

**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo A. C.**

**HAPLOTIPOS HLA-DQ2 Y DQ8 EN NIÑOS SONORENSES  
CON POSIBILIDAD DE ENFERMEDAD CELIACA**

**POR:**

**OSCAR TRINIDAD GALVÁN VALENCIA**

**TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**HERMOSILLO, SONORA**

**SEPTIEMBRE DE 2009**

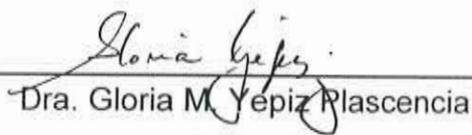
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del L.N. Oscar Trinidad Galván Valencia, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dra. Ana María Calderón de la Barca  
**Directora de Tesis**



---

Dra. Gloria M. Yepiz Plascencia  
**Asesora**



---

Dra. Verónica Mata Haro  
**Asesora**



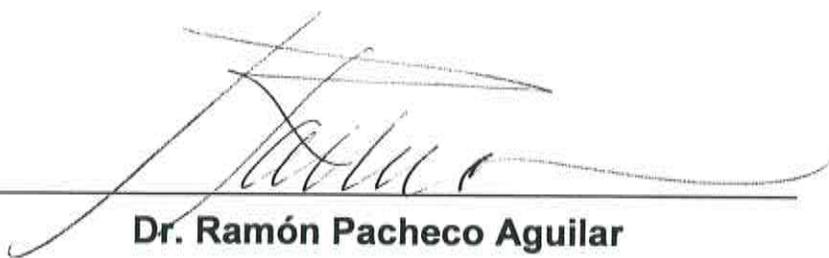
---

Dr. Norberto Sotelo Cruz  
**Asesor**

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin el permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, de la directora de tesis.



---

**Dr. Ramón Pacheco Aguilar**

**Director General**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, una noble institución, que me abrió sus puertas y me permitió crecer más como profesional y como persona.

Al CONACYT, por el apoyo económico para la realización de este trabajo, además por los esfuerzos que realiza como institución para el desarrollo de la ciencia en México.

A la Dra. Esther Casanueva y López, porque aunque se nos adelantó un poquito en el camino de la vida, sé que desde el cielo te sientes orgullosa de este humilde logro, muchas gracias Esther.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca, por ser una excelente asesora, pero aún mejor persona.

A mi comité de tesis, Dra. Gloria Yepiz Plascencia, Dra. Verónica Mata Haro, Dr. Norberto Sotelo Cruz, por su apoyo y ayuda para la realización de esta tesis.

A la M. en C. Adriana Verónica Bolaños y al Q. B. René Valenzuela por toda su ayuda, cooperación y organización, por formar parte inherente del laboratorio de proteínas, sin ustedes proteínas no sería lo mismo.

A mis compañeros del laboratorio de proteínas, por su ayuda, compañía, buena onda y buena vibra, por la solidaridad que siempre mostraron para la realización de este trabajo, Muchas gracias.

A mis compañeros de generación "Comesolos AC", por ser la mejor generación con la que pude haberme encontrado, por convertirse en mi familia, gracias por todos los buenos ratos que pasamos juntos.

A mis compañeros y amigos de generación Brisa Flores, Paulina Tapia, Alex Salazar, Marcela Vázquez y María Luisa Santiago, muchas gracias por su apoyo, ayuda, compañía y comprensión, los voy a extrañar.

A Marce Vázquez, por ser la mejor de las amigas, porque siempre estabas cuando más lo necesitaba, muchas gracias, valió la pena.

A mí siempre ejemplar madre Leticia Valencia Hernández, porque cada paso que doy, también es tuyo, muchas gracias por todo.

A mis hermanos Claudia, Rodrigo y Sergio porque este ha sido un esfuerzo compartido.

A mi Abuela Catita por ser la mejor abuela del mundo y a don Marcos Galván, muchas gracias por todo tío, siempre serás un ejemplo para mí.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada con mucho cariño y aprecio para mi madre Leticia Valencia Hernández, todo un ejemplo, porque sus esfuerzos merecen todos los reconocimientos del mundo, gracias por todo el apoyo mami, este trabajo no ha sido de uno, sino de un esfuerzo compartido. Para ti, con cariño.

A mis hermanos Rodrigo, Sergio y a mi hermana Claudia, por su apoyo, por ser los mejores hermanos que pude haber tenido, gracias por sus porras, buena onda y todo su cariño. Gracias hermanitos, los quiero.

A toda mi familia, porque sé que siempre estuvieron pendientes de mí, aunque no estuvieran conmigo, yo los sentía siempre a mi lado. Muy en especial a mi Abuela Catita y a mi tío Marcos Galván, gracias por todo.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca, por todo lo que representa como persona y como profesional en la ciencia, muchas gracias por enseñarme a crecer más.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	3
Factores involucrados en la enfermedad celiaca.....	3
Ambientales.....	3
Inmunológicos.....	4
Genéticos.....	5
Diagnóstico.....	6
Biopsia intestinal.....	6
Pruebas serológicas.....	7
Patologías asociadas a la enfermedad celiaca.....	9
HLA-DQ2 y DQ8.....	10
Prevalencia de la enfermedad celiaca.....	13
En el mundo.....	13
En México.....	14
En Sonora.....	15
El genoma mexicano: implicaciones para la enfermedad celiaca.....	16
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
General.....	18
Particulares.....	18

SUJETOS Y MÉTODOS.....	19
Población de Estudio.....	19
Obtención de ADN Genómico.....	20
Extracción de ADN.....	20
Cuantificación de la concentración de ADN.....	21
Diseño de oligonucleótidos específicos para HLA-DQ2 y DQ8...	21
Secuencia específica de iniciadores.....	22
Estandarización de la reacción.....	22
Identificación de los haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8.....	23
Electroforesis en gel de agarosa.....	24
Análisis estadístico.....	25
Consideraciones éticas.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Población de estudio.....	26
Pruebas serológicas.....	26
Optimización de la reacción de PCR e identificación de HLA-DQ2 y/o DQ8.....	31
Identificación de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8.....	33
Detección de las combinaciones HLA-DQA1*0501, DQA1*0301 y DQB1*0201 y DQB1*0302.....	34
Marcadores serológicos y haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, riesgo para el desarrollo de la enfermedad celiaca.....	39
CONCLUSIÓN.....	43
REFERENCIAS.....	44

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Haplotipos que predisponen enfermedad celiaca.....	13
2.	Combinaciones HLA-DQ2 y DQ8 susceptibles para EC y sus oligonucleótidos específicos para las reacciones de PCR.....	23
3.	Temperaturas de alineación, extensión y amplificación de los fragmentos HLA-DQ2 y DQ8, además de las combinaciones DQA1*0501, DQA1*0201, DQB1*0201, DQB1*0302.....	24
4.	Haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 y combinaciones DQA1 y DQB1 en niños sonorenses que acuden al HIES. ....	36
5.	Distribución de los haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8 en niños sonorenses del HIES comparado con poblaciones del mundo con EC.....	38
6.	Marcadores serológicos y haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8 en niños sonorenses atendidos en el HIES.....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Utilización de los haplotipos como indicadores de riesgo a desarrollar enfermedad celiaca.....	8
2.	Unión y presentación de péptidos de gliadinas a células T.	11
3.	Secuencia utilizada para el diseño de iniciadores específicos para el haplotipo HLA-DQ2.....	22
4.	Secuencia utilizada para el diseño de iniciadores específicos para el haplotipo HLA-DQ8.....	22
5.	Distribución de los índices de anticuerpos IgG anti-gliadinas en suero de niños atendidos en el HIES.....	27
6.	Distribución de los índices de anticuerpos IgA anti-gliadinas en suero de niños atendidos en el HIES.....	28
7.	Distribución de los índices de anticuerpos IgA anti-TG en suero de niños atendidos en el HIES.....	29
8.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% para la optimización de la reacción del fragmento HLA-DQB1*0201.....	32
9.	Detección por PCR convencional de los fragmentos A) HLA-DQ8 y B) HLA-DQ2 de diferentes muestras de sangre.....	33
10.	Productos de amplificación por PCR convencional de los alelos DQA1* y DQB1*.....	35
11.	Distribución de las combinaciones HLA-DQB1* y DQB1* en pacientes del HIES.....	39
12.	Relación Marcadores serológicos-Haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 en niños sonorenses con sospecha de EC.....	41

## RESUMEN

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía autoinmune desarrollada en individuos genéticamente predispuestos. Hasta hace poco, la EC se consideraba rara debido a su diagnóstico difícil. Actualmente, se conoce que su patogénesis involucra la producción de anticuerpos contra gliadinas (antígenos exógenos), y contra la transglutaminasa (TG), el autoantígeno. Prácticamente todos los celíacos presentan las moléculas HLA-DQ2 ó DQ8 codificadas por las combinaciones alélicas HLA-DAQ1\*0501, DQB1\*0201 para DQ2 y DQA1\* 0301, DQB1\*0302 para DQ8. Así, se miden anticuerpos anti-gliadinas (Gd) y anti-transglutaminasa (TG), además de la expresión de los haplotipos en sangre, para diagnosticarla. Por ello el objetivo de este trabajo fue identificar los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 en niños sonorenses que presentaran marcadores serológicos de EC. Para lograr este objetivo, se analizaron los haplotipos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, mediante una secuencia específica de iniciadores para las combinaciones DQA1\*0501, DQB1\*0201, DQA1\*0301 y DQB1\*0302. Así, se encontró predominancia del haplotipo HLA-DQ2, en el 44.8%; un 23.5% con DQ8 y 31.7%, con DQ2/DQ8, de 124 sujetos de estudio. La combinación de mayor frecuencia fue DQA1 \*0501, con lo que se revelan las características genóticas de la población, con una mayor contribución de genes europeos sobre los amerindios. El número de sujetos con haplotipos positivos sumados a los tres índices de anticuerpos evaluados, resultó en el 2.4% de la población estudiada. Con esto, se evidencia la importancia de la detección de HLA-DQ2 y DQ8 en individuos con marcadores serológicos positivos, para el diagnóstico de EC.

## INTRODUCCIÓN

La intolerancia al gluten del trigo o enfermedad celiaca (EC) es un desorden autoinmune que se caracteriza por la atrofia de las vellosidades del intestino delgado, detonada por la ingestión del gluten (Schuppan y Junker, 2007). Su manifestación típica consiste en diarrea crónica, mala absorción y distensión abdominal; aunque puede expresarse en forma atípica, sin síntomas gastrointestinales. En algunos casos sólo se detecta porque los niños no se desarrollan bien, porque de jóvenes presentan anemia u osteopenia; así como por síntomas diversos en los adultos (Torres *et al.*, 2007).

Debido a sus altos contenidos de glutamina y prolina, las proteínas del gluten de trigo no se hidrolizan bien en el tracto gastrointestinal. En las personas genéticamente predispuestas a la EC, por diversas causas aun no muy bien tipificadas, falla la permeabilidad de la mucosa y los péptidos de gluten (gliadinas) atraviesan la barrera intestinal. La transglutaminasa tisular (TGt) desamina esos péptidos, formando neoepítopes que se unen al antígeno leucocitario de histocompatibilidad (HLA) del tipo DQ2 o DQ8 y así son presentados a las células T intestinales. Éstas proliferan, liberan citocinas pro-inflamatorias y producen anticuerpos anti-gliadinas (anti-Gd) y anti-TGt, el autoantígeno en la EC. Así, la mucosa intestinal sufre atrofia (Green y Cellier, 2007).

Para diagnosticar la EC, se analiza el daño de la mucosa duodenal en una serie de biopsias. La toma de biopsias solo se realiza después de contar con otros indicadores que actualmente se pueden medir por medio de juegos de reactivos comerciales. Se miden anticuerpos séricos IgA anti-TGt, IgA e IgG anti-Gd; así como los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, en sangre completa (Bhatnagar y Tandon, 2006). Por medio de estos indicadores y sin evidencia de biopsia, se estima que la prevalencia de la EC es alrededor del 1 % en Europa

(West *et al.*, 2003) y los Estados Unidos (Fasano *et al.*, 2003). En Latinoamérica hay pocos estudios y se sugiere una prevalencia similar a la europea (Gomez *et al.*, 2001).

La principal predisposición genética a la EC es la presencia de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8. Los genes que los expresan, son necesarios pero no suficientes como determinantes de la EC, ya que no todas las personas que los presentan la sufren. Además, la combinación de alelos varía de población a población. En México no se han caracterizado los haplotipos HLA que tipifican a la EC, mientras que en una población chilena con componente amerindio sí se ha estudiado (Araya *et al.*, 2000). Debido al trabajo de nuestro grupo de investigación, sabemos que la EC también se presenta en la población de Sonora (Cabrera-Chavez *et al.*, 2008; Hurtado-Valenzuela *et al.*, 2008).

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### Factores involucrados en la enfermedad celiaca

La EC es un ejemplo claro de una enfermedad multifactorial en la que intervienen factores ambientales, inmunológicos y genéticos involucrados directamente en la detonación y desarrollo de la enfermedad.

#### **Ambientales**

Los factores ambientales son considerados elementos indispensables en la patogénesis de la EC. Se ha encontrado una asociación fuerte entre la alimentación durante las primeras etapas de vida y los riesgos de desarrollar EC. Resulta interesante que para proteger a los niños contra la EC, se recomienda introducir paulatinamente y en pequeñas cantidades, alimentos que contengan gluten, mientras se continua con el amamantamiento (D'Amico *et al.*, 2005). Si se introducen alimentos con gluten antes de los 4 meses de edad, aumenta el riesgo de desarrollar EC en la infancia (Ivarsson *et al.*, 2002). Además, también la desarrollan tempranamente algunos niños predispuestos genéticamente, cuando no son amamantados.

Otra asociación es la de los pacientes con giardiasis y EC que comparten sintomatología clínica similar. El tratamiento de la giardiasis, revierte la intolerancia al trigo de activa a latente, regresando a la normalidad la morfología del intestino, sin tener que recurrir a una dieta libre de gluten. A pesar de esto, los hallazgos en la morfología del intestino deben ir acompañados por otros marcadores para llevar a cabo el diagnóstico de EC en estos pacientes (Sorell *et al.*, 2004). En forma similar, hay analogía de síntomas entre EC y la infección por *Helicobacter pylori*, infección que se da desde formas asintomáticas hasta enfermedades gastroduodenales. Tanto en la infección con *H. pylori* como en

EC, hay respuesta inmune humoral, enfocando particularmente su acción sobre la reacción inflamatoria local (Broide *et al.*, 2007).

Los enfermos celíacos se recuperan completamente cuando se remueve el gluten del trigo de la dieta. Por tanto, requieren una dieta libre de gluten de por vida y si no la siguen, al largo plazo desarrollan complicaciones e incluso aumenta su riesgo de muerte (Pastore *et al.*, 2007). Las alternativas al trigo para los celíacos, son productos libres de gluten, elaborados con harinas de maíz, arroz y otros granos, sin relación o con poca relación taxonómica con el trigo (Arifeen *et al.*, 2007; Sae-Eaw *et al.*, 2007).

### **Inmunológicos**

En los enfermos celíacos se activa una respuesta inmunológica a los péptidos de gliadinas, que provoca inflamación. Para este tipo de respuesta, se requiere de una falla en la permeabilidad de la mucosa intestinal, que permita el ingreso de los péptidos de gliadinas a lámina propia. Una vez dentro, la transglutaminasa tisular (TGt) desamina las glutaminas de los péptidos, dando lugar a neo-epítopes. Esto ocurre en la parte proximal del intestino, caracterizado por la infiltración del epitelio y la lámina propia. Lo anterior da como resultado la subsecuente infiltración por células T CD4<sup>+</sup> en la lámina propia y por células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> y CD8<sup>-</sup> en el epitelio. En esta parte del proceso, las HLA-DQ2 y DQ8 limitan la respuesta inmune a las células T CD4<sup>+</sup> (Alaedini y Green, 2005). Este mecanismo es típico de la respuesta inmune adaptativa. Además, se hipotetiza una respuesta inmune innata, por efecto directo sobre las células absortivas del epitelio. Ambas vías, se alternan en la respuesta celíaca (Ciccocioppo *et al.*, 2005).

Poco se conoce sobre los estadios tempranos por medio de los cuales se da la inflamación en la EC. De acuerdo a algunos autores, la interleucina (IL) -15 es una citocina reguladora que mantiene la homeostasis entre la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa. La IL-15, se produce en las células

epiteliales y se convierte en estimuladora de linfocitos intraepiteliales. Por ello, se le ha dado un enfoque particular a su estudio como una molécula clave en la patogénesis de la EC (Ciccocioppo *et al.*, 2005).

Las características de la inflamación intestinal dependen del tipo de citocinas que se produzcan durante la respuesta inmune, ya sea por células T o por macrófagos. Las lesiones histológicas en la mucosa intestinal de los celíacos, se asocian con una infiltración marcada de células Th1, dominadas por la síntesis de citocinas proinflamatorias, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Torres *et al.*, 2007).

### **Genéticos**

La EC es una enfermedad poligénica. Se le ha asociado directamente con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (HLA II) para las moléculas DQ2 y DQ8. Los HLA-DQ2 se presentan en aproximadamente el 90 % de los casos de EC y el DQ8 en los restantes, en población europea. El heterodímero HLA-DQ2 está codificado por los alelos DQA1\*0501/DQB1\*0201, mientras que el resto expresa normalmente HLA-DQ8, codificado por DQA1\*0301/ DQB1\*0302 (Tollefsen *et al.*, 2006). Sin embargo, los genes que codifican los haplotipos solo representan el 40 % del riesgo genético, el resto es atribuible a genes de otro tipo (Green y Jabri, 2006). Se ha asociado a la EC con el factor MY09B, CTLA4 como regulador negativo de la respuesta inmune, limitando su respuesta. Hay además otros genes candidatos como tTG, FAS, MMP-1 Y 3, TCR  $\alpha\beta$  ó  $\gamma\delta$ , IL12 $\beta$ , CD28, CD80, CD86, KIR, LILR, ATAT 1, PGPEP1, IRF1, DPPIV, TGM2, NOS2 o IFN $\gamma$ , también como reguladores y activadores de la respuesta inmune (Wolters y Wijmenga, 2008).

Los haplotipos HLA DQ2 y DQ8 son moléculas receptoras que presentan los péptidos de gliadinas a las células T en el intestino de los celíacos. Las moléculas HLA requieren residuos de ácido glutámico cargados negativamente en las secuencias que van a unir. Aunque las gliadinas no tienen muchas cargas para el reconocimiento, cuando están desaminadas, tienen hasta 400

veces mayor afinidad por las moléculas DQ2 y DQ8, lo cual permite una presentación más eficiente. Por esto, las personas con los marcadores HLA DQ2 y DQ8, son más susceptibles de desarrollar EC. Otro marcador genético que incrementa el riesgo de EC es una variante de miosina IXB (MY09B), implicada en la remodelación de la actina en los enterocitos del epitelio, lo que puede provocar un deterioro en la barrera intestinal. La hipótesis sugiere que esta variante genética podría ser un factor involucrado en los eventos de respuesta inflamatoria temprana en EC (Lochman *et al.*, 2007).

## **Diagnóstico**

Las manifestaciones histológicas halladas en la EC pueden en algunos casos dificultar el diagnóstico. Además, debido a la naturaleza de la enfermedad, se puede confundir con otros síndromes con sintomatología similar (James, 2008).

### **Biopsia intestinal**

La biopsia intestinal sigue siendo el estándar de oro en el diagnóstico de la EC. Las lesiones y cambios histológicos en la mucosa intestinal de los celíacos se clasifican de acuerdo a los criterios de Marsh. Esta clasificación está basada en el grado de lesión de la mucosa intestinal y concentración de IELs (linfocitos intraepiteliales). El estadio I se caracteriza por una arquitectura normal de las vellosidades, definida con un conteo de IELs > 30 células por 100 enterocitos. El estadio II está determinado por un incremento de los IELs, acompañados de hiperplasia en las criptas (elongación y brecha de las criptas). Finalmente, el estadio III se identifica por un daño más severo, con hiperplasia y atrofia de las criptas, finalizando en la atrofia total de las vellosidades (Hadithi *et al.*, 2007).

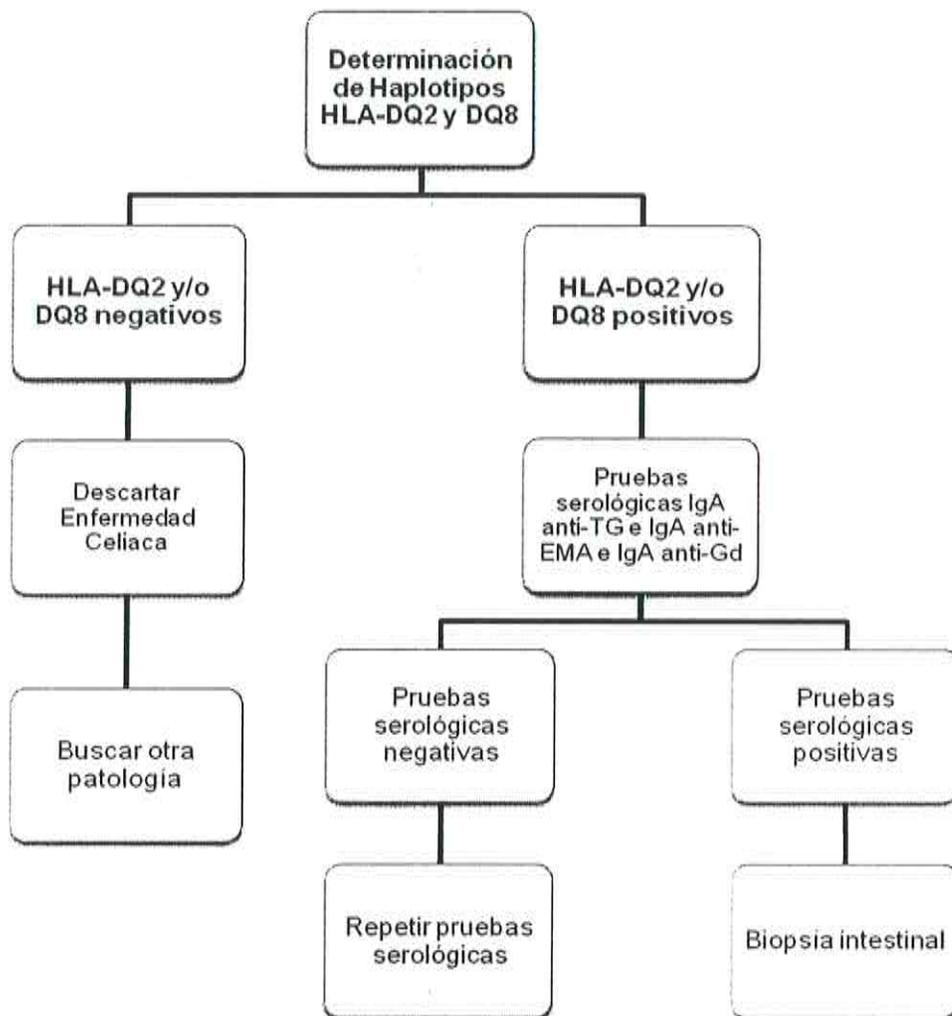
## **Pruebas serológicas**

El análisis de la biopsia intestinal aún sigue siendo el mejor estándar para confirmar el diagnóstico de EC. Sin embargo, se usan frecuentemente las pruebas serológicas, que son de gran utilidad en pacientes asintomáticos, con condiciones asociadas a EC. Además, estos indicadores se usan ampliamente en estudios epidemiológicos para evaluar o explorar la prevalencia de EC (Dehghani y Asadi-Pooya, 2008).

Las pruebas serológicas incluyen el análisis de anticuerpos específicos para la EC. Éstos, deben incluir IgA anti-TG (IgA anti-transglutaminasa) o anti-endomisio que reaccionan con la transglutaminasa tisular (EMA); IgA e IgG anti-Gd (antigliadinas). Los niveles de IgA anti-TG o anti-EMA son los más sensibles para determinar los riesgos de EC. Sin embargo, para un análisis más completo es necesario cuantificar anticuerpos IgA Anti-Gd (Heredia *et al.*, 2007).

Otro indicador de EC, es la respuesta de alivio de los síntomas, después de una dieta sin gluten; esto además de la positividad en las pruebas serológicas específicas para EC. Recientemente, también se usa la tipificación de los haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8 para evaluar riesgos de EC (Green y Cellier, 2007).

En la Figura 1 se ilustra la importancia del análisis de haplotipos en la práctica clínica, para los pacientes con hallazgos histológicos inciertos en la biopsia y con positividad en las pruebas serológicas. En estos casos la tipificación de HLA-DQ2 y DQ8 ayuda en el diagnóstico. Por tanto la presencia de alguno de los dos haplotipos DQ2 y/o DQ8 es de utilidad para excluir a los pacientes de EC. De hecho la tipificación de haplotipos puede ser una primera línea de exploración si hay riesgo (Kaukinen *et al.*, 2002).



**Figura 1. Utilización de los haplotipos como indicadores de riesgo a desarrollar enfermedad celiaca (Kaukinen et al., 2002).**

## **Patologías asociadas a la enfermedad celiaca**

La anemia por deficiencia de hierro y/o ácido fólico, es una complicación común en los enfermos celiacos; tanto, que hasta un 50 % la presenta (Zipser *et al.*, 2005). Se calcula que aproximadamente el 40% de los celiacos tiene riesgo de desarrollar osteopenia, y en condiciones más severas osteoporosis. Los especialistas recomiendan identificar esta complicación en etapas tempranas, pues las reducciones del contenido y densidad mineral ósea son considerables en la EC. Lo anterior es importante porque a través de una dieta libre de gluten las complicaciones pueden prevenirse (Barera *et al.*, 2004). Para los pacientes con problemas de osteoporosis es recomendable evaluar marcadores serológicos que incluyan IgA anti-TG o anti-EMA. Los individuos con resultados positivos, deberán ser sometidos a una biopsia intestinal para confirmar el diagnóstico de EC (Stenson *et al.*, 2005).

La artritis reumatoide es la enfermedad erosiva inflamatoria con mayor distribución alrededor del mundo. Al igual que en la EC y en otras enfermedades autoinmunes, en la artritis reumatoide el factor genético HLA es el principal responsable. La artritis reumatoide está asociada a la EC por la presencia de alelos compartidos, como los HLA-DQ8, además de las regiones HLA-DR $\beta$ 1 y algunas otras regiones HLA (Varga *et al.*, 2003).

Entre las enfermedades autoinmunes que predisponen a la EC destacan la diabetes mellitus tipo 1 (DM1), el síndrome de Sjögrens, el síndrome de Down y la tiroiditis. También es común que los enfermos celiacos sufran deficiencia de IgA; además tienen mayor riesgo, las personas con una historia familiar de EC (Green y Cellier, 2007).

La relación entre la enfermedad celiaca y la DM1 es bien conocida. Entre 0.97 y 16.4% de los diabéticos, sufre enfermedad celiaca. A pesar de esto, hay muy pocas investigaciones concernientes a dicha asociación (Deja *et al.*, 2008).

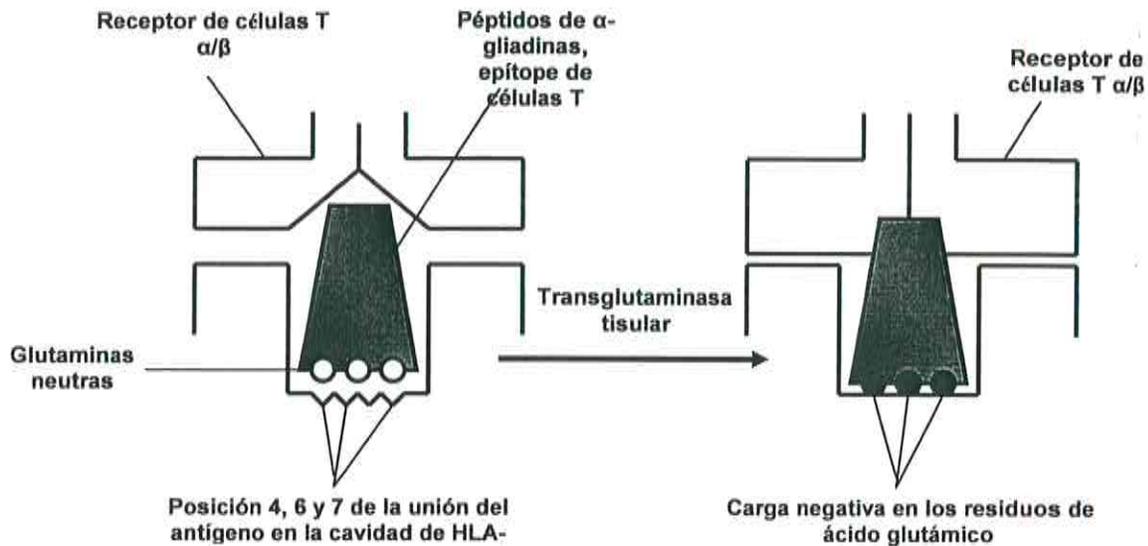
Aunque los pacientes con EC y DM1 presentan el haplotipo DQ2 o DQ8, éste no puede ser un criterio por sí solo para el diagnóstico de EC. Lo anterior es debido a que hay un porcentaje significativo de pacientes con diabetes tipo 1, sin EC y que poseen estos haplotipos. En general, en poblaciones con alta incidencia de DQ2 y/o DQ8, la tipificación de los haplotipos de HLA no se considera como criterio para el diagnóstico de EC (Doolan *et al.*, 2005).

### **HLA-DQ2 y DQ8**

Los HLA en humanos o MHC en otros organismos, son antígenos leucocitarios de naturaleza proteica localizados en las células presentadoras de antígenos (Figura 2). Su función principal es ligar péptidos, generalmente de 11 residuos de aminoácidos o menos y presentarlos a las células T (Abbas *et al.*, 2002).

La predisposición genética de los pacientes celíacos se relaciona con la presencia de HLA-DQ2 y/o DQ8 (Sollid y Thorsby, 1993). Los genes que codifican para estos haplotipos se asocian primariamente a dos moléculas presentadoras de péptidos: DQ2 ( $\alpha 1^*0501$ ,  $\beta 1^*0201$ ) o al de menor extensión, DQ8 ( $\alpha 1^*0301$ ,  $\beta 1^*0302$ ). Una cuestión que todavía no ha sido definida es si hay moléculas adicionales que codifiquen para genes no identificados en el complejo de genes HLA, que además contribuyan a la predisposición genética de EC. Es probable que algunos de los efectos de estos genes adicionales, sean moderados (Sollid, 2000).

Aunque se acepta generalmente que los genes DQ *per se* son la mayor conexión a genes HLA, responsables de la manifestación de EC, no todos los haplotipos DQ confieren la misma susceptibilidad. La asociación genética más fuerte es la de los genes que codifican para los haplotipos DR3 y DQ2. Estas moléculas, contienen los haplotipos extendidos B8-DR3-DQ2 y B18-DR3-DQ2. Esto es significativo, debido a que ambos haplotipos son visiblemente distintos en las regiones exteriores de DR-DQ (Bolognesi *et al.*, 2003).



**Figura 2. Unión y presentación de péptidos de gliadinas a células T.** Los péptidos se unen a las células presentadoras de antígenos a través de su interacción con HLA-DQ2 o DQ8. La transglutaminasa tisular desamina los péptidos de gliadinas en sus residuos de glutamina (neutros), a residuos de ácido glutámico con carga negativa, que son preferidos en las posiciones 4, 6 y 7 del HLA-DQ2. Estas secuencias desaminadas, son los epítopes con mayor afinidad a las células T a las que son presentados e inducen una respuesta fuerte (Farrell y Kelly, 2002).

Algunos pacientes celíacos son portadores de los haplotipos DR3-DQ2 o DR5-DQ7/DR7-DQ2 heterocigotos. Estas combinaciones genéticas, les confieren una mayor susceptibilidad a la EC a los predispuestos. Los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0201 de los haplotipos DR3-DQ2 también se encuentran en la combinación de haplotipos DR5-DQ7 y DR7-DQ2. Los primeros son portadores de los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0301 y los segundos portan los alelos DQA1\*0201 y DQB1\*0202. La fracción de los pacientes en diferentes poblaciones que expresan estos heterodímeros DQ por genes en la posición *cis* o *trans*, depende de la frecuencia de los haplotipos DR3-DQ2, DR5-DQ7 y DQ7-DQ8 (Tabla 1) (Dubois y van Heel, 2008).

De acuerdo al origen de la población, entre el 2% y el 10% de los pacientes celíacos no son portadores de los heterodímeros DQ ( $\alpha$  1\*0501.

$\beta 1^*02$ ), sino que presentan subtipos de DR4. Las determinantes genéticas responsables de la asociación de estos individuos es probablemente diferente a la expresión de individuos DQ ( $\alpha 1^*0501$ .  $\beta 1^*02$ ). Notablemente, hay un claro sesgo en la representación de los haplotipos DR8-DQ8 vs los DR4-DQ7 entre estos pacientes. Lo anterior podría implicar que la molécula DQ8 (DQ  $\alpha 1^*0301$ ,  $\beta 1^*0302$ ), muy probablemente represente mayor susceptibilidad, en lugar de DQ2 ( $\alpha 1^*0501$ .  $\beta 1^*02$ ) (Sollid, 2000).

Se conoce poco acerca de genes diferentes a los HLA que predispongan a EC. Sin embargo, distintos loci han mostrado una evidencia de esta asociación; algunos de los cuales se han asociado previamente con enfermedades autoinmunes. Estos incluyen al gen CTLA-4/CD28 en la región 2q33 previamente identificado porque predispone a DM1 en el locus IDDM12 y otro en la región 15q26 (IDDM3). A pesar de esto, los resultados no son consistentes en todas las poblaciones. Para los pacientes con EC y DM1 se ha sugerido la existencia de algún otro locus susceptible en el lado del telómero de la región HLA y más recientemente MICA (MHC clase I relacionado a la cadena de proteína A). Éste, se expresa unido a NFG2Ddefinir en los enterocitos en respuesta al estrés y, activando al receptor de células asesinas (NK) y células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (Bilbao *et al.*, 2002).

**Tabla 1. Haplotipos que predisponen a enfermedad celiaca.** Codificación de DQA1\*0501 y DQB1\*0201 en *cis* o *trans* para formar el heterodímero DQ2. Una menor proporción de los pacientes no son portadores de DQ2, pero pocos son portadores de DQA1\*0301 y DQB1\*0302 para el heterodímero DQ8

Haplotipo I			Haplotipo II			Tipificación
DRB1	DQA1	DQB1	DRB1	DQA1	DQB1	
03	05	02	-	-	-	DR3-DQ2
03	05	02	03	05	02	DR3-DQ2/DR3-DQ2
03	05	02	07	02	02	DR3-DQ2/DR7-DQ2
11/12	05	0301	07	01	02	DR5-DQ7/DR7-DQ2
0401	03	0302	-	-	-	DR4-DQ8

Fuente: (Louka *et al.*, 2002).

Dadas las múltiples asociaciones genéticas de la EC, es preciso entender mejor a las que representen mayor susceptibilidad. La asociación más reconocida sigue siendo la presentada por las moléculas HLA asociada a los haplotipos DQ2 y/o DQ8. Sin embargo, ciertos genes adicionales muy probablemente representen algún efecto moderado (Sollid, 2000).

## Prevalencia de la enfermedad celiaca

### En el mundo

Los estudios de prevalencia de EC, revelan que se presenta en aproximadamente el 1% de la población general. Ésta, se encuentra bien tipificada no solo a través de los países europeos sino además en ancestros europeos del Medio Este, Asia, América del Sur y el norte de África. Sin embargo, en muchas poblaciones el diagnóstico sigue siendo incierto (Green y Cellier, 2007).

En América del Norte, particularmente en Estados Unidos, la ocurrencia de la enfermedad en pacientes sintomáticos y asintomáticos es similar a la encontrada en Europa (Fasano *et al.*, 2003). No obstante, no se conocen las características epidemiológicas de la EC a lo largo de América Latina. A pesar de que en países como Argentina, Chile y Uruguay se cuenta con datos similares a los europeos (1:124 a 1:251), poco se sabe de la incidencia en otros países. Lo anterior se debe en parte a la diversidad étnica con marcadores geográficos y genéticos diferentes (Gomez *et al.*, 2001). Para poner un ejemplo, en Chile se conoce, de acuerdo con los estudios genéticos, que en los celíacos existe una mayor predominancia de las combinaciones DQ8, que se encuentra a favor de la genética mapuche-española (Araya *et al.*, 2000) .

### **En México**

En México, hay un solo estudio de prevalencia de EC (Remes-Troche *et al.*, 2006). Los casos de este estudio, fueron 1009 donadores de sangre proveniente de adultos mestizos sanos de diversos lugares del país. No fueron diagnosticados en forma completa, sino que solamente se analizaron anticuerpos séricos anti-TG. Tampoco se tipificaron en cuanto a haplotipos, ni se cuenta con alguna otra información de morbilidad o sintomatología. El 2.7% resultó positivo para IgA anti-TG, lo cual parece muy alto en comparación a las prevalencias de cualquier población.

Además de ese único estudio de prevalencia, hay publicados casos aislados de mexicanos a los que se les diagnosticó EC relacionada con otras patologías (Remes-Troche *et al.*, 2007; Remes-Troche *et al.*, 2008). Con esto, se infiere que la EC no es una enfermedad ajena a los mexicanos.

Al igual que para los celíacos chilenos que muestran predominancia de HLA DQ8, con presencia de DQ8/DQ2 debido a la conexión racial mapuche-español, en México probablemente se dé una mezcla similar, debido a la mezcla racial con fuerte componente de poblaciones amerindias. Esto sería

como población total mexicana, aunque se esperarían variaciones muy grandes entre regiones, debido a la variabilidad genética de sus pobladores.

### **En Sonora**

El grupo de trabajo de CIAD en donde se desarrolló esta tesis, ha estado colaborando con el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) durante varios años, en la detección y diagnóstico de la EC. Aunque no se estudiaba prevalencia, cada vez hubo más casos con indicadores positivos de EC, especialmente en 2006 y 2007. De allí la importancia de explorar prevalencia y tipificar el factor genético asociado a EC, en esta población.

La población de niños que acuden al HIES, ha variado con el tiempo y actualmente la mayoría de los atendidos son sonorenses. Esto a diferencia de hace unos años cuando no había centros de atención a la salud en las zonas agrícolas del estado, con jornaleros provenientes del sureste del país, que eran atendidos en el HIES.

Así, se han tipificado varios casos de niños con EC en el HIES y sus características están incluidas en una publicación de caso clínico (Hurtado Valenzuela *et al.*, 2008) y dos publicaciones relacionadas con el riesgo de los alimentos y su procesamiento, para los celíacos (Cabrera-Chavez *et al.*, 2008; Cabrera-Chavez *et al.*, 2009). El surgimiento de esos casos, pudiera estar relacionado a los cambios en los regímenes de lactancia y alimentación complementaria, que son factores determinantes del desarrollo de EC. En esta región, la lactancia con fórmulas infantiles es común y la introducción de alimentos a base de trigo se hace tempranamente (Caire *et al.*, 2004). Esto unido a la expresión de los haplotipos que predisponen, puede ser una combinación que induzca a la EC.

Es posible que la combinación de los factores dietarios y genéticos, llevó a la manifestación de EC en un niño sonorenses de 2.9 años, que fue diagnosticado por nuestro equipo de trabajo (Hurtado-Valenzuela *et al.*, 2008).

El niño ingresó al HIES con calambres y temblores a causa de diarrea crónica durante el último año en el que había sido hospitalizado 6 veces por la misma razón. Fue muy útil para el diagnóstico contar con los indicadores serológicos de anticuerpos IgA anti-TGt, IgA e IgG anti-gliadinas, ya que la biopsia no presentó mayor daño histológico.

### **El genoma mexicano: implicaciones para la enfermedad celiaca**

El análisis de los haplotipos HLA se considera como una de las pruebas más sensibles, que permite interpretar las relaciones entre las poblaciones y sus movimientos migratorios alrededor del mundo. Esto mediante la identificación de los loci e incluso análisis más sofisticados que clasifiquen la estructura genética de los grupos nativos de América. Con esta herramienta, se pone de manifiesto la mezcla de razas. La población mexicana es principalmente mestiza como resultado de una mezcla de tres razas, la caucásica, la amerindia y la africana. Los amerindios provienen de los grupos indígenas asentados en el país antes de la Colonia Española. El componente europeo viene principalmente de España y los genes africanos fueron traídos al país por los españoles. Así, se encuentran diferentes grados de mezclas en los mestizos que habitan el territorio mexicano (Leal *et al.*, 2005).

En las últimas tres décadas, se han llevado a cabo importantes proyectos científicos para el análisis de las variaciones genéticas en diversas poblaciones de México. Se han estudiado mestizos de Guanajuato, Yucatán, Oaxaca, Coahuila, Puebla y la Ciudad de México (Hidalgo-Miranda *et al.*, 2006); así como algunos grupos indígenas (Balladares *et al.*, 2002).

En el Estado de Sonora, la mezcla genética parece igual de amplia a la de otras poblaciones mexicanas debido a la presencia de 9 distintos grupos indígenas de la región. Estos son, Guajiros, Mayos, Ópatas, Pápagos, Pimas,

Seris, Yaquis, Cucápa y Kikapú. Se han tipificado los haplotipos en una muestra de la población Seri, uno de los grupos más conservados; todos ellos resultaron de ancestros amerindios, excepto por un sujeto con QBP2.1-DQB1-0201-QAP2.1-DQA1\* 0201-DRB1\*0701. Este último, sin lugar a dudas es un haplotipo caucásico introducido por los españoles, lo cual indica la presencia de algún grado de mezcla, aún en este grupo más conservado (Balladares *et al.*, 2002).

Recientemente la comunidad científica se encuentra investigando las variaciones en el genoma del mexicano que describa la diversidad genómica de esta población. En la actualidad el abordaje para la identificación de genes asociados a enfermedades complejas ha sido muy exitoso. En esto, la existencia de patrones de contribución ancestral diferenciales entre e intra grupos se relaciona con la densidad poblacional indígena antes de la conquista de América (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009). Seguramente los resultados encontrados en este trabajo, permitirán hacer inferencias acerca de los patrones genéticos de la EC, resultado del mestizaje en la población de estudio.

## **HIPÓTESIS**

En los niños celíacos que acuden al Hospital Infantil del Estado de Sonora, los haplotipos DQ8 prevalecerán sobre los DQ2, lo anterior originado por el componente amerindio de la población sonoreense.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Identificar los haplotipos HLA DQ2 y/o DQ8 en niños sonorenses con sospecha de enfermedad celíaca, de acuerdo con las características genotípicas a que da lugar la combinación entre europeos e indígenas.

### **Particulares**

1. Tipificar por PCR convencional, los haplotipos HLA DQ2 y DQ8 en una población de niños sonorenses celíacos y no celíacos.
2. Estimar la frecuencia con la que se presentan las combinaciones HLA- DQ A1\*0501, DQA1\*0301 y HLA-DQB1\*0201 y DQB1\*0302 en los niños sonorenses con sospecha de enfermedad celíaca.
3. Describir la relación entre los anticuerpos específicos y los haplotipos HLA- DQ2 y DQ8 como marcadores de riesgo para desarrollar enfermedad celíaca.

## SUJETOS Y MÉTODOS

### Población de Estudio

Los participantes del estudio fueron niños de un rango de edad entre 1 y 18 años, que acudieron al Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) por diversas patologías y se les realizó algún análisis de laboratorio que requería muestra de sangre. El sobrante de la muestra después del análisis correspondiente, fue utilizado para el presente estudio.

Cada día de entre semana se colectaron de 3 a 4 muestras de sangre completa. Después de tomar una alícuota para extracción de ADN genómico (ADNg), la muestra se centrifugó y a partir del suero se cuantificaron anticuerpos IgA e IgG anti-gliadinas (anti-Gd), así como IgA anti-transglutaminasa (IgA anti-TG). En aquellos casos en que las IgG anti-Gd resultaron altas y las de IgA no, se cuantificó IgA total, para descartar su deficiencia. En todos los casos con índices altos de IgG anti-Gd, así como en un número similar de casos negativos para éstos o los otros anticuerpos analizados (IgA anti-Gd e IgA anti-TG), se realizó la identificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8. La determinación de anticuerpos se realizó mediante un ensayo de ELISA, como se describe en (Cabrera-Chavez *et al.*, 2009).

Brevemente, en el ensayo de ELISA se inmovilizaron gliadinas extraídas de gluten de trigo con 70% de etanol o TG de cobayos (0.5 µg/mL) en buffer de carbonatos (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) durante la noche. Después de lavar en 100 µL (0.10 M Tris-HCl, 5.0 Mm NaN<sub>3</sub>, pH 7.4, conteniendo 0.05% Tween 20 y 0.05% de rojo de fenol), se bloqueó en 100 µL con 3% de gelatina de pescado. Se lavó de nuevo en 100 µL e incubó con suero humano (diluido 1:100) durante 2 h y a continuación en 100 µL con anticuerpos de conejo anti-IgA humana conjugados a peroxidasa, durante 1 h. La actividad enzimática fue revelada en

100  $\mu$ L con 3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina y se detuvo la reacción con 50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  1M, para leer a 450 nm (Microplate reader, Biorad, Hercules, CA).

Parámetros para obtener el valor de referencia de las pruebas serológicas

$$\text{Índice de anticuerpos} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{*Absorbancia de referencia} + 2 \text{ Desv. Estándar}}$$

Con lo anterior se obtienen los índices que son clasificados de la siguiente manera: Los valores  $\geq$  a 1 se consideraron positivos; 1 – 5 bajos, 5.1 – 10 moderados, 10.1 – 20 altos y mayores de 20 muy altos (Lagerqvist *et al.*, 2001).

\*Absorbancia de referencia: promedio de absorbancias, utilizando el suero de 20 niños con haplotipos negativos, + 2 DE.

## Obtención de ADN Genómico

### Extracción de ADN

A las muestras de sangre se les realizó la extracción de ADNg y fueron analizadas por PCR convencional para la detección de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8.

La extracción de ADN de cada sujeto fue realizado en base al protocolo del juego de reactivos comercial QIAGEN "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (QIAGEN, USA) utilizando los reactivos del juego. A partir de sangre completa obtenida en tubos tratados previamente con EDTA. Se agregaron 20  $\mu$ L de QIAGEN proteasa (proteasa o proteinasa K) en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Después, se agregaron 200  $\mu$ L de sangre completa y 200  $\mu$ L de buffer AL. Se incubó a 56° C por 10 min y se adicionaron 200  $\mu$ L de etanol (96-100%). Después se pasó cuidadosamente la mezcla a una columna de separación QIAamp y se centrifugó a 6800 g (Eppendorf centrifuge 5417R, Brinkmann

Instruments, Westbury, N.Y.) durante 1 min. La columna de separación fue pasada a un nuevo tubo de colección de 2 mL. Se añadieron 500  $\mu$ L de buffer AW1 y se centrifugó a 6800  $g$  x 1 min. Se añadieron 500  $\mu$ L de buffer AW2 y se centrifugó a 20000  $g$  durante 3 min. Finalmente el DNA fue resuspendido en 200  $\mu$ L de buffer AE en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Para evitar contaminación de las muestras se utilizaron tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y puntas con filtro previamente esterilizados. Además la zona de trabajo fue higienizada con alcohol al 95 %.

### **Cuantificación de la concentración de ADN**

El ADN<sub>g</sub> extraído en solución fue cuantificado midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260/280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Posteriormente se realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, para la identificación de los haplotipos DQ2 y DQ8 utilizando ~200 ng de ADN<sub>g</sub> extraído de cada muestra por cada microtubo de reacción (Sacchetti *et al.*, 1997). Los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de reacción se describen en los apartados siguientes.

### **Diseño de oligonucleótidos para los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8**

Se diseñaron iniciadores específicos para la detección de los fragmentos DQ2 y DQ8 de manera general. Los oligonucleótidos diseñados amplifican secuencias de diferentes tamaños. El oligonucleótido específico para DQ2 amplifica un fragmento de 154 pb (Fig. 3), mientras que el oligonucleótido para DQ8 amplifica uno de 530 pb (Fig. 4). Este diseño se realizó en base a las diferentes combinaciones y secuencias de las cadenas alfa (GenBank-NM\_002122) y beta (GenBank-NM\_2123) publicadas en el banco de genes y la nomenclatura utilizada por Bodmer *et al.* (1994), que codifican para las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (Bodmer *et al.*, 1994).

TCCAACCTCTACCGCTGCC**ACCAATGAGGTTCTGAGGT**CACAGTGTTTTCCAAGTTCCTGTGAC  
 GCTGGGTCAGCCCAACACCCCTCATCTGTCTTGTGGACAACATCTTTCCTCCTGTGGTCAACATC  
 ACCTGGCTGAGCAATGGGCAC**TCAGTCACAGAAGGTGTTTCTG**AGACCAGCTTCCTCTCCAAGA  
 GTGATCATTCCTTCTTCAAGATCAGTTACCTCACCTTCCTCCCTTCTGCTGATGAGATTTATGA  
 CTGCAAGGTGGAGCACTGGGGCCTGGACGAGCCTCTTCTGAAACACTGGG

**Figura 3. Secuencia utilizada para el diseño de iniciadores específicos para el haplotipo HLA-DQ2.** Las secuencias de los iniciadores se encuentran en negritas. (GenBank-NM\_002122)

ATGATCCTAAACAAAGCTCTGCTGCTGGGGGCCCTCGCCCTGACTGCCGTGATGAGCCCCTGTG  
 GAG**GGTGAAGACATTGTGGGTGA**GTGCATGAGTGAGGAATGTTCTCTGGAGCTGAAAAACAGTAA  
 ATTTAAAGGAAAAGAAAAGAGTGCAATTTGCTAAGAAATAGTAGAAATTTCCCAAGGGTCTTTTCA  
 ATATTAAGAAATTTTAAAAATTATGGCAGTTCCTCCTTTAGGAAACCAGAGCTCCAACCGACTCT  
 CTTTGCTACCTGTGCTATTGGAGTTTACCAAGGACGTTGTTCTGTTTATATTATATCCAGAGAC  
 TATAGCCTGGAGGTCTGTGTGGCATTCCATCATGATTGCCTCAAAGACTAGGGATGTTTCCATG  
 AATGGAGTATTTTTTTTGTATTAAAAATTTCTGAACTGTTACTCCCAAATTTCTCTGAACAAC  
 TTTGAAGCTTTTCATATGCCCTCTATAGCATATGTTGGGGTAGATAGTTCATGAAGTATGTAC  
 ACTCTATAGATATAAAGAAAGAGGTTCTTTTCTTTCTCTCAGACTTACATTTCCACATGGGAAT  
 TG**GCACAGGTGGGGAGTAGG**TGAAAGAGCCCAGCAGGCTGAATGCCTCAACAATCATTTTACC  
 ACGTGGTAAATGTGGTACTTACTCTCTGCTACCTCATATATGTCACCTCGCTTATGATCAATA  
 AAATGGGCATGTAGATATGCTTTATGAATAGTAAAAACATGAATGTCAACTTTTTTTAACTTAT  
 TCCTATTACAGGTATAACTTCGTATTTTTTTCTTTAGCAAAGTAAGGAATATATTTTAAACTGA  
 GAACTTTATGATAAAATGCTTGGTAAATTAATTATTTTATTCTCAAATGTCAACCCAAATTA  
 CTTGTTCTTCACCTTATCTAATGAAGTCTTATAAAGAGAAAAATGGGCAGGCA

**Figura 4. Secuencia utilizada para el diseño de iniciadores específicos para el haplotipo HLA-DQ8.** Las secuencias de los iniciadores se encuentran como negritas. (GenBank-NM\_2123)

### Secuencia específica de iniciadores

Una vez detectado el fragmento para DQ2 y/o DQ8, se utilizó la secuencia específica de iniciadores para las combinaciones DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201, DQB1\*0302 reportadas por (Olerup *et al.*, 1993). Los detalles de los iniciadores se muestran en la Tabla 2.

### Estandarización de la reacción

Para la identificación de los fragmentos HLA-DQA1\* y HLA-DQB1\*, se optimizaron las cantidades de los componentes de la amplificación: MgCl<sub>2</sub>, buffer 10X PCR y mezcla de dNTPs 2.5 mM. Lo anterior se realizó mediante un

gradiente de temperaturas con el objetivo de identificar la Tm de amplificación para cada par de oligonucleótidos.

Las reacciones de amplificación fueron preparadas conteniendo 2.5 µL de buffer de PCR 1X (Tris-HCL 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 1.0 µL de MgCl<sub>2</sub> 15 mM, 0.5 µL de la mezcla de dNTPs 0.2 mM, 0.4 µM de cada oligonucleótido para las combinaciones DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201 y DQB1\*0302. 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carisbad, CA, USA) y 200 ng de ADN<sub>g</sub>, en un volumen final de 25 µL por reacción. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.8% teñidos con bromuro de etidio (µg/mL) y documentados por una fotografía.

**Tabla 2. Combinaciones HLA-DQ2 y DQ8 susceptibles para EC y sus oligonucleótidos específicos para las reacciones de PCR**

Amplificación Especificidades	Secuencia	Dirección	Tamaño	Haplotipo
HLA-DQ2 General	5' ACCAATGAGGTTTCCTGAGGT3' 5'ACGAAACACCTTCTGTGACTGA3'	Sentido Antisentido	154 pb	HLA-DQ2
HLA-DQ8 General	5'GGTGAAGACATTGTGGGTGA3' 5'CCTACTCCCCACCTGTGC3'	Sentido Antisentido	530 pb	HLA-DQ2
DQB1*0201	5'GACGGAGCGCGTGCGTCT3' 5'CTGTTCCAGTACTCGGCGG3'	Sentido Antisentido	129 pb	HLA-DQ2**
DQB1*0302	5'GACGGAGCGCGTGCGTTA3' 5'AGTACTCGGCGTCAGGCG3'	Sentido Antisentido	122 pb	HLA-DQ8**
DQA1*0301	5'TTCACTCGTCAGCTGACCAT3' 5'CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT3	Sentido Antisentido	183 pb	HLA-DQ8**
DQA1*0501	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTA3' 5'AGTTGGAGCGTTAATCAGAC3'	Sentido Antisentido	186 pb	HLA-DQ2**

\*\* (Ölerup *et al.*, 1993)

### Identificación de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8

Se detectaron fragmentos correspondientes a las combinaciones DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201, DQB1\*0302 que confieren susceptibilidad a EC por

PCR convencional, utilizando oligonucleótidos específicos (IDT-Integrated DNA Technologies, Tucson-AZ, USA). Además se utilizó como gen constitutivo la GAPDH para asegurar que la muestra de ADN estaba íntegra y amplificable. Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando las condiciones óptimas obtenidas de la estandarización para cada reacción.

**Tabla 3. Temperaturas de alineación, extensión y amplificación de los fragmentos HLA-DQ2 y DQ8, además de las combinaciones DQA1\*0501, DQA1\*0201, DQB1\*0201, DQB1\*0302.**

Parámetro	HLA-DQ2	HLA-DQ8	DQA1* 0501	DQA1* 0301	DQB1* 0201	DQB1* 0302
Iniciación	95°C 7 min					
Desnaturalización	95° C 30 seg					
Alineamiento	52° C	60° C	60° C	60° C	52° C	52° C
Elongación	72°C 35 seg					
Ciclos	39	39	39	39	39	39
Elongación final	72° C 5 min					
Conservación	4° C					
Terminación	Fin	Fin	Fin	Fin	Fin	Fin

### Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron visualizada por electroforesis en gel de agarosa al 1.8%, preteñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). La separación se hizo durante 1.5 h a 90 V en buffer TBE (89 mM Tris base/89 mM, ácido bórico 2 mM EDTA, pH 8.0). Los geles fueron examinados bajo rayos UV y documentados por medio de una fotografía (Olerup *et al.*, 1993).

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron evaluados por medio de estadística descriptiva para la prevalencia de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8.

### **Consideraciones éticas**

La investigación se realizó de acuerdo a lo estipulado en la Ley General de Salud (Título Quinto, investigación para la salud) artículo 100. Además esta investigación es básicamente de tipo descriptivo, por tal motivo se considera de un riesgo bajo a la integridad del individuo estudiado.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Población de estudio**

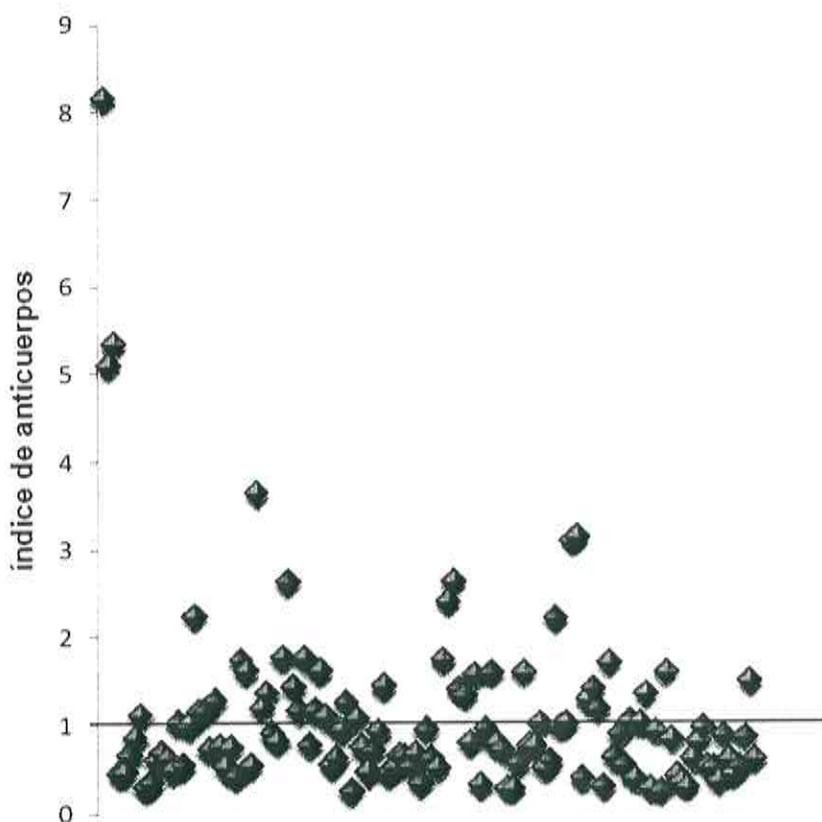
De agosto a noviembre de 2008 y de febrero a abril de 2009, se analizaron 354 muestras de sangre colectadas del HIES. Las muestras provenían de niños a los que se les practicaron análisis de sangre por diversas patologías. Del total de muestras, se seleccionaron 124 tanto con índices de anticuerpos positivos, al menos en IgG anti-gliadinas; así como con índices menores de 1 (negativos), para la identificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8. La media de edad de los niños que aportaron las 124 muestras, fue de  $8.55 \pm 5.41$  años. El 52.4% de ellos pertenecía al sexo femenino y el 47.6% restante al sexo masculino. Todos los sujetos fueron mexicanos, la mayoría originarios de Hermosillo y los demás de las diferentes ciudades y municipios del Estado de Sonora.

### **Pruebas serológicas**

En esta tesis, se presentan sólo los resultados de las 124 muestras antes descritas como población de estudio para el análisis de haplotipos. Éstas, como se comentó, fueron previamente analizadas para anticuerpos IgG anti-Gd, IgA anti-Gd e IgA anti-TG, en el Laboratorio de Proteínas de la Coordinación de Nutrición de CIAD.

La Fig. 5 muestra la distribución de índices de anticuerpos promedio obtenida en los sueros de 124 niños en el ensayo ELISA para anticuerpos IgG anti-gliadinas. Los resultados para los anticuerpos IgG anti-gliadinas mostraron que 45 sueros (36.3%) presentaron índices positivos con valores superiores al punto de corte (media de  $\sim 20$  controles negativos + 2 DE).

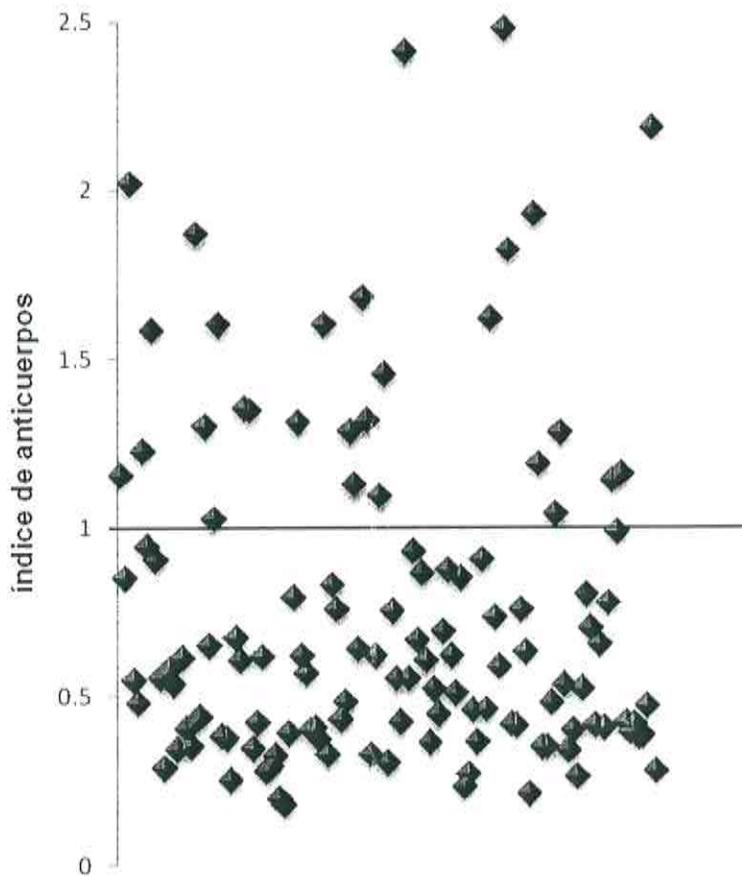
El porcentaje de sueros positivos a IgG anti-Gd de 35.7% no es representativo de la población general, ya que los pacientes de este estudio fueron preseleccionados por conveniencia. De cualquier forma, si se considera que 45 de 354 muestras fueron positivas, un 12.7% es un porcentaje muy alto. Sin embargo, IgG anti-Gd no es el mejor indicador serológico de EC, su especificidad es del 66% (Vilppula *et al.*, 2009). En la población de estudio, son frecuentes las infecciones gastrointestinales, que inducen producción de anticuerpos IgG contra diversas proteínas (Saravanan *et al.*, 2009). Por esto, la mayoría de las muestras positivas presentaron índices bajos (valores entre 1 y 5) y solo tres mostraron índices moderados (entre 5 y 10).



**Figura 5. Distribución de los índices de anticuerpos IgG anti-gliadinas en suero de niños atendidos en el HIES.**

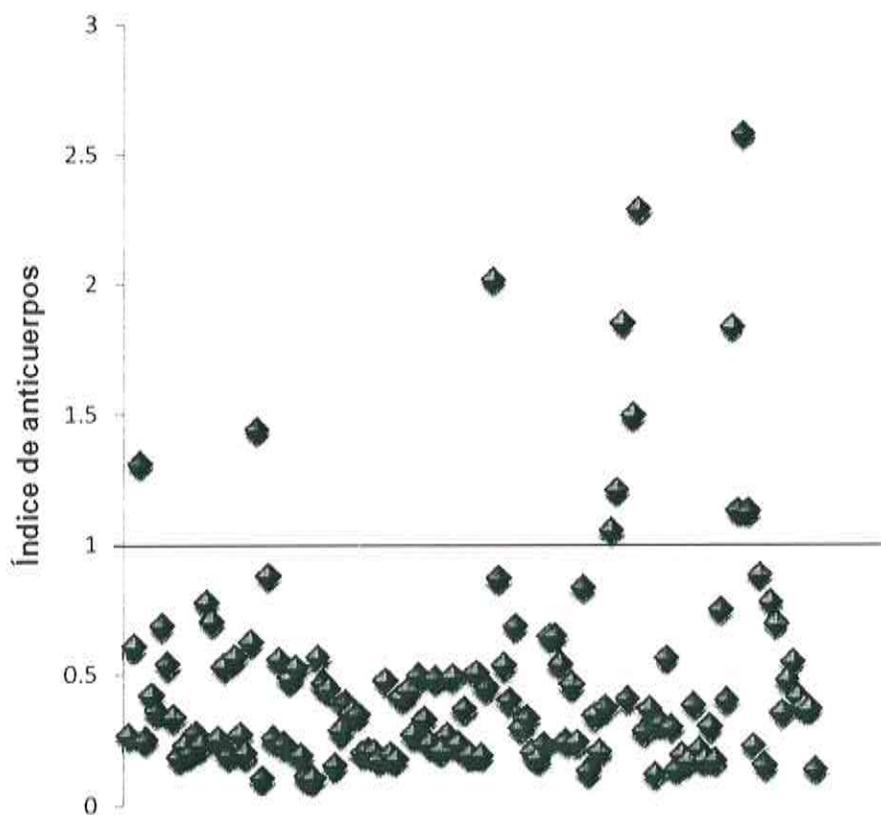
En la Fig. 6, se puede observar que para los anticuerpos IgA anti-Gd, 29 sueros (23.3%) presentaron índices positivos o superiores punto de corte (media de ~20 controles negativos + 2 DE).

Los anticuerpos IgA anti-Gd, son mucho más específicos (90%), aunque su sensibilidad es más baja (82%) que los IgG anti-Gd, para EC (Vilppula et al., 2009). El porcentaje de positividad de estos anticuerpos en la población total (354), sería de 8.1%, lo cual parece aun alto. Aunque este tipo de análisis se usa en estudios epidemiológicos de EC (Hadithi *et al.*, 2007), es más real en niños pequeños (Vader *et al.*, 2002; Stenberg *et al.*, 2009). En este estudio, 45 de los 124 niños tenían entre 0 y 6 años de edad.



**Figura 6. Distribución de los índices de anticuerpos IgA anti-gliadinas en suero de niños atendidos en el HIES.**

La Fig. 7 muestra los resultados para IgA anti-TG de los 124 sueros preseleccionados, provenientes de niños que asisten al HIES. Los resultados muestran que 12 sueros (9.6%) obtuvieron índices positivos o superiores al punto de corte (media de ~20 controles negativos + 2 DE). Si se considera a toda la población analizada (354 muestras), el 3.3% tendría este indicador positivo.



**Figura 7. Distribución de los índices de anticuerpos IgA anti-TG en suero de niños atendidos en el HIES.**

Es de hacer notar que los anticuerpos IgA anti-TG también se elevan en casos de hepatitis tipo B, y enfermedades asociadas como son: enfermedad de Crohn, diabetes mellitus tipo I y dermatitis herpetiforme, entre las más destacadas (Bonamico *et al.*, 1997; Lampasona *et al.*, 1999; Karpati, 2004). No se tienen aun los datos de sintomatología y diagnóstico completo de los casos estudiados, por lo que no se pueden hacer inferencias en este sentido.

Para IgA anti-TG, también se observó que 2 de los niños que presentaron niveles altos de anticuerpos IgA anti-TG, se encontraban por debajo de los 3 años de edad. En muchos casos, en los niños celíacos pequeños no se elevan los índices de este tipo de anticuerpos, por lo que no es el mejor indicador en esta etapa (Skovbjerg *et al.*, 2004).

Remes-Troche *et al.* (2006), analizaron anticuerpos IgA anti-TG en poco más de 1000 muestras de suero de adultos mexicanos sanos, donadores de sangre. Encontraron una prevalencia inesperadamente alta de 2.6%; sin embargo, el 3.7% encontrada en la población de niños del HIES que se estudió en el presente trabajo, es aún más alta. Esto, puede deberse a que se trata de una población de niños con alguna patología, lo que por una parte implica mayor probabilidad de cualquier enfermedad, incluida la celíaca. Además, algunos casos pudieran sufrir otras enfermedades en donde se eleva el nivel de anti-TG, como las antes comentadas, aunque es una prueba que se considera muy sensible y específica para adultos con EC (Hashemi *et al.*, 2008; Vilppula *et al.*, 2009).

De los 124 sueros de la población analizados, 2 resultaron deficientes de anticuerpos IgA, lo cual es más común en pacientes celíacos que en la población general. Consecuentemente en esos casos no se pudo medir anticuerpos IgA anti-TG e IgA anti-Gd; por tanto, fue de utilidad la medición de anticuerpos IgG anti-Gd, como se ha determinado para otras poblaciones (Di Sabatino y Corazza, 2009).

Comúnmente los niños que asisten al HIES son llevados porque sufren alguna patología, ya que normalmente no los llevan a revisiones periódicas. De esta manera, el uso de marcadores serológicos como método de rastreo para EC, revela que puede haber celíacos con grados variables de enteropatía. En ellos los síntomas digestivos pueden ser nulos, poco prominentes o bien, puede haber francas manifestaciones intestinales. Como en el presente estudio, en otros trabajos se han usado los marcadores serológicos para detectar pacientes con sospecha de EC (West *et al.*, 2003). Lurz *et al.* (2009), evaluaron (entre los años 2001 y 2006), a 206 escolares con síntomas relativamente leves de EC, por medio de biopsia intestinal e IgA anti-TG. Se diagnosticaron como celíacos a 95 de los 206 pacientes y 72 de los 95, presentaron títulos positivos de IgA anti-TG (Lurz *et al.*, 2009).

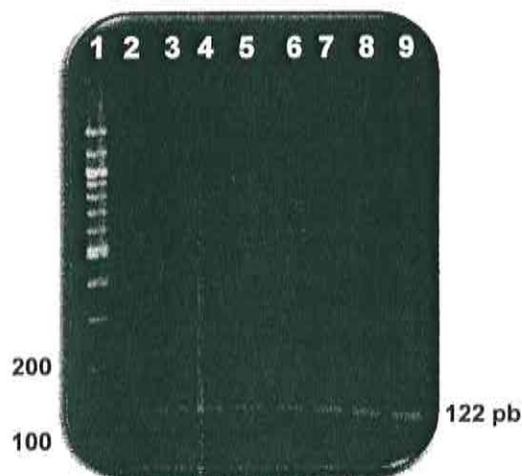
Los datos obtenidos como un primer acercamiento exploratorio en la búsqueda de prevalencia de EC a partir de marcadores serológicos, podrían representar la mejor aproximación en la población estudiada, la de niños sonorenses que se atienden en el HIES. El único estudio de población mexicana antes citado (Remes-Troche *et al.*, 2006), en donde solo se consideraron anticuerpos anti-TG, indica que la EC puede ser igual de alta que en países europeos. Así, la caracterización de haplotipos se hace necesaria e importante para complementar la información.

### **Optimización de la reacción de PCR e identificación de HLA-DQ2 y/o DQ8**

La estandarización de las condiciones de amplificación se realizó a partir de sangre de pacientes con títulos altos para los marcadores serológicos de EC, IgA e IgG anti-Gd, así como IgA anti-TG. A partir de dichas muestras se realizó un barrido de temperaturas de 50°C a 64°C para cada uno de los juegos de iniciadores, con el fin de obtener la T<sub>m</sub> óptima de amplificación para los

fragmentos HLA-DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201 y DQB1\*0302. Las reacciones se probaron de manera sencilla, doble e incluso triple para alguno de los casos, para confirmar la presencia del fragmento.

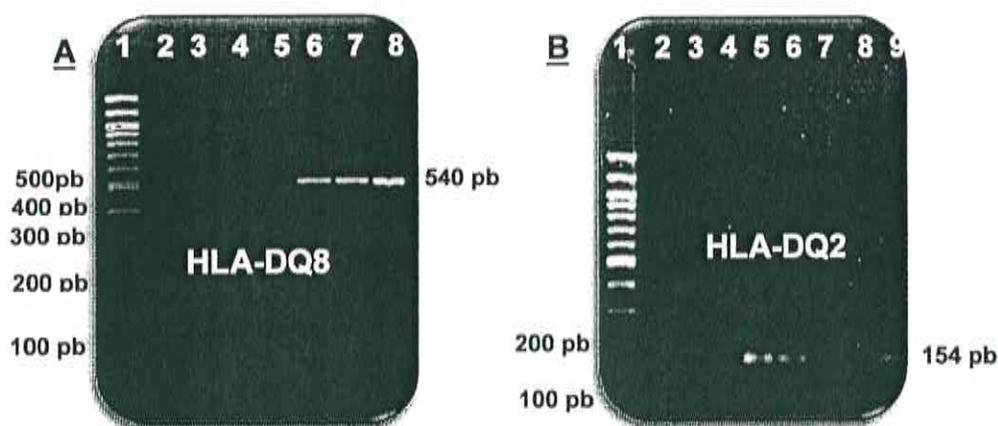
Durante los ensayos preliminares de amplificación se detectó la presencia de los fragmentos con las bandas más intensas y definidas que permitieran localizar el fragmento de interés. A partir del barrido de temperaturas se obtuvieron bandas únicas de cada uno de los fragmentos, esto indicaba la especificidad de los iniciadores, demostrando con ello que no se unían con secuencias inespecíficas. Por otro lado la intensidad en las bandas sin barridos indicaron la  $T_m$  óptima para cada iniciador. La Fig. 8 presenta el producto de PCR de 122 pb para la combinación DQB1\*0201 que codifica para el haplotipo DQ2. Se realizó un barrido de temperaturas en un rango de 50 a 60°C que mostrara la mejor banda para el producto esperado. Al término del barrido se encontró que la  $T_m$  óptima para el fragmento DQB1\*0201 fue de 52°C debido a que era la más intensa, además de que no presentaba barridos ni bandas inespecíficas, como las que se presentaron a partir de los 56.2°C (Fig. 8, carril 5).



**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% para la optimización de la reacción del fragmento HLA-DQB1\*0201.** Carril 1: Marcador ADN 100 pb, 2: 50°C, 3: 52.1°C, 4: 54°C, 5: 56.2°C, 6: 58°C, 7: 59.3°C, 8: 60°C, 9: 62°C. Muestra ADNg paciente HIES.

## Identificación de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8

En esta tesis el análisis incluyó como fase primaria la detección de los haplotipos a partir de los oligonucleótidos diseñados dentro de nuestro propio estudio, buscando detectar los fragmentos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 de manera general. Así, existía la seguridad de obtener el haplotipo al que pertenecía cada muestra. En la Figura 9 A y B se muestran los productos de PCR de los fragmentos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 respectivamente para la detección general. Los productos de PCR esperados para DQ8 eran de 540 pb y de 154 pb para DQ2. Con esto se podía asegurar que las muestras analizadas para este estudio presentaban los haplotipos HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8, en dos reacciones en lugar de correr cinco reacciones independientes. En la misma Fig. 9 se resalta la intensidad de la banda esperada para algunas de las muestras que previamente se sabía eran positivas por el análisis con los iniciadores diseñados por otros autores (Tabla 2).



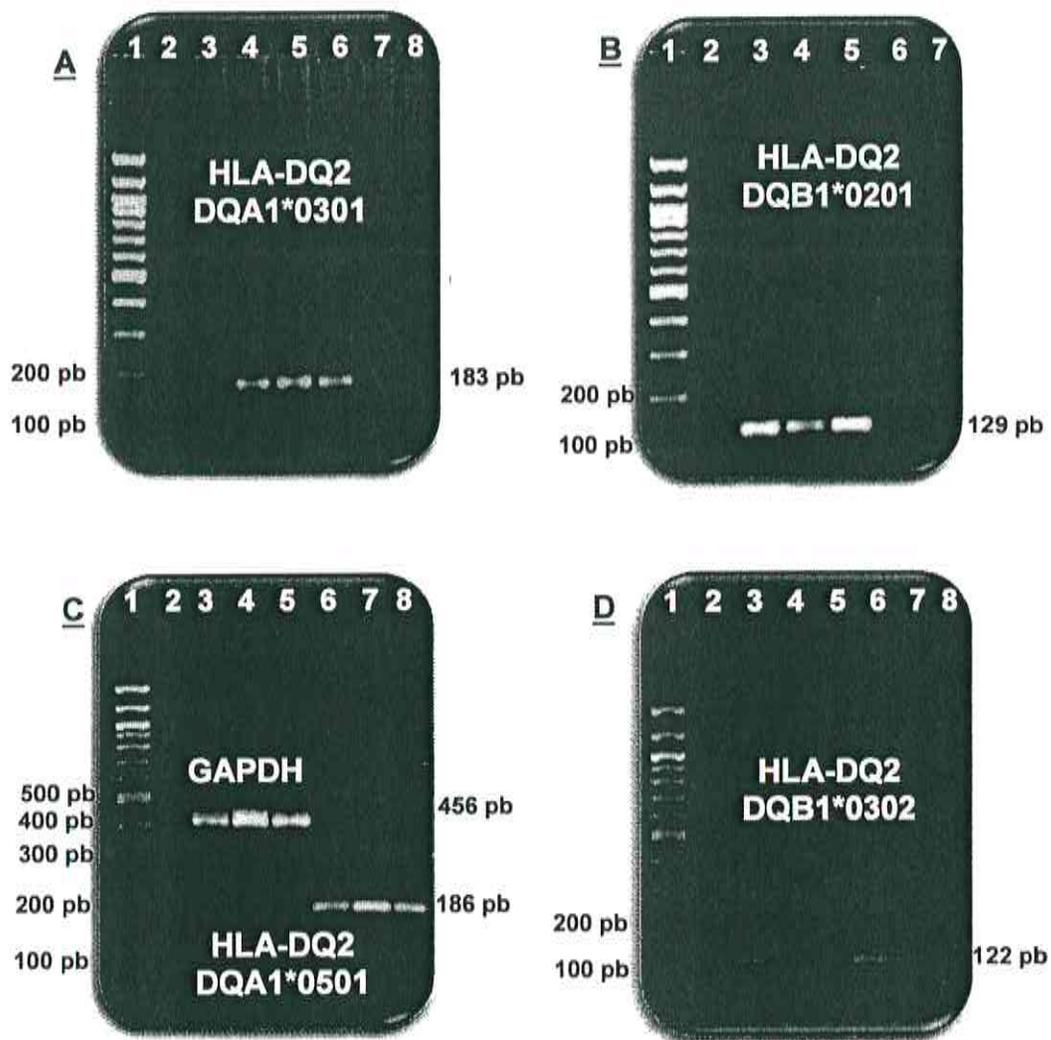
**Figura 9. Detección por PCR convencional de los fragmentos A) HLA-DQ8 y B) HLA-DQ2 de diferentes muestras de sangre.** (A) HLA-DQ8. Carril 1: Marcador de tamaño 100 pb, 2: Control negativo, 3-7 muestras analizadas con iniciadores ya publicados para HLA-DQ8, 8: Control positivo. (B) HLA-DQ2. Carril 1: Marcador de tamaño 100 pb, 2: Control negativo, 3-8: Muestras analizadas con iniciadores ya publicados para HLA-DQ2, 9: Control positivo.

Tomando en consideración que las bandas detectadas en los geles de agarosa fueron lo suficientemente claras, se concluyó que los iniciadores diseñados eran específicos para la detección de haplotipos DQ2 y DQ8.

### **Detección de las combinaciones HLA-DQA1\*0501, DQA1\*0301 y DQB1\*0201 y DQB1\*0302**

Una vez detectados en general los haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8, se procedió a identificar la combinación a la que pertenecía cada muestra. Esto con la finalidad de obtener así los datos de prevalencia de las combinaciones. La Figura 10 muestra la identificación de las diferentes combinaciones que presentan susceptibilidad para EC. Se obtuvieron fragmentos de 180 pb para HLA-DQA1\*0501, de 183 pb para DQA1\*0301 y de 129 pb para DQB1\*0201, que corresponden a las combinaciones recomendadas para evaluar la asociación con el genotipo HLA en la EC (Reinton *et al.*, 2006).

La Tabla 4 muestra el número de casos positivos para los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8. El mayor número de casos (38 de 85 positivos) fueron portadores del haplotipo HLA-DQ2. La menor proporción (20 de 85 positivos) estuvo dada por el haplotipo HLA-DQ8. Un resultado interesante del presente estudio es que 27 de 85 positivos fueron portadores de ambos haplotipos DQ2 y DQ8. Lo anterior quizás sea debido a que la población de estudio es mestiza conformada principalmente por orígenes ancestrales amerindios y europeos (Seguin *et al.*, 2008). De acuerdo a diversos autores (Kaukinen *et al.*, 2002; Hadithi *et al.*, 2007) sólo la tipificación de los haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 es clínicamente relevante para EC. El papel principal de estas moléculas radica en el alto valor predictivo para excluir EC, vislumbrando información adicional que es de gran utilidad en la práctica clínica



**Figura 10. Productos de amplificación por PCR convencional de los alelos DQA1\* y DQB1\*.** (A) Carril 1: Marcador 100 pb, 2: Ctlol. Neg., 3-8: DQA1\*0301, (B) Carril 1: Marcador 100 pb, 2: Ctlol. Neg., 3-7: DQB1\*0201, (C) Carril 1: Marcador 100 pb, 2: Ctlol. Neg., 3-5: GAPDH, 6-8: DQA1\*0501. (D) Carril 1: Marcador 100 pb, 2: Ctlol. Neg., 3-8: DQB1\*0302.

**Tabla 4. Haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 y combinaciones DQA1 y DQB1 en niños sonorenses que acuden al HIES.**

Haplotipos HLA	No. de positivos	Combinación de alelos
DQ2	38	DQA1*0501 ó DQB1*0201
DQ8	20	DQA1*0301 ó 0302
DQ2 y DQ8	27	DQA1*0501, DQB1*0201, DQA1*0301 y DQB1*0302
Negativos	39	Todas las combinaciones
<b>Total</b>	124	

Diversos autores han tipificado los haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 en diferentes poblaciones alrededor del mundo. Megiorni et al. (2009), tipificó los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, a pacientes celíacos de Italia. El 91% eran portadores del haplotipo HLA-DQ2, que es el de mayor prevalencia (90-95%) en las poblaciones celíacas de Europa (Louka y Sollid, 2003), mientras que una menor proporción presentó el haplotipo HLA-DQ8, que es entre el 5 y 10% en los celíacos europeos. En el grupo control del mismo estudio, solo el 21% fue portador de DQ2 (Megiorni *et al.*, 2009). En el norte de Europa los pacientes celíacos normalmente son portadores del haplotipo DQ2 en la forma *cis* 0201/0501, mientras que en el sureste europeo es más común en su forma *trans* 0301/0501 (Dubois y van Heel, 2008).

En la población sonorense del presente estudio, con haplotipos de predisposición a la EC, la proporción de DQ2 positivos al menos en un alelo fue 76.5%, lo cual pareciera acercarse al 90-95% de los celíacos europeos. Sin embargo, un 31.8% presenta combinación de alelos HLA-DQ2/DQ8; además de

un 23.5% con ambos alelos en DQ8. Así, las proporciones de haplotipos de predisposición en los niños sonorenses, se asemejan más a las de los chilenos (Perez-Bravo *et al.*, 1999), como se puede ver en la Tabla 5.

En países como Cuba y Argentina se cuenta con datos para pacientes celíacos, donde la proporción de haplotipos que predisponen a EC difiere. Para los celíacos cubanos, la presencia del haplotipo HLA-DQ2 es la de mayor proporción (86.3%). Sin embargo, en esa investigación no se evaluaron combinaciones que codificaran para DQ8, ya que los autores solo identificaron la presencia de las combinaciones DQA1\*0501 y DQB1\*0201, que codifican para DQ2 (Cintado *et al.*, 2006). En cuanto a los enfermos celíacos de Argentina, según datos publicados por Herrera *et al.* (1994), hay una prevalencia del 95% para el haplotipo DQ2 identificado por las combinaciones DQA1\*0501, DQB1\*0201 y solo el 5% para DQ8 identificado por DQB1\*0302, 0401 y DQA1\*0301 (Herrera *et al.*, 1994), estos datos también se pueden ver en la Tabla 5.

Además, si se compara la población estudiada en esta investigación, con la de un estudio chileno (Araya *et al.*, 2000), la proporción de combinaciones para los haplotipos HLA-DQ2 es mayor en la población sonorense pero no por mucho (44.8% vs 37.1%). El estudio genético de los chilenos con EC reveló una proporción alta de las combinaciones que codifican para DQ8, asociada directamente con el genotipo mapuche-europeo de la población (Perez-Bravo *et al.*, 1999).

Los resultados de haplotipos de este estudio, permiten hacer algunas observaciones sobre las características genéticas de la población. Recientemente se publicó un estudio sobre la contribución de genes europeos, amerindios, euroasiáticos y africanos, en algunas poblaciones de México (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009). Una de éstas es la población sonorense, que de acuerdo al estudio, tiene una contribución alta de genes europeos (61.6%) y baja de amerindios (36.2%), en comparación con otras poblaciones mexicanas. El

haplotipo HLA-DQ2 es el más común en los celíacos europeos y no es de extrañar entonces, que la población sonoreense presente al menos un alelo de ese haplotipo en una proporción alta (76.5 %). Esto, sin dejar de considerar un 55.2% con al menos un alelo en DQ8, como se muestra en la tabla 5.

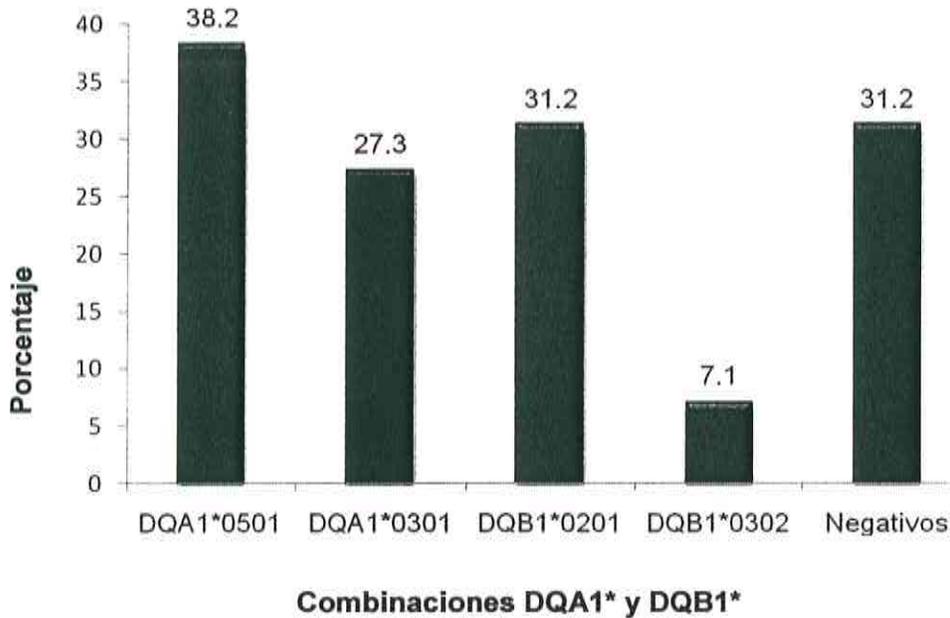
**Tabla 5. Distribución de los haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8 en niños sonorenses del HIES comparado con poblaciones del mundo con EC**

Autor	Año	País	Número pacientes	% DQ2	% DQ8	% DQ2 y DQ8
<b>Hadithi</b>	2001	Holanda	22	88	6	6
<b>Fasano</b>	2003	EUA	98	83.7	16.3	n/a
<b>Herrera</b>	1994	Argentina	55	95	5	n/a
<b>Cintado</b>	2006	Cuba	22	86.3	n/a	n/a
<b>Pérez-Bravo</b>	1999	Chile	62	37.1	25.8	37.1
<b>Este estudio</b>	2009	México	85	44.8	23.5	31.7

Por otro lado, también es importante mencionar que aún en un mismo país los genotipos tienen variaciones muy amplias. Así en población general del norte de la India, la prevalencia de HLA-DQ2 y DQ8 se estima en 9.9 y 15.6%, respectivamente; mientras que en el sur, varían entre 6 y 5%. En los países asiáticos la epidemiología de enfermedad celíaca es desconocida, por lo que no se ha estudiado la prevalencia de haplotipos ligados (Louka y Sollid, 2003).

La Figura 11 muestra la distribución de los alelos DQA1\* y DQB1\* de las 124 muestras de ADNg obtenidas a partir de sangre completa de los niños que acuden al HIES. La distribución mostró una mayor frecuencia para la combinación DQA1\*0501 con un 38.2%, seguida de la combinación DQB1\*0201

con 31.2%, DQA1\*0301 con 27.3% y DQB1\*0302 con 7.1% de frecuencia. Además, el 31.2% no presentó ninguna de las combinaciones para HLA-DQ2 y/o DQ8.



**Figura 11. Distribución de las combinaciones HLA-DQA1\* y HLA-DQB1\* en niños sonorenses con sospecha de EC.**

### **Marcadores serológicos y haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, riesgo para el desarrollo de la enfermedad celiaca**

En esta tesis se evaluaron haplotipos, que en conjunto con los anticuerpos, son componentes involucrados directamente en la EC. Los marcadores serológicos son una herramienta exploratoria en pacientes sospechosos de EC. Por su parte, los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 son el factor genético de mayor riesgo para EC. Para la IgA anti-Gd, 29 casos obtuvieron índices positivos y una mayor frecuencia del haplotipo DQ2 comparado con DQ8 (Tabla 6). El índice de

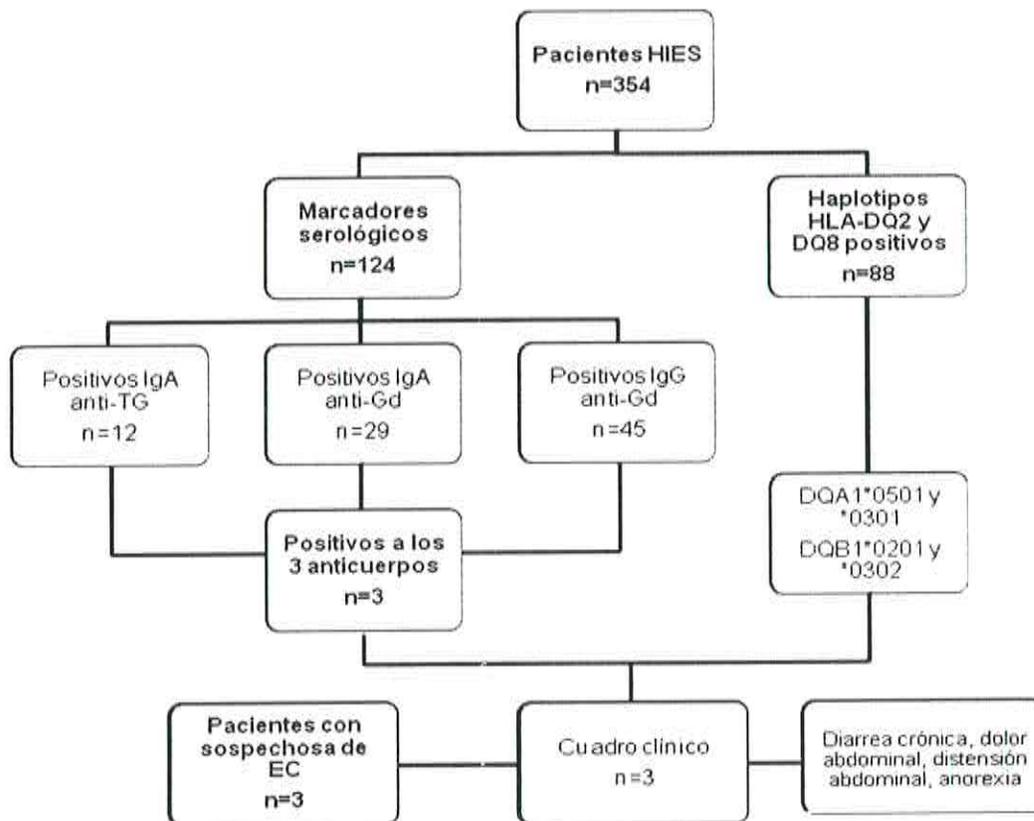
anticuerpos IgA anti-TG que es el más específico y sensible para EC, mostró 12 pacientes positivos, dos de ellos presentaron HLA-DQ2 y uno DQ8. IgG anti-Gd, el indicador con menos especificidad en EC, mostró a 45 sujetos con índices positivos. De éstos, 18 fueron portadores de DQ2 seguidos de 8 con ambos haplotipos y 7 con DQ8. La Tabla 6 muestra el número total de niños cuyos sueros presentaron índices positivos y negativos de IgA anti-Gd, IgA anti-TG e IgG-Gd, además de los haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8.

**Tabla 6. Marcadores serológicos positivos y haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8 en niños sonorenses atendidos en el HIES.**

Marcadores Serológicos	Número de niños	Haplotipos HLA-DQ			
		DQ2	DQ8	DQ2/DQ8	Sin DQ2 ni DQ8
<b>IgA anti-Gd</b>					
+ positivos	29	10	1	8	10
- negativos	95	28	19	19	29
<b>IgA anti-TG</b>					
+ positivos	12	2	1	0	9
- negativos	112	36	19	27	39
<b>IgG anti-Gd</b>					
+ positivos	45	18	7	8	12
- negativos	79	20	13	19	27

Los resultados anteriores son interesantes debido a la asociación de estos indicadores con el desarrollo de EC, como lo muestran diversos estudios. Hadithi (2007), evaluó el valor predictivo de los marcadores serológicos IgA anti-TG e IgA anti-EMA, la tipificación de HLA-DQ y la relación de signos y síntomas para el diagnóstico de EC. De 452 sujetos que participaron en esa investigación, el 3.46% presentó resultados positivos para EC.

El objetivo final de esta tesis fue identificar sujetos potencialmente en riesgo de EC. La Figura 12 muestra al total de sueros analizados para marcadores serológicos, el número de pacientes positivos para haplotipos DQ2 y DQ8 y el número total de pacientes con valor positivo para a IgA anti-Gd, IgA anti-TG e IgG anti-Gd y HLA-DQ2 y/o DQ8. Además se presenta el cuadro clínico de los 3 pacientes con posible EC. De los 124 pacientes analizados, 3 (2.4%) presentaron índices positivos para los 3 tipos de anticuerpos analizados una o dos de las combinaciones que codifican para DQ2 y/o DQ8.



**Figura 12. Relación marcadores serológicos-haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 en niños sonorenses con sospecha de EC.**

No se descarta que alguno de los niños con solo dos o incluso un índice de anticuerpos positivos y que hubiera presentado los haplotipos, sufriera de EC. Sin embargo, respetando el criterio de todos los indicadores de EC positivos, aunque no se tiene análisis de biopsia, tres de los niños, el 2.4% de la población estudiada, sería celiaca. Esto significa una prevalencia alta con respecto al 1-2% de cualquier población (Fasano *et al.*, 2003; West *et al.*, 2003). Sin embargo, es importante considerar que la población de estudio no es una población general, sino una población intrahospitalaria y que está bajo sospecha de alguna patología. Así, el 2.4% puede ser un dato claro de lo que pasa en esta población de estudio.

Cada día va en aumento el número de diagnosticados con EC, mientras que hasta hace poco años, se consideraba una enfermedad poco común. Lo más importante dentro de todo, es un diagnóstico temprano, que permita aplicar un tratamiento que brinde a los niños la posibilidad de crecer y desarrollarse en forma adecuada. En muchos casos, quizá la mayoría, el diagnóstico de EC no se da por desconocimiento (Fowell *et al.*, 2006).

En México, el conocimiento sobre la EC es limitado, existen pocos estudios que evalúan la prevalencia de la enfermedad, con datos en población mestiza-mexicana que sugieren a la EC como una patología común (Remes-Troche *et al.*, 2006; Remes-Troche *et al.*, 2008). Los datos de esta tesis, de 3 (2.4%) sujetos, fueron obtenidos a partir del análisis de más y mejores indicadores relacionados al desencadenamiento de la EC. Los portadores de los haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8 conllevan un riesgo genético muy fuerte para el desarrollo de EC; si además presentan títulos positivos para los anticuerpos IgA anti-Gd, IgA-TG e IgG-Gd, así como la sintomatología típica, se podrían considerar celíacos. Con la publicación reciente del mapa de haplotipos de la población mestiza mexicana reflejo de la genética de la población de estudio, se pueden inferir los beneficios en la identificación de los genes relacionados con la EC, de acuerdo a su ascendencia (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009).

## CONCLUSIÓN

Los haplotipos predominantes en la población de niños sonorenses que acuden al HIES fueron los HLA-DQ2 con 44.8%, seguidos de la combinación DQ2/DQ8 con 31.7% y 23.5% con DQ8, con una mayor frecuencia del alelo DQA1\*0501 (38.2%). Lo anterior revela las características genóticas de la población de estudio, con predominancia de rasgos europeos sobre los amerindios. En conjunto con los marcadores serológicos IgA anti-TG, IgA anti-Gd e IgG anti-Gd y los síntomas clínicos, los haplotipos tipificados fueron útiles para tipificar la EC en 2.4% de 124 niños, con una certeza muy próxima al diagnóstico. Los resultados, permiten dimensionar la importancia de la tipificación de HLA-DQ2 y DQ8 y los marcadores serológicos, en la detección de individuos con o en riesgo de desarrollar EC.

## REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A y Pober J (2002) *Inmunología celular y molecular*, Cuarta edición ed: Mc Graw Hill e Interamericana.
- Alaedini A y Green PH (2005) Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med* **142**, 289-298.
- Araya M, Mondragon A, Perez-Bravo F, Roessler JL, Alarcon T, Rios G y Bergenfreid C (2000) Celiac disease in a Chilean population carrying Amerindian traits. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **31**, 381-386.
- Arifeen N, Wang R, Kookos I, Webb C y Koutinas AA (2007) Optimization and cost estimation of novel wheat biorefining for continuous production of fermentation feedstock. *Biotechnol Prog* **23**, 872-880.
- Balladares S, Alaez C, Pujol J, Duran C, Navarro JL y Gorodezky C (2002) Distribution of TAP gene polymorphisms and extended MHC haplotypes in Mexican Mestizos and in Seri Indians from northwest Mexico. *Genes Immun* **3**, 78-85.
- Barera G, Beccio S, Proverbio MC y Mora S (2004) Longitudinal changes in bone metabolism and bone mineral content in children with celiac disease during consumption of a gluten-free diet. *Am J Clin Nutr* **79**, 148-154.
- Bhatnagar S y Tandon N (2006) Diagnosis of celiac disease. *Indian J Pediatr* **73**, 703-709.
- Bilbao JR, Martin-Pagola A, Vitoria JC, Zubillaga P, Ortiz L y Castano L (2002) HLA-DRB1 and MHC class 1 chain-related A haplotypes in Basque families with celiac disease. *Tissue Antigens* **60**, 71-76.
- Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P y Sasazuki T (1994) Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens* **44**, 1-18.
- Bolognesi E, Karell K, Percopo S, Coto I, Greco L, Mantovani V, Suoraniemi E, Partanen J, Mustalahti K, Maki M y Momigliano-Richiardi P (2003) Additional factor in some HLA DR3/DQ2 haplotypes confers a fourfold increased genetic risk of celiac disease. *Tissue Antigens* **61**, 308-316.
- Bonamico M, Ballati G, Mariani P, Latini M, Triglione P, Rana I, Porro E, Mesturino MA y Criscione S (1997) Screening for coeliac disease: the meaning of low titers of anti-gliadin antibodies (AGA) in non-coeliac children. *Eur J Epidemiol* **13**, 55-59.
- Broide E, Sandbank J, Scapa E, Kimchi NA, Shapiro M y Lerner A (2007) The immunohistochemistry profile of lymphocytic gastritis in celiac disease and helicobacter pylori infection: interplay between infection and inflammation. *Mediators Inflamm* **2007**, 81838.
- Cabrera-Chavez F, Rouzaud-Sandez O, Sotelo-Cruz N y Calderon de la Barca AM (2008) Transglutaminase treatment of wheat and maize prolamins of bread increases the serum IgA reactivity of celiac disease patients. *J Agric Food Chem* **56**, 1387-1391.

- Cabrera-Chavez F, Rouzaud-Sandez O, Sotelo-Cruz N y Calderon de la Barca AM (2009) Bovine milk caseins and transglutaminase-treated cereal prolamins are differentially recognized by IgA of celiac disease patients according to their age. *J Agric Food Chem* **57**, 3754-3759.
- Caire G, Casanueva E, De Regil LM, Bolanos A y Calderon de la Barca AM (2004) Nutritional status of exclusively breastfeeding adolescents from northwest and central Mexico. *Adv Exp Med Biol* **554**, 337-339.
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A y Corazza GR (2005) The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* **140**, 408-416.
- Cintado A, Sorell L, Galvan JA, Martinez L, Castaneda C, Fragoso T, Camacho H, Ferrer A, Companioni O, Benitez J, Nazabal M, Novoa LI y Duenas M (2006) HLA DQA1\*0501 and DQB1\*02 in Cuban celiac patients. *Hum Immunol* **67**, 639-642.
- D'Amico MA, Holmes J, Stavropoulos SN, Frederick M, Levy J, DeFelice AR, Kazlow PG y Green PH (2005) Presentation of pediatric celiac disease in the United States: prominent effect of breastfeeding. *Clin Pediatr (Phila)* **44**, 249-258.
- Dehghani SM y Asadi-Pooya AA (2008) Celiac disease in children with short stature. *Indian J Pediatr* **75**, 131-133.
- Deja G, Myrda A, Jarosz-Chobot P y Siekiera U (2008) The assessment of autoimmunological status and prevalence of different forms of celiac disease among children with type 1 diabetes mellitus and celiac disease. *Mediators Inflamm* **2008**, 285989.
- Di Sabatino A y Corazza GR (2009) Coeliac disease. *Lancet* **373**, 1480-1493.
- Doolan A, Donaghue K, Fairchild J, Wong M y Williams AJ (2005) Use of HLA typing in diagnosing celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **28**, 806-809.
- Dubois PC y van Heel DA (2008) Translational mini-review series on the immunogenetics of gut disease: immunogenetics of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* **153**, 162-173.
- Farrell RJ y Kelly CP (2002) Celiac sprue. *N Engl J Med* **346**, 180-188.
- Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA y Horvath K (2003) Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* **163**, 286-292.
- Fowell AJ, Thomas PW, Surgenor SL y Snook JA (2006) The epidemiology of coeliac disease in East Dorset 1993-2002: an assessment of the 'coeliac iceberg', and preliminary evidence of case clustering. *Qjm* **99**, 453-460.
- Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S, Castelletto R, Echeverria R, Sugai E, Vazquez H, Maurino E y Bai JC (2001) Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* **96**, 2700-2704.
- Green PH y Cellier C (2007) Celiac disease. *N Engl J Med* **357**, 1731-1743.

- Green PH y Jabri B (2006) Celiac disease. *Annu Rev Med* **57**, 207-221.
- Hadithi M, von Blomberg BM, Crusius JB, Bloemena E, Kostense PJ, Meijer JW, Mulder CJ, Stehouwer CD y Pena AS (2007) Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med* **147**, 294-302.
- Hashemi J, Hajjani E, Shahbazin HB, Masjedizadeh R y Ghasemi N (2008) Prevalence of celiac disease in Iranian children with idiopathic short stature. *World J Gastroenterol* **14**, 7376-7380.
- Heredia PC, Castro PF y Palma HJ (2007) [Adult celiac disease]. *Rev Med Chil* **135**, 1186-1194.
- Herrera M, Theiler G, Augustovski F, Chertkoff L, Fainboim L, DeRosa S, Cowan EP y Satz ML (1994) Molecular characterization of HLA class II genes in celiac disease patients of Latin American Caucasian origin. *Tissue Antigens* **43**, 83-87.
- Hidalgo-Miranda A, Silva-Zolezzi I y Barrientos-Rangel E (2006) Proyecto: mapa genómico de los mexicanos. *Ciencia y desarrollo* **32(191)**, 32-52.
- Hurtado-Valenzuela JG, Sotelo-Cruz N, Lopez-Cervantes G y de la Barca AM (2008) Tetany caused by chronic diarrhea in a child with celiac disease: A case report. *Cases J* **1**, 176.
- Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H y Persson LA (2002) Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr* **75**, 914-921.
- James H (2008) Adult autoimmune enteropathy *World J Gastroenterol* **2008 14(8)**, 1156-1158.
- Karpati S (2004) Dermatitis herpetiformis: close to unravelling a disease. *J Dermatol Sci* **34**, 83-90.
- Kaukinen K, Partanen J, Maki M y Collin P (2002) HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol* **97**, 695-699.
- Lagerqvist C, Ivarsson A, Juto P, Persson LA y Hernell O (2001) Screening for adult coeliac disease - which serological marker(s) to use? *J Intern Med* **250**, 241-248.
- Lampasona V, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Venerando A, Chiumello G, Bosi E y Bonifacio E (1999) Antibodies to tissue transglutaminase C in type I diabetes. *Diabetologia* **42**, 1195-1198.
- Leal CA, Mendoza-Carrera F, Rivas F, Rodriguez-Reynoso S y Portilla-de Buen E (2005) HLA-A and HLA-B allele frequencies in a mestizo population from Guadalajara, Mexico, determined by sequence-based typing. *Tissue Antigens* **66**, 666-673.
- Lochman I, Martis P, Burlingame RW y Lochmanova A (2007) Multiplex assays to diagnose celiac disease. *Ann N Y Acad Sci* **1109**, 330-337.
- Louka AS, Nilsson S, Olsson M, Talseth B, Lie BA, Ek J, Gudjonsdottir AH, Ascher H y Sollid LM (2002) HLA in coeliac disease families: a novel test of risk modification by the 'other' haplotype when at least one DQA1\*05-DQB1\*02 haplotype is carried. *Tissue Antigens* **60**, 147-154.

- Louka AS y Sollid LM (2003) HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* **61**, 105-117.
- Lurz E, Scheidegger U, Spalinger J, Schoni M y Schibli S (2009) Clinical presentation of celiac disease and the diagnostic accuracy of serologic markers in children. *Eur J Pediatr* **168**, 839-845.
- Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, Lulli P y Mazzilli MC (2009) HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol* **70**, 55-59.
- Olerup O, Aldener A y Fogdell A (1993) HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* **41**, 119-134.
- Pastore L, Lo Muzio L y Serpico R (2007) Atrophic glossitis leading to the diagnosis of celiac disease. *N Engl J Med* **356**, 2547.
- Perez-Bravo F, Araya M, Mondragon A, Rios G, Alarcon T, Roessler JL y Santos JL (1999) Genetic differences in HLA-DQA1\* and DQB1\* allelic distributions between celiac and control children in Santiago, Chile. *Hum Immunol* **60**, 262-267.
- Reinton N, Helgheim A, Shegarfi H y Moghaddam A (2006) A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1\*05, DQB1\*02 and DQB1\*0302 to aid diagnosis of celiac disease. *J Immunol Methods* **316**, 125-132.
- Remes-Troche JM, Adames K, Castillo-Rodal AI, Ramirez T, Barreto-Zuniga R, Lopez-Vidal Y y Uscanga LF (2007) Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes: a comparative study between celiac disease, small intestinal bacterial overgrowth, and irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* **41**, 671-676.
- Remes-Troche JM, Ramirez-Iglesias MT, Rubio-Tapia A, Alonso-Ramos A, Velazquez A y Uscanga LF (2006) Celiac disease could be a frequent disease in Mexico: prevalence of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors. *J Clin Gastroenterol* **40**, 697-700.
- Remes-Troche JM, Rios-Vaca A, Ramirez-Iglesias MT, Rubio-Tapia A, Andrade-Zarate V, Rodriguez-Vallejo F, Lopez-Maldonado F, Gomez-Perez FJ y Uscanga LF (2008) High prevalence of celiac disease in Mexican Mestizo adults with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Gastroenterol* **42**, 460-465.
- Sacchetti L, Sarrantonio C, Pastore L, Carlino V, Calcagno G, Ferrajolo A y Salvatore F (1997) Rapid identification of HLA DQA1\*0501, DQB1\*0201 and DRB1\*04 alleles in celiac disease by a PCR-based methodology. *Clin Chem* **43**, 2204-2206.
- Sae-Eaw A, Chompreeda P, Prinyawiwatkul W, Haruthaithanasan V, Suwonsichon T, Saidu JE y Xu Z (2007) Acceptance and purchase intent of US consumers for nonwheat rice butter cakes. *J Food Sci* **72**, S92-97.
- Saravanan S, Velu V, Nandakumar S, Madhavan V, Shanmugasundaram U, Murugavel KG, Balakrishnan P, Kumarasamy N, Solomon S y Thyagarajan SP (2009) Hepatitis B virus and hepatitis C virus dual

- infection among patients with chronic liver disease. *J Microbiol Immunol Infect* **42**, 122-128.
- Schuppan D y Junker Y (2007) Turning swords into plowshares: transglutaminase to detoxify gluten. *Gastroenterology* **133**, 1025-1028.
- Seguin B, Hardy BJ, Singer PA y Daar AS (2008) Genomics, public health and developing countries: the case of the Mexican National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN). *Nat Rev Genet* **9 Suppl 1**, S5-9.
- Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, Balam-Ortiz E, del Bosque-Plata L, Velazquez-Fernandez D, Lara C, Goya R, Hernandez-Lemus E, Davila C, Barrientos E, March S y Jimenez-Sanchez G (2009) Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8611-8616.
- Skovbjerg H, Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Anthonsen D, Ascher H, Midhagen G, Hallert C, Noren O y Sjostrom H (2004) Intestinal tissue transglutaminase in coeliac disease of children and adults: ultrastructural localization and variation in expression. *Scand J Gastroenterol* **39**, 1219-1227.
- Sollid LM (2000) Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* **18**, 53-81.
- Sollid LM y Thorsby E (1993) HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* **105**, 910-922.
- Sorell L, Garrote JA, Galvan JA, Velazco C, Edrosa CR y Arranz E (2004) Celiac disease diagnosis in patients with giardiasis: high value of antitransglutaminase antibodies. *Am J Gastroenterol* **99**, 1330-1332.
- Stenberg R, Dahle C, Lindberg E y Schollin J (2009) Increased Prevalence of Anti-gliadin Antibodies and Anti-tissue Transglutaminase Antibodies in Children With Cerebral Palsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.
- Stenson WF, Newberry R, Lorenz R, Baldus C y Civitelli R (2005) Increased prevalence of celiac disease and need for routine screening among patients with osteoporosis. *Arch Intern Med* **165**, 393-399.
- Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Raki M, Kwok WW, Jung G, Lundin KE y Sollid LM (2006) HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest* **116**, 2226-2236.
- Torres MI, Lopez Casado MA y Rios A (2007) New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol* **13**, 1156-1161.
- Vader W, Kooy Y, Van Veelen P, De Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Pena S, Mearin L, Drijfhout JW y Koning F (2002) The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* **122**, 1729-1737.
- Varga E, Palkonyai E, Temesvari P, Toth F y Petri IB (2003) The role of HLA-DRB1\*04 alleles and their association with HLA-DQB genes in genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Acta Microbiol Immunol Hung* **50**, 33-41.

- Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekela I, Patrikainen H, Valve R, Maki M y Collin P (2009) Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: A population-based study. *BMC Gastroenterol* **9**, 49.
- West J, Logan RF, Hill PG, Lloyd A, Lewis S, Hubbard R, Reader R, Holmes GK y Khaw KT (2003) Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut* **52**, 960-965.
- Wolters VM y Wijmenga C (2008) Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* **103**, 190-195.
- Zipser RD, Farid M, Baisch D, Patel B y Patel D (2005) Physician awareness of celiac disease: a need for further education. *J Gen Intern Med* **20**, 644-646.