Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer.* J Exp Med, 1989. 169(1): p. 345-50.
29. Vader, W., et al., *The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(21): p. 12390-5.
30. Spurkland, A., et al., *HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7.* Hum Immunol, 1992. 35(3): p. 188-92.
31. Karell, K., et al., *HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease.* Hum Immunol, 2003. 64(4): p. 469-77.

32. Molberg, O., et al., *Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease*. *Nat Med*, 1998. 4(6): p. 713-7.
33. Sjostrom, H., et al., *Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition*. *Scand J Immunol*, 1998. 48(2): p. 111-5.
34. Godkin, A., et al., *Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2)*. *Int Immunol*, 1997. 9(6): p. 905-11.
35. Johansen, B.H., et al., *Identification of a putative motif for binding of peptides to HLA-DQ2*. *Int Immunol*, 1996. 8(2): p. 177-82.
36. Fallang, L.E., et al., *Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation*. *Nat Immunol*, 2009. 10(10): p. 1096-101.
37. Henderson, K.N., et al., *A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease*. *Immunity*, 2007. 27(1): p. 23-34.
38. Lenz, T.L., et al., *Widespread non-additive and interaction effects within HLA loci modulate the risk of autoimmune diseases*. *Nat Genet*, 2015. 47(9): p. 1085-90.
39. Gutierrez-Achury, J., et al., *Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease*. *Nat Genet*, 2015. 47(6): p. 577-8.
40. Hadley, D., et al., *HLA-DPB1*04:01 Protects Genetically Susceptible Children from Celiac Disease Autoimmunity in the TEDDY Study*. *Am J Gastroenterol*, 2015. 110(6): p. 915-20.
41. van Heel, D.A., et al., *A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21*. *Nat Genet*, 2007. 39(7): p. 827-9.
42. Garner, C.P., et al., *Replication of celiac disease UK genome-wide association study results in a US population*. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(21): p. 4219-25.
43. Hunt, K.A., et al., *Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response*. *Nat Genet*, 2008. 40(4): p. 395-402.
44. Trynka, G., et al., *Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling*. *Gut*, 2009. 58(8): p. 1078-83.
45. Dubois, P.C., et al., *Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression*. *Nat Genet*, 2010. 42(4): p. 295-302.
46. Trynka, G., et al., *Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease*. *Nat Genet*, 2011. 43(12): p. 1193-201.

47. Coleman, C., et al., *Common polygenic variation in coeliac disease and confirmation of ZNF335 and NIFA as disease susceptibility loci*. Eur J Hum Genet, 2016. 24(2): p. 291-7.
48. Zupin, L., et al., *Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and celiac disease in Italian patients*. Mol Biol Rep, 2015. 42(2): p. 525-33.
49. Hunt, K.A., et al., *Negligible impact of rare autoimmune-locus coding-region variants on missing heritability*. Nature, 2013. 498(7453): p. 232-5.
50. Mistry V, B.N., Levine AP, Mirza MM, Hunt KA, Ciclitira PJ, Hummerich H, Neuhausen SL, Simpson MA, Plagnol V, van Heel DA., *Exome sequencing of 75 individuals from multiply affected coeliac families and large scale resequencing follow up*. PLoS One, 2015. 30(10 (1)).
51. Festen, E.A., et al., *A meta-analysis of genome-wide association scans identifies IL18RAP, PTPN2, TAGAP, and PUS10 as shared risk loci for Crohn's disease and celiac disease*. PLoS Genet, 2011. 7(1): p. e1001283.
52. Ostensson, M., et al., *A possible mechanism behind autoimmune disorders discovered by genome-wide linkage and association analysis in celiac disease*. PLoS One, 2013. 8(8): p. e70174.
53. Cordell, H.J., *Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases*. Nat Rev Genet, 2009. 10(6): p. 392-404.
54. Manolio, T.A., et al., *Finding the missing heritability of complex diseases*. Nature, 2009. 461(7265): p. 747-53.
55. Liu, Y., et al., *Genome-wide interaction-based association analysis identified multiple new susceptibility Loci for common diseases*. PLoS Genet, 2011. 7(3): p. e1001338.
56. Parkes, M., et al., *Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases*. Nat Rev Genet, 2013. 14(9): p. 661-73.
57. Welter, D., et al., *The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations*. Nucleic Acids Res, 2014. 42(Database issue): p. D1001-6.
58. Brant, S.R., *Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies*. Inflamm Bowel Dis, 2011. 17(1): p. 1-5.
59. Liu, J.Z., et al., *Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations*. Nat Genet, 2015. 47(9): p. 979-86.
60. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. 491(7422): p. 119-24.
61. Franke, L. and R.C. Jansen, *eQTL analysis in humans*. Methods Mol Biol, 2009. 573: p. 311-28.

62. Gabrielsen IS, A.S., Helgeland H, Flåm ST, Hatinoor N, Holm K, Viken MK, Lie BA, *Genetic risk variants for autoimmune diseases that influence gene expression in thymus*. Hum Mol Genet., 2016. 19.
63. Plaza-Izurieta, L., et al., *Revisiting genome wide association studies (GWAS) in coeliac disease: replication study in Spanish population and expression analysis of candidate genes*. J Med Genet, 2011. 48(7): p. 493-6.
64. Plaza-Izurieta, L., et al., *Expression analysis in intestinal mucosa reveals complex relations among genes under the association peaks in celiac disease*. Eur J Hum Genet, 2015. 23(8): p. 1100-5.
65. Fernandez-Jimenez, N., et al., *Coregulation and modulation of NFkappaB-related genes in celiac disease: uncovered aspects of gut mucosal inflammation*. Hum Mol Genet, 2014. 23(5): p. 1298-310.
66. Castellanos-Rubio, A., et al., *A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease*. Science, 2016. 352(6281): p. 91-5.
67. Amundsen, S.S., et al., *Coeliac disease-associated polymorphisms influence thymic gene expression*. Genes Immun, 2014. 15(6): p. 355-60.
68. Mesin, L., L.M. Sollid, and R. Di Niro, *The intestinal B-cell response in celiac disease*. Front Immunol, 2012. 3: p. 313.
69. Gomez-Villegas, M.A., I. Salazar, and L. Sanz, *A Bayesian decision procedure for testing multiple hypotheses in DNA microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2014. 13(1): p. 49-65.
70. Catassi, C., et al., *Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg*. Lancet, 1994. 343(8891): p. 200-3.
71. Dube, C., et al., *The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review*. Gastroenterology, 2005. 128(4 Suppl 1): p. S57-67.
72. Murray, J.A., et al., *Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2003. 1(1): p. 19-27.
73. Vilppula, A., et al., *Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study*. BMC Gastroenterol, 2009. 9: p. 49.
74. Hill ID, D.M., Liptak GS, et al. , *Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*. 2005. 40: p. 1-19.
75. Maki, M., et al., *Dental enamel defects in first-degree relatives of coeliac disease patients*. Lancet, 1991. 337(8744): p. 763-4.
76. Bardella, M.T., et al., *Chronic unexplained hypertransaminasemia may be caused by occult celiac disease*. Hepatology, 1999. 29(3): p. 654-7.
77. Bottaro, G., et al., *The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases*. Am J Gastroenterol, 1999. 94(3): p. 691-6.

78. Volta, U., et al., *The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center*. BMC Gastroenterol, 2014. 14: p. 194.
79. Kelly, C.P., et al., *Advances in diagnosis and management of celiac disease*. Gastroenterology, 2015. 148(6): p. 1175-86.
80. Fernandez, A., L. Gonzalez, and J. de-la-Fuente, *Coeliac disease: clinical features in adult populations*. Rev Esp Enferm Dig, 2000. 102(8): p. 466-71.
81. Sanders, D.S., et al., *Association of adult coeliac disease with irritable bowel syndrome: a case-control study in patients fulfilling ROME II criteria referred to secondary care*. Lancet, 2001. 358(9292): p. 1504-8.
82. Corazza, G.R. and G. Gasbarrini, *Coeliac disease in adults*. Baillieres Clin Gastroenterol, 1995. 9(2): p. 329-50.
83. Lionetti, E. and C. Catassi, *New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment*. Int Rev Immunol, 2011. 30(4): p. 219-31.
84. Bonaci-Nikolic, B., et al., *Serological and clinical comparison of children and adults with anti-endomysial antibodies*. J Clin Immunol, 2007. 27(2): p. 163-71.
85. Lauret, E. and L. Rodrigo, *Celiac disease and autoimmune-associated conditions*. Biomed Res Int, 2013. 2013: p. 127589.
86. Dieterich, W., et al., *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease*. Nat Med, 1997. 3(7): p. 797-801.
87. Giersiepen, K., et al., *Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. 54(2): p. 229-41.
88. Rostom, A., et al., *Celiac disease*. Evid Rep Technol Assess (Summ), 2004(104): p. 1-6.
89. Salmi, T.T., et al., *Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits*. Gut, 2006. 55(12): p. 1746-53.
90. Abrams, J.A., et al., *Seronegative celiac disease: increased prevalence with lesser degrees of villous atrophy*. Dig Dis Sci, 2004. 49(4): p. 546-50.
91. Matthias T, P.S., Selmi C, et al., *Diagnostic challenges in celiac disease and the role of the tissue transglutaminase-neo-epitope*. Clin Rev Allergy Immunol 2010. 38: p. 298-301.
92. Dieli-Crimi, R., *Anticuerpos específicos de enfermedad celíaca: relación con otras pruebas diagnósticas e implicación clínicas*. 2016, Madrid.
93. Maki, M. and P. Collin, *Coeliac disease*. Lancet, 1997. 349(9067): p. 1755-9.
94. Marsh, M.N., et al., *Studies of intestinal lymphoid tissue. XIV--HLA status, mucosal morphology, permeability and epithelial lymphocyte populations in*

- first degree relatives of patients with coeliac disease.* Gut, 1990. 31(1): p. 32-6.
95. Oberhuber, G., G. Granditsch, and H. Vogelsang, *The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. 11(10): p. 1185-94.
 96. Corazza, G.R. and V. Villanacci, *Coeliac disease.* J Clin Pathol, 2005. 58(6): p. 573-4.
 97. Chang F, M.U., Deere H., *Pathological and clinic significance of increased intraepithelial lymphocytes (IELs) in small bowel mucosa.* APMIS: acta pathologica, microbiota, et immunologica Scandinavica., 2005. 113(6): p. 385-99.
 98. Vivas, S., et al., *Duodenal biopsy may be avoided when high transglutaminase antibody titers are present.* World J Gastroenterol, 2009. 15(38): p. 4775-80.
 99. Marsh, M.N., *Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue').* Gastroenterology, 1992. 102(1): p. 330-54.
 100. Camarero, C., et al., *Age-related variation of intraepithelial lymphocyte subsets in normal human duodenal mucosa.* Dig Dis Sci, 2007. 52(3): p. 685-91.
 101. Bhagat, G., et al., *Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease.* J Clin Invest, 2008. 118(1): p. 281-93.
 102. Spencer, J., et al., *Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulations in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine).* Gut, 1989. 30(3): p. 339-46.
 103. Spencer, J., et al., *Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease.* Clin Exp Immunol, 1991. 85(1): p. 109-13.
 104. Wyatt, C.R., et al., *Activation of intestinal intraepithelial T lymphocytes in calves infected with Cryptosporidium parvum.* Infect Immun, 1997. 65(1): p. 185-90.
 105. Nilssen, D.E., et al., *Duodenal intraepithelial gamma/delta T cells and soluble CD8, neopterin, and beta 2-microglobulin in serum of IgA-deficient subjects with or without IgG subclass deficiency.* Clin Exp Immunol, 1993. 94(1): p. 91-8.
 106. EC, E., *Giardia induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes.* Gut, 1999. 44(3): p. 342-6.
 107. Savilahti, E., A. Arato, and M. Verkasalo, *Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease.* Pediatr Res, 1990. 28(6): p. 579-81.

108. Leon, F., et al., *Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes*. *Gastroenterology*, 2003. 125(2): p. 345-56.
109. Calleja, S., et al., *Dynamics of non-conventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and gammadelta T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology*. *Dig Dis Sci*, 2011. 56(7): p. 2042-9.
110. MJ, B., *The clinical response to gluten challenge: a review of the literature*. *Nutrients*, 2013. 19(5(11)): p. 4614-41.
111. Anderson, R.P., et al., *In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope*. *Nat Med*, 2000. 6(3): p. 337-42.
112. Gurish, M.F., et al., *Intestinal mast cell progenitors require CD49beta7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing*. *J Exp Med*, 2001. 194(9): p. 1243-52.
113. Camarca, A., et al., *Short wheat challenge is a reproducible in-vivo assay to detect immune response to gluten*. *Clin Exp Immunol*, 2012. 169(2): p. 129-36.
114. Anderson, R.P., et al., *T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease*. *Gut*, 2005. 54(9): p. 1217-23.
115. Raki, M., et al., *Tetramer visualization of gut-homing gluten-specific T cells in the peripheral blood of celiac disease patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(8): p. 2831-6.
116. Ontiveros, N., et al., *Ex-vivo whole blood secretion of interferon (IFN)-gamma and IFN-gamma-inducible protein-10 measured by enzyme-linked immunosorbent assay are as sensitive as IFN-gamma enzyme-linked immunospot for the detection of gluten-reactive T cells in human leucocyte antigen (HLA)-DQ2.5(+)-associated coeliac disease*. *Clin Exp Immunol*, 2014. 175(2): p. 305-15.
117. Han, A., et al., *Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells and gammadelta T cells in celiac disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(32): p. 13073-8.
118. Shan, L., et al., *Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue*. *J Proteome Res*, 2005. 4(5): p. 1732-41.
119. Siegel, M., et al., *Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury*. *PLoS One*, 2008. 3(3): p. e1861.
120. Fesus, L. and M. Piacentini, *Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions*. *Trends Biochem Sci*, 2002. 27(10): p. 534-9.
121. Jabri, B. and B. Meresse, *NKG2 receptor-mediated regulation of effector CTL functions in the human tissue microenvironment*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. 298: p. 139-56.
122. Meresse, B., et al., *Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease*. *J Exp Med*, 2006. 203(5): p. 1343-55.

123. Roberts, A.I., et al., *NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment*. J Immunol, 2001. 167(10): p. 5527-30.
124. Meresse, B., et al., *Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease*. Immunity, 2004. 21(3): p. 357-66.
125. Sollid, L.M., et al., *Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase-guilt by association?* Gut, 1997. 41(6): p. 851-2.
126. Caprioli, F., Pallone, F., and G. Monteleone, *Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism*. J Crohns Colitis, 2008. 2(4): p. 291-5.
127. Koga, T., K. Ichinose, and G.C. Tsokos, *T cells and IL-17 in lupus nephritis*. Clin Immunol, 2016.
128. Karczewski, J., et al., *New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis*. Autoimmunity, 2016: p. 1-16.
129. Parham, C., et al., *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. J Immunol, 2002. 168(11): p. 5699-708.
130. Ishizaki, M., et al., *Involvement of tyrosine kinase-2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axes in vivo*. J Immunol, 2009. 187(1): p. 181-9.
131. Martinez, G.J., et al., *Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation*. J Biol Chem, 2009. 284(51): p. 35283-6.
132. Liu, J., et al., *Rhbdd3 controls autoimmunity by suppressing the production of IL-6 by dendritic cells via K27-linked ubiquitination of the regulator NEMO*. Nat Immunol, 2014. 15(7): p. 612-22.
133. Korn, T., et al., *Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties*. Semin Immunol, 2007. 19(6): p. 362-71.
134. Medrano, L.M., et al., *Th17-related genes and celiac disease susceptibility*. PLoS One, 2012. 7(2): p. e31244.
135. Monteleone, I., et al., *Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa*. J Immunol, 2010. 184(4): p. 2211-8.
136. Lahdenpera, A.I., et al., *Expression pattern of T-helper 17 cell signaling pathway and mucosal inflammation in celiac disease*. Scand J Gastroenterol, 2014. 49(2): p. 145-56.
137. Sapone, A., et al., *Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. 152(1): p. 75-80.
138. Castellanos-Rubio, A., et al., *TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin*. Autoimmunity, 2009. 42(1): p. 69-73.

139. La Scaleia, R., et al., *Size and dynamics of mucosal and peripheral IL-17A+ T-cell pools in pediatric age, and their disturbance in celiac disease*. *Mucosal Immunol*, 2012. 5(5): p. 513-23.
140. Casellas, F., et al., *Factors that impact health-related quality of life in adults with celiac disease: a multicenter study*. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(1): p. 46-52.
141. Cosnes, J., et al., *Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. 6(7): p. 753-8.
142. Holmes, G.K., et al., *Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet*. *Gut*, 1989. 30(3): p. 333-8.
143. Malamut, G. and C. Cellier, *Refractory celiac disease: epidemiology and clinical manifestations*. *Dig Dis*, 2015. 33(2): p. 221-6.
144. Ludvigsson, J.F., et al., *The Oslo definitions for coeliac disease and related terms*. *Gut*, 2013. 62(1): p. 43-52.
145. Al-Toma, A., et al., *Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience*. *Gut*, 2007. 56(10): p. 1373-8.
146. Nasr, I., et al., *Recognising and Managing Refractory Coeliac Disease: A Tertiary Centre Experience*. *Nutrients*, 2015. 7(12): p. 9896-907.
147. *Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*. *Arch Dis Child*, 1990. 65(8): p. 909-11.
148. *AGA Institute Medical Position Statement on the Diagnosis and Management of Celiac Disease*. *Gastroenterology*, 2006. 131(6): p. 1977-80.
149. Catassi, C. and A. Fasano, *Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms*. *Am J Med*, 2010. 123(8): p. 691-3.
150. Vogl, T., et al., *Alarmin S100A8/S100A9 as a biomarker for molecular imaging of local inflammatory activity*. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 4593.
151. Lennard-Jones, J.E., *Classification of inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1989. 170: p. 2-6; discussion 16-9.
152. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16(3): p. 1215.
153. *geNorm and version3.5, Center for Medical Genetics. Ghent University; Ghent, Belgium. 2007.*
154. *NormFinder and version0.953, Aarhus University Hospital; Aarhus, Denmark. 2005.*
155. Ausín, M.C., et al., *Bayesian analysis of multiple hypothesis testing with applications to microarray experiments*. *Communications in Statistics - Theory and Methods* 2011. 40(13): p. 2276 -2291.

156. Kumar, V., et al., *Systematic annotation of celiac disease loci refines pathological pathways and suggests a genetic explanation for increased interferon-gamma levels*. Hum Mol Genet, 2015. 24(2): p. 397-409.
157. Galatola, M., et al., *Gene expression profile of peripheral blood monocytes: a step towards the molecular diagnosis of celiac disease?* PLoS One, 2013. 8(9): p. e74747.
158. Szklarczyk, D., et al., *STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life*. Nucleic Acids Res, 2015. 43(Database issue): p. D447-52.
159. Ge, J., et al., *Elevated expression of interleukin-21 and its correlation to T-cell subpopulation in patients with ulcerative colitis*. Cent Eur J Immunol, 2015. 40(3): p. 331-6.
160. Bodd, M., et al., *HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22*. Mucosal Immunol, 2010. 3(6): p. 594-601.
161. Ricano-Ponce, I., et al., *Refined mapping of autoimmune disease associated genetic variants with gene expression suggests an important role for non-coding RNAs*. J Autoimmun, 2016. 68: p. 62-74.
162. Quinn, E.M., et al., *Transcriptome Analysis of CD4+ T Cells in Coeliac Disease Reveals Imprint of BACH2 and IFNgamma Regulation*. PLoS One, 2015. 10(10): p. e0140049.
163. *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. Nature, 2007. 447(7145): p. 661-78.
164. Couzin, J. and J. Kaiser, *Genome-wide association. Closing the net on common disease genes*. Science, 2007. 316(5826): p. 820-2.
165. Xu, X.R., et al., *Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. 20(12): p. 3255-64.
166. Pascual, V., et al., *Inflammatory bowel disease and celiac disease: overlaps and differences*. World J Gastroenterol, 2014. 20(17): p. 4846-56.
167. Susaki, K., et al., *Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte*. Immunol Lett, 2010. 127(2): p. 135-42.
168. De Andres, A., C. Camarero, and G. Roy, *Distal duodenum versus duodenal bulb: intraepithelial lymphocytes have something to say in celiac disease diagnosis*. Dig Dis Sci, 2015. 60(4): p. 1004-9.
169. Eiras, P., et al., *Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease*. Cytometry, 1998. 34(2): p. 95-102.
170. Camarero, C., et al., *Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry*. Acta Paediatr, 2000. 89(3): p. 285-90.
171. Fernandez-Banares, F., et al., *Intestinal intraepithelial lymphocyte cytometric pattern is more accurate than subepithelial deposits of anti-tissue*

- transglutaminase IgA for the diagnosis of celiac disease in lymphocytic enteritis*. PLoS One, 2014. 9(7): p. e101249.
172. Bodd M, R.M., Bergseng E, Jahnsen J, Lundin KE, Sollid LM, *Direct cloning and tetramer staining to measure the frequency of intestinal gluten-reactive T cells in celiac disease*. Eur J Immunol, 2013. 43(10).
173. Cepek, K.L., et al., *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin*. Nature, 1994. 372(6502): p. 190-3.
174. Christophersen, A., et al., *Tetramer-visualized gluten-specific CD4+ T cells in blood as a potential diagnostic marker for coeliac disease without oral gluten challenge*. United European Gastroenterol J, 2014. 2(4): p. 268-78.

ARTÍCULOS

- **Pascual V**, Dieli-Crimi R, López-Palacios N, Bodas A, Medrano LM, Núñez C. *Inflammatory bowel disease and celiac disease: Overlaps and differences*. **World J Gastroenterol**. 2014 May 7; 20(17):4846-4856.
- **Pascual V**, Medrano LM, López-Palacios N, Bodas A, Dema B, Fernández-Arquero M, González- Pérez B, Salazar I and Núñez C. *Different gene expression signatures in children and adults with celiac disease*. **Plos One**, 2016 Feb 9; 11(2): e0146276. doi:10.1371/journal.pone.0146276.
- **Pascual V**, Medrano LM, Bodas A, López-Palacios N, Salazar I, González-Pérez B, Fernández-Arquero M, Urcelay E , Mendoza JL and Núñez C. *Expression patterns of common and unique susceptibility loci to celiac disease and ulcerative colitis*. **Artículo enviado para su publicación.**
- **Pascual V**, López-Palacios N, Castaño M, Ojinaga-Nodal E, Dieli-Crimi R, Bodas A and Núñez C. *Evaluation of activated CD8⁺ and TCRγδ⁺ T cells in blood as a diagnostic marker of celiac disease in gluten free diet*. **Artículo enviado para su publicación.**

