



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA

**UTILIDAD CLINICA DE TIPIFICAR LOS ALELOS DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE II EN SUJETOS CON  
SOSPECHA DE ENFERMEDAD CELIACA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

**EDUARDO CERDA CONTRERAS**

TUTORES

DR JULIO GRANADOS ARRIOLA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

DR LUIS FEDERICO USCANGA DOMÍNGUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

DRA YOLANDA LÓPEZ VIDAL

FACULTAD DE MEDICINA UNAM

ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

CD. MX. , JUNIO DEL 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# UTILIDAD CLINICA DE TIPIFICAR LOS ALELOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE II EN SUJETOS CON SOSPECHA DE ENFERMEDAD CELIACA

## TABLA DE CONTENIDOS

### Contenido

ANTECEDENTES .....	1
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPÓTESIS .....	13
OBJETIVOS .....	14
Objetivo general .....	14
Objetivos específicos.....	14
Objetivos secundarios.....	14
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	15
Diseño del estudio .....	15
Pacientes .....	15
<b>Definiciones operacionales</b> .....	17
Tipificación de los alelos de los genes HLA .....	18
Cálculo del tamaño de muestra.....	19
Criterios de inclusión de los pacientes .....	19
Criterios de inclusión de los controles.....	20
Criterios de exclusión .....	20
Criterios de eliminación.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	21
RESULTADOS .....	22
Grupo A .....	22
Grupo B .....	22
Comparación entre grupos.....	23
<b>DISCUSIÓN</b> .....	24
<b>CONCLUSIONES</b> .....	29

## ANTECEDENTES

La enfermedad celiaca (EC), también conocida como enteropatía sensible al gluten, esprue celiaco o esprue no tropical, es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que se caracteriza por daño a la mucosa intestinal y absorción deficiente de nutrientes debido a la ingestión de gluten de la dieta en individuos genéticamente susceptibles (1, 2, 29). Actualmente se le considera la condición inflamatoria crónica más común.

Su incidencia se ha incrementado en forma notoria en los últimos años como consecuencia de la introducción clínica de pruebas serológicas con alta exactitud y mejores criterios para el diagnóstico de la lesión intestinal. Estos avances han llevado a la identificación de enfermos con formas asintomáticas o atípicas, que actualmente representan la mitad de los casos, siendo que antes de 1993 eran menos del 30% (3). Estudios recientes han demostrado que entre 0.5 y 1% de la población norteamericana y europea padece EC; mientras que en Latinoamérica, estudios realizados en Brasil y Argentina han observado una prevalencia de 1:183 individuos y 1:167 (4, 5). En México se han llevado a cabo tres estudios de seroprevalencia. El primero, que incluyó 350 universitarios de la Ciudad de México encontró 0.72% (6), mientras que el segundo, con una población de 1009 donadores de sangre mostró 2.6% (7), aunque cabe resaltar que este estudio sólo evaluó serología positiva para anticuerpos anti-transglutaminasa, pero no antiendomiso ni histología. El tercer estudio, que fue un seguimiento del previo, determinó la presencia de anticuerpos antiendomiso de los sueros que habían sido positivos para anti-transglutaminasa, determinándose una doble positividad en el 0.59% de la muestra, tomándose este valor como equivalente de la presencia de EC (30). Esto indica que la EC, previamente considerada una afección infrecuente en nuestro país,

tiene una prevalencia similar a la descrita en poblaciones norteamericanas y europeas. La prevalencia de enfermedad celiaca no rebasa el 5% en ninguna población (15).

La patogenia de la EC tiene componentes genéticos, ambientales e inmunológicos. Genéticamente se considera una enfermedad poligénica, con participación principal del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA por sus siglas en inglés, antígeno leucocitario humano), así como de otros genes no pertenecientes al HLA, todavía no bien identificados (8). La susceptibilidad genética fue inicialmente sospechada por la alta prevalencia en familiares (5-15%), concordancia en gemelos monocigotos (~75%) y en individuos HLA-idénticos (~30%) (2). Se estima que el HLA constituye sólo el 50% o menos del efecto genético (9), siendo genes no HLA los que explican el resto del riesgo. Algunos de estos genes no HLA que han sido estudiados, sin encontrarse franca predisposición genética son los polimorfismos de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, RANTES y MCP-1 (10). El HLA de clase II está compuesto por los genes HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. En múltiples estudios, sobre todo en Europa, el marcador genético que predomina es el HLA DQ2 (90-95%), codificado por los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02, mientras que la mayoría de los enfermos negativos para este marcador expresan HLA-DQ8, codificado por los alelos DQA1\*03 y DQB1\*0302 (8, 11). Sin embargo, cada vez más estudios han descrito predominio del HLA DQ8 en grupos de Norte y Sudamérica (12, 13, 14, 31).

Como se verá a continuación, es necesaria (aunque no suficiente) la presencia de estos alelos para el desarrollo de enfermedad celiaca y podrían en consecuencia tener una implicación diagnóstica y como método de escrutinio. Se refiere que la presencia de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad, dado que

estos marcadores se encuentran presentes en 25-40% de la población general, y de estos sólo 2 a 3% desarrollaran EC (29). También se tienen datos en población mexicana sobre la frecuencia de las moléculas HLA en la población general. Barquera y cols. describieron la frecuencia de las moléculas HLA clase I y II en 381 individuos no relacionados siendo de 16% para el HLA-DQB1\*02 (DQ2) y 24% para el HLA DRB1\*0302 (DQ8) (16).

Los factores ambientales e inmunológicos consisten en la activación del sistema inmune adaptativo e innato (vía HLA) mediante péptidos derivados del gluten. El endosperma de los granos de trigo contiene entre otras sustancias gliadina y glutenina que dan lugar a la proteína conocida como gluten, el factor ambiental desencadenante de esta enfermedad. Sustancias similares como hordeína en la cebada, secalina en el centeno y probablemente avenina en la avena son también capaces de activar al sistema inmunológico (21). Todas estas proteínas son ricas en prolinas y glutaminas las cuales son incompletamente digeridas por las enzimas digestivas. A grandes rasgos, el mecanismo por el cual se logra la activación del sistema inmune adquirido implica el paso de péptidos derivados del gluten (i.e.  $\alpha$ -gliadina 33-mer) hacia la lámina propia del intestino delgado, sea por vía intercelular o transcelular, siendo esta última vía la más importante debido al aumento en la permeabilidad intestinal dependiente de una proteína llamada “zonulina” que aumenta su liberación ante la presencia de gliadina. Una vez que estos péptidos (gliadinas) se ponen en contacto con la transglutaminasa 2 o transglutaminasa tisular, son tomados por células presentadoras de antígenos para ser presentados a linfocitos CD4 mediante heterodímeros de HLA-DQ2 o HLA-DQ8. La transglutaminasa tisular juega un papel muy importante en la respuesta inmunológica, dado que al deaminar los residuos de glutamina del gluten permite una mayor afinidad

del HLA por estos. La estimulación de las células CD4 deriva en una respuesta Th1, mediada por interferón- $\gamma$  con activación de linfocitos T citotóxicos, macrófagos y células del estroma que dañan la mucosa de manera directa o mediante la liberación de enzimas como metaloproteinasas de la matriz, llevando a pérdida de las vellosidades e hiperplasia epitelial de las criptas. Paralelamente las células CD4 estimulan a los linfocitos B para formar anticuerpos (Ig A e Ig G) contra el gluten y la transglutaminasa tisular (11, 8). Como una vía alterna ocurre la activación del sistema innato por otros péptidos derivados del gluten (i.e.  $\alpha$ -gliadina p31-p49) que estimulan la expresión de interleucina-15, proteínas de choque de calor (*heat shock proteins*), del gen de cadena relacionado al HLA clase I y moléculas E por los enterocitos, que llevan a activación de los linfocitos intraepiteliales (incluyendo células NK) y dañan la mucosa (29).

Actualmente se reconocen varios fenotipos de EC (17, 32):

- 1) ***EC sintomática con presentación clásica (síntomas gastrointestinales):*** presentan síntomas gastrointestinales y secuelas de absorción intestinal deficiente, representa aproximadamente el 50% de los casos. El diagnóstico se establece con estudios serológicos positivos y atrofia de las vellosidades en la biopsia. Existe mejoría clínica con la dieta libre de gluten.
- 2) ***EC sintomática con presentación atípica (síntomas extraintestinales):*** síntomas gastrointestinales ausentes o mínimos, con manifestaciones extraintestinales predominantes, entre los que destacan alteraciones neuropsiquiátricas, neuropatías, hepatitis, osteoporosis y anemia por deficiencia de hierro. El diagnóstico y respuesta al gluten son similares a la forma clásica. Probablemente sea la forma de presentación más común en la actualidad.

- 3) **EC silenciosa:** individuos asintomáticos pero con serología positiva y atrofia de vellosidades demostrada por biopsia. Suele ser diagnosticada al estudiar personas de alto riesgo como son los familiares directos de sujetos con EC.
- 4) **EC potencial:** aquellos individuos con serología positiva pero sin atrofia de las vellosidades. Tienen riesgo de desarrollar síntomas o cambios histológicos durante su evolución.
- 5) **EC refractaria:** Persistencia de síntomas e inflamación intestinal a pesar de la dieta libre de gluten. Esta forma de presentación es poco frecuente pero constituye un reto diagnóstico y terapéutico, además de que representa el principal factor de riesgo para desarrollar linfomas de células T.

En su forma clásica, la EC da lugar a absorción intestinal deficiente total, con grados variables de afección dependiendo de lo extenso del compromiso intestinal, siendo característicamente mayor en los segmentos proximales. Es frecuente la deficiencia de hierro y folatos, y menos común la de B<sub>12</sub>, dado que el íleon terminal no suele verse afectado en esta enfermedad. Las manifestaciones clínicas son resultado de este compromiso en la absorción: astenia, adinamia, diarrea, distensión abdominal y pérdida de peso (aunque cabe señalar que hasta 30% de los pacientes presentan sobrepeso). Algunos sólo manifiestan datos sugerentes de reflujo gastroesofágico o dispepsia (8%), síndrome de intestino irritable (por lo menos 5% tienen criterios de Roma II) y en un porcentaje creciente sólo se identifican manifestaciones extraintestinales como anemia ferropénica (8%), osteoporosis (7%), trastornos neurológicos (neuropatía periférica sensitiva, ataxia cerebelosa, convulsiones), infertilidad, abortos recurrentes, estatura baja, defectos en el esmalte dental, ansiedad, depresión e incluso trastornos psicóticos. La elevación de transaminasas se encuentra hasta en 47% de los enfermos, con niveles



de ALT mayores a AST, que suelen normalizarse después de excluir el gluten de la dieta. Además, en 30% de los pacientes, la EC se asocia con otras enfermedades autoinmunes, prevalencia que aumenta en relación a la duración de la exposición al gluten. Entre las más comunes están la dermatitis herpetiforme (más del 80% de estos sujetos cursa con EC), diabetes mellitus tipo 1 (3-8%), enfermedad tiroidea autoinmune, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjögren, colitis microscópica (10%) y deficiencia de Ig A (2-10%); así como con síndromes genéticos como Turner, Down y Williams (18, 19). En todos estos casos se recomienda la búsqueda intencionada de EC, así como en familiares de primer grado dada la alta prevalencia. También se ha observado mayor frecuencia de algunas neoplasias, especialmente del linfoma de células T asociado a enteropatía (2, 3, 17), pero también de adenocarcinomas de intestino delgado, faringe y esófago (20).

Desde el punto de vista histológico, las alteraciones de la mucosa intestinal en la EC no tratada se caracterizan por aplanamiento de la mucosa con reducción en la altura de las vellosidades e hiperplasia de las criptas, así como infiltración de la lámina propia por linfocitos y células plasmáticas, alteraciones todas inespecíficas. Un hallazgo característico presente inclusive en ausencia de síntomas gastrointestinales es el incremento en el número de linfocitos intraepiteliales, si bien puede observarse también en otras patologías como sobrepoblación bacteriana, alergia nutricional, colitis microscópica con enteropatía y esprue tropical (2, 15, 21, 22).

Tradicionalmente, se utilizan los criterios modificados de Marsh (1999) para clasificar los cambios histológicos observados en la EC (21, 33):

- a) **Tipo 0 (preinfiltrativa):** Se caracteriza por mucosa normal pero existe serología positiva para anticuerpos anti-gliadina.
- b) **Tipo I (infiltrativa):** Mucosa normal, pero con incremento de linfocitos intraepiteliales. Aunque el punto de corte es un tanto arbitrario, se considera cuando existen más de 30-40 linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos.
- c) **Tipo II (hiperplásica):** Además de la linfocitosis intraepitelial existe hiperplasia de las criptas con incremento en el número de mitosis, y radio altura-vellosidad/profundidad-cripta inferior a lo normal (3 a 5).
- d) **Tipo III (destructiva):** Comprende la lesión característica de atrofia de las vellosidades. Se divide en los siguientes subtipos: A) atrofia parcial con radio altura-vellosidad/profundidad-cripta inferior a 1; B) atrofia subtotal, sólo observándose vellosidades aisladas; C) atrofia total, similar a la mucosa colónica.
- e) **Tipo IV (hipoplásica):** Es la etapa terminal de la enfermedad con aplanamiento y atrofia de la mucosa como consecuencia de daño irreversible por inflamación crónica. Existen depósitos de colágena en la mucosa y submucosa. Se asocia a EC refractaria y al desarrollo ulterior de linfoma de células T asociado a enteropatía.

El diagnóstico de la EC requiere una alta sospecha clínica y que el médico tenga presente todo el espectro clínico de la enfermedad, especialmente si se toma en cuenta la alta prevalencia de formas atípicas. No existe una sola prueba que permita establecer el diagnóstico, por tanto deben tomarse en cuenta varios criterios, incluyendo las manifestaciones clínicas (diarrea y malabsorción), la serología y el estudio histopatológico. Estos tres parámetros permitirán clasificar a la EC de acuerdo a los tipos previamente descritos (clásica, con síntomas atípicos, silenciosa, latente). Pero incluso con esta evaluación no es infrecuente que exista duda sobre el diagnóstico y se

justifique un ensayo terapéutico con una dieta libre de gluten, sin embargo, para complicar aun más la evaluación, muchos pacientes con diarrea crónica de otra etiología, incluyendo síndrome de colon irritable responden a una dieta libre de gluten.

Los estudios serológicos iniciales se basaban en la medición de anticuerpos dirigidos contra la gliadina (fracción proteica del gluten). Actualmente esta prueba no se considera apropiada, ya que aunque con buena sensibilidad, su especificidad es limitada, por lo que se utilizan otras con mayor sensibilidad y especificidad que identifican anticuerpos Ig A contra la transglutaminasa tisular (TGt), ya sea en forma directa mediante técnica de ELISA (anticuerpos anti-transglutaminasa) o indirecta a través de inmunofluorescencia (anticuerpos antiendomiso, los cuales también están dirigidos contra la transglutaminasa). Es importante mencionar que para que la determinación de estos anticuerpos sea válida, el paciente debe llevar una dieta sin restricción de gluten, de lo contrario deberá considerarse realizar un reto con gluten por 2 a 4 semanas previo a la determinación de estos marcadores de autoinmunidad. Está demostrado que los anticuerpos antiendomiso tipo Ig A en adultos tienen especificidad cercana al 100% y sensibilidad también alta (90-96%). En el caso de los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular tipo Ig A, las cifras correspondientes son 95-99 y 90-98% respectivamente. Sin embargo, hay que considerar que los pacientes con formas leves de la enfermedad (tipos I y II de Marsh), la sensibilidad llega a ser menor a 90% para ambos anticuerpos, además de que después de aproximadamente 3-6 meses de apego a la dieta la prueba puede resultar negativa en gran parte de los enfermos. Por otra parte, como ya se mencionó, 2-10% de los enfermos presentan deficiencia de Ig A, por lo que en casos de sospecha alta y anticuerpos Ig A negativos, deben medirse los anticuerpos clase Ig G, que aunque tienen baja sensibilidad, conservan especificidad muy altas (23).

Actualmente se cuenta con anticuerpos dirigidos contra péptidos de gliadina deaminados (anticuerpos antigliadina deaminada), los cuales tienen sensibilidad y especificidad muy similares a los anticuerpos anti-transglutamisa, por lo que la clase Ig G de estos anticuerpos se considera el estudio diagnóstico de primera línea en pacientes con deficiencia de Ig A (24, 29). El uso de inmunosupresores es otra causa de falsos negativos para serología.

Las características operacionales imperfectas de los anticuerpos para el diagnóstico de EC, así como la falta de especificidad de los hallazgos histopatológicos, han creado la necesidad de contar con otros marcadores, sobre todo en casos de diagnóstico incierto. En consecuencia, la expresión prácticamente indispensable de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 ha abierto la posibilidad de contar con otra herramienta de diagnóstico para que si estos marcadores no están presentes, pueda descartarse el diagnóstico en aquéllos casos equívocos, por ejemplo atrofia de vellosidades con serología negativa (discrepancia entre serología e histología) y/o en personas que ya siguen dieta libre de gluten y rehúsan hacerse una prueba de reto (35, 36).

En un estudio reciente realizado en niños con diagnóstico histopatológico de EC, pudo observarse que en 36 casos con anticuerpos antiendomiso y anti-TGt positivos todos expresaron HLA-DQ2 o HLA-DQ8; mientras que en 35 sin estos anticuerpos el 56% tuvo positividad para HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Además, en 15 no se detectó alguno de estos alelos y pudieron recibir una dieta con gluten sin recidiva de manifestaciones clínicas. Esto sugiere que en pacientes con diagnóstico histopatológico y anticuerpos antiendomiso no es necesaria la confirmación genética, mientras que en los pacientes

que no expresen HLA-DQ2 o HLA-DQ8 puede excluirse el diagnóstico de EC con un valor predictivo negativo de 100% (25).

Otra utilidad demostrada del diagnóstico genético en EC deriva del escrutinio de familiares directos con la intención de evaluar el riesgo de padecer la enfermedad ante la presencia de alguno de los alelos implicados. Esto fue demostrado recientemente en un estudio finlandés, en el cual se incluyeron 382 familiares de primer grado de 54 sujetos con EC (y por tanto 54 familias). Los autores encontraron 136 (35%) familiares con criterios para EC, todos excepto uno tenía alguno de los HLA de riesgo, a saber, HLA-DQA1\*0501, DQB1\*0201 y DRB1\*04 (este último relacionado estrechamente con el DQB1\*0302). De los 245 sujetos sin EC, nadie tenía estos alelos. La conclusión fue que la genotificación de los alelos HLA evitaría la realización de estudios invasivos (endoscopia) y de mayor escrutinio a personas sin expresión de los alelos de riesgo, dejando la evaluación más detallada para aquellos familiares positivos a estos marcadores (26). Rubio-Tapia y cols. en la clínica Mayo también estudiaron predictores de riesgo familiar para EC, incluyendo los alelos HLA. Encontraron que el tener estos marcadores genéticos, sobretodo en hermanos de afectados, confería un alto riesgo de padecer EC, dado que todos ellos expresaban alguno de los HLA mencionados, sugiriendo así la necesidad de una evaluación más completa e invasiva en estos pacientes (27).

Por otro lado, se ha sugerido que la gravedad de la enfermedad, así como la ocurrencia de patología autoinmune asociada, están también relacionadas a la presencia y dosis (homocigoto o heterocigoto) de los diferentes alelos HLA como se comentará más adelante. Esto tiene un alto sentido lógico ya que sabemos que la reactividad de

linfocitos T así como el proceso inflamatorio consecuente dependen de la presencia de los alelos clase II. Jonson y cols. evaluaron la relación del HLA con la gravedad de la EC en una cohorte de pacientes de Nueva York, bajo la justificación de tener diferente comportamiento genético (alta prevalencia de DQ8) y enfermedad en general más leve comparado con pacientes europeos, sin que encontraran diferencias (14). En el caso de patología autoinmune asociada, se sabe por ejemplo, que la EC y la DM tipo 1 comparten los mismos alelos HLA de predisposición genética (28, 31).

## **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La EC constituye una enfermedad que ofrece un reto diagnóstico y su frecuencia es suficientemente elevada (0.5-0.7% en México) para justificar un estudio de prueba diagnóstica. La sintomatología, serología e histología en muchos casos no es concluyente e incluso puede ocasionar confusión. Por otro lado, el tratamiento (exclusión total del gluten en la dieta) tiene implicaciones sociales y económicas importantes por lo que resulta obligatorio tener un sustento suficientemente sólido al indicar una dieta de estas características. Dicho esto, resulta indispensable contar con un método diagnóstico más preciso e idealmente económico y poco invasivo.

La evaluación de los marcadores genéticos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 podría constituir una herramienta útil en la práctica clínica para el diagnóstico diferencial de esta enfermedad, sobre todo en los casos de duda diagnóstica. Por otro lado, se conoce poco sobre predictores de complicaciones, de curso clínico y de riesgo de aparición de otras enfermedades autoinmunes en pacientes con EC, así resulta interesante evaluar como candidato a los alelos HLA, sobre todo dado las diferencias genéticas encontradas entre diferentes poblaciones, así como la heterogeneidad de las manifestaciones y gravedad de la enfermedad.

Así mismo, debido a las implicaciones que tiene la enfermedad no tratada (deficiencias nutricionales, riesgo de complicaciones, mayor mortalidad a largo plazo), es muy importante contar con un método de escrutinio en individuos de alto riesgo, como lo son familiares de afectados, y así dirigir la necesidad de mayor evaluación (endoscopia y biopsia), por lo que un marcador de fácil determinación, no invasivo y con alto valor predictivo negativo como son las moléculas HLA sería de gran utilidad en este campo.

Como ya se mencionó, aunque existen datos preliminares en México, la utilidad de los resultados es limitada, requiriéndose un estudio mejor diseñado que nos de a conocer la prevalencia real de estos marcadores genéticos y por tanto su utilidad clínica, tanto desde el punto de vista de prueba diagnóstica como de marcadores de asociación con diferentes características de la enfermedad, incluyendo tipo de presentación clínica, gravedad, enfermedades asociadas y complicaciones.

## **HIPÓTESIS**

Las moléculas HLA clase II en pacientes con sospecha de EC tienen utilidad clínica al permitir identificar la asociación de cada alelo con el riesgo de padecer esta enfermedad. Se postula que la asociación será con el HLA DQ8 será mayor, o al menos igual que con el HLA DQ2.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar si existe asociación entre la presencia de los diferentes alelos HLA Clase II y el riesgo de padecer EC en población mexicana con sospecha de esta enfermedad

### **Objetivos específicos**

- Determinar si existe asociación del alelo HLA DQ2 con EC en cualquiera de sus presentaciones, en términos de razón de momios, sensibilidad, especificidad y valores predictivos
- Determinar si existe asociación del alelo HLA DQ8 con EC en cualquiera de sus presentaciones
- Determinar si existe asociación de diferentes haplotipos y/o cadenas alfa con EC

### **Objetivos secundarios**

- Conocer la prevalencia de los alelos HLA DQ2 y HLA DQ8 en población mexicana con diagnóstico confirmado de EC.
- Buscar si existe asociación de los diferentes alelos con características de la EC, a decir, gravedad de la enfermedad, forma de presentación, complicaciones y presencia de enfermedades asociadas.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Diseño del estudio**

Se trata de un estudio de asociación (transversal), con diseño de casos y controles donde la exposición será el HLA. La generación y recolección de los datos se hará de forma prolectiva. Habrá cegamiento de los investigadores para la variable principal a estudiar (HLA). Se someterá a aprobación por el comité de ética y estudios en humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

### **Pacientes**

Se incluirán pacientes de consulta externa y hospitalización del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán con diagnóstico reciente o nuevo, confirmado o presuntivo, de EC en cualquiera de sus presentaciones clínicas (clásica o atípica) a quienes se les realizará determinación de los alelos HLA clase II.

Se realizarán las siguientes evaluaciones y mediciones:

1. **Antropometría:** Talla y peso, obtención del IMC
2. **Bioquímica**, incluyendo estudios de absorción intestinal deficiente: biometría hemática, glucosa en ayuno, AST y ALT, albúmina, TSH, inmunoglobulinas, carotenos, niveles de vitamina B12, ácido fólico, hierro, ferritina y vitamina D, y prueba de D-Xilosa.
3. **Anticuerpos:**
  - a. Antiendomisio (AEM) Ig A, anti-transglutaminasa tisular (ATG) Ig A, antigliadinas deaminadas (AGD) Ig A, niveles totales de Ig A
  - b. En caso de deficiencia de Ig A, se medirán los subtipos Ig G de los anticuerpos mencionados en el inciso anterior

- c. Antitiroideos (antiperoxidasa) en caso de hipotiroidismo
  - d. Anti-insulina y anti-islotos en caso de diabetes
  - e. Anti-Ro (SSA) y anti-La (SSB) si se sospecha síndrome de Sjögren
  - f. Antinucleares y antimitocondriales en caso de alteración de las pruebas de función hepática.
4. **Estudio endoscópico:** Esofagogastroduodenoscopia incluyendo toma de biopsias de duodeno, así como aspirado de líquido duodenal. En caso de diarrea crónica se realizará también colonoscopia con toma de biopsias.
5. **Gabinete:** Densitometría ósea de dos regiones (cadera y columna). En los casos en los que exista sospecha de enfermedad pancreática se realizará tomografía de páncreas o US endoscópico.
6. Evaluación por **Psiquiatría** en busca de depresión y ansiedad.
7. Evaluación por **Dermatología** en caso de lesiones cutáneas con toma de biopsia si existe sospecha de dermatitis herpetiforme.

Los pacientes serán entonces clasificados en dos grupos: celíacos y no celíacos en base a los criterios mencionados abajo. Se determinará si la enfermedad es grave o no, y la forma de presentación. Idealmente, tratará de incluirse un control (paciente no celíaco) que se haya evaluado por manifestaciones similares a la de los pacientes con EC.

## **Definiciones operacionales**

**EC DEFINITIVA (CASOS).** Presencia de al menos 2 de los siguientes anticuerpos: anti-transglutaminasa Ig A, antiendomiso Ig A o antigliadina deaminada Ig A con niveles totales de Ig A normales, más una de las siguientes:

- a. Cuadro clínico típico (diarrea crónica con o sin datos de absorción intestinal deficiente).
- b. Biopsia compatible (ver definición más adelante).

### **NOTAS:**

1. En los pacientes con deficiencia de Ig A, se medirán también los anticuerpos subtipos Ig G.
2. En pacientes catalogados como celíacos, sin anticuerpos adecuados, y sometidos a dieta sin gluten se valorará la posibilidad de someterlos a un reto con gluten ingiriendo 2 rebanadas de pan blanco, o equivalente, diario durante 2 semanas.
3. La respuesta a la dieta sin gluten no será criterio diagnóstico.

**EC GRAVE.** Se catalogará como grave a los pacientes con pérdida de peso mayor al 10% en 6 meses o menos, o que hayan requerido hospitalización por desequilibrio hidroelectrolítico.

**EC CON PRESENTACION TIPICA.** EC con diarrea crónica (> 4 semanas) con o sin datos de síndrome de absorción intestinal deficiente (SAID).

**EC CON PRESENTACION ATIPICA.** Pacientes que se presenten con anemia por deficiencia de hierro, osteoporosis, alteraciones de las pruebas de función hepática u otra que no incluya síntomas gastrointestinales.

**EC SILENTE.** Pacientes asintomáticos, que debido a escrutinio por cualquier razón hayan resultado con anticuerpos ATG, AEM o AGD positivos y que tengan biopsia compatible.

**BIOSPIA COMPATIBLE.** Presencia de las características típicas: hiperplasia de las criptas, atrofia de vellosidades intestinales y linfocitosis intraepitelial (más de 30-40 por cada 100 enterocitos) en biopsia de duodeno reportadas en base a la clasificación de Marsh. Un solo patólogo revisará las biopsias.

**COMPLICACIONES.** Se evaluará la presencia de SAID, osteoporosis, depresión y ansiedad con criterios estándar. La presencia de linfoma de células T asociado a enteropatía será en base a criterios histológicos.

**SAID.** Presencia de hipocarotenemia o esteatorrea más alguna otra deficiencia documentada: hierro, vitamina B12, ácido fólico, vitamina D o D-Xilosa baja.

#### **Tipificación de los alelos de los genes HLA**

Se tomarán muestras de sangre periférica que se colocarán en tubos con 10 U/ml de heparina líquida libre de conservadores para la determinación de HLA. La extracción del DNA se realizará en linfocitos de sangre periférica con técnicas estándar. La tipificación de antígenos HLA tipo II, DR y DQ se hará por medio de PCR-SSOP (Polymerase Chain Reaction—Sequence-Specific Oligonucleotide Probe) de alta resolución, lo que significa que se determinarán con sondas específicas las diferentes variantes del DQ3 para poderlo subclasificar en sus componentes, DQ 7, 8 y 9.

La determinación de los HLA se realizará en el departamento de Inmunología, los investigadores desconocerán en todo momento el diagnóstico definitivo de los pacientes.

### **Cálculo del tamaño de muestra**

Utilizando como datos de referencia los resultados obtenidos en el estudio preliminar, tomando en cuenta el alelo que si se asoció a enfermedad celiaca, el DQ3 (interpretado como DQ8) y su frecuencia en población general mexicana, se tiene que para una alfa de 0.05% y un poder del 80%, utilizándose la fórmula de cálculo de tamaño de muestra para 2 proporciones (P1 haplotipo DR4/DQ3 en EC, que la mayoría deben ser DQ8 60%; P2 mismo haplotipo en población general 20%) el número de pacientes necesarios por grupo (celiacos y no celiacos) es de 22. Este cálculo resulta válido sólo para pacientes con síntomas típicos, sin embargo se incluirán pacientes con EC y síntomas extraintestinales tratando de extrapolar los datos. Al final los resultados se analizarán como grupo total y como subgrupos en base a la presentación clínica.

### **Criterios de inclusión de los pacientes**

1. Edad entre 18 y 70 años
2. De ascendencia mexicana (al menos 2 generaciones)
3. Diagnóstico de EC como se mencionó arriba
4. Que tengan determinación de anticuerpos AEM, ATG y AGD
5. Que cuenten con biopsia de intestino delgado tomada por vía endoscópica
6. Aceptación y firma del consentimiento informado

### **Criterios de inclusión de los controles**

1. Edad entre 18 y 70 años
2. De ascendencia mexicana (al menos 2 generaciones)
3. Exclusión del diagnóstico de EC en base a serología negativa, pueden tener biopsia duodenal anormal (no se requerirá un diagnóstico de certeza para estos pacientes, únicamente que se haya descartado EC). Estos pacientes serán aquellos evaluados en busca de enfermedad celiaca por cualquier indicación.
4. Que tengan determinación de anticuerpos AEM, ATG y AGD
5. Aceptación y firma del consentimiento informado

### **Criterios de exclusión**

- No hay. Al ser un estudio de prueba diagnóstica genética, no existen contraindicaciones de ninguna índole ni situaciones que puedan alterar los resultados

### **Criterios de eliminación**

1. Imposibilidad para clasificar a los enfermos como celíacos o no celíacos
2. Incapacidad para obtener la información sobre los HLA

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentarán como medidas de tendencia central y dispersión para datos dimensionales (media o mediana y desviación estándar o rango intercuartilar dependiendo se es distribución normal o no normal) y como frecuencias para datos categóricos.

Se determinará la prevalencia de los diferentes alelos HLA clase II y se realizarán tablas de 2x2 para comparar las frecuencias de los diferentes alelos HLA (DQ2 y DQ8) y de los haplotipos DR4/DQ8 y DR3/DQ2 en pacientes con y sin enfermedad celiaca. De la misma manera, se comparará el riesgo entre homocigotos, heterocigotos y pacientes que porten ambos alelos de riesgo. Se utilizará la prueba de  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher para el análisis estadístico y se calcularán las razones de momios y sus intervalos de confianza al 95%. Así mismo, se obtendrán los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para cada uno de los diferentes alelos y haplotipos, también con sus intervalos de confianza.

Posteriormente, de ser posible por número de pacientes, se hará un subanálisis dividiendo a los pacientes con EC en sus formas clásica y atípica en búsqueda de asociación con los diferentes alelos HLA. De la misma forma, se buscará asociación con otras características de la EC como se ha mencionado.



## RESULTADOS

Se muestran los datos obtenidos en el estudio inicial (ya publicado, referencia 34) ya que por razones ajenas al protocolo no se pudo realizar la genotipificación de los alelos HLA por medio de PCR-SSOP como estaba planeado.

De los 60 pacientes estudiados se incluyeron en el análisis final 49 debido a que en 11 no fue posible establecer un diagnóstico de certeza. Treinta y ocho fueron mujeres (78%). La edad media fue de  $53 \pm 14.5$  años y el IMC de  $21 \pm 4.6$ . En 27 (61%) de 44 casos se logró establecer el diagnóstico de absorción intestinal deficiente. Se encontró HLA-DQ2 en 27 enfermos (55%), 5 de los cuales (20%) fueron homocigotos y HLA-DQ3 (DQ7 y DQ8) en 31 de ellos (63%). Cuarenta y seis (94%) sujetos presentaron al menos uno de estos alelos.

### **Grupo A**

Se estableció el diagnóstico de EC 30 pacientes (61%), 23 fueron mujeres (77%). La edad media fue  $54.2 \pm 15.5$  años y el IMC de  $20.8 \pm 5$ . Veinticuatro (80%) expresaron el alelo DQ3, mientras que sólo en 15 (50%) se encontró el alelo DQ2. Once expresaron ambos (37%) y dos ninguno. El 72% de los individuos presentó datos de absorción intestinal deficiente.

### **Grupo B**

Este grupo consistió de 19 sujetos en los cuales no se encontraron datos que sustentaran el diagnóstico de EC, 15 fueron mujeres (79%), la edad media fue de  $50.7 \pm 12.5$  y el IMC de  $21.2 \pm 4.1$ . Doce tuvieron el alelo DQ2 (63.2%) y siete el DQ3 (36.8%), sólo un paciente (5%) presentó ambos alelos. Se demostró absorción intestinal deficiente sólo en 40% de los sujetos.

### **Comparación entre grupos**

No se encontraron diferencias estadísticas respecto a la presencia del alelo DQ2 (50% vs 63%,  $p=0.37$ ), pero si con el DQ3 (80% vs 37%,  $p=0.002$ ). La RM para el DQ2 fue por tanto no significativa (0.58, IC 95% 0.18-1.89) y para el DQ3 (DQ7/DQ8) fue de 6.9 (IC 95% 1.9-25). La sensibilidad y especificidad para DQ2 fue de 50% y 37%, y para DQ3 de 80% y 63% respectivamente. La asociación con el alelo DQ3 persistió al comparar la presencia del haplotipo DR4/DQ3 (virtualmente DQ8 todos), siendo su frecuencia en el grupo A de 60% y en el grupo B de 26.3% ( $p=0.021$ ) con una RM de 4.2 (IC 95% 1.2-14.7). La presencia de ambos alelos (DQ2 y DQ3) también mostró diferencia significativa a favor de EC (37% vs 5%,  $p=0.013$ ) con una RM de 10.4 (IC 95% 1.2-89) (tabla 2). La sensibilidad, especificidad y VPP para diagnóstico de EC con esta combinación fue de 37%, 95% y 92% respectivamente.

## DISCUSIÓN

Como se ha mencionado, la presencia de los alelos HLA DQ8 y/o DQ2, codificado por los alelos A1\*05 / B1\*02 y A1\*03 / B1\*0302 respectivamente, se considera necesario pero no suficiente para el desarrollo de la EC. En ese sentido se han realizado múltiples estudios que confirman la utilidad de la genotipificación en esta enfermedad, y varios de ellos han mostrado datos interesantes respecto a la prevalencia de los diferentes alelos.

En Chile, Pérez-Bravo, Araya y cols. evaluaron a 62 niños con EC, encontrando una frecuencia para el HLA DQ2 de 48% vs 16% en controles sanos, y para DQ8 de 43% vs 24%, siendo la combinación de ambos alelos lo que otorgaba el mayor riesgo. El aumento en la frecuencia de DQ8 lo atribuyen en parte a la alta prevalencia del alelo DR4 observada en grupos amerindios de este país (Mapuches), el cual se encuentra en desequilibrio genético con el DQ8, es decir, con una asociación haplotípica mayor a la esperada, conocida como haplotipo extendido (12, 13).

Johnson y cols. estudiaron una cohorte de enfermos celíacos de la ciudad de Nueva York y los compararon con otra cohorte de Paris. De los 44 pacientes de NY, 59% eran portadores del HLA DQ2 (vs 79% de la cohorte de Paris) y 41% presentaban DQ8 (comparado con 21% de los franceses). Es importante señalar que la mayoría de sus enfermos eran de ascendencia europea. No hubo diferencias entre grupos étnicos (14).

Mejía-León y cols. en Sonora México, una población con mestizaje muy particular con alto linaje europeo y bajo componente amerindio, evaluaron el gradiente de riesgo genético HLA-DQ para diabetes autoinmune (tipo 1) y enfermedad celíaca, para lo que estudiaron una población de casi 400 recién nacidos y 25 casos de EC. De manera muy

interesante encontraron que la relación de alelos HLA DQ2 a DQ8 en la población estudiada fue de 1.2:1 (16.1 y 13.6% respectivamente). Al evaluar las frecuencias alélicas, encontraron una baja prevalencia del alelo DQB1\*0302 (la cadena beta del HLA DQ8), contrastado con lo encontrado en otras poblaciones mestizas de Latinoamérica y más parecido a lo que sucede en Europa. Hablando específicamente de los pacientes con EC, las frecuencias alélicas de las cadenas beta del DQ2 y DQ8 fueron exactamente el doble de las de la población general de recién nacidos, manteniendo una relación DQ2 / DQ8 de 1.2:1, de nuevo contrastando con lo encontrado en poblaciones europeas donde esta misma relación es 9:1 (a favor del DQ2). Este hallazgo se confirmó al observarse que la presencia del DQ8 sólo o en combinación, representó el riesgo más alto (expresado como razón de momios) para desarrollar EC (31).

En un estudio reciente de un grupo de Madrid encabezado por Vegas-Sánchez, evaluaron el valor predictivo de la determinación del HLA-DQ para el diagnóstico de EC en pacientes mayores de 50 años con datos clínicos sugerentes de EC, de forma muy interesante el 87% de los mayores de 50 años tenían alguno de los dos alelos de riesgo DQ8 o DQ2.5, y de ellos el 23% eran celíacos diagnosticados por biopsia y serología. También encontraron un paciente con EC negativo para los 2 alelos. El VPP fue de 29% y el VPN del 93%, lo cual no es diferente a otros reportes de la literatura y depende como es sabido, de la prevalencia de la enfermedad (37).

Otro estudio realizado en varios países de Europa, además de Estados Unidos, evaluó el riesgo de desarrollar EC en niños de hasta 5 años de edad, en base a la presencia de determinados haplotipos HLA, donde el HLA DR3 se hereda en bloque con el DQ2, y a su vez el DR4 con el DQ8, debido a un fenómeno genético conocido como desequilibrio

de ligamiento. Encontraron que la frecuencia de EC en portadores del haplotipo DR3/DQ2 fue del 3% para los heterocigotos y del 11% para los homocigotos, triplicando el riesgo por el efecto de “dosis alélica”. En este estudio, el haplotipo DR4/DQ8 fue el de menor riesgo para EC (38).

Por otra parte, la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, en sus últimas guías para el diagnóstico de EC, acepta que la presencia de anticuerpos anti-transglutaminasa a títulos altos, junto con anticuerpos antiendomiso, HLA DQ2 o DQ8 y síntomas sugerentes, confirman el diagnóstico de EC sin necesidad de contar con una biopsia de intestino (39).

También se ha demostrado que el tipo de alelo HLA correlaciona con la gravedad de la EC. En el estudio de Zamani y cols, donde determinaron la cadena beta del HLA DQ en pacientes iraníes con EC, observaron que el alelo DQB1\*02:01 se asoció a mayor gravedad de la enfermedad y a mayor atrofia comparado con aquellos portadores del alelo DQB1\*03:02 (40). Otro estudio italiano de Biagi y cols, documentó que los pacientes con EC potencial tenían mayor frecuencia de la cadena beta del DQ8 y menor de la correspondiente al DQ2 en contraste con EC complicada (41).

Finalmente, se ha observado que la utilidad de la genotipificación depende de la indicación clínica. En el estudio de Pallay y cols, se observó que el mayor el rendimiento diagnóstico de la determinación de los alelos HLA fue en pacientes con linfocitosis intraepitelial aislada o asociada a serología negativa (58-60%), y la menor utilidad fue en pacientes con anticuerpos positivos y atrofia de vellosidades, por lo que en este último grupo en particular, no estaría indicada la prueba genética. En el caso de

familiares de pacientes con EC el rendimiento fue del 20% (42).

En México, un estudio reciente recientemente publicado por nuestro grupo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, y en el que se basa esta discusión y las consiguientes conclusiones debido a lo arriba comentado, encontró una mayor frecuencia del alelo DQ8 sobre el DQ2 en una población de 30 celíacos (80 vs 50%), siendo de valor diagnóstico sólo el DQ8 con un RR de 6.9 (IC 95% 1.9-25), sin embargo este estudio presenta varias deficiencias. Una de las más importantes fue la imposibilidad de contar con determinación de HLA de alta resolución, por lo que sólo fue posible obtener el antígeno genérico DQ3, el cual incluye a los subtipos DQ7, 8 y 9 sin conocer exactamente la proporción de cada uno. La otra limitante resultó de la dificultad de clasificar clínicamente a los pacientes como portadores de EC debido a que al ser un estudio transversal hubo diferencias importantes en cuanto al tipo y calidad de los anticuerpos realizados, muchos de los pacientes incluso habían sido diagnosticados en base a criterios de respuesta a dieta y a anticuerpos que en la actualidad ya no se utilizan por su baja sensibilidad (ac. anti gliadina). En estos sujetos no fue posible contar con una nueva determinación debido a que se encontraban bajo un régimen dietético sin gluten lo cual puede negativizar la respuesta de anticuerpos. Además se encontraron descripciones histológicas incompletas y datos faltantes o no bien documentados en los expedientes respecto a manifestaciones clínicas, complicaciones y enfermedades asociadas. Por estas razones, los resultados deben tomarse con cautela y únicamente como datos preliminares (34).

Por todo lo antes mencionado, es evidente que la utilidad clínica de determinar los alelos HLA es amplia e incluye los siguientes:

- a. Descartar EC como causa de atrofia vellositaria en caso de discrepancia serología-histología.
- b. Descartar EC en personas con diagnóstico incierto que ya siguen una dieta libre de gluten y no desean realizar una prueba de reto, en quienes la serología pierde utilidad.
- c. Descartar el riesgo de padecer EC y, por tanto la necesidad de realizar estudios adicionales de escrutinio en personas con alto riesgo, como los familiares de primer grado de enfermos celíacos o pacientes con otras enfermedades autoinmunes, donde además cantidad de copias que se porten (1 o 2) modificará el riesgo por el efecto de dosis.

Es importante mencionar que en cualquiera de estos escenarios clínicos, y debido al alto valor predictivo negativo de la prueba genética (>98%), sólo la ausencia de los alelos de riesgo permite descartar la EC como causa de los síntomas. Por otro lado, en caso de que la prueba detecte alguno de los 2 alelos DQ2 o DQ8, siempre se requerirán otros elementos de diagnóstico para confirmar la enfermedad, principalmente la determinación seriada de anticuerpos específicos.

Además de la posibilidad de descartar EC, la determinación de estos alelos también permite:

- a. Conocer el riesgo de padecer otras enfermedades genéticas, por ejemplo DM1, con la cual comparte los mismos haplotipos en >90% de los casos
- b. Conocer el pronóstico de la EC en cuanto a gravedad, reconociendo que debido a su mayor afinidad a los péptidos de gluten inmunogénicos, el HLA DQ2 se

asocia a mayor gravedad.

- c. Hacer el diagnóstico de EC en niños, junto a otros criterios bien establecidos, sin necesidad de realizar biopsia intestinal.

## **CONCLUSIONES**

En conclusión, la tipificación de los alelos HLA clase II, mediante técnicas avanzadas (PCR de alta resolución) que nos permitan conocer los diferentes haplotipos HLA DR y DQ, incluyendo sus cadenas alfa y beta, es de utilidad clínica demostrada en ciertas situaciones de incertidumbre diagnóstica o bien en el escrutinio de paciente con riesgo elevado de presentar EC. Además, en base a nuestro estudio previo, y otros datos obtenidos de estudios en poblaciones mestizas y amerindias, la presencia del HLA DQ8 confiere mayor riesgo de EC comparado con otras poblaciones, y muy similar el del alelo DQ2, debido a su mayor prevalencia en población general.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Kagnoff MF. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128: S10-8.
2. Chand N, Mihas AA. Celiac disease. Current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:3-14.
3. Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology* 2005; 128: S74-8.
4. Gomez JC, Selvaggio G, Viola M, et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of a general adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2700-2704.
5. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, et al. Prevalence of celiac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 747-50.
6. Valcarce-Leon JC, Santiago-Lomeli M, Schmulson M, et al. Seroprevalence of IgA antibodies to tissue transglutaminase in a university-based population study in Mexico City. *Am J Gastroenterol* 2005; 100 (Suppl 7): S96.
7. Remes-Troche JM, Ramírez-Iglesias MT, Rubio-Tapia A, et al. Celiac disease could be a frequent disease in Mexico: prevalence of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 697-700.
8. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3(9): 516-25.
9. Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, et al. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest* 2006; 116(8): 2226-36.

10. Rueda B, Zhernakova A, López-Nevot MA et al. Association study of functional genetic variants of innate immunity related genes in celiac disease. *BMC Medical Genetics* 2005, 6: 29.
11. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(3): 408-16.
12. Araya M, Mondragón A, Pérez-Bravo F et al. Celiac disease in a Chilean population carrying Amerindian traits. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31(4): 381-6.
13. Pérez-Bravo F, Araya M, Mondragón A et al. Genetic differences in HLA-DQA1\* and DQB1\* allelic distributions between celiac and control children in Santiago, Chile. *Hum Immunol* 1999; 60(3): 262-267.
14. Johnson TC, Diamond B, Fasano A, et al. Relationship of HLA-DQ8 and severity of celiac disease: comparison of New York and Parisian cohorts. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2(10): 888-94.
15. Rodrigo L. Celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(41): 6585-93.
16. Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol* 2008; 45(4): 1171-8.
17. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Celiac Disease, June 28-30, 2004. Introduction. *Gastroenterology* 2005; 128: S1-9.
18. Remes-Troche JM, Rios-Vaca A, Ramírez-Iglesias MT, et al. High prevalence of celiac disease in Mexican Mestizo adults with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42(5): 460-5.
19. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, et al. Detection of Celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(7): 1454-60.

20. Catassi C, Bearzi I, Holmes GK. Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology* 2005; 128(4 Suppl 1): S79-86.
21. Dewar DH, Ciclitira PJ. Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128: S19-24.
22. Remes-Troche JM, Adames K, Castillo-Rodal AI, et al. Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes: a comparative study between celiac disease, small intestinal bacterial overgrowth, and irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41(7): 671-6.
23. Hill ID. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology* 2005; 128: S25-32.
24. Setty M, Hormaza L, Guandalini S. Celiac Disease: risk assessment, diagnosis, and monitoring. *Mol Diagn Ther.* 2008; 12(5): 289-98.
25. Kapitany A, Toth L, Tumpek J, et al. Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous celiac disease diagnosis based on histology alone. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1395-402.
26. Karinen H, Karkkainen P, Pihlajamaki J, et al. HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for celiac disease in the 1<sup>st</sup>-degree relatives of patients with celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1299-304.
27. Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Lahr BD et al. Predictors of Family Risk for Celiac Disease: A Population-Based Study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6(9): 983-7.
28. Barker J. Type 1 Diabetes-Associated Autoimmunity: Natural History, Genetic Associations, and Screening *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(4): 1210–17.
29. Leonard M, Sapone A, Catassi C, et al. Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity A Review. *JAMA.* 2017; 318(7): 647-656.

30. Remes-Troche JM, Nuñez-Alvares C, Uscanga-Dominguez LF. Celiac disease in Mexican population: an update. *Am J Gastroenterol*. 2013; 108(2): 283-4.
31. Mejía-León ME, Ruiz-Dyck KM, Calderón de la Barca AM. HLA-DQ genetic risk gradient for type 1 diabetes and celiac disease in northwestern Mexico. *Rev Gastroenterol Mex* 2015; 80(2): 135-43.
32. Remes-Troche JM, Uscanga-Domínguez LF, Aceves-Tavares RG, et al. Clinical guidelines on the diagnosis and treatment of celiac disease in Mexico. *Rev Gastroenterol Mex* 2018; 83(4): 434-450.
33. Bao F1, Green PH, Bhagat G. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136:735-745.
34. Cerda-Contreras E, Ramírez-Cervantes KL, Granados J, Is celiac disease better identified through HLA-DQ8 than through HLA-DQ2 in Mexican subjects? *Rev Gastroenterol Mex* 2018; 83(4): 410-413.
35. Leonard MM, Serena G, Sturgeon C, et al. Genetics and celiac disease: The importance of screening. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9: 209-15.
36. Hadithi M, von Blomberg BM, Crusius JB, et al. Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med*. 2007; 147: 294-302.
37. Vegas-Sánchez MC, Calabia-González O, Llorente-Jiménez P, et al. Valor predictivo y utilidad clínica del genotipado HLA-DQ en el diagnóstico de la enfermedad celiaca en mayores de 50 años. *Revista del Laboratorio Clínico* 2015; 8(3): 131-137.
38. Lui E, Lee HS, Aronsson CA, et al. Risk of Pediatric Celiac Disease According to HLA Haplotype and Country. *N Engl J Med* 2014; 371:42-49.

39. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Korponay Szabó IR, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54: 136-60.
40. M. Zamani, M. Modares-Sadegi, F. Shirvani, et al. The involvement of the HLA-DQB1 alleles in the risk and the severity of Iranian coeliac disease patients. *Int J Immunogenet* 2014; 41: 312-317.
41. Biagi F, Bianchi PI, Vattiato C, et al. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on severity in celiac Disease. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46(1): 46-50.
42. Pallav K, Kabbani T, Tariq S, et al. Clinical utility of celiac disease associated HLA testing. *Dig Dis Sci* 2014; 59(9): 2199-206.