



Universidad de Oviedo

**Departamento de Biología Funcional**

**Programa de Doctorado**

**Biología Funcional y Clínica**

**INFLUENCIA DE LAS MOLÉCULAS DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD NO CLÁSICAS MICA Y  
MICB EN LA HETEROGENEIDAD CLÍNICA DE LA  
ENFERMEDAD CELÍACA**

**Tesis Doctoral**

**Antonio López Vázquez**

**Oviedo 2015**





Universidad de Oviedo

**Departamento de Biología Funcional**

**Programa de Doctorado**

**Biología Funcional y Clínica**

**INFLUENCIA DE LAS MOLÉCULAS DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD NO CLÁSICAS MICA Y  
MICB EN LA HETEROGENEIDAD CLÍNICA DE LA  
ENFERMEDAD CELÍACA**

**Autor:**

**Antonio López Vázquez**

**Directores:**

**Carlos López Larrea**

**Segundo González Rodríguez**





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: INFLUENCIA DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD NO CLÁSICAS MICA Y MICB EN LA HETEROGENEIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD CELIACA	Inglés: INFLUENCE OF NON CLASSIC HISTOCOMPATIBILITY MOLECULES MICA AND MICB IN CLINIC HETEROGENEITY OF CELIAC DISEASE
2.- Autor	
Nombre: <b>Antonio López Vázquez</b>	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología Funcional y Clínica	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

### RESUMEN (en español)

El planteamiento inicial de esta tesis doctoral surgió al observar que, a pesar de compartir la asociación con HLA-DQ2 o HLA-DQ8 existen, desde el punto de vista clínico, fenotipos diferentes de enfermedad celíaca que se diferencian simplemente por el desarrollo o no de ciertas manifestaciones clínicas. Sin descartar una posible influencia del entorno, el desarrollo de un estudio con el fin de establecer si existe un condicionamiento genético de estas diferencias, nos pareció especialmente relevante.

Por ese motivo nos planteamos inicialmente analizar si las diferentes formas de herencia del heterodímero HLA-DQ2 en el seno de diferentes haplotipos HLA, condicionaba de algún modo el desarrollo de estas diferentes formas de la enfermedad. Nos encontramos que las formas heredadas en trans, es decir el heterodímero codificado por HLA-DQA1\*05:05 y DQB1\*02:02 estaba más asociado a las formas clásicas de la enfermedad, es decir, aquellas con sintomatología predominantemente digestiva.

A continuación decidimos investigar si existían otros genes candidatos en la región MHC que condicionen el desarrollo de las diferentes formas clínicas. Dentro de los posibles genes candidatos, han cobrado especial importancia tanto por su situación en el genoma, como a su papel funcional en la respuesta inmune, los ligandos de NKG2D, MICA y MICB. Estos ligandos y su receptor han sido implicados tanto en la propia enfermedad celíaca como en el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes, por lo que decidimos investigar la posible implicación de dichos genes. Nos encontramos que el alelo transmembrana MICA A-5.1, que codifica para una proteína truncada y posiblemente soluble, estaba asociado al desarrollo de formas atípicas predominantemente extradigestivas de la enfermedad celíaca. En el caso de MICB



encontramos que el alelo asociado con estas formas de la enfermedad era MICB\*01:06. Ambas asociaciones resultaron ser independientes de HLA-DQ2. Estos resultados se confirmaron en otra cohorte de pacientes y controles procedentes de los campamentos saharauis en Tindouf (Argelia). Esta población resulta especialmente interesante ya que previamente se había descrito que presenta la mayor prevalencia descrita de la enfermedad celíaca.

Una vez que habíamos establecido la asociación de genética de MICA y MICB con las formas atípicas de la enfermedad celíaca, decidimos investigar si la expresión de ambas moléculas, así como de su receptor NKG2D y de la citocina IL15, principal inductor de su expresión en la mucosa intestinal, estaban relacionadas con el desarrollo de las diferentes formas clínicas. Nos encontramos que MICB y sobre todo MICA se sobre-expresaba en la mucosa de los pacientes con daño leve de la mucosa intestinal (grados I, II y IIIa de Marsh) con respecto a los que presentaban daño severo (grados IIIb y IIIc) y con respecto a controles sanos. NKG2D sin embargo presentaba mayores niveles de expresión en pacientes con daño severo y la IL15 estaba incrementada en ambos grupos de pacientes con respecto a los controles. Estos resultados sugieren que el incremento de la expresión de MICA y MICB es un proceso inicial en el desarrollo de la patogenia de la enfermedad celíaca, mientras que la expresión de IL15 se mantiene elevada durante todas las fases de la enfermedad.

Una vez que nuestro trabajo y el de otros autores demostró que la proteína MICA está sobre-expresada en la mucosa de los pacientes con enfermedad celíaca, especialmente en aquellos que presentan estadios iniciales de la lesión, decidimos investigar si esto inducía la formación de anticuerpos anti-MICA, que ya habían sido descritos en el LES de inicio juvenil y en el rechazo del trasplante de órganos sólidos. Nos encontramos con que casi la mitad de los pacientes con enfermedad celíaca desarrollaban anticuerpos anti-MICA con respecto al 3% detectado en un grupo de 200 controles sanos y al 8% detectado en un grupo de 428 pacientes con otras patologías autoinmunes. Nos encontramos también que estos anticuerpos eran más frecuentes en un grupo de pacientes pediátricos (>15 años). Además su aparición se relacionaba con el desarrollo de patología autoinmune adicional, sobre todo diabetes mellitus tipo 1, en ambos grupos de pacientes, aunque esta asociación era especialmente relevante en los niños.



## RESUMEN (en Inglés)

The initial approach of this thesis arose from observations that, despite sharing the association with HLA-DQ2 or HLA-DQ8, from a clinical point of view, there are different phenotypes of celiac disease which differ in the development or not of some clinical manifestations. Taking in account the possible influence of the environment, we found particularly relevant the developing of a study to establish whether there is a genetic conditioning of these clinical differences.

For this reason initially we investigate whether different forms of genetic heredity of HLA-DQ2 heterodimer within different HLA haplotypes, somehow conditioned the development of these different forms of the disease. We found that the forms in trans such as the heterodimer encoded by HLA-DQA1\*05:05 and DQB1\*02:02 was associated to classical forms of the disease, those forms with predominantly gastrointestinal symptoms.

Then, we decided to investigate whether other candidate genes in the MHC region influence in the progression of different clinical forms of celiac. Among the candidate genes, NKG2D ligands MICA and MICB have become particularly important both for its location in the genome, and its functional role in the immune response. These ligands and their receptor have been implicated both in celiac disease itself and in the development of other autoimmune diseases, so we decided to investigate the possible influence of these genes in the clinical phenotype of celiac disease. We found that MICA transmembrane allele A-5.1, which encodes a truncated and possibly soluble protein, was associated with development of predominantly extradigestive atypical celiac disease. For MICB we found that the allele MICB 01:06 was also associated with these forms of the disease. Both associations were found to be independent of HLA-DQ2. These results were confirmed in another cohort of patients and controls from the Saharawi camps in Tindouf (Algeria). This population is particularly interesting as previously described which has the highest reported prevalence of celiac disease in world.

Once we had established the genetic association of MICA and MICB with atypical forms of celiac disease, we decided to investigate whether the expression of both molecules, its receptor NKG2D and IL15 cytokine, principal inducer of expression for both in the intestinal mucosa, were related to the development of different clinical



forms. We found that MICB and especially MICA is over-expressed in the mucosa of patients with mild damage of the intestinal mucosa (grades I, II and IIIa of Marsh) relative to those with severe damage (grade IIIb and IIIc) and with respect to healthy controls. However, NKG2D showed higher expression levels in patients with severe damage and IL15 was increased in both groups of patients with respect to healthy controls. These results suggest that the increased expression of MICA and MICB is an initial process in the development of the pathogenesis of celiac disease, whereas IL15 expression remains elevated during all phases of the disease.

Our work and other studies from some authors demonstrated that MICA protein is over-expressed in the mucosa of patients with celiac disease, especially in those with early stages of the injury, we decided to investigate whether this induced the formation of antibodies against MICA, which had already been described in juvenile-onset SLE and in rejection of solid organ transplantation. We found that nearly half of patients with celiac disease developed anti-MICA antibodies, comparing with the 3% detected in a group of 200 healthy controls and 8% detected in a group of 428 patients with other autoimmune diseases. We also found that these antibodies were more frequent in a group of pediatric patients (> 15 years). Moreover, we also found that the presence of these antibodies was related with the development of additional autoimmune diseases, especially diabetes mellitus type 1, in both groups of patients, although this association was especially important in children.



## **Agradecimientos.**

Esta tesis doctoral ha sido fruto de la insistencia de muchas personas a las que tengo que agradecerles que siempre hayan pensado que podía conseguirlo...

En primer lugar, mi agradecimiento a Carlos López Larrea, mi jefe. Después de 19 años trabajando juntos que puedo decir de mi mentor... Su empuje, su dedicación y su entusiasmo son infinitos. Su visión de la ciencia siempre va un paso más allá. Y además, su capacidad para transmitir todo eso a los demás es insuperable. Nada de lo que se describe a continuación hubiera sido posible sin él.

De Segundo González Rodríguez he aprendido muchas cosas, pero creo que la más importante de todas ellas es que no puede haber buena ciencia sin rigor y sin responsabilidad. Tengo que añadir que algunos de los mejores años de mi vida los pasé trabajando con él y con Jesús Martínez Borra. Creo que formábamos un equipo estupendo.

Poco más tengo que añadir de Jesús. Es un placer trabajar a su lado y espero seguir trabajando durante muchos años más.

No me olvido del resto de mis compañeros adjuntos del Servicio de Inmunología y en especial de Rebeca Alonso Arias. Volviendo a lo del equipo... Creo que este funciona y además muy bien.

A las doctoras Mozo y Tricas, y al resto del personal del Servicio y en especial a los más veteranos gracias por aguantarme todos estos años.

También quiero acordarme de la gente que ya no está entre nosotros. La doctora Carmen Gutiérrez, de la cual, y a pesar de las diferencias insalvables que había entre nosotros, aprendí algunas cosas verdaderamente útiles.

Y finalmente, que decir de mi querido Padawan, Jose Ramón Vidal (Jose sin acento). Espero que podamos seguir haciendo muchas cosas juntos.

## **ABREVIATURAS**

ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo)

EC: Enfermedad celíaca

ALT: Alanina aminotransferasa

APC: Antigen-presenting cell (Célula presentadora de antígeno)

AST: Aspartato aminotransferasa

CTL: Linfocitos T CD8+ citotóxicos

DC: Células dendríticas

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ELISA: Enzimoimmuno análisis

EMSA: electrophoretic mobility shift assay (Ensayo de cambio en la corrida electroforética)

$\gamma$ GT: Gamma glutamiltransferasa

GWAS: Genome-wide association study (Estudio de asociación del genoma completo)

HLA: Human Leukocyte Antigen (Antígeno leucocitario humano)

MICA: polipéptido relacionado con el MHC de clase I secuencia A

MICB: polipéptido relacionado con el MHC de clase I secuencia B

IFN: Interferón

IL: Interleucina

ISG: Interferon stimulated genes (Genes estimulados por interferón)

KIR: Killer Immunoglobulin-like receptors

LG: Logic regresion (Regresión lógica)

MDA: Melanoma Differentiation-Associated protein

NK: Célula Natural Killer

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pDC: Células dendríticas plasmacitoides

RIG: Retinoic acid-inducible gene

RNA: Ácido ribonucleico

SSO: Sequence Specific Oligonucleotide (Oligonucleótido de secuencia específica)

Taq: *Thermus aquaticus*

TLR: Toll-like receptor

## **INDICE**

<b>INTRODUCCION</b>	<b>11</b>
<b>1. EL GLUTEN Y LA ENFERMEDAD CELIACA</b>	<b>15</b>
<b>2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD</b>	<b>16</b>
<b>3. GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA</b>	<b>19</b>
<b>4. PATOGÉNI A DE LA ENFERMEDAD CELÍACA</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>53</b>
<b>1. PACIENTES Y CONTROLES SANOS</b>	<b>55</b>
<b>2. OBTENCION DE DNA GENOMICO</b>	<b>56</b>
<b>3. TÉCNICAS DE GENOTIPADO</b>	<b>57</b>
<b>4. RT-PCR EN “TIEMPO REAL”</b>	<b>74</b>
<b>5. INMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>75</b>
<b>6. DETERMINACIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS ANTI-ENDOMISIO Y ANTI- TRANSGLUTAMINASA</b>	<b>76</b>
<b>7. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MICA</b>	<b>77</b>
<b>8. ESTADISTICA</b>	<b>80</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>83</b>
<b>1. ESTUDIO GENÉTICO DE LAS FORMAS CLÁSICAS Y ATÍPICAS DE LA ENFERMEDAD CELIACA EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA</b>	<b>85</b>
<b>2. ESTUDIO GENÉTICO DE LAS FORMAS CLÁSICAS Y ATÍPICAS DE LA ENFERMEDAD CELIACA EN LA POBLACIÓN SAHARAUI</b>	<b>105</b>
<b>3. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE NKG2D Y SUS LIGANDOS MICA Y MICB EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA.</b>	<b>117</b>
<b>4. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-MICA EN LA ENFERMEDAD CELÍACA</b>	<b>124</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>137</b>
<b>1. GENETICA DE LA ENFERMEDAD CELIACA</b>	<b>139</b>

<b>2. EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NKG2D EN LA ENFERMEDAD CELÍACA</b>	<b>152</b>
<b>3. LA INMUNIDAD HUMORAL EN LA ENFERMEDAD CELÍACA</b>	<b>155</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>161</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>165</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>169</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>173</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>193</b>

## INTRODUCCIÓN



La enfermedad celíaca, intolerancia al gluten o enteropatía sensible al gluten, es una patología en la cual la ingesta de cereales que contienen este grupo de proteínas u otros similares (tabla 1) provoca un fenómeno de malabsorción de la

Cereales con Gluten o proteínas similares	Cereales sin gluten o proteínas similares
Trigo	
Avena	Arroz
Centeno	Maíz
Cebada	
Mijo	

**Tabla 1.** Cereales que contienen gluten o similares y han de ser retirados de la dieta de los pacientes con enfermedad celíaca. El arroz y el maíz son perfectamente tolerados.

práctica totalidad de los nutrientes por destrucción de la mucosa de intestino delgado.

Las primeras descripciones clínicas de los fenómenos de intolerancia al gluten las encontramos ya en los escritos de Areteo de Capadocia en el siglo II a. de C. Sin embargo, tenemos que esperar hasta bien entrado el siglo XIX para encontrarnos la primera publicación en la que ya se recogen, de forma moderna, las características clínicas de lo que se denominaba “afección celíaca”.

La enfermedad celíaca es una patología que afecta exclusivamente al intestino delgado, iniciándose la lesión en los primeros segmentos del duodeno, para extenderse luego en sentido distal, a medida que avanza la enfermedad. Se caracteriza clásicamente por la presencia de diarreas crónicas, distensión abdominal, astenia y desnutrición grave, aunque cada día cobran más importancia los procesos larvados u oligosintomáticos, diagnosticados cada vez con mayor frecuencia en el curso de estudios familiares o de grandes grupos poblacionales. Su tratamiento es tan simple como complicado es llevarlo a cabo. Consiste en retirar totalmente y de manera



## *Introducción*

permanente de la dieta, todos aquellos alimentos que contengan gluten, es decir, una parte importante de los alimentos que constituyen la dieta básica en los países occidentales. El resultado de este tratamiento es la desaparición en poco tiempo de la diarrea y de todos los procesos relacionados con la malabsorción generalizada de nutrientes, sin que quede ningún tipo de secuela, salvo que la duración excesiva de la enfermedad haya propiciado la aparición de alteraciones irreversibles derivadas de la malnutrición.

Otra patología característica de la intolerancia al gluten es la dermatitis herpetiforme, lesión cutánea asociada o no a afectación digestiva, que responde igual que esta a la dieta.

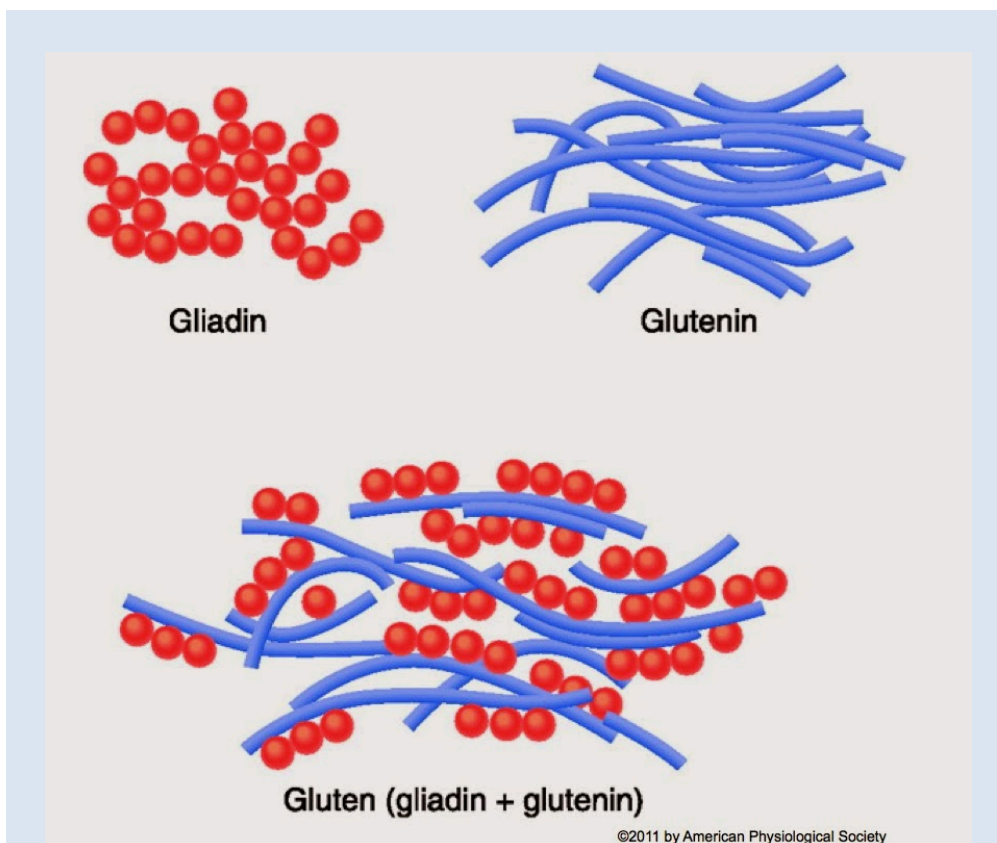
Existen además otras patologías que acompañan de forma minoritaria a la condición de celíaco, y que se relacionan con una prolongada exposición al gluten en individuos no tratados. Muchas son enfermedades de tipo autoinmune, propiciadas posiblemente por la estimulación continua del sistema inmune. En este grupo nos encontramos con mayor frecuencia con diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis autoinmune, etc. Otras enfermedades están relacionadas con la desnutrición prolongada, como son la insuficiencia adrenal, la esterilidad, alopecia, etc. Pero la complicación más temible a largo plazo es el linfoma intestinal, proceso de evolución mortal, muy raro en los pacientes tratados, pero que puede aparecer hasta en un 10% de los enfermos que mantienen el gluten en la dieta. La sospecha de que muchas de estas complicaciones tardías, en especial el linfoma, puedan aparecer en las formas larvadas de la enfermedad no tratadas, nos da una idea de la importancia que puede tener el diagnóstico de estas, y de los notables beneficios que pueden obtener estos pacientes de una dieta libre de gluten.

La enfermedad puede manifestarse a cualquier edad, desde el momento en el que se introduce el gluten en la dieta, pero lo más habitual es que se inicie durante la primera infancia. Se ha relacionado su aparición con la duración de la lactancia materna pero sobre todo con la introducción precoz del gluten.

## 1. EL GLUTEN Y LA ENFERMEDAD CELIACA

En 1950 una tesis doctoral de un desconocido investigador holandés llamado Dicke<sup>1</sup>, revelaba que la causa de la enfermedad celíaca era la presencia de determinados cereales en la dieta. Tres años más tarde, van der Kamer y el propio Dicke descubrían que una proteína contenida en estos cereales, denominada gluten, era el agente tóxico en la enfermedad<sup>2</sup>.

El gluten es la fracción proteica del trigo y los cereales relacionados. Puede ser separado en gliadinas o prolaminas solubles en etanol y en gluteninas insolubles. Son las primeras las causantes de la toxicidad sobre la mucosa intestinal, aunque recientes estudios sugieren que las gluteninas también podrían dañarla. Común a todas las



**Figura 1.** El Gluten es una estructura molecular compleja formada por las proteínas Gliadina y Gluteina. La presencia de agua (con propiedades polares) favorece su formación, mientras que la presencia de grasas (de naturaleza apolar) actúa en forma contraria.

## Introducción

gliadinas del trigo, es su elevado contenido en glutamina y prolina, mientras que las gliadinas del maíz y el arroz tienen bajo contenido de estos aminoácidos. Esta particular composición de aminoácidos les confiere la capacidad de estimular al sistema inmune de una manera muy particular como veremos más adelante. Las gliadinas del trigo pueden ser separadas mediante electroforesis en cuatro fracciones denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  y  $\epsilon$ . Todas pueden tener capacidad tóxica sobre la mucosa, pero es posiblemente la fracción  $\alpha$ -gliadina la mayor responsable de la enfermedad.

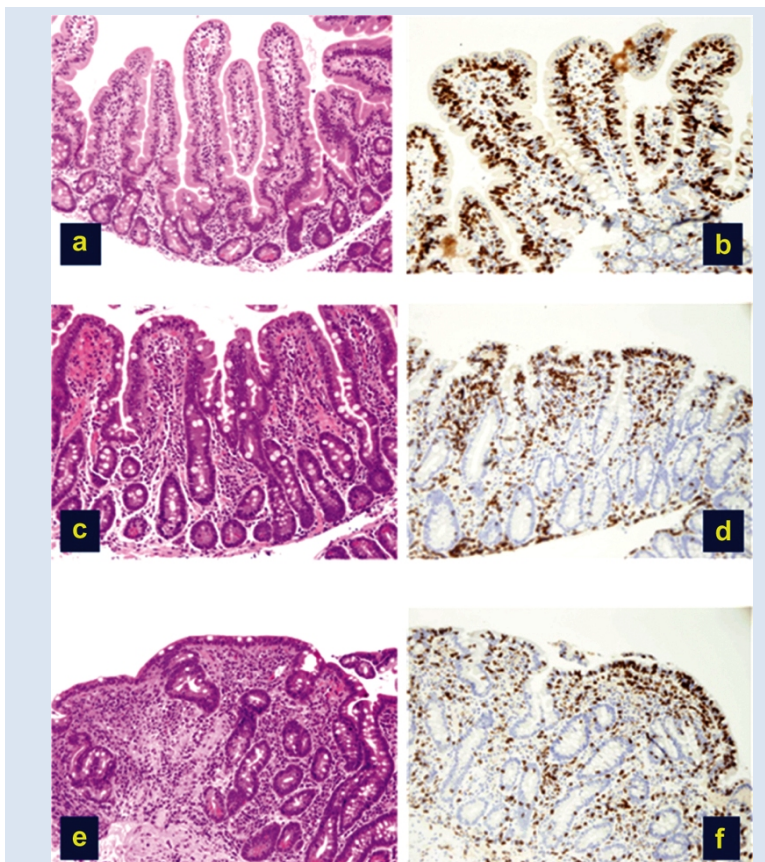
## 2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD

La lesión afecta exclusivamente a la mucosa del intestino delgado (ID), quedando preservadas las demás capas de este. La afectación es más pronunciada en las zonas más proximales, especialmente en duodeno, aunque puede acabar por extenderse a la totalidad del ID. A simple vista podemos observar una mucosa más lisa de lo normal, lo que es reflejo de la atrofia vellositaria existente. Microscópicamente, nos encontramos con una combinación de alteraciones epiteliales e infiltración

Lesión de Marsh	
tipo 0	Mucosa normal
Tipo 1	Lesión infiltrativa caracterizada por el incremento de LIE*
Tipo 2	Lesión hiperplásica caracterizada por el incremento de LIE y la elongación de las criptas.
Tipo 3	Lesión destructiva caracterizada por la atrofia vellositaria
Tipo 3a	atrofia vellositaria parcial
Tipo 3b	atrofia vellositaria subtotal
Tipo 3c	atrofia vellositaria total
Tipo 4	Lesión hipoplásica, caracterizada por atrofia vellositaria total e hipoplasia de las criptas.

**Tabla 2.** Tipos histológicos de la enfermedad celíaca. Clasificación de Marsh

inflamatoria. Fue Marsh en 1992 el primero en clasificar la evolución histológica de la enfermedad en tres fases<sup>3</sup>. En una primera fase, el número de linfocitos intraepiteliales (IEL) aumenta de forma considerable, sin que aparezcan otros signos patológicos en la mucosa, seguido de la infiltración linfocitaria de la lámina propia. En la siguiente fase aparecen ya las primeras alteraciones en las células del epitelio absotivo. Estas células pierden su característica forma cilíndrica, adquiriendo un aspecto cúbico. Los núcleos se distribuyen al azar, en lugar de estar situados en la zona basal de la célula. El borde en cepillo desaparece, y con él la superficie absortiva de la célula. La batería de



**Figura 1.** Diferentes grados de daño del intestino delgado en pacientes con enfermedad celíaca: a) vellosidades normales; b) infiltrado patológico de linfocitos intraepiteliales (IEL) (tinción de CD3); c-d) atrofia leve/moderada de las vellosidades y aumento patológico de IEL; e-f) atrofia vellositaria total (en todos los casos, a la izquierda tinción con hematoxilina/eosina, a la derecha tinción CD3). (Modificado de Volta et al 2011)

enzimas y receptores fundamentales para la correcta absorción de los nutrientes, se reduce considerablemente. Para intentar compensar esto se produce una hipertrofia de las criptas, caracterizada por el intenso infiltrado inflamatorio de estas, evidenciándose además un notable incremento en el número de mitosis. Finalmente, en una tercera fase se produce la destrucción de las vellosidades intestinales, lo que se traduce en el clásico aspecto liso y brillante de la mucosa.

Es característico de la enfermedad el hecho de que tras la retirada del

## *Introducción*

gluten de la dieta, la mucosa recupera la normalidad sin que queden secuelas de ningún tipo. De igual manera, si nuevamente lo reintroducimos, las lesiones aparecen de nuevo. No existe sin embargo una clara relación lineal entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad y el grado de lesión histológica objetivado mediante la realización de una biopsia. Es importante resaltar que los pacientes con las clásicas manifestaciones de la enfermedad y claros síntomas de desnutrición, presentan necesariamente lesiones en la fase 3 de Marsh. Sin embargo, enfermos celíacos con formas larvadas u oligosintomáticas de la enfermedad, presentan también en algunos casos, lesiones en estado avanzado. Esto podría ser debido a que la biopsia intestinal suele limitarse a las primeras porciones del intestino delgado, por lo que es incapaz de reflejar la extensión real de la enfermedad.

### 3. GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

#### 3.1. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Fue en 1972 y de forma totalmente independiente, cuando dos grupos demostraron la asociación entre el antígeno HL-A8 (HLA-B8) y la enteropatía sensible al gluten<sup>4,5</sup>. Poco tiempo después se demostró la asociación aún más marcada con Dw3<sup>6</sup> (HLA-DR3). Fue el punto de partida para numerosísimos estudios que han convertido a la celíaca en una de las asociaciones entre HLA y enfermedad mejor conocidas. En la actualidad se sabe que aquellos primeros descubrimientos eran reflejo de la asociación real con HLA-DQ2, cuya implicación patogénica esta hoy ampliamente demostrada. Antes de entrar en detalle sobre estos mecanismos, repasaremos las características más relevantes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

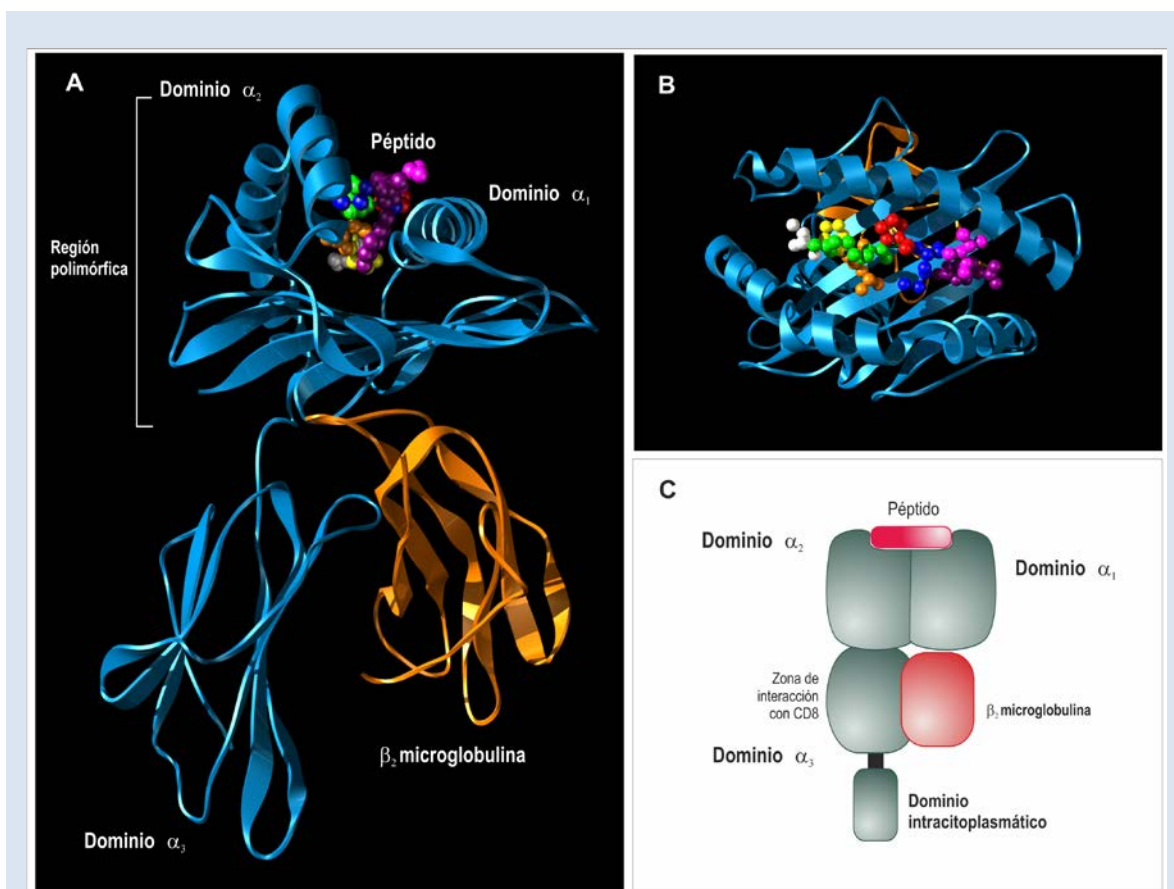
A mediados de los años 40, George Snell en colaboración con Peter Gorer identificaron en ratones, un locus importante en el rechazo de transplantes alogénicos, al que denominaron H-2 (histocompatibility-2). Dedujeron que existía en realidad un complejo sistema de genes estrechamente ligados, con diversos alelos en cada locus relacionados todos ellos con los fenómenos de histocompatibilidad. En los años 50 Jean Dausset, un investigador francés que años más tarde recibiría como Snell el premio Nobel, encontró en la sangre de receptores de transfusiones, anticuerpos frente a antígenos de leucocitos a los que denominó *Human Leukocyte Antigens* (HLA), nombre poco afortunado si se tiene en cuenta lo que se conoce sobre ellos en la actualidad, demostrando además su analogía con el complejo H-2 del ratón. En 1965 el propio Dausset y sus colaboradores, describieron un sistema de al menos 10 antígenos humanos codificados en un complejo de genes, cada uno con varios alelos antigénicos. Sin embargo a muchos investigadores les pareció imposible que un sistema tan complejo de genes y proteínas tuviese como única finalidad intervenir en situaciones no fisiológicas como el transplante de órganos o la transfusión de sangre. Fue otro premio Nobel Baruj Benacerraf y sus colaboradores quienes utilizando antígenos simples y polipéptidos sintéticos, demostraron que la capacidad de un animal de responder a estímulos antigénicos estaba controlada por genes específicos, que denominaron Ir (*Immune response*), situados en lo que hoy se conoce como Complejo

Principal de Histocompatibilidad o MHC (del inglés: *Major Histocompatibility Complex*). En los años 70 Zinkernagel y Doherty demostraron que los linfocitos T solo eran capaces de reconocer antígenos cuando las células que se los presentaban expresaban los mismos genes MHC que ellos mismos, y poco después se puso de manifiesto que las moléculas HLA eran las encargadas de presentar antígenos a estas células T en forma de pequeños péptidos.

### 3.2. ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS HLA

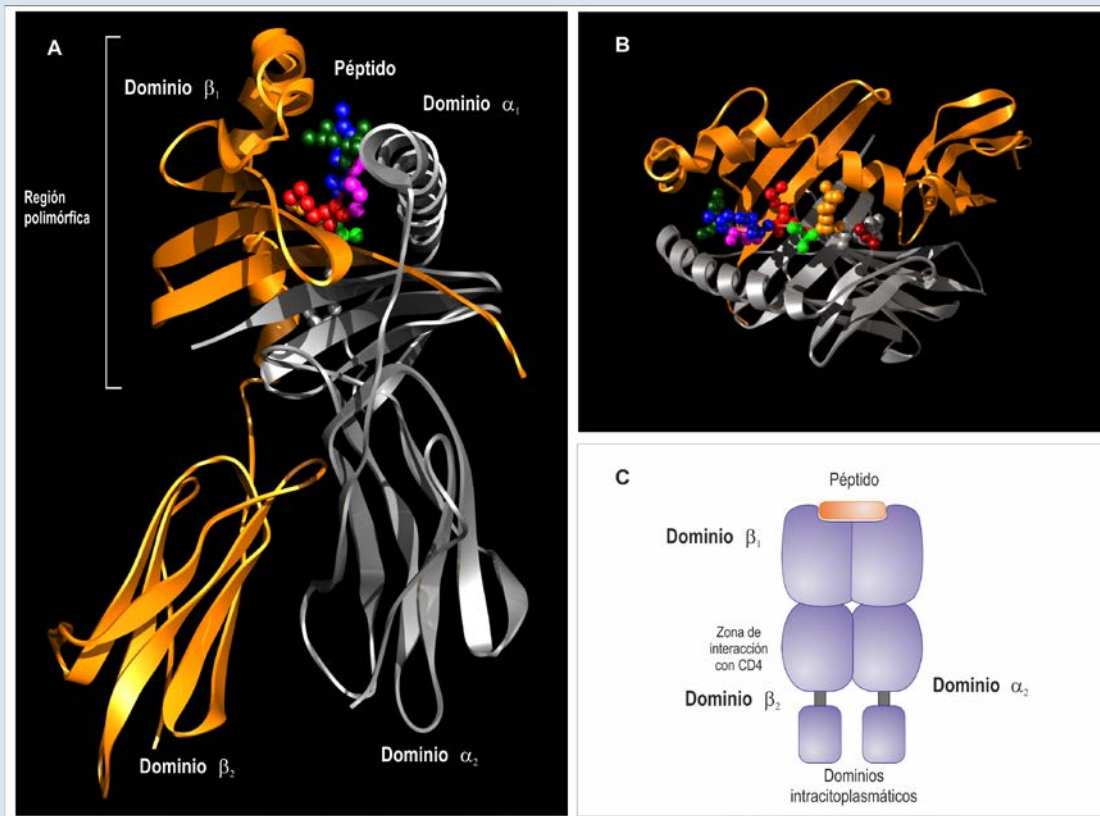
Como ya habíamos apuntado anteriormente, las proteínas HLA son glicoproteínas de la membrana plasmática, formadas por dos cadenas polipeptídicas. Existen dos tipos distintos de moléculas denominadas HLA de clase I y HLA de clase II, que se distinguen por su estructura, su función y por su distribución tisular. Fue en 1987 cuando los trabajos de Bjorkman y sus colaboradores permitieron conocer la estructura cristalina de una proteína de clase I (Figura 2). Estas moléculas son extracelulares ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ), una región transmembrana y una cola intracitoplasmática, y una cadena ligera denominada  $\beta_2$  microglobulina, unida a la anterior de forma no covalente. Entre los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de la cadena pesada se forma una depresión alargada constituida por dos hélices  $\alpha$ , una perteneciente a cada dominio, en la que se acomodan los péptidos antigénicos que esta molécula es capaz de presentar a los linfocitos T. Esta hendidura está dividida en seis pequeñas cavidades denominadas “pockets” que se nombran con las letras A a F, cada una de las cuales es capaz de alojar cadenas laterales de algunos de los residuos que forman el péptido presentado. Los residuos 2 y 9, que se sitúan respectivamente en los “pockets” B y F, interaccionan de manera más intensa con los residuos de la molécula de clase I que forman estas cavidades. Se les denomina por ello “residuos de anclaje”, y restringen en gran manera el rango de péptidos que es capaz de presentar cada molécula. Los residuos 1 y 9 están anclados también a la molécula de clase I por sus extremos amino y carboxilo terminal. El resto del péptido se encuentra más libre en el interior de la hendidura, lo que permite que sea reconocido con mayor facilidad por el TCR. Las moléculas HLA de clase I son capaces de unir péptidos formados por 8 a 12 residuos, aunque el número

habitual es de nueve. Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  presentan como característica fundamental, un elevado grado de polimorfismo, de gran importancia como veremos más adelante. El dominio  $\alpha_3$  es sin embargo una región monomórfica, pero en el se encuentra el lugar que sirve de anclaje para la molécula CD8 de los linfocitos T. Es pues también de gran importancia, ya que sin este reconocimiento la interacción entre el TCR y la molécula HLA sería imposible. La cadena  $\beta_2$  microglobulina es también monomórfica.



**Figura 2.** A. Representación tridimensional de una molécula HLA de clase I. En ella podemos distinguir la cadena pesada  $\alpha$ , coloreada en azul, y la cadena ligera  $\beta$  ( $\beta_2$  microglobulina) en amarillo. B. Hendidura formada por los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  en la que se muestra un péptido antigénico encajado en ella. C. Representación esquemática de la molécula en la que se destacan los diferentes dominios que la conforman.





**Figura 3.** A. Representación tridimensional de una molécula HLA de clase II. En ella podemos distinguir la cadena  $\alpha$ , coloreada en gris, y la cadena  $\beta$  en amarillo. B. Hendidura formada por los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  en la que se muestra un péptido antigénico encajado en ella. C. Representación esquemática de la molécula en la que se destacan los diferentes dominios que la conforman.

Las moléculas HLA de clase II son heterodímeros (Figura 3) formados por dos cadenas polipeptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas de forma no covalente, cada una de las cuales presenta dos dominios extracelulares, una región transmembrana y una cola citoplasmática. Entre los dominios  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  existe también una hendidura para la unión de péptidos (figura 3B). Esta hendidura es semejante, aunque de mayor amplitud que la de clase I y puede alojar péptidos de mayor tamaño.

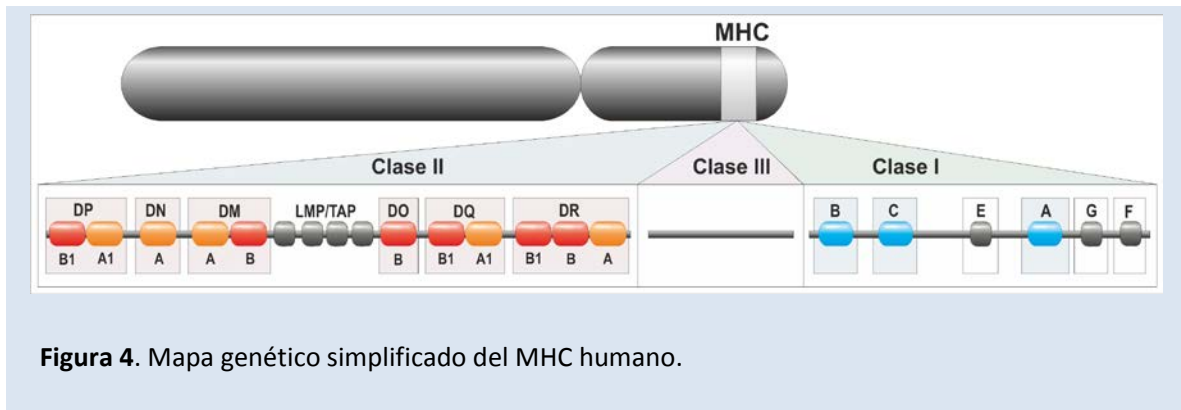
A diferencia de clase I los péptidos no están anclados en los extremos, y son las cadenas laterales de los residuos 1, 4, 6 y 9, las que interaccionan con los residuos variables que forman los "pockets" de la molécula de clase II. La hendidura de unión de estas moléculas es mucho más permisiva a la hora de admitir distintos péptidos, por lo que resulta mucho más complicado definir residuos de anclaje y predecir que péptidos va a unir determinada molécula de clase II. Debido al hecho de que los péptidos no se

encuentran anclados en sus extremos, estos pueden sobresalir fuera de la hendidura de unión, no habiendo límite superior en cuanto a su tamaño. Sin embargo, parece ser que cuando estos son muy grandes actúan determinadas peptidasas que los recortan hasta un tamaño de entre 13 y 17 aminoácidos. El dominio  $\beta 2$  presenta el sitio de unión para el correceptor CD4 de los linfocitos T. Tanto este como el dominio  $\alpha 2$  son monomórficos. Es necesario destacar como hecho curioso y de funcionalidad desconocida, que la cadena  $\alpha$  de la molécula HLA-DR es también monomórfica, a diferencia de la equivalente en otras moléculas de clase II.

### 3.3. ORGANIZACION GENICA DEL MHC

Los grandes avances de la genética molecular en los últimos años, han permitido conocer de una manera muy precisa, la localización de los genes que codifican para estas proteínas. Hoy se sabe que se encuentran en una pequeña zona del genoma, que en la especie humana abarca unos 4 millones de nucleótidos, situada en el brazo corto del cromosoma 6. Esta región, en la que existen entre 100 y 200 loci relacionados en su mayor parte con la regulación de la respuesta inmune, se denomina, como vimos antes, Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

En el MHC se reconocen tres regiones distintas. La región más telomérica se denomina MHC de clase I, y en ella se encuentran tres genes principales, HLA-A, B y C, que codifican para las cadenas pesadas de las moléculas de clase I. Esto implica que, cada célula expresa tres tipos distintos proteínas HLA de clase I (A, B y C), cada una de las cuales es codificada por su gen correspondiente. Estas moléculas de clase I se expresan en mayor o menor cantidad en todas las células nucleadas del organismo. Existen además en esta región del genoma otros genes que codifican para proteínas de estructura similar a las anteriores, pero con funciones y distribución tisular diferente, que se denominan moléculas HLA “no clásicas”, de las que hablaremos más adelante.



**Figura 4.** Mapa genético simplificado del MHC humano.

A la región más centromérica se la conoce como MHC de clase II. Existen en ella 6 genes principales denominados DRA1, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1 y DPB1 que codifican para las cadenas  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) de las moléculas de clase II. Aquí sucede lo mismo que con las moléculas de clase I, ya que también hay 3 variantes distintas denominadas HLA-DR, -DQ y -DP que se expresan conjuntamente en la superficie celular, aunque, a diferencia de las anteriores, su expresión está limitada a determinados tipos: linfocitos B, células presentadoras de antígenos y linfocitos T activados. Hay además, en algunos casos un segundo gen para la cadena  $\beta$  de HLA-DR con tres variantes posibles conocidas como DRB3, DRB4 y DRB5.

Entre las dos regiones ya expuestas se encuentra el MHC de clase III. Esta zona incluye una amalgama de genes que codifican para proteínas con funciones muy diversas, la mayoría de las cuales presentan importantes funciones inmunológicas. Aquí se encuentran los genes de algunos factores del Complemento, de varios mediadores de los procesos inflamatorios, etc.

Una característica fundamental de la organización génica del MHC es el bajo grado de recombinación que existe entre los genes que lo forman. Entre los loci de la región de clase I la posibilidad de recombinación es menor del 1%, y aun entre esta región y los distantes genes de clase II el grado de recombinación no supera el 3%. Esto hace que los genes del MHC se transmitan normalmente ligados, formando bloques denominados haplotipos. Así pues, cada individuo hereda un haplotipo MHC de sus progenitores.

### 3.4.POLIMORFISMO DEL MHC

Como ya comentamos en el apartado anterior, cada célula expresa tres tipos distintos de moléculas de clase I que se denominan HLA-A, HLA-B y HLA-C. Del mismo modo, limitándose en este caso a los tipos celulares que son capaces de expresarlas, existen también tres tipos de moléculas de clase II conocidas como HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Esta notable variedad de moléculas HLA, cada una de las cuales es capaz de presentar distintos péptidos a los linfocitos T, limita mucho la capacidad de los patógenos de evadir la respuesta inmune, ya que permite reconocer con mayor facilidad lo que es extraño, para poder eliminarlo con mayor eficacia.

Añade todavía mayor eficacia el hecho de que los genes MHC son enormemente polimórficos, lo que quiere decir que existen muchos alelos de cada gen. Este polimorfismo se localiza, como ya habíamos comentado antes, en los dominios que conforman la hendidura de unión de la molécula, afectando de manera notable al repertorio de péptidos que es capaz de unir la proteína codificada por cada alelo. Se ha estimado que, por ejemplo una molécula HLA de clase I es capaz de presentar un repertorio de péptidos que oscila entre 2000 y 10000, existiendo además notables diferencias entre los distintos alelos.

### 3.5.MOLÉCULAS HLA NO CLÁSICAS

Dentro de la región MHC existen además de los genes que codifican para las moléculas HLA clásicas, otros genes que codifican para otras proteínas de estructura similar, pero con funciones y patrones de expresión tisular muy distintos. Característicamente suelen ser poco o nada polimórficas A estas moléculas se las conoce como “no clásicas”. (Tabla 3)

	Distribución tisular	Función	Polimorfismo
<b>HLA-G</b>	Trofoblasto veloso	Tolerancia materno-fetal	No
<b>HLA-E</b>	Distintos tipos celulares	Regulación de la actividad NK	No
<b>HLA-F</b>	Desconocida	Desconocida	No
<b>HFE</b>	Epitelio absortivo intestinal, macrófagos, etc.	Cooperación con el receptor de la transferrina en la absorción de Fe	No

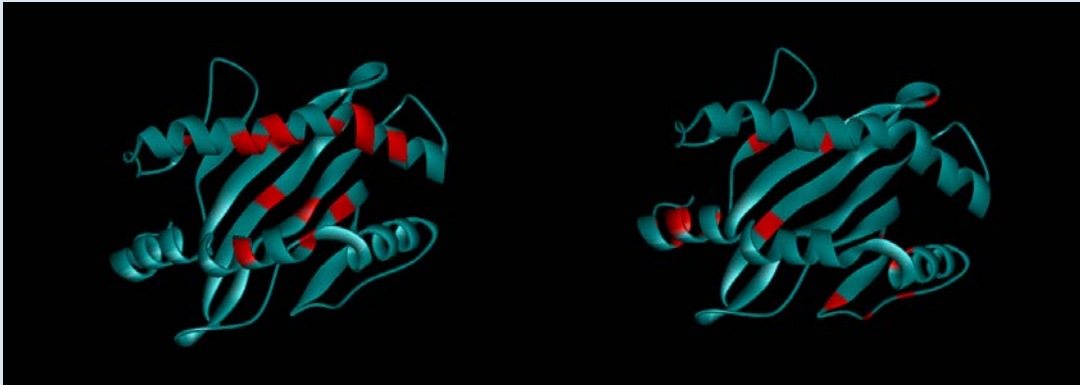
**Tabla 3.** Moléculas HLA no clásicas.



**Figura 5.** Representación tridimensional de una molécula MIC.

Una familia de genes descrita en 1994<sup>7</sup>, formada por varios pseudogenes y dos genes principales, son los MIC (Major Histocompatibility class I-Chain related). Los dos genes principales se encuentran situados en la región más telomérica de clase III y se denominan MICA y MICB. Se encuentran muy próximos al gen HLA-B. Concretamente, la distancia a la que se encuentra MICA es de sólo 47 Kb, lo que motiva el alto grado de desequilibrio de ligamiento que existe entre ambos genes.

Los genes MICA y MICB codifican para una proteína

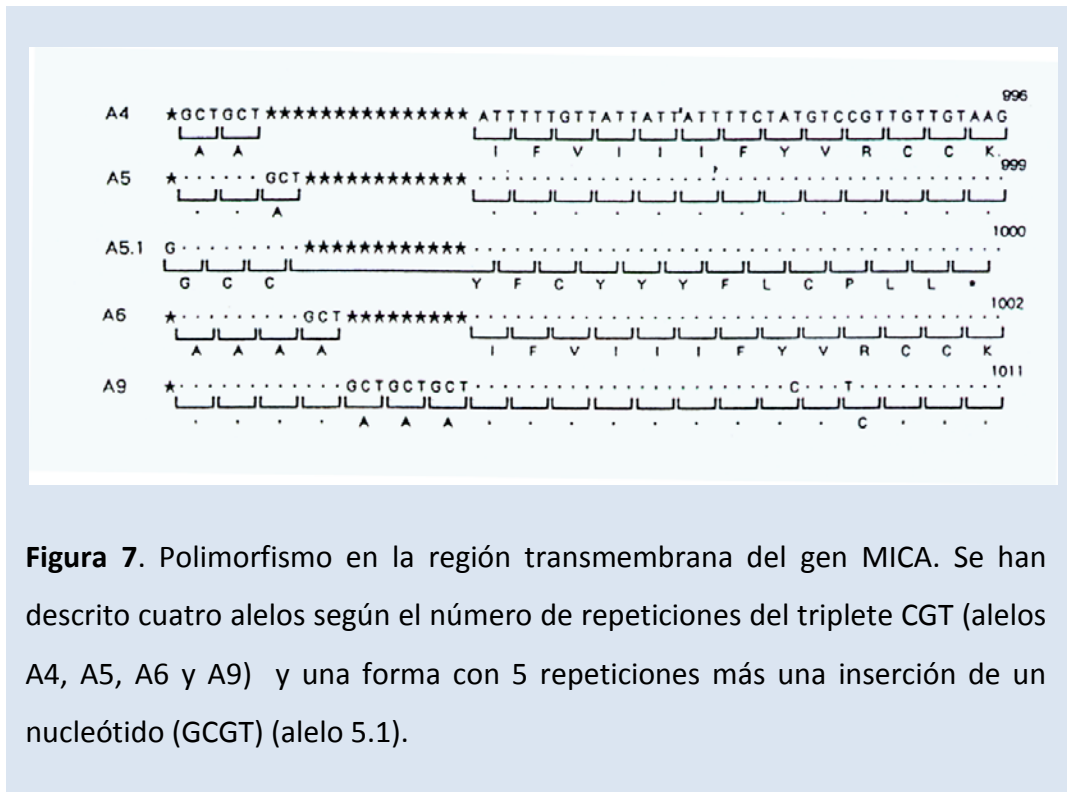


**Figura 6.** Distribución del polimorfismo en una molécula HLA de clase I clásica (izquierda) y MICA.

semejante a clase I, (Figura 5) con tres dominios extracelulares, otro transmembrana y un cuarto dominio intracitoplasmático. Entre los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  presenta una hendidura de unión semejante a la de las moléculas clásicas pero incapaz de unir péptidos, por lo que se ha especulado con la posibilidad de que su ligando lo constituyan cadenas de lípidos, polisacáridos o incluso polinucleótidos. Son pues capaces de expresarse en membrana en ausencia de un ligando peptídico. También se diferencian de las moléculas clásicas en que no unen covalentemente  $\beta_2$  microglobulina.

Tienen un patrón de expresión restringido a células epiteliales, especialmente en la mucosa digestiva<sup>8</sup>, y fibroblastos. Tanto MICA como MICB presentan en la región promotora elementos funcionales semejantes a los de proteínas de choque térmico. Esto se traduce en la posibilidad de que sean proteínas de estrés celular, y de hecho varios experimentos demuestran un incremento de los niveles de mRNA de MICA en líneas celulares epiteliales (HeLa) sometidas a un shock térmico<sup>8</sup>.

Anteriormente habíamos comentado que una característica diferenciadora de las moléculas HLA no clásicas era su escaso polimorfismo. MICA y MICB son la excepción, ya que su nivel de variabilidad es incluso similar al de algunos genes HLA clásicos<sup>9</sup>. Sin embargo la distribución de este polimorfismo es muy diferente a la de clase I (figura 6). No afecta a la hendidura de unión, dando la sensación de que la



**Figura 7.** Polimorfismo en la región transmembrana del gen MICA. Se han descrito cuatro alelos según el número de repeticiones del triplete CGT (alelos A4, A5, A6 y A9) y una forma con 5 repeticiones más una inserción de un nucleótido (GCGT) (alelo 5.1).

distribución de este en los tres dominios extracelulares se debe al azar, lo que hace muy difícil intuir su posible funcionalidad. MICA presenta además en su región transmembrana un microsatélite constituido por 4, 5, 6 o 9 repeticiones del triplete CGT (alelos A4, A5, A6 y A9) y una forma de 5 repeticiones más una inserción de un nucleótido (GCGT)<sup>10</sup>. Esta inserción condiciona una interrupción en la transcripción que daría lugar a una forma truncada de la proteína, posiblemente soluble, que se conoce como alelo A5.1 (figura 7).

La función biológica de las proteínas MIC es, por el momento, desconocida. Como ya habíamos apuntado es muy probable que tenga un papel relacionado con el estrés celular de diverso origen: infeccioso, transformación neoplásica, tóxico, etc. Hace ya algunos años se demostró que MICA y MICB eran ligandos para linfocitos con TCR $\gamma\delta$  que expresa la cadena V $\delta$ 111 aunque no se conoce realmente cual puede ser el papel de su reconocimiento por estas células. Estos linfocitos son especialmente frecuentes en la mucosa del tubo digestivo y forman la mayor parte de los linfocitos intraepiteliales infiltrantes en la enfermedad celíaca. Más recientemente se ha demostrado que MICA y MICB son ligandos del receptor activador NKG2D, que en humanos se expresa en la superficie de los linfocitos T CD8+ y de las células NK.

### 3.6. ASOCIACION DE LOS GENES HLA Y LA ENFERMEDAD CELÍACA

Como se ha mencionado anteriormente, la región HLA es el locus de susceptibilidad más importante en la EC y explica alrededor del 50% de la heredabilidad de la enfermedad. La asociación de HLA-DQ2 con la enfermedad es la más fuerte y así, alrededor del 90% de los pacientes celíacos presentan al menos una copia del heterodímero HLA-DQ2.5 (formado por la combinación de los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02, encargados de codificar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del heterodímero, respectivamente). Por otro lado, un 20-30% de la población no celíaca también es portadora del heterodímero de riesgo, lo que demuestra que, aún siendo el factor genético más importante, HLA-DQ2 es por sí solo insuficiente para desarrollar la enfermedad. La gran mayoría de los enfermos celíacos que no son portadores de HLA-DQ2 lo son del heterodímero HLA-DQ8, codificado por los alelos DQA1\*03 y DQB1\*03:02. Una proporción muy pequeña de pacientes son negativos tanto para DQ2 como para DQ8, pero se ha observado que en la mayoría de los casos estos individuos presentan al menos uno de los dos alelos que codifican para la molécula HLA-DQ2, es decir, DQA1\*05 o DQB1\*02.

Las heterodímeros de susceptibilidad HLA-DQ2 y HLA-DQ8, están en desequilibrio de ligamiento con los alelos HLA-DRB1\*03 y HLA-DRB1\*04, respectivamente. Por ello, al referirse a estas variantes de riesgo, se habla de los haplotipos DR3-DQ2 y DR4-DQ8. Los haplotipos que codifican el heterodímero de riesgo HLA-DQ2.5 se han asociado con la enfermedad en la mayoría de las poblaciones. En algunos haplotipos, como el DR3-DQ2, ambos alelos del heterodímero HLA-DQ2.5 (DQA1\*05:01 and DQB1\*02:01) se encuentran en el mismo cromosoma y están codificados en cis. En los individuos heterocigotos para los haplotipos DR11-DQ7 y DR7-DQ2, las dos moléculas se codifican en cromosomas diferentes, es decir, en trans (Figura X). Las diferencias entre ambos heterodímeros HLA-DQ2.5 afectan a un aminoácido del péptido señal de la cadena DQ $\alpha$ 1 (DQA1\*05:01 vs. DQA1\*05:05) y otro residuo situado en la región transmembrana de la cadena DQ $\beta$ 1 (DQB1\*02:01 vs. DQB1\*02:02) y no parece tener consecuencias funcionales, por lo que se les atribuye un riesgo similar.

### 3.7. OTROS GENES NO HLA Y LA ENFERMEDAD CELÍACA

Tal y como ya hemos mencionado, los heterodímeros de susceptibilidad HLA-DQ2 o HLA-DQ8 son condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la



## Introducción

enfermedad, ya que su efecto estimado sobre el riesgo es tan sólo del 36-53%. Existen multitud de genes no HLA que contribuyen a la enfermedad celíaca; sin embargo, el aporte de cada uno de ellos al desarrollo de la enfermedad es en realidad muy modesto. Debido al pequeño tamaño del efecto y la heterogeneidad genética entre poblaciones, la búsqueda de genes no-HLA que predisponen a la enfermedad celíaca ha sido una tarea realmente compleja. Sin embargo, este proceso se ha visto facilitado por la reciente aplicación de estudios de asociación de genoma completo (genome-wide association studies GWAS), un enfoque libre de hipótesis mediante el cual se puede probar la posible asociación con la enfermedad de miles de polimorfismos de nucleótido único (single nucleotide polymorphism SNP) distribuidos a través de todo el genoma.

Loci	Cromosoma	Región	Genes
<b>CELIAC1</b>	6	6p21	HLA-DQ
<b>CELIAC2</b>	5	5q31-33	Varios
<b>CELIAC3</b>	2	2q33	CTLA4
<b>CELIAC4</b>	19	19p3	MYO9XB
<b>OTROS</b>	4	4q27	IL2, IL21
	3	3p21	CCR
	12	12q24	SH2B3
	2	2q12	IL18RAP

**Tabla 1.4.** Lista provisional de loci genéticos descritos que predisponen al desarrollo de la enfermedad celíaca.

Una lista provisional de loci que predisponen a la enfermedad celíaca incluye CELIAC1 en el cromosoma 6 (HLA-DQ2 y HLA-DQ8), CELIAC2 en el cromosoma 5q31-33, CELIAC3 en el cromosoma 2q33 (que contiene los genes reguladores de linfocitos T CD28, CTLA4, e ICOS), y CELIAC4 en el cromosoma 19p13.1 (en el que se encuentra el gen de la miosina IXB, MYO9XB) (Tabla 1.4).

MYO9B codifica una molécula de miosina no convencional que parece tener un papel en la remodelación de la actina de los enterocitos. Se ha planteado la hipótesis de que esta variante genética podría estar asociada a un deterioro de la barrera intestinal, lo que podría permitir el paso de los péptidos inmunogénicos de gluten capaces de desarrollar la enfermedad. Aunque la asociación con MYO9XB no se ha replicado en algunas poblaciones europeas, ha sido un hallazgo especialmente interesante ya que algunas variantes genéticas de MYO9B predisponen también a la enfermedad inflamatoria intestinal. Estos datos implican que es muy probable que ambas patologías intestinales compartan mecanismos etiológicos subyacentes. Se encontró también una variante genética de MYO9B asociada con el lupus eritematoso sistémico y con la artritis reumatoide, lo que sugiere que MYO9B es un factor de riesgo general para la autoinmunidad. Por otra parte, se ha encontrado en pacientes holandeses una asociación con los genes *Pard3* y *MAGI2*, en enfermedad celíaca y en colitis ulcerosa, sugiriendo de nuevo un defecto común de la barrera intestinal en estas dos patologías.

El primer GWAS en una gran cohorte de pacientes y controles se realizó en el Reino Unido. En este estudio se identificaron variantes de riesgo para la enfermedad celíaca en la región 4q27, en la que se encuentran los genes que codifican para la IL2 y la IL21. La IL-2, secretada de forma autocrina por las células T estimuladas por el antígeno, es una citocina clave para la activación y la proliferación de las células T. Otra citocina derivada de las células T, la IL-21, incrementa la proliferación de linfocitos B, T, y de las células natural killer, además de la producción de IFN- $\gamma$ . Ambas citocinas están implicadas en la patogenia de otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1 y la artritis reumatoide, lo que sugiere que la región 4q27 podría representar un locus de riesgo para las enfermedades autoinmunes en general.

## *Introducción*

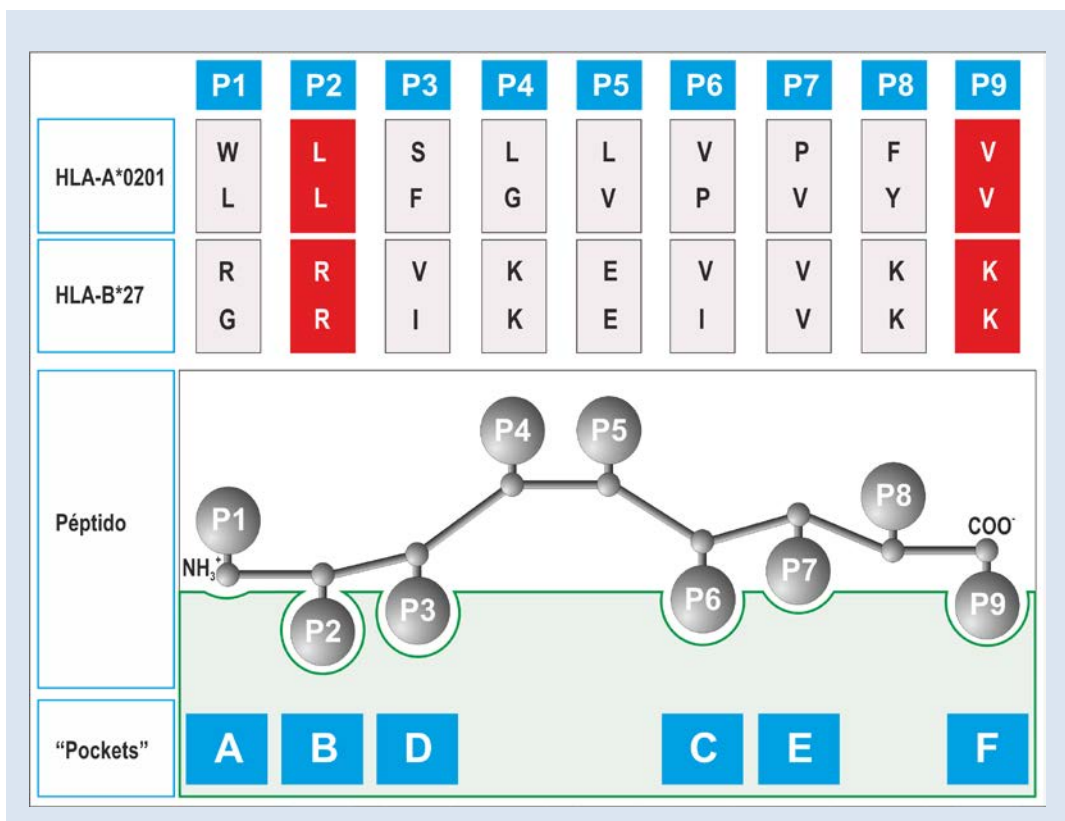
En otro estudio posterior en muestras procedentes de tres colecciones europeas independientes de pacientes con enfermedad celíaca, se identificaron siete regiones previamente desconocidas que contribuyen de manera significativa con respecto al riesgo de desarrollar la enfermedad. Estas siete regiones, junto con IL2-IL21, explican el 3-4% de la heredabilidad de la enfermedad celíaca. Seis de estas siete regiones contienen genes que controlan la respuesta inmune albergado, por ejemplo genes relacionados con la señalización de leucocitos en respuesta a la IL-18 o con la producción de IFN- $\gamma$ . Junto con otros estudios más recientes, estos hallazgos sugieren posibles mecanismos patogénicos comunes entre la enfermedad celíaca y la diabetes tipo 1, relacionados con la región SH2B3 y la región 3p21, así como entre la celíaca y la enfermedad de Crohn en relación con la región IL18RAP.

En resumen, parece claro que la predisposición genética a la enfermedad celíaca depende de un gen con un gran efecto (HLA-DQ2 / DQ8) sobre la respuesta inmune adaptativa a péptidos derivados del gluten y muchos otros genes que influyen sobre diferentes aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa, sobre la permeabilidad intestinal, y sobre la predisposición general a la autoinmunidad.

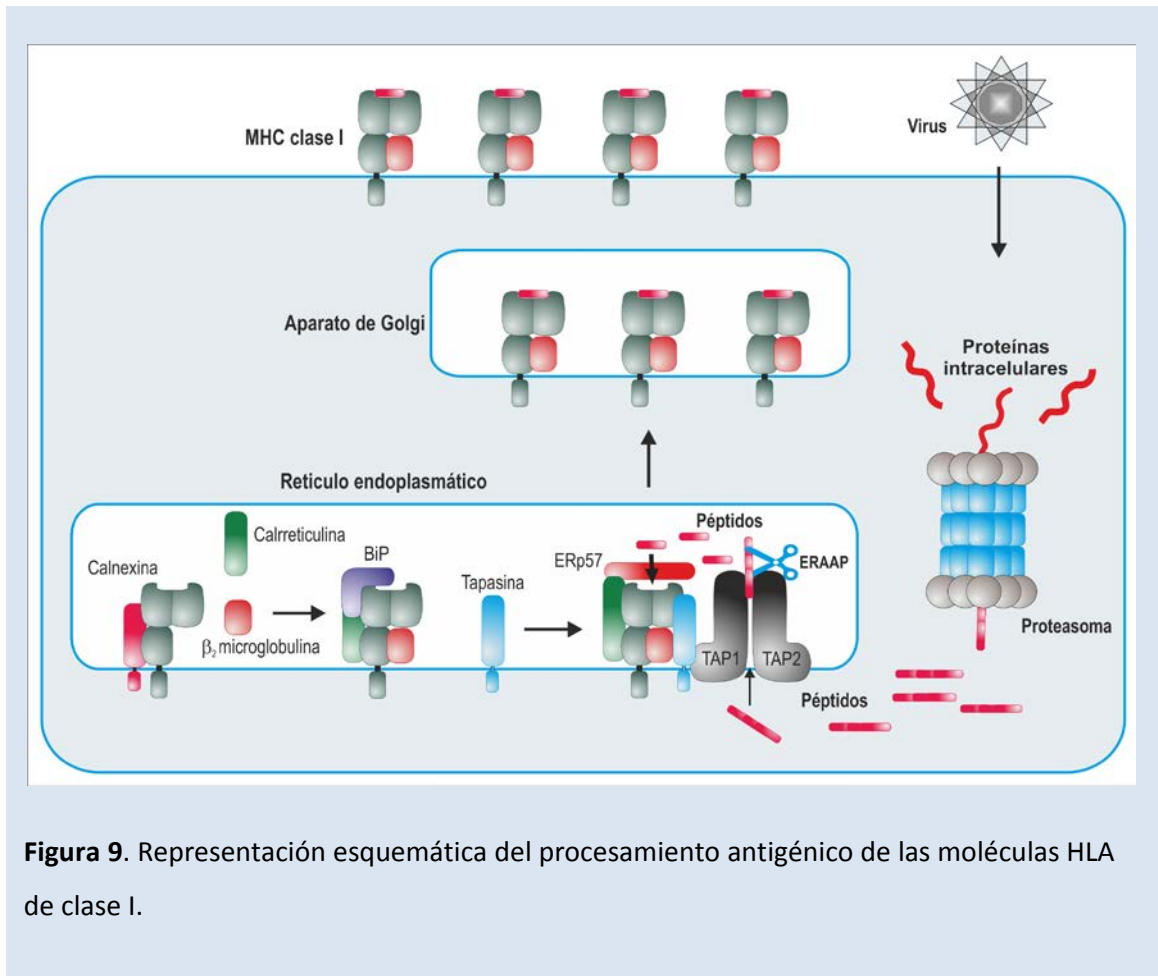
## 4. PATOGÉNIA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.

### 4.1. EL PROCESAMIENTO Y LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

Como ya hemos expuesto en apartados anteriores la misión de las moléculas HLA es presentar pequeños péptidos antigénicos a los linfocitos T (Figura 8). Todo el proceso que acontece desde que las distintas cadenas polipeptídicas que forman estas moléculas, son sintetizadas en los ribosomas a partir del RNA mensajero, hasta que ya ubicadas en la superficie celular con un péptido unido a su hendidura, interaccionan con el TCR de los linfocitos T, es verdaderamente complejo. Existen rutas de procesamiento distintas para las moléculas de clase I y II, llegando ambas al mismo término, con la expresión de la molécula en la membrana celular. Es importante resaltar el hecho de que estas moléculas no pueden expresarse si antes no ha unido un



**Figura 8.** Hendidura de unión de péptidos de las moléculas HLA de clase I. En la figura están representados los diferentes "pockets" a los que se anclan ciertos residuos del péptido antigénico.

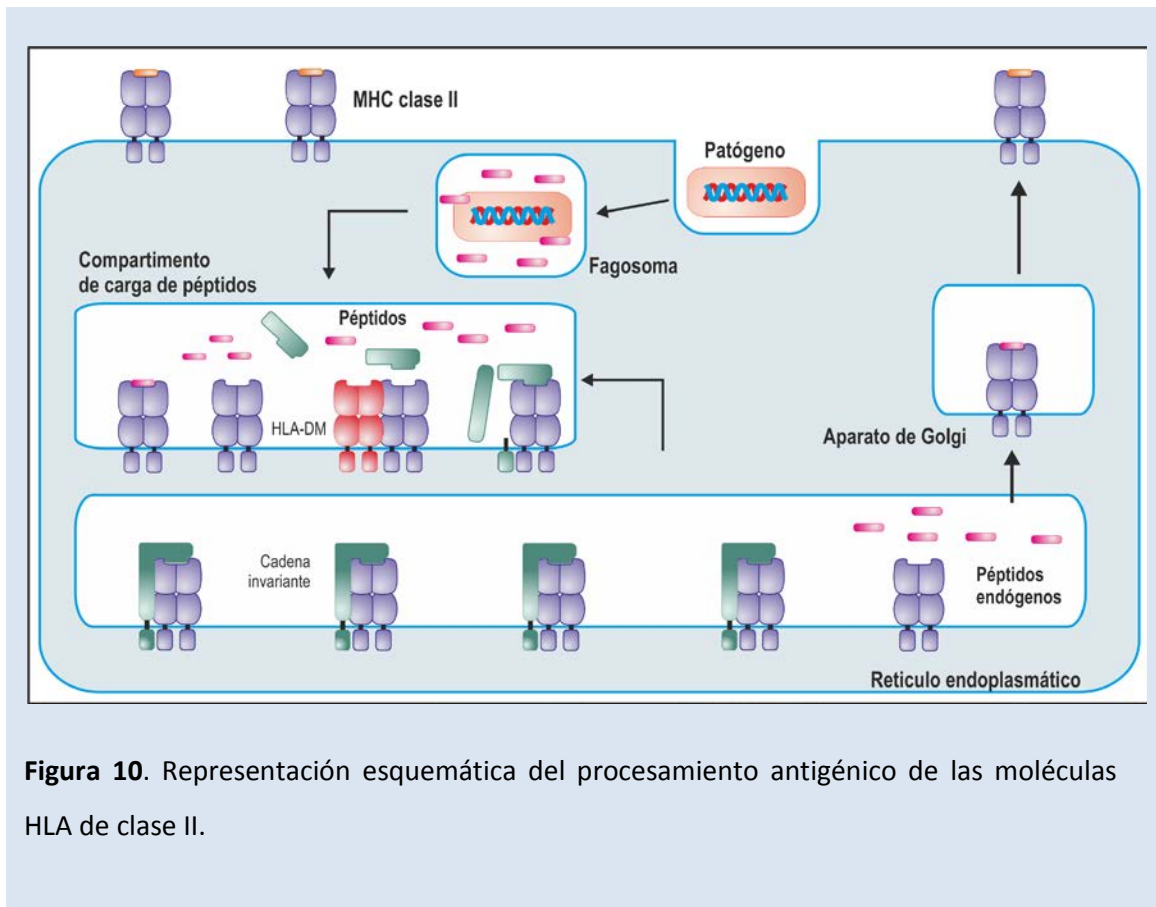


**Figura 9.** Representación esquemática del procesamiento antigénico de las moléculas HLA de clase I.

péptido.

El mecanismo de procesamiento antigénico para las moléculas de clase I se inicia cuando una cadena pesada recién sintetizada se une dentro del retículo endoplasmático a una proteína unida a membrana llamada calnexina. Esta proteína hace que la cadena pesada permanezca parcialmente plegada, lo que permite su unión a la  $\beta_2$  microglobulina, formándose de este modo el heterodímero característico una vez que se disocia de este la calnexina. Dos nuevas proteínas, la calreticulina y la tapasina, se unen a este complejo recién formado asociándolo a un complejo proteico transmembranal denominado TAP (*Transporter associated with antigen processing*). Esta estructura está formada por dos subunidades distintas (TAP-1 y TAP-2) codificadas por genes situados en la región MHC de clase II. Es la encargada de introducir en el retículo endoplasmático, péptidos generados en el citoplasma a partir de proteínas codificadas por los propios genes de la célula por un gran complejo enzimático, denominado proteasoma, formado por varias proteínas algunas de las cuales, LPM2 y

LPM7, están también codificadas por genes que se encuentran en la región de clase II.



**Figura 10.** Representación esquemática del procesamiento antigénico de las moléculas HLA de clase II.

Estos péptidos, formados por 8-12 residuos (habitualmente son 9) se introducen en la hendidura de la molécula de clase I, desligándose esta del complejo proteico al que estaba unida. La cadena pesada termina de plegarse, y el heterodímero con el péptido unido sale del retículo endoplasmático y a través de las vías de secreción habituales llega a la superficie de la célula.

La ruta de procesamiento antigénico para las moléculas de clase II, se inicia también en el retículo endoplasmático, cuando una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$  recién sintetizadas se unen para formar una molécula de clase II. Un número mínimo de estas moléculas son capaces de unir péptidos presentes en el interior del retículo endoplasmático, por lo que pasan directamente al aparato de Golgi y salen a la membrana a través de la ruta de secreción clásica por exocitosis. Sin embargo, la mayor parte de ellas se asocian en el interior del retículo endoplasmático a otra proteína no polimórfica llamada cadena invariante, que actúa bloqueando las

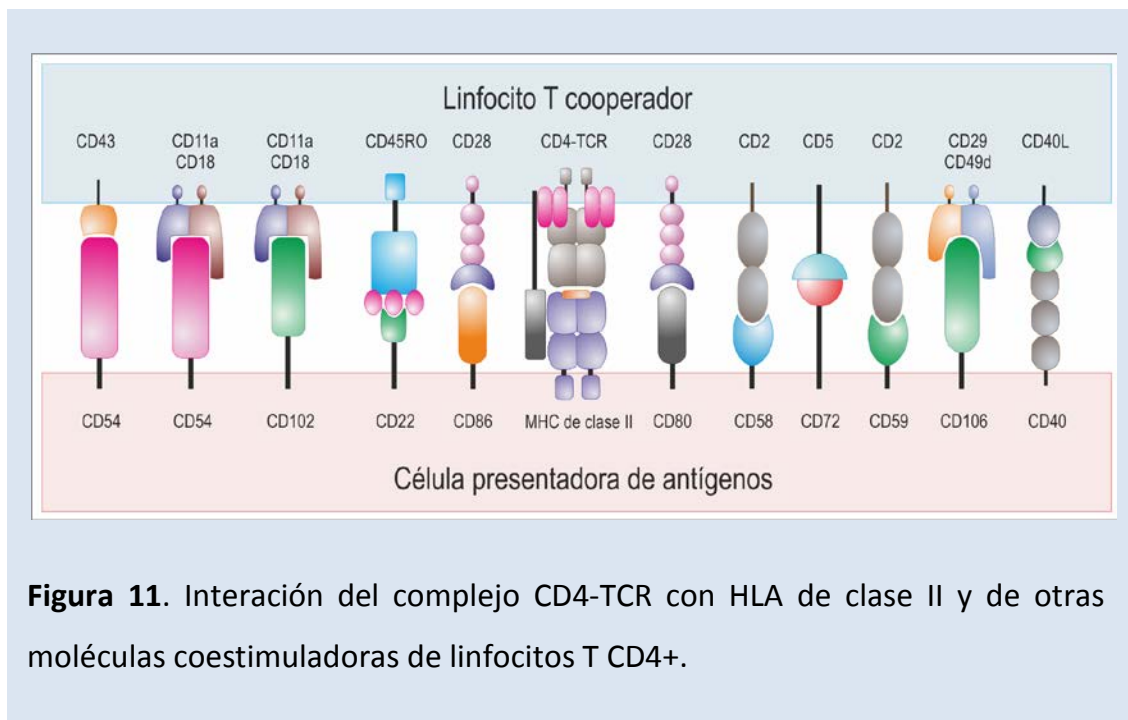
presentes en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. Esta proteína impide también que el heterodímero de clase II salga de la célula por exocitosis, y la obliga a entrar en una vía endocitótica. Como se deduce de lo dicho en párrafos anteriores, todo este proceso tiene lugar exclusivamente en determinados tipos celulares. En el caso de las células presentadoras de antígenos, estas son capaces de internalizar patógenos por mecanismos de endocitosis. Estos patógenos son degradados en el interior de vesículas de endocitosis denominadas endosomas. Otras vesículas desprendidas del aparato de Golgi conteniendo moléculas de clase II unidas a cadenas invariantes, que poco a poco va siendo degradada por el ambiente ácido existente en el interior, se unen a estos endosomas formando lo que se denomina compartimento de carga de péptidos. Ya dentro de este compartimento solo persiste un pequeño fragmento de la cadena invariante, denominado “clip” que ocupa la hendidura de unión del péptido. Este “clip” es desplazado por la acción de una proteína heterodimérica, formada por una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$ , denominada HLA-DM. Codificada por dos genes situados en la región de clase II, llamados HLA-DMA y –DMB, presenta una estructura semejante a las moléculas de clase II, aunque no se expresa en membrana y es incapaz de unir péptidos. Con la hendidura de unión libre de los últimos restos de la cadena invariante, la molécula de clase II ya puede unir péptidos derivados del patógeno que han ido formándose a partir de la degradación de las proteínas de este en el ambiente con alta actividad proteolítica del endosoma. Finalmente, la molécula de clase II con el péptido antigénico unido, se expresa en la membrana celular, lista para realizar su función presentadora.

### 4.2.INTERACCION ENTRE HLA Y TCR. ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T.

¿Cómo reconocen los linfocitos T estos pequeños péptidos presentados por las moléculas HLA? La estructura de membrana encargada de este reconocimiento es lo que conocemos como receptor de células T o TCR (del inglés: *T cell receptor*). En concreto, HLA de clase I que, como veíamos, une péptidos derivados de proteínas de la propia célula, interacciona con el TCR de linfocitos T CD8+, también conocidos como citotóxicos o efectoros. Estos linfocitos son capaces de este modo, de reconocer

células infectadas por virus o células neoplásicas con proteínas anormales, extrañas para el sistema inmune. La consecuencia de este reconocimiento es la destrucción de estas células diana.

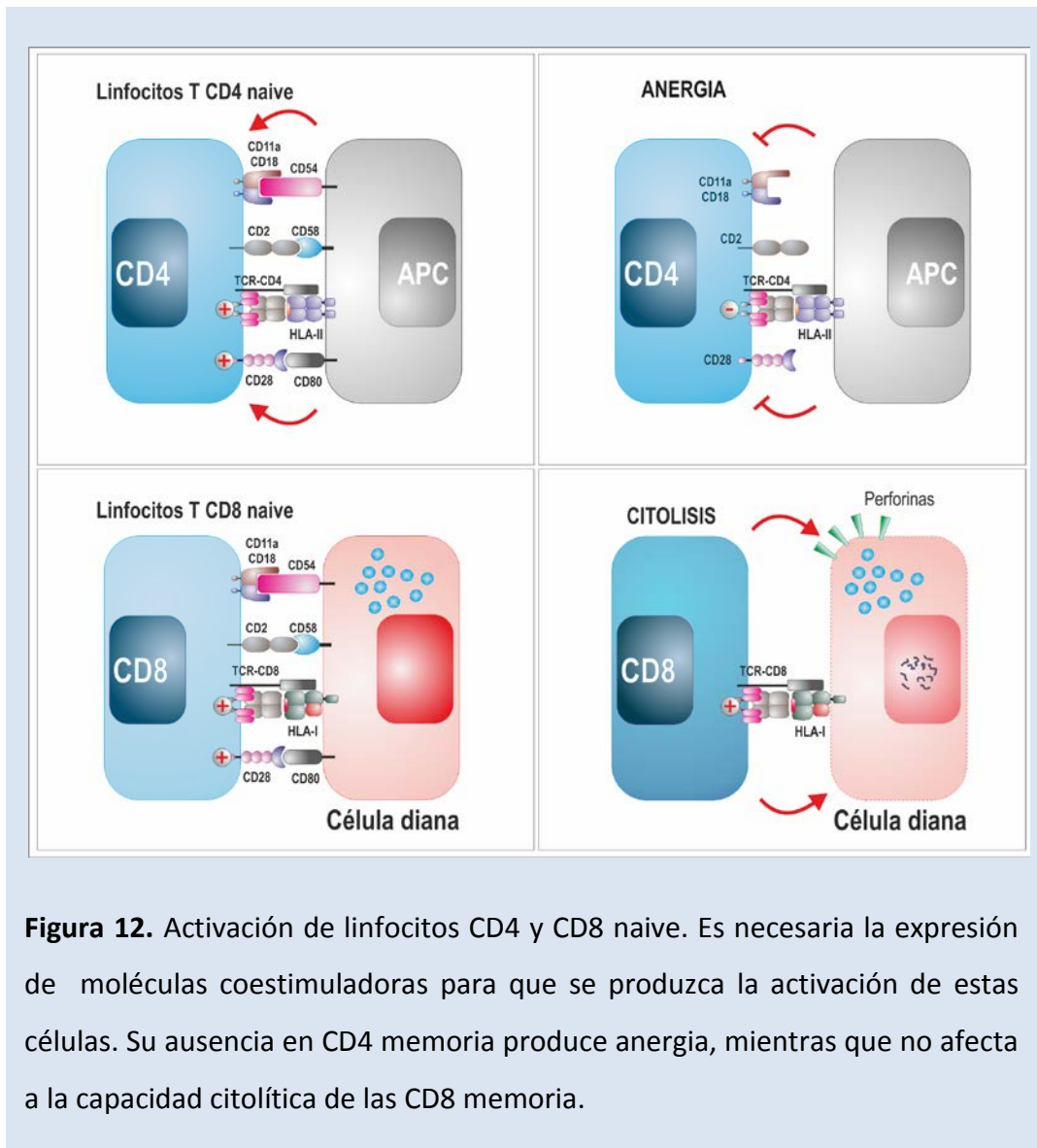
HLA de clase II, que a diferencia de las anteriores une péptidos derivados de patógenos, interacciona con el TCR de las células T CD4+. La misión de estos linfocitos no es lisar células infectadas o anormales, sino regular la función de los otros tipos celulares que intervienen en la respuesta inmune.



**Figura 11.** Interacción del complejo CD4-TCR con HLA de clase II y de otras moléculas coestimuladoras de linfocitos T CD4+.

La interacción entre la célula T y la célula presentadora de antígenos (*APC* o *Antigen processing cell*) es un fenómeno complejo en el que intervienen varias proteínas de membrana que interactúan entre sí (figura 11). Las proteínas LFA-1 (CD11a-CD18), CD2, ICAM-1 (CD54) y LFA-3 (CD58) por un lado, son moléculas de adhesión que permiten y hacen estable la interacción entre ambas células. El complejo TCR-CD3 y el correceptor CD4 interactúan con las moléculas presentadoras de antígenos y dan lugar a la señal principal de activación. La afinidad del TCR por un determinado antígeno constituye la base de la especificidad de esta activación, aunque en circunstancias excepcionales puede producirse una activación inespecífica. Es el caso de determinadas moléculas denominadas mitógenos, o el de los superantígenos bacterianos o víricos. En la superficie del linfocito T CD4 existe otra molécula





denominada CD28, capaz de reconocer dos proteínas presentes en la membrana de la célula presentadora de antígenos llamadas B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86). Esta interacción induce una señal secundaria de activación, que resulta imprescindible, ya que su ausencia provoca una situación especial de arreactividad en la que el linfocito CD4 es capaz de reconocer el antígeno pero incapaz de activarse. A esta situación especial se la conoce como anergia (Figura 12).

Existen otras muchas moléculas de superficie que intervienen en esta interacción. Su función en la activación celular resulta en algunos casos irrelevante y en otros muchos es poco conocida.

Una vez inducidas estas señales activadoras, se inician diversas cascadas de transducción de señales que tienen como finalidad hacer saber a núcleo del linfocito

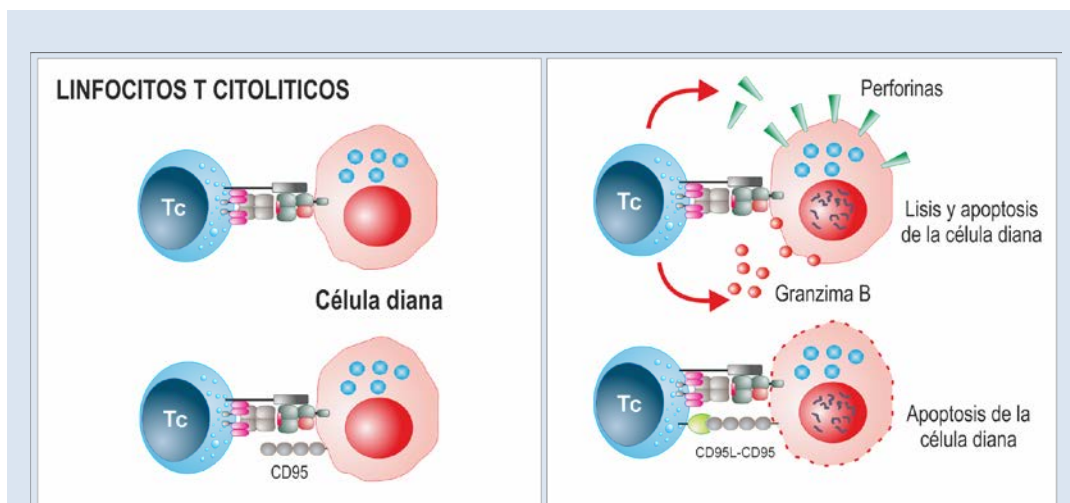
que se ha reconocido un antígeno. La reacción de este no se hace esperar y comienza a transcribir diversos genes que codifican las proteínas necesarias para que el linfocito T prolifere y lleve a cabo sus funciones. Los linfocitos citotóxicos producirán las perforinas necesarias para destruir células tumorales o infectadas, mientras que los Helper centrarán su producción en las citocinas que precisan para realizar sus funciones reguladoras.

### 4.3.LOS LINFOCITOS T EN LA ENFERMEDAD CELIACA.

Las células responsables de desencadenar la respuesta inmune de tipo específico son los linfocitos. Existen dos poblaciones principales de linfocitos, las células B y las células T. Ambas tienen como característica más relevante su capacidad de reconocer antígenos de forma específica, mediante receptores de membrana altamente especializados.

Las células B se diferencian durante la vida fetal en el hígado, para luego hacerlo en la médula ósea. Su principal función es la de producir inmunoglobulinas o anticuerpos, proteínas especializadas en reconocer y facilitar la eliminación de antígenos.

Las células T se originan en su mayoría en la médula ósea y desde allí emigran al

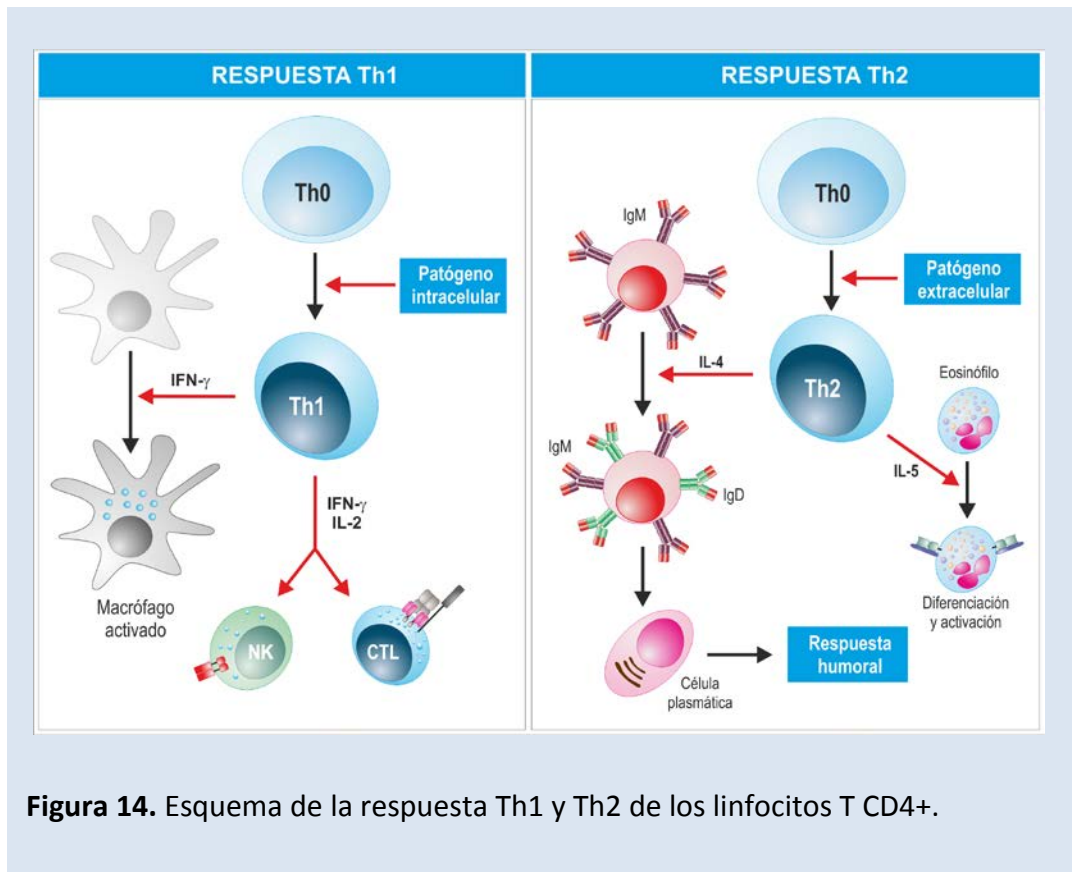


**Figura 13.** Activación de los linfocitos T citolíticos (CD8) y su efecto directo sobre la célula diana.

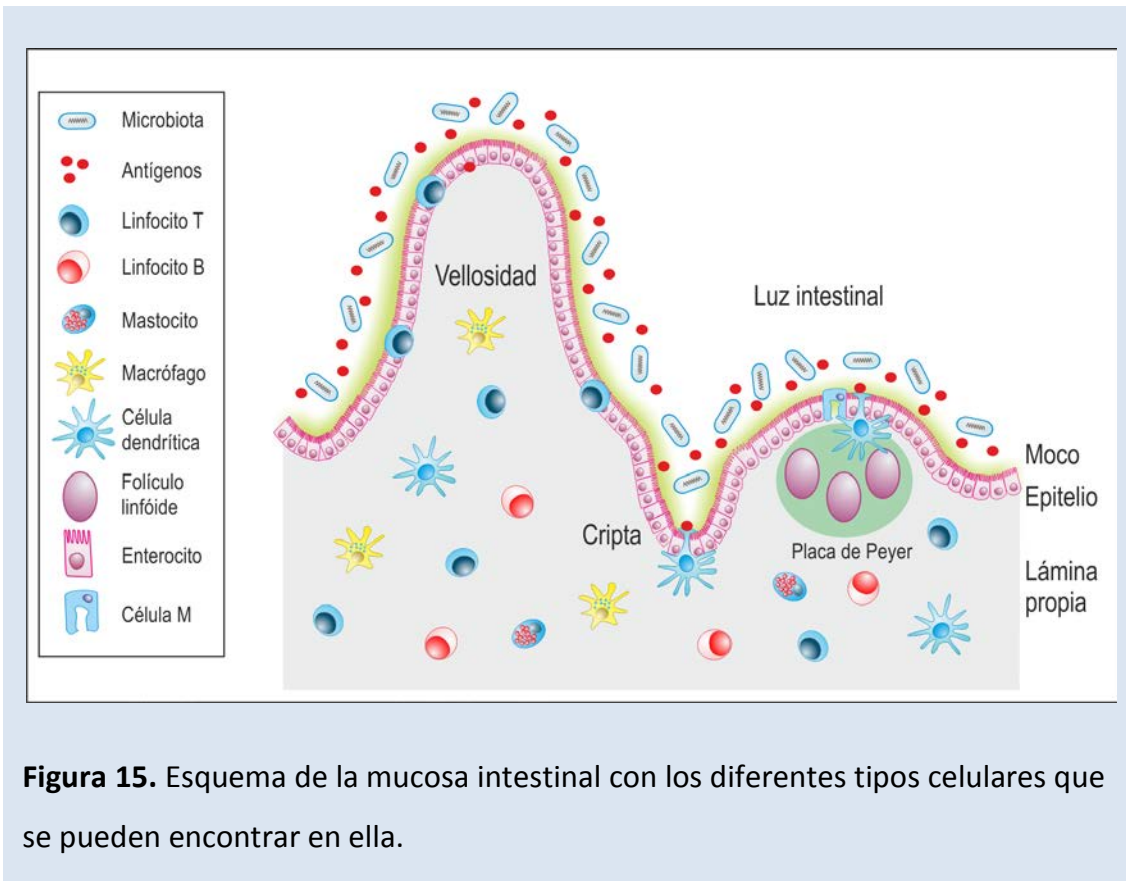
## Introducción

timo, donde maduran. Como ya habíamos señalado, su receptor de membrana para el antígeno se conoce como TCR. Tiene una estructura semejante a la de las inmunoglobulinas, un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. A diferencia de estas, no es capaz de reconocer el antígeno de manera directa si no que este debe sufrir una serie de modificaciones, comentadas ya anteriormente, que tienen como resultado final la producción de pequeños péptidos inmunogénicos que pueden ser reconocidos por el TCR cuando se encuentran unidos a las moléculas HLA.

Los linfocitos T suelen clasificarse atendiendo al tipo de TCR que presentan. En más del 90%, el heterodímero está formado por una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$ , por lo que se le conoce como  $TCR\alpha\beta$ . Este receptor es capaz de reconocer péptidos presentados por las moléculas HLA, interaccionando selectivamente con HLA de clase I si expresan el correceptor CD8, y con clase II si expresan CD4. Las células  $CD8+$  ejercen una función predominantemente citolítica; lisan células que expresan proteínas extrañas al organismo por que han sido infectadas por virus o por que han sufrido transformación



**Figura 14.** Esquema de la respuesta Th1 y Th2 de los linfocitos T  $CD4+$ .



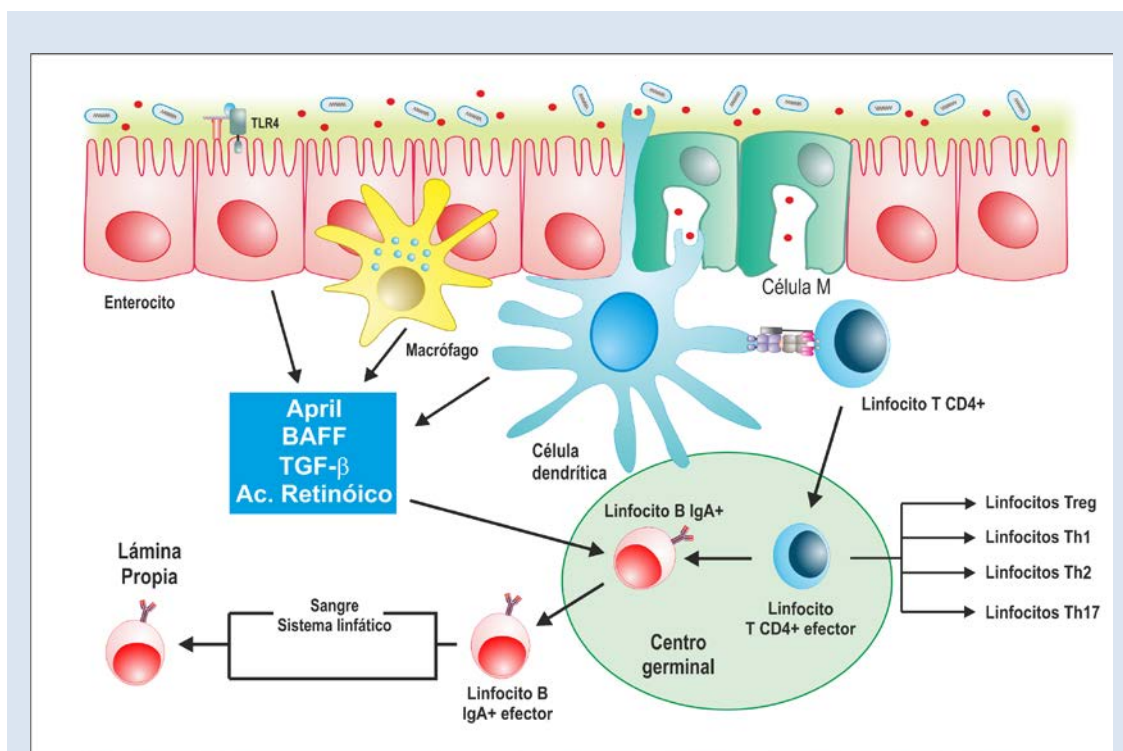
neoplásica. Su activación por el antígeno induce la liberación de moléculas como las perforinas y las granzimas capaces de lisar o inducir la apoptosis de la célula diana (Figura 13).

A las células CD4+ también se las conoce como “helper” porque actúan como colaboradoras o inductoras de la respuesta inmune, mediante la secreción de citocinas. Dependiendo de los patrones de citocinas que secretan se las puede clasificar en T<sub>H</sub>1 (figura 14), reguladoras de los procesos de citotoxicidad y de las reacciones inflamatorias locales, y T<sub>H</sub>2 (figura 14), que colaboran en los procesos inmunitarios mediados por anticuerpos.

El resto de los linfocitos T expresan un receptor formado por una cadena  $\gamma$  y otra  $\delta$  (TCR $\gamma\delta$ ). Salvo un número pequeño de ellas que expresa el correceptor CD8, son CD4- CD8-, lo que indica su incapacidad de reconocer péptidos presentados por las moléculas HLA. Estas células abundan especialmente en los epitelios mucosos, donde se supone desempeñan un importante papel en la defensa de estos frente a las agresiones de tipo infeccioso, tóxico, etc.

## Introducción

Hemos visto que la primera fase de la lesión celíaca se caracteriza por el incremento del número de linfocitos intraepiteliales (IEL). Estos linfocitos de tipo T, están representados en la mucosa del intestino delgado normal, por tres poblaciones distintas. Los más numerosos son los linfocitos  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}^+$   $\text{CD4}^-$ , aunque también aparecen linfocitos  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}^-$   $\text{CD4}^+$  y  $\text{TCR}\gamma\delta^+$   $\text{CD8}^-$   $\text{CD4}^-$ , aunque su número es muy inferior. En el epitelio de la mucosa del ID de un enfermo celíaco expuesto al gluten, las poblaciones  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}^+$  y  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  están expandidas, expresando ambas el marcador de proliferación Ki67. Cuando se instaura el tratamiento con una dieta libre de cereales que contengan gluten, los IEL de tipo  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}^+$  vuelven a la normalidad, mientras que los IEL  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  se mantienen en niveles elevados de manera permanente<sup>12</sup>. Es importante resaltar que la mayoría de los IEL  $\gamma\delta$  expresan la región variable  $\text{V}\delta 1$  del TCR, que como ya habíamos comentado es capaz de reconocer MICA y MICB, proteínas de membrana semejantes a las moléculas HLA de clase I, con un



**Figura 16.** Mecanismos fisiológicos relacionados con la respuesta inmune en la lámina propia de la mucosa intestinal, que podrían estar implicados en la patogenia de la enfermedad celíaca.

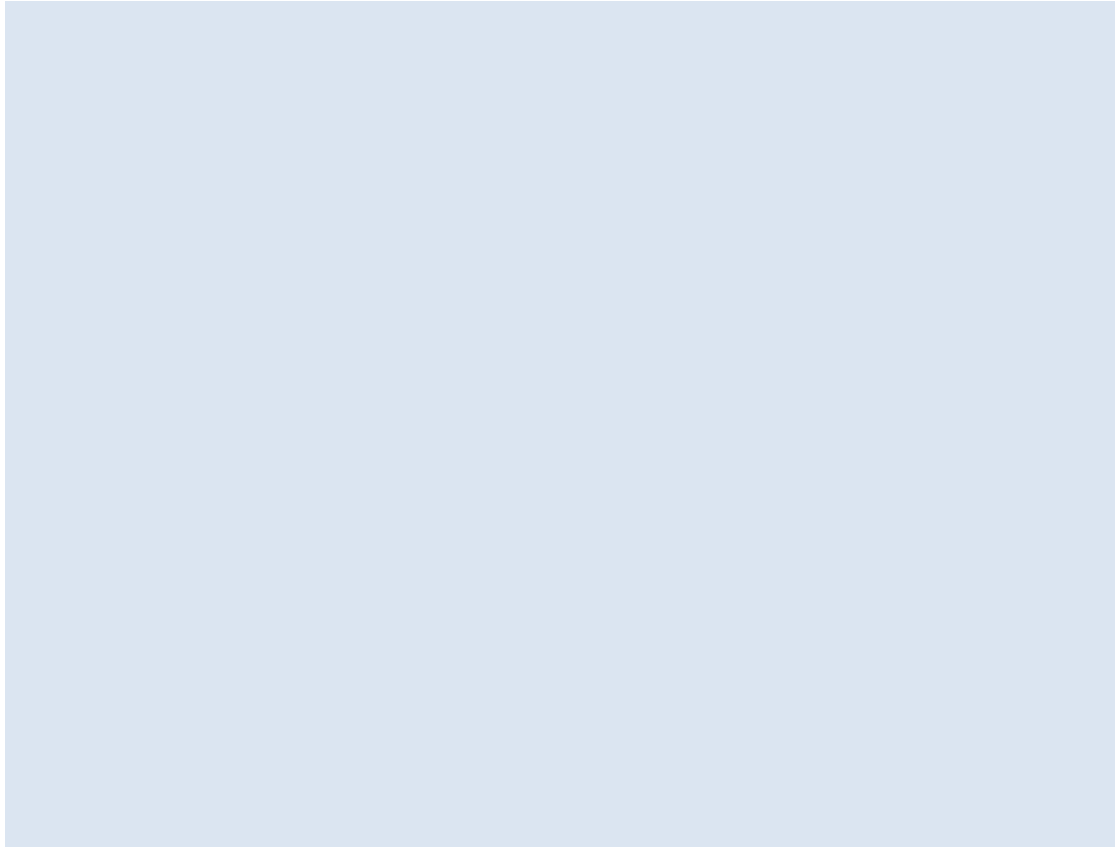
patrón de expresión tisular muy característico, relacionadas con los fenómenos de estrés celular<sup>8,11</sup>.

Todas estas poblaciones de IEL son capaces de producir, una vez activados, numerosas citocinas con potencial citolítico, sobre todo IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-15 y TNF- $\alpha$ <sup>13</sup>. Además, la presencia de marcadores característicos, revela que algunos de estos linfocitos podrían ser células T citotóxicas activadas, lo que contribuiría también al daño de la mucosa<sup>14</sup>.

El siguiente paso en la evolución de la enfermedad sería la infiltración de la lámina propia por linfocitos T TCR $\alpha\beta$ +, la mayoría de los cuales son CD4+ con fenotipo de células memoria (CD45RO+). Curiosamente, un elevado porcentaje de estas células expresa CD25, que es la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2, marcador que indica que se encuentran activadas. Sin embargo, a diferencia de los IEL, no expresan marcadores indicativos de proliferación celular<sup>16</sup>. Esto sugiere que el gluten no induce una respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ en la lámina propia, lo que concuerda con los resultados obtenidos por varios grupos, que revelan que estas células estarían produciendo grandes cantidades de citocinas, especialmente IFN- $\gamma$ , aunque también IL-2, IL-4, IL-6 y TNF- $\alpha$  (Figura 16). De hecho, estudios "in vitro" han demostrado que, estimulando con gluten biopsias de pacientes tratados, los niveles de mRNA de IFN- $\gamma$  alcanzan los niveles encontrados en biopsias de pacientes no tratados<sup>17</sup>. Se puede afirmar pues que los linfocitos T CD4+ que infiltran la lámina propia tienen como función primordial la producción de citocinas, especialmente IFN- $\gamma$ , desarrollando una respuesta Th1 fundamental para explicar gran parte de los cambios que sufre la mucosa del intestino delgado en los pacientes con enfermedad celíaca.

#### 4.4. PAPEL PATOGENICO DE HLA DQ EN LA ENFERMEDAD CELIACA

Como ya habíamos comentado, lo más característico de las moléculas de clase II es su capacidad de presentar péptidos derivados de patógenos a los linfocitos T CD4+. Aunque no pueda descartarse del todo, en la actualidad no se cree que existan microorganismos directamente relacionados con la enfermedad. ¿Cómo interviene entonces HLA-DQ2 en el desencadenamiento de la enfermedad?



La clave está en la hendidura de unión de péptidos de esta molécula. Al igual que las moléculas HLA-DR presenta residuos de anclaje en las posiciones P1, P4, P6, P7 y P9. Pero, a diferencia de otras moléculas de clase II, DQ2 presenta una gran afinidad por péptidos cargados negativamente en las posiciones de anclaje centrales. Curiosamente DQ8, que tiene una hendidura muy distinta a la de DQ2, también presenta posiciones de anclaje con gran afinidad por estos péptidos<sup>18,19</sup>.

DQ2 y DQ8 podrían intervenir en el desarrollo de la celíaca presentando péptidos relacionados con el gluten. De hecho, esto ha sido demostrado estimulando especímenes de biopsias de ID de pacientes con productos obtenidos de la digestión del gluten. El resultado es la rápida activación (expresión de CD25, cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2...) de las células T de la lámina propia, cosa que no sucede en controles sin enfermedad celíaca<sup>20</sup>. Estas células han sido aisladas y se ha objetivado que son capaces de reconocer péptidos antigénicos derivados del gluten presentados por la molécula DQ2<sup>21</sup>. Esto no descarta que también esta molécula intervenga también en los fenómenos de selección tímica del repertorio de TRC de linfocitos T.

Hay que resaltar que HLA-DQ no es la molécula preferente en los procesos de reconocimiento antigénico intestinal, incluso en los enfermos con intolerancia al gluten<sup>22</sup>. Esto sugiere un patrón de restricción HLA muy particular en estos linfocitos T sensibles al gluten.

Sin embargo, las características peculiares del sitio de unión de péptidos de DQ2 y DQ8, con su particular afinidad por residuos cargados negativamente, no se ajusta a las características de las proteínas de la fracción gliadínica del gluten, particularmente pobres en aminoácidos con carga negativa. Una importante pista que ayudó a resolver esta curiosa paradoja, fue el poder constatar que la capacidad de los preparados de gliadina de estimular células T específicas, aumentaba considerablemente cuando estos extractos habían sido expuestos a altas temperaturas y a un pH bajo<sup>23</sup>. Se sabía de antemano que estas condiciones favorecen la deamidación inespecífica de los residuos de glutamina a ácido glutámico, aminoácido que presenta carga negativa, formándose de esta forma péptidos ideales para las particulares capacidades de presentación de DQ2 y DQ8. La posterior ampliación de estos trabajos ha permitido conocer que es necesaria esta deaminación previa para que se produzca la activación de los linfocitos T y se precipite de esta forma la enfermedad.

Extrapolando estos conocimientos a la realidad de la mucosa intestinal, podemos preguntarnos como se produce esta deaminación "in vivo". El pH ácido del estómago sin duda es una importante fuente de deaminación, pero es un enzima, la transglutaminasa tisular (tTG) la principal responsable de ésta en la mucosa del ID<sup>24,25</sup>. Destacaremos además, que se ha constatado un particular incremento de la actividad de este enzima en la mucosa de los enfermos celíacos<sup>25</sup>. La tTG parece inducir una deaminación controlada de los residuos de la gliadina, a diferencia de la que se produce de forma espontánea, afectando específicamente a aquellos que son clave para el adecuado anclaje de los péptidos a la molécula DQ2<sup>25</sup>. De hecho, la deaminación de otros residuos puede impedir la correcta interacción péptido-DQ2. Además recientemente se ha demostrado que este enzima es blanco de la respuesta inmune humoral que se produce en estos enfermos. Concretamente, el antígeno de los autoanticuerpos anti-endomisio, los más específicos de la enfermedad, es en realidad

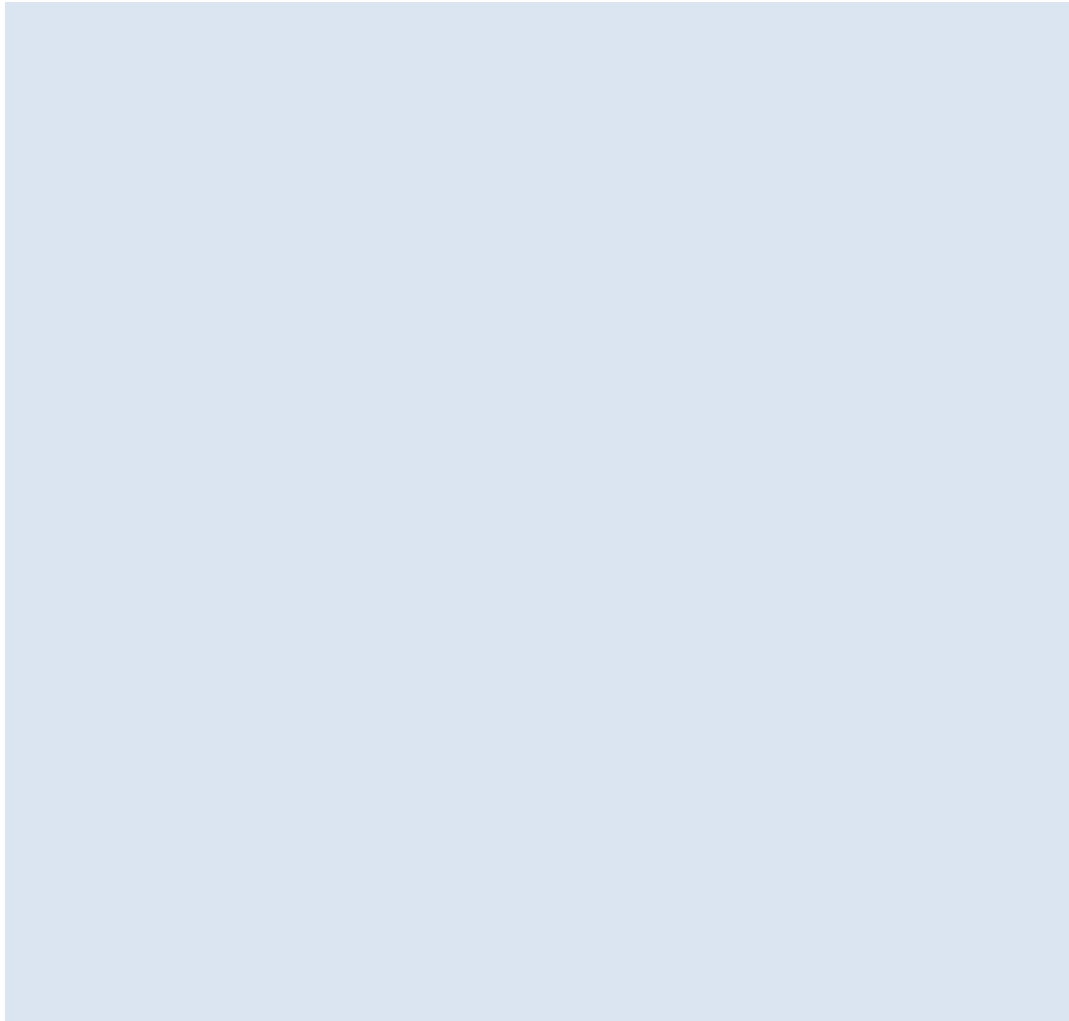


la tTG, aunque se desconoce hasta el momento la importancia que esto puede tener en la patogenia de la enfermedad<sup>26</sup>. Es muy intrigante la hipótesis de que la tTG juega un papel central en la selección de epitopos de la gliadina reconocidos por las células T. Esta idea se apoya en la observación de la respuesta de células T en los enfermos adultos esta focalizada en una sola glutamina deamidada, que es sustrato de la tTG.

#### **4.5. NKG2D Y SUS LIGANDOS EN LA ENFERMEDAD CELÍACA.**

Otros mecanismos, tales como la interacción MICA-NKG2D, parecen estar directamente implicados en la patogénesis de la enfermedad. Los polipéptidos de secuencia relacionada con MHC de clase I A y B (MICA / MICB) muestran una homología con las moléculas HLA de clase I, pero no tienen ningún papel en la presentación de antígenos. Tal y como ya hemos apuntado, MICA / MICB son glicoproteínas de la superficie celular que se expresan constitutivamente en los enterocitos. Estas proteínas son ligandos para el receptor K tipo 1 de la subfamilia de receptores tipo lectina de los linfocitos NK (KLRK1), también conocido como NKG2D. Se trata de un receptor de activación que se expresa de forma constitutiva en células NK, linfocitos T CD8 y T gamma-delta. La interacción entre MICA y NKG2D en las células NK produce la activación de estas e induce su capacidad citolítica, mientras que la interacción MICA-NKG2D en células T CD8 parece actuar como una señal co-estimuladora complementando el reconocimiento del antígeno por el receptor de células T (TCR). El papel que juega este receptor en linfocitos gamma-delta es más discutible, ya que parece tener un efecto activador directo como en el caso de las NK.

Ya hemos comentado que los ligandos de NKG2D (NKG2DL) no se expresan de forma constitutiva en la mayor parte de los tejidos sanos. Sin embargo, la expresión aberrante de NKG2DL se ha detectado en algunas enfermedades autoinmunes, como por ejemplo en islotes pancreáticos de ratones NOD (non-obese diabetic) prediabéticos y en los sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide. Por otra parte, MICA se expresa constitutivamente a niveles bajos en las células epiteliales intestinales normales (IECs). Sin embargo, MICA se expresa de forma muy elevada en los enterocitos de los pacientes con celíaca, tanto en las vellosidades como en las criptas.



Esta expresión parece responder a un efecto tóxico directo del gluten, ya que se ha demostrado que un péptido derivado de gliadina regula positivamente la expresión de MICA en células del epitelio como consecuencia de la inducción de IL-15. Este incremento de la expresión de MICA en el epitelio puede estar relacionado directamente con el daño en la mucosa y por lo tanto con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Además del posible papel patogénico del incremento de la expresión de esta molécula en los enterocitos, otro estudio ha demostrado además el efecto directo que juega la interacción MICA-NKG2D en la activación de los linfocitos intraepiteliales en respuesta a este efecto tóxico directo del gluten. Esta activación provoca daños en los enterocitos, y podría ser el evento inicial que, en última instancia, conduce a la atrofia de las vellosidades y por lo tanto al desarrollo de la enfermedad celíaca.

## *Introducción*

Finalmente, y tal y como sucede con la transglutaminasa tisular, el daño en el tejido y el incremento de la expresión de MICA que se produce en la enfermedad podrían inducir el desarrollo de anticuerpos contra esta molécula. De hecho, en el lupus eritematoso sistémico de inicio temprano se han descrito auto-anticuerpos anti-MICA. Por otra parte, estos anticuerpos han sido implicados en el rechazo de órganos en pacientes sometidos a trasplante renal y cardíaco, probablemente como consecuencia de una expresión aberrante de esta molécula en el injerto.

## OBJETIVOS

## *Objetivos*

El planteamiento inicial de este trabajo surgió al observar que, a pesar de compartir la asociación con HLA-DQ2 o HLA-DQ8, existen desde el punto de vista clínico, fenotipos diferentes de enfermedad celíaca, que se diferencian simplemente por el desarrollo o no de ciertas manifestaciones clínicas. Sin descartar una posible influencia del entorno, el desarrollo de un estudio con el fin de establecer si existe un condicionamiento genético de estas diferencias, nos pareció especialmente relevante.

Dentro de los posibles genes candidatos, han cobrado especial importancia tanto por su situación en el genoma, como a su papel funcional en la respuesta inmune, los ligandos de NKG2D, MICA y MICB. Estos ligandos y su receptor han sido implicados tanto en la propia enfermedad celíaca como en el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes

Por estos motivos nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Investigar la posible influencia sobre el fenotipo de la enfermedad celíaca de los diferentes haplotipos HLA portadores del heterodímero de susceptibilidad HLA-DQ2.
2. Analizar la posible asociación de otros genes en la región HLA de clase I y clase III, que predispongan o protejan de la aparición de formas más agresivas de la enfermedad.
3. Comprobar en una cohorte de pacientes y controles procedente de la población saharai de los campamentos de Tindouf los resultados obtenidos en el desarrollo de los dos primeros objetivos.
4. Analizar si la expresión en la mucosa de los pacientes con enfermedad celíaca de MICA, MICB, NKG2D y IL15 está relacionada con el grado de lesión que han desarrollado estos pacientes.
5. Investigar la presencia de anticuerpos anti-MICA en pacientes con enfermedad celíaca activa.
6. Investigar si el desarrollo de anticuerpos anti-MICA está relacionado con el desarrollo de patología autoinmune adicional en los enfermos celíacos.

## *Objetivos*

## MATERIALES Y METODOS





## 1. PACIENTES Y CONTROLES SANOS

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizaron muestras de 1.636 individuos, con un total de 698 pacientes con enfermedad celíaca, 428 con otras enfermedades autoinmunes y 510 controles sanos.

Los pacientes se distribuyeron en los diversos estudios que conforman esta tesis doctoral según se refleja en la tabla 1.1.

Estudio	Población			Procedencia
	Celíacos	Otras EAI	Controles	
Estudio genético de las formas clásicas y atípicas de la enfermedad celíaca en la población española	171	-	207	HUCA
Estudio genético de las formas clásicas y atípicas de la enfermedad celíaca en la población saharai	124	-	98	Camapmentos de Tindouf (Argelia)
Estudio de la expression de NKG2D y sus ligandos MICA y MICB en biopsias de pacientes con enfermedad celíaca	20	-	5	HUCA
Análisis de la presencia de anticuerpos anti-MICA en la enfermedad celíaca	383	428	200	HUCA, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Hospital Marqués de Valdecilla, Policlinico S'Orsola-Malpighi
Total	698	428	510	-

**Tabla 1.1.** Volúmenes de los diversos reactivos empleados para la realización del genotipado alélico de MICA.

## 2. OBTENCION DE DNA GENOMICO

Se obtuvo una muestra de DNA genómico a partir de 10ml de sangre total con EDTA como anticoagulante. Todo el proceso se realizó en tubos “Falcon” de 25 ml. El método de extracción se inicia tratando la sangre con solución de lisis de eritrocitos, recogiendo el precipitado de leucocitos después de dos centrifugaciones a 2500 rpm durante 15 minutos. Este precipitado se trata con una solución de lisis de glóbulos blancos en presencia de SDS al 10%. A esta mezcla se le añade una proteinasa y se incuba durante 12 horas a 37 °C. Seguidamente se procede a precipitar las proteínas añadiendo una solución saturada de cloruro sódico, agitando la mezcla vigorosamente y centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante en un nuevo tubo y se añaden 2.5 volúmenes de etanol absoluto, lo que induce la insolubilización del DNA. Se recoge la “medusa” de DNA en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se lava con etanol al 70%. Seguidamente se retira el etanol y se deja secar el DNA a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente se procede a su solubilización en agua destilada. Su concentración y pureza se evalúan por medición de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro.

En el caso específico de los pacientes y de los controles saharauis se obtuvieron dos mililitros de sangre periférica de cada paciente y cada control sano. La sangre se mezcló con 2 ml de etanol con el fin de fijarla para su transporte y almacenamiento hasta hasta el momento en que se procesaron las muestras. El etanol se eliminó lavando dos veces con PBS (tampón fosfato salino) y eliminando el sobrenadante tras una centrifugación. Finalmente el ADN genómico se obtuvo utilizando las columnas de purificación con membrana de sílice NucleoSpin Blood LTM de MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemania. Su concentración y pureza se evalúan por medición de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro.

También se extrajo DNA genómico a partir de sangre periférica con los kits “DNA Magtration-MagaZorb commons N-200” utilizando el sistema automático 12GC Magtration (Pecisión System Science Co., Ltd., Woerrstadt, Alemania) y con el reactivo de extracción “Maxwell® 16 Blood Purification Kit” utilizando el equipo automático Maxwell® 16 Instrument (Promega Corporation, Madison (Wisconsin), EE.UU.). En el

caso de las obtenidas con los sistemas automáticos, su concentración y pureza se evaluó utilizando el sistema de espectrofotometría Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) utilizando el ratio de absorbancia de 260/280 nm.

### 3. TÉCNICAS DE GENOTIPADO

#### 2.1. TIPAJE DE HLA-B\*

Para el tipaje de HLA de clase I se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR="Polymerase Chain Reaction") con cebadores específicos de secuencia (SSP="Sequence Specific primers"). Como control interno de reacción se ha utilizado una pareja de cebadores que amplifican parte del exón 2 del gen HFE (tabla

	Cebador 5'	Cebador 3'
<b>HFE</b>	ACATGGTTAAGGCCTGTTGC	CTTGCTGTGGTTGTGATTCCC

**Tabla 1.1.** Cebadores empleados como control interno de PCR.

6). Se han amplificado específicamente, mediante los cebadores recogidos en la tabla 2, los alelos HLA-B7, B8, B18, B35 y B44 escogidos por ser conocida de antemano su asociación a la enfermedad celíaca (HLA-B8 y B18) o por ser los más frecuentes en nuestra población (B7, B44 y B35).

Las amplificaciones se realizaron en tubos de polipropileno de 200 µl, con un volumen final de reacción de 15 µl, en termocicladores tipo peltier con bloque de 96 tubos, de la marca TECHNE modelo GENIUS. La composición final de la mezcla de reacción fue la siguiente:

- 1.5 µl de buffer de PCR 10x BIOTAQ.
- 1 µl de cloruro de magnesio a una concentración de (25 mM).
- 1.5 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (2mM).

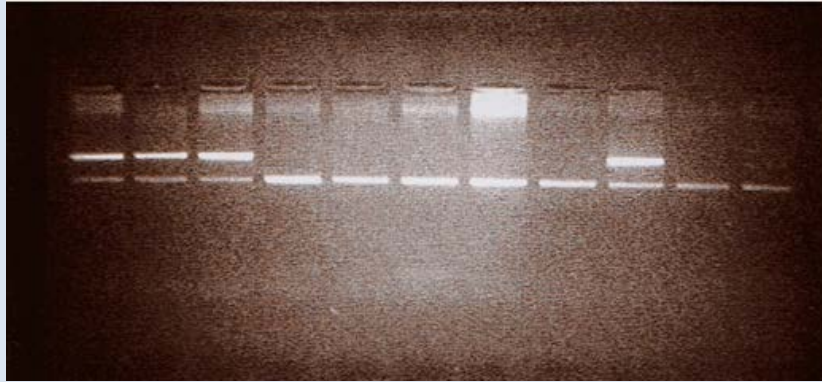
Alelos	Cebador 5'	Cebador 3'	Tamaño del amplicón
<b>HLA-B</b>			
<b>HLA-B*07</b>	GGAGTATTGGGACCGGAAAC	TACCAGCGCGCTCCAGCT	619 bp
<b>HLA-B*08</b>	CCACTCCATGAGGTATTTTCG	CCGCGCGCTCCAGCGTG	781 bp
<b>HLA-B*18</b>	GCGCCGTGGATAGAGCAA	CTTGCCGTCGTAGGCGG	458 bp
<b>HLA-B*35</b>	GACCGGAACACACAGATCTT	GAGGAGGCGCCCGTTCG	389 bp
		GGAGGAAGCGCCCGTTCG	340 bp
<b>HLA-B*44</b>	CGCCACGAGTCCGAGGAA	GTCGTAGGCGTCCTGGTC	480 bp

**Tabla 1.2.** Lista de cebadores utilizados en tipaje de HLA-B, sintetizados en nuestro laboratorio.

- 1.5 µl de una dilución del cebador 5' (10 µM).
- 1.5 µl de una dilución del cebador 3' a 10 µM.
- 1 µl de una mezcla de los cebadores de control interno (10 mM).
- 1.5 µl de buffer de carga formado por rojo cresol y glicerol.
- 3.5 µl de agua bidestilada.
- 2 µl de DNA genómico (100 ng / µl).
- 0.08 µl de Taq DNA polimerasa BIOTAQ™ (5 U / µl).

En todos los casos se empleó como control negativo una mezcla de reacción en la que el DNA genómico fue sustituido por agua destilada.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio como marcador del DNA. El resultado fue fotografiado utilizando un retroiluminador de luz UV y una cámara de video con filtro especial. El tamaño de los amplificados fue estimado comparándolos con un marcador de tamaños estándar de 1 Kb (Amershan-Pharmacia).



**Figura 1.** Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, que representa el tipaje de HLA-B44 en un grupo de pacientes. La banda de mayor tamaño corresponde al amplificado específico de B44 y la de menor tamaño es el control interno de la PCR.

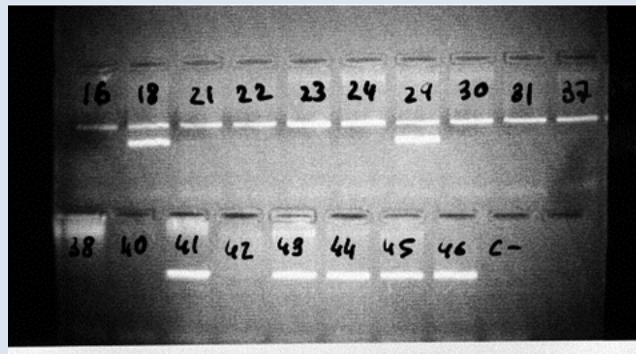
## 2.2. TIPAJE DE HLA-DRB1\* DE BAJA RESOLUCION

Para el tipaje de HLA-DR se empleó también la técnica de PCR-SSP, utilizando los

Alelos	Cebador 5'	Cebador 3'	Amplición
<b>DR1</b>	TTGTGGCAGCTTAAGTTTGAAT	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	255 255
<b>DR15</b>	TCCTGTGGCAGCCTAAGA	CCGCGCCTGCTCCAGGAT	197
<b>DR16</b>	TCCTGTGGCAGCCTAAGAG	AGGTGTCCACCGCGGCG	213
<b>DR3</b>	GACGGAGCGGGTGC GGTA	CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	217
<b>DR4</b>	GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	260 260
<b>DR7</b>	CCTGTGGCAGGGTAAGTATA	CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	232
<b>DR8</b>	AGTACTCTACGGGTGAGTGTT	CTGCAGTAGGTGTCCACCAG	214
<b>DR9</b>	GTTTCTTGAAGCAGGATAAGTTT	CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	236
<b>DR10</b>	CGGTTGCTGAAAGACGCG	CTGCACTGTGAAGCTTCTAC	204
<b>DR11</b>	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	CTGGCTGTTCAAGTACTCCT	176
<b>DR12</b>	AGTACTCTACGGGTGAGTGTT	CACTGTAAGCTCTCCACAG	248
<b>DR13</b>	TACTCCATACCAGGAGGAGA	CCCGCTCGTCTTCCAGGAT	130
<b>DR14</b>	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC AGTACTCTACGGTAAGTGTT	TCTGCAATAGGTGTCCACCT	224 215

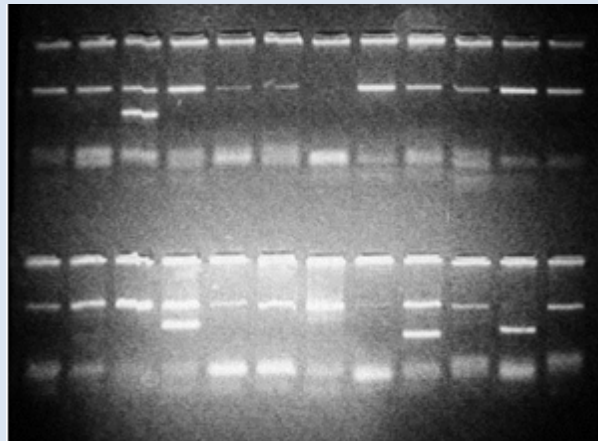
**Tabla 1.3.** Lista de cebadores utilizados para el tipaje de HLA-DR de baja resolución.

cebadores recogidos en la tabla 1.3, y el mismo control interno de reacción que en el caso anterior. Se tiparon ambos alelos tanto en enfermos como en controles. La mezcla de reacción empleada tenía la misma composición que la usada para amplificar HLA-B y que se describe con detalle en el apartado anterior.



**Figura 1.2.** Tipaje HLA-DR3 de un grupo de pacientes celíacos. La banda de mayor tamaño corresponde al control interno de reacción. La de menor tamaño es el amplificado específico de DR3.

Los casos dudosos fueron tipados de nuevo con el kit comercial “Fastype HLA-DR Low Resolution” de BIOSYNTHESIS INCORPORATED distribuido por Diagnóstica Longwood SL. En este kit se realizan por 24 reacciones de PCR-SSP por paciente con cebadores específicos para cada alelo. Los sistemas de electroforesis, fotografía y estimación de tamaños fueron los mismos empleados para el tipaje de HLA-B.



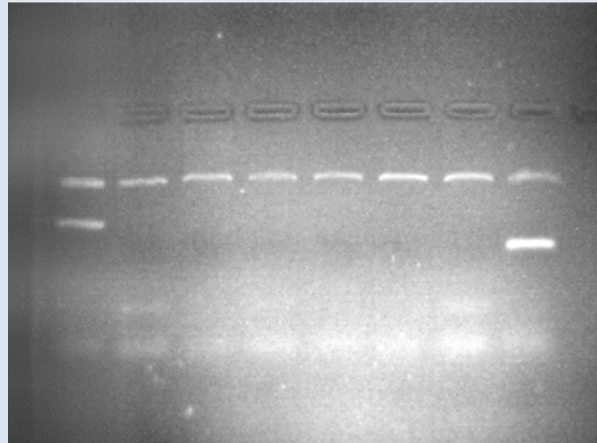
**Figura 1.2.** Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, de un tipaje HLA-DRB1\* de baja resolución realizado con el kit comercial Fastype. El genotipo resultante en este caso es DRB1\*07,15.



### 2.3. TIPAJE HLA-DQB1\* DE BAJA RESOLUCIÓN

Para el tipaje de HLA-DQ se utilizó también la técnica de PCR-SSP, aunque en este caso se empleó el kit comercial “Fastype HLA-DQ Low Resolution” de BIOSYNTHESIS INCORPORATED distribuido por Diagnóstica Longwood SL. En este caso se realizaron ocho reacciones de PCR por cada sujeto, obteniendo en cada caso ambos alelos HLA-DQ.

La electroforesis y la fotografía del gel se realizaron de la forma descrita anteriormente.



**Figura 1.3.** Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, de un tipaje HLA-DQ de baja resolución. El genotipo resultante en este caso es DQB1\*02 homocigoto.

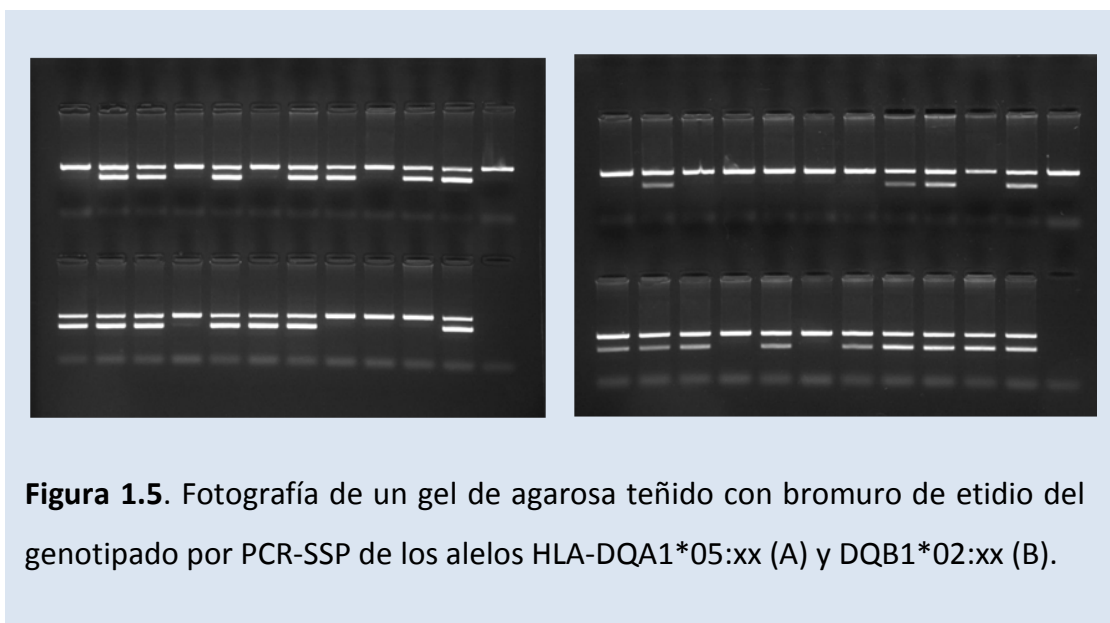
### 2.4. TIPAJE HLA-DQB1\* DE ALTA RESOLUCIÓN

Para demostrar la presencia o ausencia del heterodímero DQ $\alpha$ 1\*05:01/05, DQ $\beta$ 1\*02:01/02 tanto en pacientes como en controles, se empleó también la técnica de PCR-SSP, usando el mismo control interno de reacción que en el tipaje de HLA-B y DR. Las dos parejas de cebadores empleados (tabla 4) amplificaban específicamente los alelos DQA1\*05:01/05 y DQB1\*02:01/02. Se realizaron dos reacciones de PCR por

sujeto, tanto en pacientes como en controles, en tubos de 200  $\mu\text{l}$  con un volumen final por reacción de 15  $\mu\text{l}$ . La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente:

- 1.5  $\mu\text{l}$  de buffer de PCR 10x. BIOTAQ.
- 1  $\mu\text{l}$  de cloruro de magnesio a una concentración 25 mM.
- 1.5  $\mu\text{l}$  de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato a una concentración 2 mM.
- 1.5  $\mu\text{l}$  de dilución del cebador 5' a una concentración 2  $\mu\text{M}$ .
- 1.5  $\mu\text{l}$  de dilución del cebador 3' a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ .
- 1  $\mu\text{l}$  de mezcla de cebadores de control interno a 2  $\mu\text{M}$ .
- 1.5  $\mu\text{l}$  de buffer de carga formado por rojo cresol y glicerol.
- 3.5  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada.
- 2  $\mu\text{l}$  de DNA genómico a una concentración de 50 ng por  $\mu\text{l}$ .
- 0.06  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerasa BIOTAQ™ a una concentración de 5 U por  $\mu\text{l}$ .

Se empleó también como control de contaminación un tubo con mezcla de reacción en el que se sustituyó el DNA por agua.



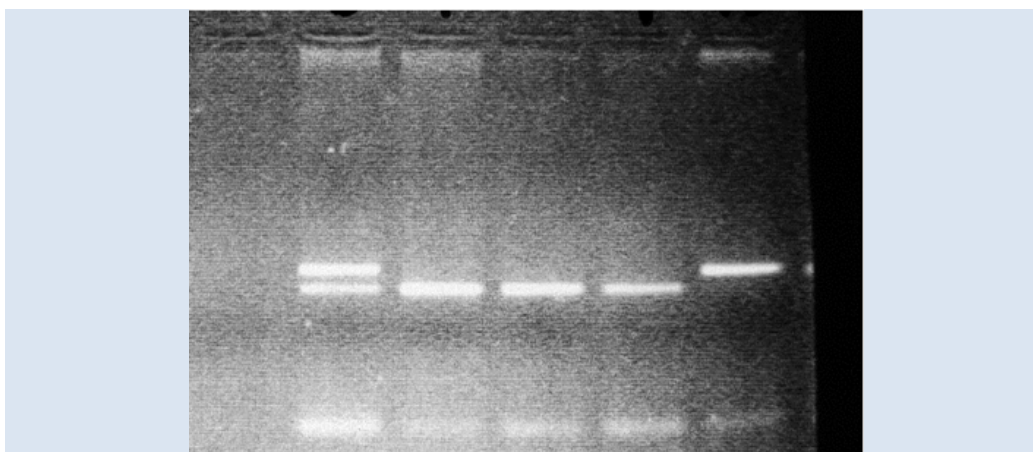
El resto de los procedimientos se realizaron de la misma forma descrita previamente.

	Cebador 5'	Cebador 3'	Tamaño amplicón
<b>DQA1*05:XX</b>	ACGGTCCCTCTGGCCAGTA	AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC	186 bp
<b>DQB1*02:XX</b>	GTGCGTCTTGAGCAGAAG	GCAAGGTCGTGCGGAGCT	205 bp

**Tabla 1.4.** Lista de cebadores usados para el tipaje de HLA-DQB1\* de alta resolución.

### 2.5. TIPAJE DEL POLIMORFISMO -308 DEL PROMOTOR DEL GEN TNFA.

Se realizó el tipaje del polimorfismo -308 del promotor del gen que codifica para TNF- $\alpha$  tanto en pacientes como en controles. Para la realización del genotipado se utilizó la técnica de PCR-RFLP (*restricted fragments lengt polymorfism*) ACRS (*amplification-created restriction sites*). Consiste en crear un sitio de restricción para el enzima NcoI mediante la utilización de un cebador que introduce un error en la



**Figura 10.** Fotografía del tipaje del polimorfismo -308 del promotor de TNFA. La calle 2 representa un genotipo AG, las tres siguientes GG y la última un genotipo AA.

secuencia. Se emplearon los cebadores 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG CAT 3' y 5' GAA AGT TGG GGA CAC CAC AGC AT 3'. De esta forma, realizamos una reacción de amplificación en tubos de 0.5 µl con un volumen final de 15 µl de mezcla de reacción. Esta mezcla estaba compuesta por:

- 1.5 µl de buffer de PCR 10x PROMEGA.
- 1 µl de cloruro de magnesio a una concentración 25 mM.
- 1.5 µl de mezcla de dNTP a una concentración 2mM.
- 1.5 µl de una dilución del cebador 5' a 10 µM.
- 1.5 µl de una dilución del cebador 3' a 10 µM.
- 6 µl de agua bidestilada.
- 2 µl de DNA genómico a una concentración de 100 ng por µl.
- 0.1 µl de Taq DNA polimerasa PROMEGA a una concentración de 5 U por µl.

Se comprobó el resultado de las reacciones, mediante la electroforesis de 3 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%. Seguidamente se procedió a añadir 0.1 µl del enzima NcoI diluido en 2 µl de cloruro de magnesio a 50 mM, a cada tubo. Las mezclas de producto de PCR y enzima se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se chequearon mediante electroforesis en un gel de agarosa al 4%. La valoración del tamaño de las bandas obtenidas se hizo comparándola con un marcador estándar de tamaños de 1 Kb.

## **2.6. TIPAJE DEL POLIMORFISMO TRANSMEMBRANA DE MICA**

La técnica empleada en este caso es de nuevo la PCR-SSP con la variante de que la electroforesis final ha de realizarse en geles de acrilamida al 6 % debido a la escasa diferencia de tamaño entre los cinco alelos de MICA. El tipaje se realizó tanto en pacientes como en controles, utilizando los cebadores 5' ACA TTC CAT GTT TCT GCT

GTT G 3' y 5' TCA CCT GGA CCC TCT GCA G 3'. Se emplearon dos técnicas distintas para realizarlos:

### **2.6.1. Genotipado con marcaje de P32.**

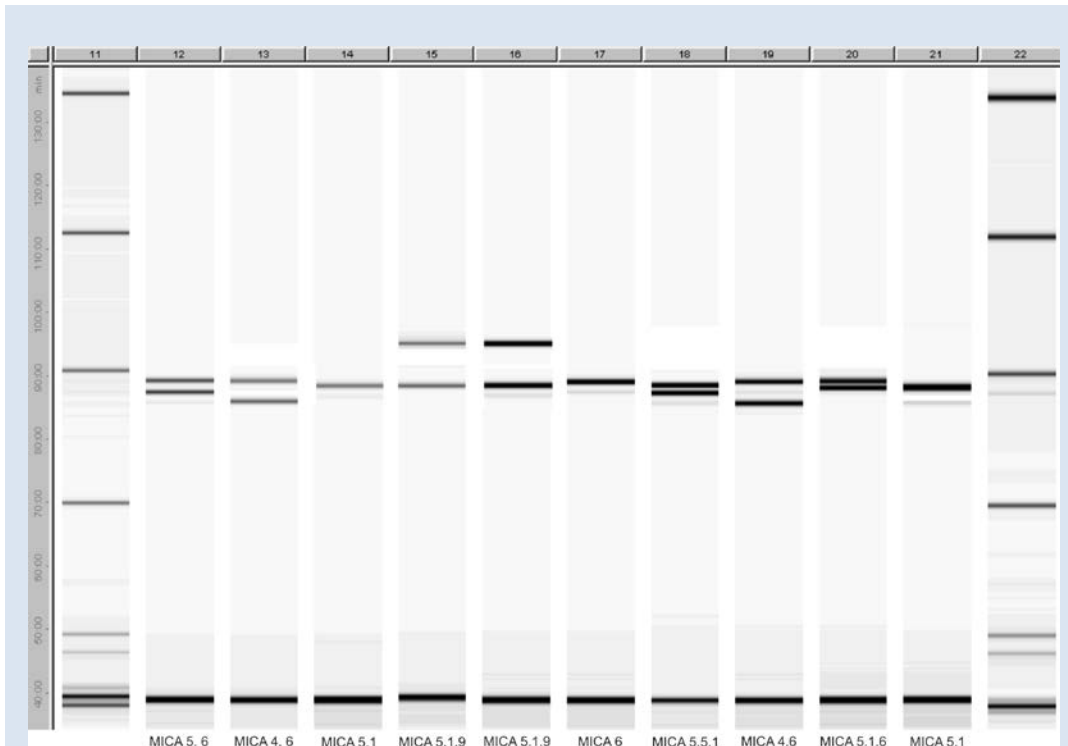
La mayor parte de los controles y algunos pacientes fueron genotipados marcando los productos de PCR con P-32. Para ello se añadió a la mezcla de reacción desoxirribonucleotidos trifosfato marcados con este isótopo. Esta mezcla estaba compuesta por:

- 1.5 µl de buffer de PCR 10x PROMEGA.
- 1 µl de cloruro de magnesio 25mM.
- 1.5 µl de mezcla de dNTP marcados con P-32 a una concentración 2 mM.
- 1.5 µl de una dilución del cebador 5' a 10 µM. (Tabla x)
- 1.5 µl de una dilución del cebador 3' a 10 µM. (Tabla X)
- 6 µl de agua bidestilada.
- 0.1 µl de Taq DNA polimerasa de PROMEGA a una concentración de 5 U por µl.

Se realizó electroforesis de los productos de PCR en un gel de acrilamida y urea, previa desnaturalización de las muestras calentándolas a 95°C durante 3 minutos. El revelado de los geles se realiza mediante la exposición de una película radiográfica.

### **2.6.2. Genotipado con marcaje de Cy5-amidita.**

La técnica empleada para el tipaje de algunos de los controles y de todos los pacientes, difiere de la anterior en que utilizamos un cebador marcado en su extremo 5' con Cy5-amidita (Amersham-Pharmacia). La electroforesis de los productos de PCR así marcados se realizó en un secuenciador automático ALFexpress II de Amersham-Pharmacia, obteniéndose el tamaño de las bandas



**Figura 1.7.** Imagen de un gel de acrilamida procesado en el sistema ALF Express II en el que se pueden apreciar los diferentes alelos transmembrana de MICA.

correspondientes a cada alelo mediante la utilización del software “ALFwin Fragment Analyser”, proporcionado por la misma empresa.

## 2.7. TIPAJE ALÉLICO DE MICA

Para la realización del genotipado alélico de MICA se emplearon los kits comerciales LABType® SSO MICA (One Lambda, Canoga Park CA, USA), basados en la tecnología X-MAP de Luminex Corporation.

Se utilizó el siguiente protocolo, que es común para todos los kits LABType® SSO.

### 2.7.1. Amplificación del DNA.

a) Para la realización del oligotipaje, las muestras de DNA deben cumplir las siguientes premisas:

- Concentración óptima... 20 ng/μl.

- Pureza... 1,65 a 1,8.
- Rango válido de concentración... 10 a 200 ng/volumen total de la

	Temperatura	Tiempo
Ciclos 1	96°C	180 seg
	96°C	20 seg
Ciclos 5	60°C	20 seg
	72°C	20 seg
	96°C	10 seg
Ciclos 30	60°C	15 seg
	72°C	20 seg
Ciclos 1	72°C	600 seg
Ciclos 1	4°C	Inf.

**Tabla 1.5.** Programa de PCR para la realización del genotipado alélico de MICA

amplificación.

- b) Se retira el ADN de su lugar de conservación a -20°C y las alícuotas correspondientes del DMix y del Primer de amplificación correspondientes al oligotipaje que se vaya a realizar.
- c) Se pipetea 2 µl de DNA de la muestra en el fondo del tubo de termociclado asignado para su oligotipaje, con respecto a un volumen final de amplificación de 20 µl.
- d) Se agitan las alícuotas del DMix y del Primer de amplificación durante 15 segundos, seguido de un “golpe” de centrifuga para recoger las gotas que se puedan haber adherido al tapón.
- e) Dependiendo del número de muestras a analizar, se prepara la mezcla DMix/Primer/Taq según las proporciones indicadas en la tabla 1.9.

- f) Se agita durante algunos segundos el tubo que contiene la mezcla DMix/Primer/Taq. Se recogen las posibles gotas del tapón con un breve 'golpe' de centrífuga y se dispensan 18  $\mu\text{l}$  de dicha mezcla en cada uno de los pocillos en donde se han situado las muestras.
- g) Se colocan los tubos/tiras/placa en el termociclador, cerrados o sellados perfectamente y se pone en marcha el programa de amplificación.
- h) Una vez que el termociclador estabilice la temperatura final de 4°C, se retiran los tubos y se continúa con el desarrollo de la técnica. En el caso que vaya a dilatarse más de 2 horas la continuación del análisis, se pueden conservar los amplificados a una temperatura de -20°C a -80°C.
- i) Es recomendable realizar una electroforesis con 2 a 5  $\mu\text{l}$  del DNA amplificado para confirmar la aparición de una (Clase 2) o dos (Clase 1) bandas nítidas y bien delimitadas que nos aseguran de la obtención posterior de una correcta hibridación de las sondas.

	Número de muestras a analizar			
	1	5	10	20
DMix Primer set	13,8 $\mu\text{l}$	69 $\mu\text{l}$	138 $\mu\text{l}$	276 $\mu\text{l}$
Primer	4,0 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{l}$
Taq (5 unidades/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$
Volumen total	18,0 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$	180 $\mu\text{l}$	360 $\mu\text{l}$
Para corregir los posibles problemas de pipeteado, preparar esta mezcla en exceso (10%).				

**Tabla 1.6.** Volúmenes de los diversos reactivos empleados para la realización del genotipado alélico de MICA



**2.7.2. Desnaturalización / neutralización del DNA amplificado.**

- a) Si el proceso de análisis consta de más de 10 a 15 pocillos, se prepara una bandeja con hielo picado.
- b) Se coloca una placa limpia de PCR en su gradilla adecuada y anotando la disposición de las muestras.
- c) Se añaden en el pocillo correspondiente 5,0 µl del amplicón correspondiente.
- d) Al dispensar el amplicón, es importante mezclarlo con el Tampón de con lentos movimientos de aspiración / dispensación, comprobando la aparición de un color violeta brillante. Evitar crear burbujas.
- e) Pasada la incubación, se añaden a cada tubo 5,0 µl del Tampón de Neutralización. Mezclar los líquidos con lentas aspiraciones / dispensaciones o voltear breve y suavemente. El color del líquido debe cambiar a traslúcido o amarillo claro, en caso contrario pueden adicionarse 1 ó 2 µl de Tampón de Neutralización. Si aún así no cambia de color, es necesario comenzar de nuevo la técnica.
- f) En estos momentos y si estamos trabajando con más de 10 a 15 pocillos, se coloca la gradilla en una bandeja de hielo picado.

**2.7.3. Hibridación del DNA amplificado y las sondas.**

- a) Se dispensa la alícuota del Tampón de Hibridación en el tubo de los Beads y se agita suavemente.
- b) Se añaden a cada pocillo 38 µl de su correspondiente mezcla de Tampón de Hibridación / Beads volteando el tubo cada 4 ó 5 dispensaciones para evitar que se depositen las Beads en el fondo.
- c) Se retira la gradilla del hielo y se cierran o sellan los tubos del análisis. Se agitan suavemente sin producir salpicaduras.
- d) Se colocan los tubos en el termociclador en funcionamiento.
- e) Se incuban durante 15 minutos exactos a 60°C.
- f) Tras los 15 minutos, se retiran los tubos del termociclador y se colocan de nuevo en la gradilla.

- g) Descubrir los pocillos y, rápidamente, añadir a cada uno 100  $\mu$ l del Tampón de Lavado.
- h) Se vuelven a cubrir los pocillos y se centrifugan los tubos a 900 - 1.000 'g' durante 5 minutos.
- i) Se elimina cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo dejando un remanente de 10 a 20  $\mu$ l.
- j) En total deben realizarse 3 procesos de lavado.

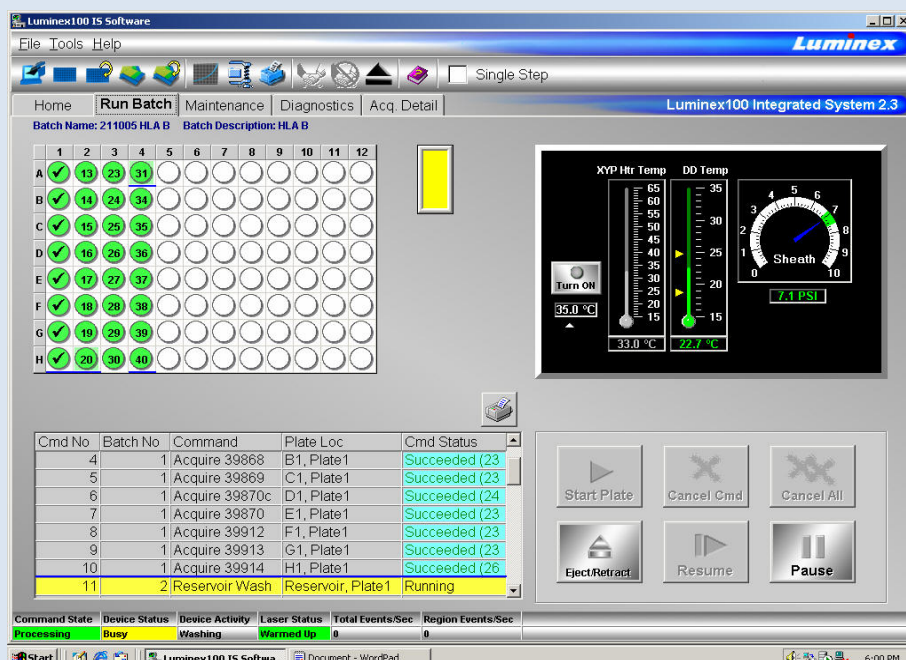
**2.7.4. Marcado con estreptavidina y lectura final.**

- a) Retirar de la nevera la solución stock SAPE 100X y su Tampón SAPE y, dependiendo del número de muestras, preparar la solución de marcado 1x SAPE según los volúmenes que aparecen en la tabla 1.7.
- b) 2. Volver a colocar los tubos/tiras/placa en la gradilla y dispensar en cada uno de los pocillos 50  $\mu$ l de la Solución de Coloración SAPE 1x.
- c) Cerrar o sellar los tubos o la placa y vortear a baja velocidad sin producir salpicaduras.
- d) Retirar los tubos/tiras/placa de la gradilla, colocarlos en el termociclador en funcionamiento, cerrar la tapa del mismo y poner en marcha el cronómetro.
- e) Incubar durante 5 minutos exactos manteniendo el programa 'rSSO incuba' de 60°C.
- f) Tras los 5 minutos, retirar los tubos/tira de tubos/placa del termociclador y colocarlos de nuevo en la gradilla. Apagar el termociclador.
- g) Descubrir los pocillos y, rápidamente, añadir a cada uno de ellos 100  $\mu$ l del Tampón de Lavado.
- h) Volver a cubrir los pocillos y centrifugar a 900 - 1.000 'g' durante 5 minutos.

No de muestras	SAPE 100X	Tampón SAPE
1	0,5 µl	49.5 µl
5	2.5 µl	247.5 µl
10	5.0 µl	495.0 µl
20	10.0 µl	990.0 µl
75	37.5 µl	3712.5 µl
100	50.0 µl	4950.0 µl

**Tabla 1.7.** Volúmenes de reactivos necesarios para la elaboración de la solución de marcado para el genotipado alélico de MICA.

i) Eliminar el sobrenadante de cada pocillo dejando un remanente



**Figura 1.7.** Captura de pantalla correspondiente al software de lectura Luminex IS 100 (Luminex corporation).

aproximado de 10 a 20  $\mu\text{l}$ .

- j) Añadir a cada pocillo 70  $\mu\text{l}$  del Tampón de Lavado asegurándose de la existencia de un volumen mínimo de 80  $\mu\text{l}$  en cada uno de los pocillos, y vortear suavemente. Si la lectura va a posponerse más de 2 horas, guardar las muestras en oscuridad y a 4°C. Si se continuase al día siguiente, conservar las muestras a -20°C.
- k) La lectura final se realizó en un sistema Luminex 100 utilizando el software de lectura Luminex IS 100 (Figura 1.7).

#### 4. RT-PCR EN “TIEMPO REAL”

El ARN total se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica utilizando el kit NucleoSpin RNA II de Macherey-Nagel (Düren, Alemania) y transcribió inversamente a ADNc (ADN complementario) utilizando el kit “First Strand cDNA Synthesis para RT-PCR (AMV) de Roche Diagnostics, GmbH (Mannheim, Alemania). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADNc resultante fue amplificado con las correspondientes parejas de cebadores específicas (Tabla 1.8) realizando las

Cebadores	Secuencia
GADPH 5´	5´-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TC-3´
GADPH 3´	5´-ATTCATATTGGAACATGTAAACCATGTAG-3´
MICA/B 5´	5´-CACCTGCTACATGGAACACAGC-3´
MICA 3´	5´-TATGGAAAGTCTGTCCGTTGACTCT-3´
MICB 3´	5´-ACATGGAATGTCTGCCAATGATC-3´
NKG2D 5´	5´-GAGGTCTCGACACAGCTGG-3´
NKG2D 3´	5´-GCAGCAGAAAAAATGGAGATG-3´
IL-15 5´	5´-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3´
IL-15 3´	5´-GCTGGAATTACCGCGGCT-3´

**Tabla 1.8.** Cebadores PCR Real-time.

amplificaciones por duplicado y utilizando el siguiente programa de PCR: 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 minuto repetido 40 ciclos. Para la detección de la amplificación se utilizó SYBRGreen, un fluoróforo que se une a ácidos nucleicos de doble cadena, con el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (de Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania). Los cebadores de PCR que se enumeran en la Tabla 1.8, se diseñaron con el fin de flanquear intrones siempre que fue posible.

La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa en la que se compara, entre las diferentes muestras, la expresión del gen

objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). En este caso como gen de referencia para el control endógeno y para la normalización de la expresión se utilizó la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Todos los amplicones fueron examinados en geles de agarosa con una concentración del 3% y utilizando un marcador de tamaños de ADN (DNA Ladder) de 1 Kb, con el fin de asegurar que tenían el tamaño correcto.

Los datos fueron analizados utilizando el método de la  $\Delta\Delta\text{TC}$  para la cuantificación relativa. Este método consiste en comparar directamente los Cts del gen testado y gen de referencia ( $\Delta\text{Ct}$ ) en cada muestra, y posteriormente comparar los  $\Delta\text{Ct}$  de las muestras experimentales con respecto a la muestra control. Para aplicar dicho método es necesario que la eficiencia en la amplificación de los genes analizados sea similar. Esto se determinó mediante el análisis de diluciones seriadas de ADNc con los valores de la pendiente del logaritmo de la cantidad de cDNA en comparación con una CT de  $<0,1$ . El cálculo final de la expresión relativa de cada gen se realizó de acuerdo a la fórmula:

$$R_i = 2^{-[(CT-CT \text{ Muestra de referencia}) - (CT-CT \text{ uniforme de muestra estándar de referencia})]}$$

La eficacia de amplificación de MICA, MICB, NKG2D, IL-15 y GAPDH se determinó mediante el análisis de series de diluciones de ADNc con los valores de la pendiente del logaritmo de la cantidad de ADNc en comparación con una CT de  $<0,1$ . Los amplicones fueron examinados en geles de agarosa al 3% para asegurar que eran del tamaño correcto.

## 5. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Para la realización de los estudios de inmunohistoquímica de MICA, se utilizó un suero policlonal, previamente desarrollado por nuestro grupo, contra el dominio  $\alpha 2$  de la molécula. Para ello se había procedido a la inmunización de conejos con un péptido

synthetic of the 140-160 (MNVRNFLKEDAMKTKTHYHAM) of the sequence translated from MICA, as well as it had been described previously.

This serum, known as S8P, was purified in a column of affinity in gel AFFI-T (KE-MEN-TEC, Copenhagen, Denmark), following the instructions of the manufacturer, and then tested in parallel with a negative control of preimmune rabbit serum.

For immunohistochemical staining, small sections of 5  $\mu$ m thickness of intestinal biopsies from paraffin blocks were mounted on slides coated with poly-L-lysine. The deparaffinized samples were blocked with 10% of normal human serum in PBS for 30 min at room temperature to eliminate non-specific binding. The sections were incubated with the polyclonal anti-MICA S8P serum for 1 h at room temperature in a humid chamber. The binding of antibodies to the tissue was detected using the EnVision system (Dako, CA, USA). In negative controls, the primary antibody was omitted or replaced by a preimmune rabbit serum at the same dilution.

## 6. DETERMINACIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS ANTI-ENDOMISIO Y ANTI-TRANSGLUTAMINASA.

Anti-endomysium antibodies (AEM) were detected by indirect immunofluorescence (IFI) using sections of esophageal tissue from mono (Biosystems, Barcelona, Spain). A titer of 1:10 or higher was considered positive.

Auto-antibodies anti-transglutaminase tissue (tTG) were detected using a kit for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of Orgentec (Manheim, Germany). A value higher than 10 units was considered positive.

Also, the detection of total immunoglobulins was performed in the sera of all patients with the aim of detecting a possible deficiency of IgA, alteration very prevalent in celiac disease. In cases of deficiencies of IgA, equivalent kits to those described previously for IgG were used.

Todos estos kits se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## **7. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MICA.**

Los anticuerpos anti-MICA se identificaron utilizando diferentes ensayos LABScreen<sup>®</sup> basados en la tecnología xMAP Luminex (Luminex Corp. TX, EE.UU.). Para la detección de anticuerpos anti-MICA se utilizó el kit LABScreen<sup>®</sup> Mixed (OneLambda, CA, EE.UU.) que realiza una detección genérica de anticuerpos frente a moléculas HLA de clase I y clase II y frente a todos los alelos de MICA. Los sueros positivos para anti-MICA se analizaron a continuación utilizando el kit LABScreen MICA Single Antigen<sup>®</sup> (OneLambda, CA, EE.UU.). Este ensayo permite establecer la especificidad de los anticuerpos detectados en test anterior, ya que a las “beads” empleadas están unidas, de forma individual, los diferentes alelos de MICA. La técnica para la realización de estos ensayos se describe a continuación:

### **7.1. REACCIÓN ANTÍGENO / ANTICUERPO:**

- Para su realización se empleó una placa microtiter de 96 pocillos de fondo plano.
- Se procedió a vortear suavemente durante 10 segundos los tubos que contenían la mezcla de los beads.
- Se dispensó esta mezcla de beads en cada uno de los pocillos de la placa.
- Seguidamente se colocó una película de plástico cubriendo la placa y se vorteo durante 10 segundos.
- El siguiente paso consistió en incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, protegiendo la placa de la luz.
- Mientras se desarrollaba este tiempo de incubación, se preparó por cada muestra 1 ml de tampón de lavado mezclando 1 volumen de tampón de lavado (10x) con 9 volúmenes de agua destilada.

### **7.2. PRIMER PROCESO DE LAVADO:**



- Una vez completada la incubación, dispensamos en cada pocillo 150  $\mu$ l del tampón de lavado 1x.
- Cubrimos la placa con una película de plástico y la vorteamos durante 10 segundos.
- Seguidamente centrifugamos la placa a 1.300g durante 5 minutos.
- Una vez completada la centrifugación se eliminó todo el líquido de la placa, utilizando un sistema de aspiración por vacío programado a una velocidad suave de aspiración.
- Se repitió dos veces el proceso de lavado, centrifugación y aspirado pero con 200  $\mu$ l de tampón.
- Terminado el último lavado, se preparó el conjugado IgG-PE anti IgG humana mezclando por cada muestra 1  $\mu$ l del Conjugado-PE (100x) con 99  $\mu$ l de tampón de lavado 1x recién reconstituido.

### **7.3. MARCADO DE LAS MUESTRAS CON EL CONJUGADO-PE:**

- Se dispensó en cada pocillo 100  $\mu$ l del Conjugado-PE anteriormente reconstituido.
- Se cubrió con una película de plástico la placa y se vorteoó durante 10 segundos.
- El paso siguiente consistió en incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos protegiendo la placa de la luz.

### **7.4. LAVADO FINAL DE LAS MUESTRAS:**

- Una vez finalizada la incubación se centrifugó la placa a 1.300g durante 5 minutos.
- Seguidamente se eliminó todo el líquido de la placa, utilizando un sistema de aspiración por vacío programado a una velocidad suave de aspiración.
- A continuación dispensamos en cada pocillo 200  $\mu$ l del tampón de lavado 1x.
- Se cubrió con una película de plástico la placa y se vorteoó durante 10 segundos.

- Se realizó una nueva centrifugación de la placa a 1.300g durante 5 minutos.
- Una vez más se eliminó todo el líquido de la placa, utilizando un sistema de aspiración por vacío programado a una velocidad suave de aspiración.
- Finalmente repetimos una vez más este proceso de lavado.

#### **7.5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU LECTURA:**

- Tras el último lavado, añadimos a cada pocillo 80 µl de tampón.
- Nuevamente se cubrió la placa con una película de plástico y se vorteoó durante 10 segundos.
- Tras este último paso la placa quedó lista para su lectura.

La señal fluorescente para cada “bead” recubierta por un alelo de MICA se midió utilizando un fluorímetro específico LabScan 100TM y dicha fluorescencia se analizó mediante el software HLA-Fusion<sup>TM</sup> (OneLambda, CA, EE.UU.). En el caso de no poder realizar la lectura de forma inmediata, es posible guardar la placa en la nevera a 4°C.

Los anticuerpos anti-MICA se consideraron positivos cuando la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada “bead” estaba por encima de un valor de corte de 500 en el análisis de los resultados del kit LABScreen<sup>®</sup> Mixed y de 2000 unidades de fluorescencia en el análisis de LABScreen<sup>®</sup> MICA Sigle Antigen, de acuerdo con lo sugerido por el fabricante.

## 8. ESTADISTICA

Las frecuencias alélicas y los haplotipos fueron calculados por conteo directo y la importancia de la asociación se determinó mediante la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates o mediante el test exacto de Fisher. Los valores de p fueron corregidos ( $p_c$ ) multiplicando éstas por el número de comparaciones. Un valor de p menor de 0,05 fue considerado significativo.

La odds ratio (OR) se calculó por la relación entre productos, y la corrección de Haldane se aplicó cuando el número de casos en un grupo era 0. Se obtuvieron los intervalos de confianza (IC) exactos del 95%. El impacto potencial de cada marcador fue estimado por la fracción etológica (EF), que indica la proporción de casos de la enfermedad entre la población total, que son atribuibles a un alelo cuando la OR es mayor de 1.

La distribución de haplotipos se derivó del genotipado de HLA-B, HLA-DR y del gen MICA. Los haplotipos extendidos (EH) se dedujeron de acuerdo con estudios previos de desequilibrio de ligamiento (LD). El grado de LD entre los dos loci se expresa como el valor de desequilibrio observado ( $\lambda_s$ ), es decir, una proporción del valor de desequilibrio máximo teórico ( $\lambda_{max}$ ) alcanzable para esta combinación de alelos. Los  $\lambda_s$  se calcularon utilizando la fórmula:  $\lambda_s = \lambda / \lambda_{max} = P_{ab} - (P_a \cdot P_b) / P_a (1 - P_b)$ .

Para los estudios de expresión de MICA, MICB, NKG2D e IL15 se realizó un análisis univariante para describir las características de la muestra a estudio. Para comparar las diferencias entre las medias de las variables continuas se utilizó la prueba t de Student. En este caso también se consideraron como estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0,05$ .

Finalmente para realizar el estudio de la influencia de los anticuerpos anti-MICA en el desarrollo de patología autoinmune asociada a la enfermedad celíaca se utilizó la prueba de contingencia de chi-cuadrado para comparar las variables dicotómicas y se utilizó la prueba t no pareada para comparar las diferencias entre grupos de variables continuas. El análisis de regresión logística multivariante se utilizó para modelar las variables que resultaron significativas en el análisis univariante o que eran de

relevancia clínica. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos al igual que en los apartados anteriores.

Para realizar el análisis estadístico en todos los casos se empleó el software IBM SPSS (versiones 15.0.1 y 17.0.1) y las herramientas de análisis disponibles en la página web ***VassarStats: Website for Statistical Computation*** (<http://vassarstats.net/>).



## RESULTADOS

## *Resultados*

## 1. ESTUDIO GENÉTICO DE LAS FORMAS CLÁSICAS Y ATÍPICAS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA.

### 1.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

El planteamiento inicial de este trabajo surgió al observar que, a pesar de compartir la asociación con HLA-DQ2 o HLA-DQ8, existían fenotipos distintos de enfermedad celíaca, que se diferenciaban simplemente en la presencia o ausencia de determinadas manifestaciones clínicas. Esta notable diferencia se daba además entre personas que vivían en el mismo medio y con unas pautas de alimentación prácticamente idénticas.

Sin descartar totalmente una posible influencia del entorno, nos planteamos la realización, con la estrecha colaboración de los Servicios de Digestivo y Pediatría del Hospital Central de Asturias, de un estudio genético de estos enfermos. En primer lugar seleccionamos dos grupos de pacientes con enfermedad celíaca. Un primer grupo con formas clásicas de la enfermedad y un segundo grupo con formas atípicas, es decir, sin síntomas digestivos. En estos grupos nos planteamos investigar las posibles diferencias existentes en cuanto a ser portador o no de los alelos de susceptibilidad DQA1\*0501 y DQB1\*0201. También nos planteamos analizar la posible existencia de otros genes en la región MHC que predispongan o protejan de la aparición de formas clásicas de la enfermedad, en relación a los resultados obtenidos en las fases previas del estudio.

### 1.2. PACIENTES Y CONTROLES SANOS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO.

#### 1.2.1. *Pacientes.*

Ciento treinta y tres pacientes celíacos fueron seleccionados para la realización de este estudio (82 mujeres, 51 varones, con una edad media de  $23,7 \pm 18,2$  años).



Todos eran pacientes ambulatorios, reclutados consecutivamente en un período de dos años (de enero 1998 a diciembre de 1999) de dos hospitales españoles. Estos pacientes fueron seguidos anualmente en el HUCA por las consultas de gastroenterología pediátrica y gastroenterología de adultos. Representaban la totalidad de pacientes celíacos ambulatorios seguidos durante este período, excepto aquellos que no dieron consentimiento para ser incluidos en el estudio.

**I. Pacientes con enfermedad celíaca clásica:**

- a) Diarrea crónica y distensión abdominal.
- b) Síntomas de desnutrición importante en algún momento de la evolución de la enfermedad.
- c) Biopsia positiva con grado 3 de Marsh.
- d) Desaparición de los síntomas tras la instauración de una dieta sin gluten.

**II. Pacientes con formas extradigestivas o larvadas (atípicas) de la enfermedad:**

- a) Episodios de diarrea aislados o ausentes.
- b) Síntomas leves de malnutrición, especialmente anemia ferropénica.
- c) Biopsia positiva con cualquier grado de Marsh.
- d) Predominio de sintomatología extradigestiva.
- e) Desaparición de los síntomas tras la instauración de una dieta sin gluten.

**Tabla 1.1** Características clínicas de las diferentes formas de la enfermedad celíaca.

Para la realización del primer objetivo del estudio, los pacientes celíacos se clasificaron en dos grupos diferentes de acuerdo con las manifestaciones clínicas que presentaban; uno de ellos incluía a todos los pacientes afectados por formas clásicas de la enfermedad y el otro grupo estaba formado por los enfermos con formas atípicas. Setenta y nueve de los 133 pacientes (59,4%) presentaban una sintomatología digestiva clara, con diarrea, flatulencia, pérdida de peso y fatiga. Estos pacientes fueron incluidos dentro del grupo con formas clásicas de la enfermedad. Cincuenta y

cuatro pacientes (40,6%) tenían solo síntomas atípicos predominantemente extra-intestinales, o eran incluso totalmente asintomáticos. Estos se incluyeron dentro del grupo con formas atípicas de la enfermedad celíaca.

El motivo inicial de consulta de estos pacientes fue mayoritariamente de, retraso en el crecimiento, anemia, dermatitis herpetiforme, un estudio familiar, deficiencia de hierro aislada e hipertransaminasemia de origen desconocido.

Como complemento de este estudio se reclutó un grupo adicional de pacientes en los cuales la característica clasificatoria fue la negatividad para el heterodímero de susceptibilidad HLA-DQ2. En este grupo se incluyeron treinta y ocho individuos no relacionados HLA-DQ2 negativos seleccionados a partir de un grupo de 316 pacientes con enfermedad celíaca consecutivos diagnosticados en el HUCA entre los años 2000 y 2001 según los criterios ESPGAN. También en este caso los pacientes se dividieron en dos grupos de acuerdo con sus manifestaciones clínicas: formas de enfermedad celíaca clásica (n = 18) y formas de enfermedad atípicas (n = 20). Todos estos individuos se tiparon para HLA-DQA1\*, HLA-DQB1\*, HLA-DRB1\*, HLA-DRB3\*, HLA-DRB4\*, HLA-DRB5\* y HLA-B\*.

### **1.2.2 Controles sanos.**

Como grupo de control se incluyeron en el estudio ciento dieciséis donantes de sangre sanos elegidos al azar de la población española. Como datos necesarios para efectuar la selección se precisó que estos individuos no estuviesen relacionados con los pacientes reclutados para el estudio, y que no tuviesen antecedentes familiares de enfermedad celíaca. Además se definió que estos sujetos no presentasen antecedentes de intolerancia al gluten y sus derivados, que no presentasen deficiencia de hierro, anemia o cualquier anomalía en los estudios bioquímicos. Además, en todos ellos se realizaron los estudios necesarios para determinar la presencia de anticuerpos antigliadina y antiendomiso, y en todos los casos resultaron negativos.

El grupo resultante estaba constituido por 50 varones y 67 mujeres, con una media de edad de  $35,3 \pm 12,4$  y con un rango de entre 18 y 62 años. Adicionalmente se seleccionó otro grupo de controles sanos HLA-DQ2 negativos formado por 91 donantes

de sangre no relacionados entre sí ni con los pacientes y que cumplían todos los requisitos antes descritos.

El Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias aprobó el protocolo, y todos los pacientes y los controles sanos dieron su consentimiento informado por escrito antes de ser enrolados en este estudio.

### 1.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

Del estudio clínico-epidemiológico de los pacientes estudiados, se dedujeron los siguientes resultados:

- La edad media del grupo de enfermos clásicos era más joven ( $18,2 \pm 16,2$  años) en comparación con la del grupo de pacientes atípicos ( $31,6 \pm 18,2$  años) ( $p < 0,001$ ).
- La distribución por sexos en el grupo de celíacos clásicos fue de 43 varones y 34 mujeres. En el grupo de pacientes atípicos fue de 39 mujeres y 17 hombres, con una mayor proporción de mujeres en el grupo con formas de celíaca atípica en comparación con el grupo de enfermos clásicos, pero sin alcanzar diferencias significativas.
- La edad media al inicio de los síntomas fue menor en el grupo de celíacos clásicos ( $8,9 \pm 13,9$  años) en comparación con el grupo de pacientes atípicos ( $25,1 \pm 18,1$  años) ( $p < 0,001$ ).
- La edad al momento del diagnóstico en el grupo de pacientes con celíaca clásica fue menor ( $11,5 \pm 16,1$  años) en comparación con el grupo enfermos con formas atípicas ( $29,4 \pm 19,4$  años) ( $p < 0,001$ ).
- El tiempo con la dieta sin gluten (DSG) fue mayor entre los pacientes con enfermedad clásica ( $7,6 \pm 6,7$  años) en comparación con los que presentaban formas atípicas ( $3,2 \pm 2,7$  años) ( $p < 0,001$ ).
- El Índice de Masa Corporal (IMC) fue menor en los pacientes con

	Controles n=116	Enfermedad celíaca n=133
<b>DQA1*05:01/05-DQB1*02:01/02</b>	25 (21,55%)	115 (86,46%) <sup>a</sup>
<sup>a</sup> p < 0,000001; OR=23,23; FE=0,82		

**Tabla 1.1.** Frecuencias del heterodímero DQA1\*05:01/05-DQB1\*02:01/02 en controles y en pacientes con enfermedad celíaca.

enfermedad celíaca clásica ( $19,8 \pm 3,7$ ) en comparación con el grupo de pacientes atípicos ( $22,4 \pm 7,9$ ) ( $p < 0,01$ ).

- No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de enfermos al comparar los niveles de hemoglobina, niveles de hierro sérico, de ferritina, de ácido fólico sérico, los enzimas hepáticos (AST y ALT), la IgA sérica o la positividad de los anticuerpos antiendomiso IgA y antigliadina.
- Tampoco se apreciaron diferencias en el grado de la atrofia de vellosidades encontrado en las biopsias duodenales obtenidas de los pacientes incluidos en el estudio.

#### 1.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DRB1/DQA1/DQB1 EN LAS FORMAS CLÁSICAS Y ATÍPICAS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.

En la tabla 1.1 se muestran los datos de frecuencias de los genes DQA1\*05:01/05-DQB1\*02:01/02 que codifican para el heterodímero de susceptibilidad HLA-DQ2 en pacientes con enfermedad celíaca y en controles sanos. Tal y como ya se había descrito en numerosos trabajos anteriores, la mayor parte de los pacientes resultaron portadores de estos alelos, con una frecuencia en conjunto del 86,46%. Esta frecuencia resulto significativamente más elevada ( $p_c < 0,000001$ , OR=23,23) que en controles sanos, en los cuales la frecuencia de portadores fue del 21,55%.

Cuando se estudió la distribución de los alelos de susceptibilidad DQA1\*05:01/05 y DQB1\*02:01/02 en los dos grupos de enfermos, y se compararon entre sí y con el grupo de controles sanos, se obtuvieron los siguientes resultados:

	Controles n=116	Formas clásicas n=79	Formas atípicas n=54
<b>DQA1*05:01/05-DQB1*02:01/02</b>	25 (21,55%)	68 (86.07%) <sup>a</sup>	47 (87,03%) <sup>b</sup>
<sup>a</sup> pc < 10 <sup>-6</sup> ; OR=24,44; IC 95% = 9,87 - 59,73.			
<sup>b</sup> pc < 10 <sup>-6</sup> ; OR=22,50; IC 95% = 10,48 - 47,94.			

**Tabla 1.2.** Frecuencias del heterodímero DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 en controles, pacientes con formas clásicas y con formas leves de la enfermedad. (OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza)

- La frecuencia de portadores del heterodímero de susceptibilidad DQ2 en las formas clásicas fue del 86,07%, resultando estadísticamente significativa al compararla con la de los controles sanos ( $p < 0,000001$ , OR = 24,31) (Tabla 1.2).
- La frecuencia de los alelos de susceptibilidad en pacientes con formas atípicas de la enfermedad (87,03%) resultó también significativa al compararla con los controles sanos ( $p < 0.000001$ ; OR = 21.63) (Tabla 1.2).
- No hay ningún tipo de diferencias al estudiar la frecuencia de dichos alelos en ambos grupos de enfermos.

### 1.5. DIFERENCIAS EN LA DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS HLA-DR/DQ EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ENFERMOS Y EN CONTROLES SANOS.

Basándonos en los resultados obtenidos por otros autores, nos pareció oportuno proseguir nuestro trabajo realizando el tipaje de los alelos DR y DQ tanto en pacientes como en controles, con el fin de analizar la distribución de los genotipos DR y DQ. Se

obtuvieron los siguientes resultados:

### 1.1.1. Formas clásicas de la enfermedad:

Al analizar la distribución de frecuencias entre enfermos con formas clásicas

Genotipo	Controles sanos n=116	Formas clásicas n=79	pc	OR	IC 95%
DRB1*03,03 (DQ2,2)	4 (3,45%)	8 (10,12%)	NS	-	-
DRB1*03,07 (DQ2,2)	5 (4,10%)	25 (31,64%)	<0,0001	10,28	3,73-28,33
DRB1*03,X (DQ2,X)	12 (10,34%)	21 (26,58%)	<0,01	3,14	1,44-6,84
DRB1*07,11 (DQ2,7)	2 (1,72%)	13 (16,45%)	<0,001	11,23	2,46-51,30

**Tabla 1.3.** Frecuencias de los genotipos DR y DQ entre controles sanos y enfermos con formas clásicas de la enfermedad. (OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; NS: no significativo)

en comparación con el grupo de controles sanos (Tabla 1.3), se dedujo que:

- El genotipo DRB1\*03,03 está ligeramente aumentado en enfermos celíacos con respecto a controles sanos, sin alcanzar significación estadística.
- El genotipo DRB1\*03,07 es casi ocho veces más frecuente en pacientes con enfermedad celíaca clásica (32,35%) que en controles sanos (4,38%). Las diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $pc < 10^{-6}$ , OR = 10.42).
- El genotipo DRB1\*03,X, (siendo X cualquier alelo DR excepto DRB1\*03 y DRB1\*07), resultó ser también más frecuente en enfermos celíacos, con diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles sanos ( $pc = 0,014$ , OR = 3,29).
- El genotipo DRB1\*07,11, que codifica el heterodímero de susceptibilidad en *trans* (alelos HLA-DQA1\*05:05 / DQB1\*02:02),

## Resultados

alcanzo una frecuencia del 16,17% en enfermos con celíaca clásica frente al 0,87% detectado en controles sanos. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ; OR = 21,80).

### 1.1.2. Formas atípicas de la enfermedad:

Al comparar la distribución de genotipos entre los pacientes con enfermedad celíaca atípica y el grupo de controles sanos, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 1.4):

- El genotipo DRB1\*03,03 está muy aumentado en los enfermos celíacos atípicos (20,37%) con respecto a los controles sanos (3,45%) alcanzando significación estadística ( $p < 0,001$ ; OR = 7,16).
- El genotipo DRB1\*03,07 también aparece en los pacientes atípicos en una proporción mayor que en los controles sanos. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ; OR = 6,34).
- El genotipo DRB1\*03,X también alcanzó significación estadística al compararlo con los controles ( $p < 0,0001$ , OR=5,95).
- No encontramos diferencias entre los enfermos con formas atípicas de celíaca y los controles sanos al comparar las frecuencias de DRB1\*07,11.

Genotipo	Controles sanos n=116	Formas atípicas n=54	p	OR	IC 95%
DRB1*03,03 (DQ2,2)	4 (3,45%)	11 (20,37%)	<0,001	7,16	2,16-23,71
DRB1*03,07 (DQ2,2)	5 (4,10%)	12 (22,22%)	<0,001	6,34	2,11-19,09
DRB1*03,X (DQ2,X)	12 (10,34%)	22 (40,74%)	<0,0001	5,95	2,66-13,36
DRB1*07,11 (DQ2,7)	2 (1,72%)	2 (3,70%)	NS	-	-

**Tabla 1.4.** Frecuencia de los genotipos DR y DQ en controles sanos y enfermos con formas atípicas de la enfermedad. (OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; NS: no significativo)

**1.1.3. Formas atípicas y clásicas de la enfermedad:**

Finalmente, de la comparación de frecuencias se realizó entre los dos grupos de enfermos, sacando las siguientes conclusiones: (Tabla 1.5)

Genotipo	Formas clásicas n=79	Formas atípicas n=54	pc	OR	IC 95%
DRB1*03,03 (DQ2,2)	8 (10,12%)	11 (20,37%)	NS	-	-
DRB1*03,07 (DQ2,2)	25 (31,64%)	12 (22,22%)	NS	-	-
DRB1*03,X (DQ2,X)	21 (26,58%)	22 (40,74%)	NS	-	-
DRB1*07,11 (DQ2,7)	13 (16,45%)	2 (3,70%)	NS	-	-

**Tabla 1.5.** Frecuencias de los genotipos DR y DQ entre enfermos con formas clásicas y con formas leves de la enfermedad. (OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza; NS: no significativo)

- No encontramos ninguna comparación que fuese estadísticamente significativa.
- Sin embargo, al analizar las frecuencias del genotipo DRB1\*07,11 en ambos grupos, resultó evidente la fuerte tendencia existente en el grupo de enfermos con formas clásicas de la enfermedad (16,45%) a ser portadores de este genotipo en comparación con el grupo de enfermos atípicos (3,70%).

## 1.6. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS HLA EN ENFERMOS CELÍACOS Y EN CONTROLES SANOS.

Aunque no encontramos ninguna diferencia significativa entre los grupos de enfermos, la evidente tendencia del haplotipo DR3-DQ2 a aparecer más en las formas atípicas nos llevó a realizar la siguiente fase de nuestro trabajo.



## Resultados

Como ya apuntamos anteriormente DRB1\*03 puede estar incluido en los haplotipos B\*08 / DRB1\*03 / DQA1\*05:01 / DQB1\*02:01 y del B\*18 / DRB1\*03 / DQA1\*05:01 / DQB1\*02:01, clásicamente asociados a celíaca, especialmente el primero de ellos. En ambos casos el heterodímero de susceptibilidad HLA-DQ2 se hereda en un cromosoma (herencia en “cis”). Tal y como se puede apreciar, ambos haplotipos comparten los mismos alelos en la región de clase II. Las diferencias existentes entre ambos haplotipos se encuentran en la región de clase I.

Haplotipos	Controles n=116	Formas Clásicas n=79	p <sub>c</sub>	OR	IC 95%
B*08/DRB1*03/DQA1*05:01/ DQB1*02:01	12 (10,34%)	32 (40,50%)	<0,000 1	5,90	2,79 -12,46
B*18/DRB1*03//DQA1*05:01 /DQB1*02:01	7 (6,03%)	10 (12,65%)	NS	--	-
Haplotipos	Controles n=116	Formas atípicas n=54	p <sub>c</sub>	OR	IC 95%
B*08/DRB1*03/DQA1*05:01/ DQB1*02:01	12 (10,34%)	40 (74,07%)	<0.000 1	24,76	10,55-58,10
B*18/DRB1*03/DQA1*05:01/ DQB1*02:01	7 (6,03%)	5 (9,25%)	NS	-	-
Haplotipos	Formas Clásicas n=79	Formas atípicas n=54	p <sub>c</sub>	OR	IC 95%
B*08/DRB1*03/DQA1*05:01/ DQB1*02:01	32 (40,50%)	40 (74,07%)	<0,001	4,19	1,97-8,94
B*18/DRB1*03/DQA1*05:01/ DQB1*02:01	10 (12,65%)	4 (9,25%)	NS	-	-

**Tabla 1.6.** Frecuencias de los haplotipos portadores de HLA-DQ2 en “cis” en controles sanos y en pacientes con formas clásicas y con formas atípicas de la enfermedad.

Del análisis de estos haplotipos se dedujeron los siguientes resultados:

- El haplotipo B\*08 / DRB1\*03 / DQA1\*05:01 /DQB1\*02:01 se encuentra

incrementado en ambos grupos de pacientes (40,50% en formas clásicas, 74,07% en atípicas y 10,34% en controles) si los comparamos con los controles (Tabla 1.6), alcanzando en ambos casos significación estadística.

- No encontramos diferencias entre las frecuencias del haplotipo B\*18/DRB1\*03/ DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 en los enfermos con respecto a los controles, ni tampoco entre ellos (Tabla 1.6).
- Como dato más importante de esta comparación, resaltar que las diferencias entre las frecuencias del haplotipo B\*08 / DRB1\*03/ DQA1\*05:01 / DQB1\*02:01 en enfermos atípicos (74,07%) con respecto a las formas clásicas (40,50%) resultaron ser estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ , OR = 4,19) (Tabla 1.6).

### 1.7. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO TRANSMEMBRANA DE MICA.

Como ya apuntábamos anteriormente, la diferencia entre los haplotipos B\*08 / DRB1\*03 / DQB1\*02:01 y B\*18 / DRB1\*03 / DQB1\*02:01 parece localizarse en la región de clase I. A la vista esto, decidimos ahondar más en el estudio de esta región, ya que estos resultados parecen sugerir que en el entorno del locus HLA-B puede haber un gen asociado con las diferentes formas clínicas de la enfermedad celíaca. Tal y como ya

MICA TM	Controles sanos n=116	Celíacas clásicas n=79	pc	OR	IC 95%
A 4	30 (25,86%)	19 (24,05%)	NS	-	-
A 5	33 (28,45%)	20(25,32%)	NS	-	-
A 5.1	51 (43,96%)	42 (53,16%)	NS	-	-
A 6	50 (43,10%)	42 (53,16%)	NS	-	-
A 9	35 (30,17%)	13 (16,45%)	NS	-	-

**Tabla 1.7.** Frecuencias de los alelos MICA TM en celíacos con enfermedad clásica y en controles sanos.

## Resultados

habíamos apuntado, uno de estos genes candidatos es MICA. Decidimos pues estudiar un polimorfismo, consistente en repeticiones del triplete ATG, que presenta el gen MICA en el exón 5. Se han descrito 5 alelos diferentes; un alelo con 4 repeticiones (MICA-A4), otro con 5 (MICA-A5), otro con 6 (MICA-A6) y otro con 9 (MICA-A9). Existe además un alelo adicional con una inserción de un nucleótido A que se denomina A5.1. El exón 5 de MICA codifica para la región transmembrana de la proteína.

### 1.7.1. El alelo MICA-A5.1 está asociado a las formas atípicas de la enfermedad celíaca.

Al analizar la distribución de la frecuencia de los diferentes alelos TM de MICA en los distintos grupos de individuos incluidos en este estudio, nos encontramos los siguientes resultados:

- Tanto en formas clásicas como en las atípicas, el alelo MICA-A 5.1 aparece incrementado, aunque solo es significativo al comparar la frecuencia este alelo en el grupo de enfermos con formas atípicas con la de los controles sanos ( $p_c < 0.000001$ ; OR = 13.02) (Tablas 1.7 y 1.8).

MICA TM	Controles sanos n=116	Celíacas atípicas n=54	pc	OR	IC 95%
A 4	30 (25,86%)	9 (16,67%)	NS	-	-
A 5	33 (28,45%)	7 (12,96%)	NS	-	-
A 5.1	51 (43,96%)	49 (90,74%)	<0,0001	12,49	4,64-33,63
A 6	50 (43,10%)	21 (38,89%)	NS	-	-
A 9	35 (30,17%)	6 (11,11%)	NS	-	-

**Tabla 1.8.** Frecuencia de los alelos MICA TM en enfermedad celíaca atípica y en controles sanos.

- La frecuencia de MICA-A6 está incrementada en los pacientes con formas clásicas comparado con la de los enfermos con celíaca atípica (53,16% vs. 38,89%), sin alcanzar significación estadística (Tabla 1.9).
- Las diferencias existentes entre las frecuencias del alelo A5.1 en enfermos con formas clásicas (55.88%) y atípicas (90.24%) resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ , OR = 7.3) (Tabla 1.9).

MICA TM	Formas clásicas n=79	Formas atípicas n=54	pc	OR	IC 95%
A 4	19 (24,05%)	9 (16,67%)	NS	-	-
A 5	20(25,32%)	7 (12,96%)	NS	-	-
A 5.1	42 (53,16%)	49 (90,74%)	<0,0001	8,63	3,11-23,96
A 6	42 (53,16%)	21 (38,89%)	NS	-	-
A 9	13 (16,45%)	6 (11,11%)	NS	-	-

**Tabla 1.9.** Frecuencias de los alelos MICA TM en celíacos clásicos y en atípicos.

### 1.7.2. La asociación del alelo MICA-A5.1 es independiente del haplotipo EH8.1.

Con el fin de investigar si la asociación del alelo MICA-A5.1 a las formas atípicas de la enfermedad es independiente del haplotipo 8.1, se realizaron los cálculos oportunos (Tabla 1.10). Nos encontramos que:

- MICA-A5.1 estaba presente en el 100% de los pacientes celíacos portadores de este haplotipo.
- MICA-A5.1 se detectó en el 64,3% de los pacientes con formas atípicas de la enfermedad que eran negativos para el haplotipo 8.1 y sólo en el 21,2% de los pacientes con celíaca clásica ( $p < 0,01$ , OR = 6,67).

	n	MICA-A5.1	pc	OR	IC 95%
<b>EH 8.1 positivos</b>					
<i>Clásicas</i>	32	32 (100%)	NS		
<i>Atípicas</i>	40	40 (100%)	NS		
<b>EH 8.1 negativos</b>					
<i>Clásicas</i>	47	10 (21.2%)			
<i>Atípicas</i>	14	<b>9 (64.3%)<sup>1</sup></b>	< 0.01	6,67	1.82-24.36

**Tabla 1.10.** Distribución del alelo MICA-A5.1 en pacientes celíacos positivos y negativos para el Haplotipo Extendido 8.1 (B\*08 / DRB1\*03 / DQA1\*05:01 / DQB1\*02:01).

## 1.8. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS ALELOS DE MICB CON LA ENFERMEDAD CELÍACA.

Una vez realizado el análisis de los alelos TM de MICA en pacientes y en controles, decidimos estudiar la distribución de 16 alelos de MICB en los mismos grupos. Solamente se encontraron nueve alelos diferentes de MICB en nuestra población (Tabla 1.11).

Los resultados de dicho análisis fueron los siguientes:

- La distribución de los alelos MICB era claramente diferente entre pacientes y controles. Se encontró una fuerte asociación del alelo MICB\*0106 con la enfermedad celíaca (pc < 0,000001; OR = 5,6; IC 95% = 3,13 - 10,17) (Tabla 1.11).

- Tal y como ya se había realizado para MICA, la distribución de MICB también se analizó agrupando a los pacientes en formas clásicas y atípicas de la enfermedad. El alelo MICB\*0106 estaba significativamente incrementado en ambos grupos de pacientes al compararlos con el grupo de controles sanos; formas clásicas ( $p_c < 0,01$ ; OR = 3,7; IC 95% = 1,94 a 7,18) y formas atípicas ( $p_c < 0,000001$ ; OR = 11,1; IC 95% = 5,23 - 23,68) (Tabla 1.11).

	Controles (n=116)	Celíacos totales (n=133)	Celíacos clásicos (n=79)	Celíacos atípicos (n=54)
<b>MICB*01021</b>	87 (75%)	90 (67%)	61 (77%)	29 (51%)
<b>MICB*01022</b>	13 (11%)	4 (3%)	3 (3%)	1 (1%)
<b>MICB*0103101</b>	28 (24%)	25(18%)	14 (17%)	11 (20%)
<b>MICB*0103102</b>	8 (6%)	13 (9%)	10 (12%)	3 (5%)
<b>MICB*0104</b>	32 (27%)	18 (13%)	9 (11%)	9 (16%)
<b>MICB*0105</b>	7( 6%)	6 (4%)	3(3%)	3 (5%)
<b>MICB*0106</b>	22 (18%)	<b>76 (57%)<sup>a</sup></b>	<b>37(46%)<sup>b</sup></b>	<b>39 (72%)<sup>c</sup></b>
<b>MICB*01021v</b>	6 (5%)	4 (3%)	1(1%)	3 (5%)
<b>MICB*005d</b>	2 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	0
<sup>a</sup> $p_c < 0.000001$ , OR = 5,6 IC 95% = 3,1 - 10,1, celíacos totales vs controles sanos. <sup>b</sup> $p_c < 0.01$ , OR = 3,7 IC 95% = 1,9 - 7,1), celíacos clásicos vs controles sanos. <sup>c</sup> $p_c < 0.000001$ ; OR = 11,1; IC 95% = 5.23 - 23,62. <i>Celíacos atípicos vs controles sanos.</i> $p_c < 0.05$ , OR = 2,9; IC 95% = 1,43 - 6,18). <i>Celíacos atípicos vs clásicos.</i>				

**Tabla 1.11.** Distribución de los diferentes alelos de MICB en pacientes con enfermedad celíaca y en controles sanos. Los pacientes celíacos se han dividido en dos grupos de acuerdo con las diferentes formas de la enfermedad.

- El alelo MICB\*0106 también estaba incrementado pacientes con enfermedad atípica en comparación con aquellos afectados por formas clásicas de la celíaca ( $p_c < 0,05$ ; OR = 2,9; IC 95% = 1,43 - 6,18) (Tabla 1.11).

## Resultados

- El análisis de la segregación de los alelos MICA y MICB en algunas familias disponibles de estos pacientes indicó que MICB\*0106 era parte de la haplotipo extendido EH8.1 (HLA-B\*08:01 - MICA-A5.1 - MICB\*0106 -DRB1\*03:01 - DQA1\*05:01 - DQB1\*02:01) (Figura X).
- Se observó un importante desequilibrio de ligamiento entre MICB\*0106, HLA-DQ2 ( $\lambda_s = 0,55$ ) y MICA-A5.1 ( $\lambda_s = 1$ ).

### 1.9 ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS INDIVIDUOS HLA-DQ2 NEGATIVOS.

Tal y como se apuntó previamente, se recluto otro grupo de 38 pacientes HLA-DQ2 negativos con el fin de evaluar si las asociaciones descritas hasta el momento eran independientes de la presencia del heterodímero de susceptibilidad HLA-DQ2. Todos estos pacientes se tiparon para HLA-DRB1\*, DQA1\* y DQB1\*, y se realizó también el

	Pacientes DQ2-negativos n=38	Controles sanos n=91
<b>HLA-DQ8 (DQA1*03:xx,DQB1*03:02)</b>	<b>11 (29%)<sup>a</sup></b>	9 (10%)
<b>HLA-DQA1*05:01/05 (Una cadena de susceptibilidad)</b>	13 (34%)	21 (23%)
<b>HLA-DQB1*02:01/02 (Una cadena de susceptibilidad)</b>	14 (37%)	27 (30%)
<b>HLA-DRB1*03:01</b>	1 (2.6%)	3 (3.3%)
<b>HLA-DRB1*04:xx</b>	10 (26%)	23 (25%)
<b>HLA-DRB1*07:01</b>	14 (37%)	26 (29%)
<b>HLA-DRB4*</b>	22 (58%)	47 (52%)
<sup>a</sup> p < 0,01; p <sub>c</sub> = NS.		

**Tabla 1.12.** Diferencias en la distribución de HLA-DQ8 y otros alelos HLA-DR en pacientes celíacos HLA-DQ2 negativos y en controles sanos.

genotipado del polimorfismo TM de MICA y de los diferentes alelos de MICB.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron los siguientes:

- Tal y como ya había sucedido en el estudio anterior, la edad promedio al momento del diagnóstico en el grupo de pacientes con enfermedad clásica fue menor ( $9,88 \pm 6,65$  años) en comparación con el grupo de pacientes con celíaca atípica ( $20,05 \pm 10,60$  años). Estas diferencias alcanzaron significación estadística ( $p < 0,01$ ).
- No se encontró significación estadística al comparar la frecuencia de HLA-DRB1\*04 en pacientes celíacos DQ2 negativos con la de los controles sanos en nuestro estudio (25% en la población de control y en el 26% de los pacientes con EC). Este alelo está en desequilibrio de ligamiento con HLA-DQ8. Tampoco se encontraron diferencias en la distribución de HLA-DRB4\* (Tabla 12).
- La frecuencia del heterodímero HLA-DQ8 (DQA1\*03:xx, DQB1\*03:02) fue claramente mayor en los pacientes (28%) en comparación con los controles (9%). Sin embargo estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Tabla 1.12). No se encontraron diferencias en la distribución de

	Pacientes clásicos n=19	Pacientes atípicos n=27	Controles sanos n=91
A5.1	7 (39%)	<b>22 (81%)<sup>a, b</sup></b>	37 (40.6%)
A6	14 (74%)	14 (52%)	42 (46.1%)
A5	5 (27%)	5 (18,5%)	26 (28%)
A4	3 (16.6%)	6 (22%)	23 (25%)
A9	1 (5.5%)	4 (15%)	27 (29.6%)
<sup>a</sup> $p < 0,001$ , OR=6,4, 95%CI (2,23-18,40) ( <i>atípicos vs. controles</i> )			
<sup>b</sup> $p < 0,05$ , OR=7,5, 95%CI (1,89-28,91) ( <i>atípicos vs. clásicos</i> )			

**Tabla 1.13.** Distribución de los alelos MICA TM en controles sanos y en pacientes en formas atípicas y clásicas de enfermedad celíaca. Todos los casos y controles son HLA-DQ2 negativos.



## Resultados

DQ8 cuando se compararon los grupos de pacientes con diferentes formas de la enfermedad.

- El alelo HLA-B8 aparecía con una mayor frecuencia el grupo con enfermedad atípica que en los pacientes con formas clásicas (3 sobre 20 frente a 0 de 18), pero las diferencias tampoco alcanzaron significación estadística.
- No se encontraron diferencias en la distribución de estos y otros alelos de HLA, entre los controles sanos y los pacientes o entre ambos grupos con EC.
- Se encontró una fuerte asociación del alelo MICA-A5.1 con el grupo de pacientes atípicos. Este alelo se encontró en el 81% de los enfermos atípicos HLA DQ2 negativos, en el 40% de los controles ( $p_c < 0,001$ , OR = 6,4) y en el 39% de los pacientes con formas clásicas de la enfermedad celíaca ( $PC < 0,05$ , OR = 7,5) (Tabla 1.13).

	Controles (n=91)	Celíacos totales (n=46)	Celíacos clásicos (n=19)	Celíacos atípicos (n=27)
<b>MICB*01021</b>	71 (78%)	35 (76%)	17 (89%)	18 (66%)
<b>MICB*01022</b>	12 (13%)	2 (4%)	0	2 (7%)
<b>MICB*0103101</b>	22 (24%)	6 (13%)	1 (5%)	5 (29%)
<b>MICB*0103102</b>	5 (5%)	4 (8%)	3 (15%)	1 (3%)
<b>MICB*0104</b>	28 (30%)	24 (52%)*	10 (52%)	14 (51%)
<b>MICB*0105</b>	5 (5%)	1 (2%)	0	1 (3%)
<b>MICB*0106</b>	12 (13%)	4 (8%)	2 (10%)	2 (7%)
<b>MICB*01021v</b>	3 (3%)	2 (4%)	0	2 (7%)
<b>MICB*005d</b>	2 (2%)	0	0	0

\* $p < 0,01$ ,  $p_c = N.S.$  celíacos totales vs controles sanos.

**Tabla 1.14.** Distribución de los alelos de MICB en controles sanos y en pacientes en formas atípicas y clásicas de enfermedad celíaca. Todos los casos y controles son HLA-DQ2 negativos.

- El alelo MICA-A6 estaba incrementado en el grupo de pacientes clásicos y

MICA-A9 estaba notablemente disminuido, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 1.13).

- El alelo MICB\*0104 estaba también incrementado en los pacientes celíacos HLA-DQ2 negativos, pero no de forma significativa (52% vs 30%,  $p = 0,01$ , PC = NS) (Tabla 1.14).
- No se encontraron diferencias en la distribución de los demás alelos de MICB en los pacientes con respecto a los controles y entre los dos grupos de pacientes (Tabla 1.14).

### 1.10 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL POLIMORFISMO -308 DEL PROMOTOR DEL GEN TNFA.

El gen que codifica para el TNF- $\alpha$  está ubicado en humanos en la región MHC. Ciertos SNPs en la región promotora de este gen pueden favorecer un cambio en la síntesis de proteína, fenómeno que se ha asociado con patología autoinmune y enfermedades infecciosas. En el caso del polimorfismo en la posición -308 se sustituye una guanina por una adenina (G/A) y se generan los alelos conocidos como TNF1 (G) y

Genotipos	Controles n=116	Formas clásicas n=79	Formas atípicas n=54
<b>A/G</b>	23 (19,83%)	40 (50,63%)	35 (64,81%)
<b>G/G</b>	89 (76,72%)	35 (44,30%)	10 (18,52%)
<b>A/A</b>	4 (3,45%)	4 (5,06%)	9 (16,67%)

**Tabla 1.15.** Frecuencias de los genotipos del polimorfismo -308 en los tres grupos analizados.

TNF2 (A). La síntesis del TNF- $\alpha$  puede variar en función de este polimorfismo. El alelo TNF2 se ha asociado con una transcripción significativamente aumentada de esta citocina (13) y está asociado con varias patologías autoinmunes y a la enfermedad

## Resultados

celíaca<sup>33, 34</sup>. Por este motivo decidimos realizar el genotipado de este polimorfismo, encontrando los siguientes resultados (tabla 1.15):

- No se encontraron diferencias entre la distribución de los genotipos A/G, G/G y A/A entre ambos grupos de pacientes y con respecto a controles sanos.
- Encontramos diferencias significativas al comparar la distribución de la frecuencia del alelo A entre las formas atípicas y las clásicas de la enfermedad

Alelos	Formas clásicas 2n=158	Formas atípicas 2n=108	pc	OR	IC 95%
<b>TNF2 (A)</b>	48 (30,38%)	53 (49,07%)*	< 0,01	2,21	1,33-3,68
<b>TNF1 (G)</b>	110 (69.62%)	55 (50,93%)	-	-	-

**Tabla 1.16.** Frecuencias alélicas del polimorfismo -308 en los dos grupos de enfermos analizados.

celíaca. Dicho alelo se encontró 49% de los enfermos atípicos y sólo en el 30% de los clásicos (pc < 0,01; OR=2,21; IC 95% = 1,33-3,68) (Tabla 1.16).

- Encontramos que todos los individuos portadores del alelo TNF2 lo eran también del haplotipo AH8.1.
- No se encontraron diferencias en la distribución del alelo G.
- Todos los resultados deducidos de dicho análisis pueden atribuirse al desequilibrio de ligamiento entre el TNF2 y HLA-DQ2.

## 2. ESTUDIO GENÉTICO DE LAS FORMAS CLÁSICAS Y ATÍPICAS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA EN LA POBLACIÓN SAHARAUI.

### 2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Como siguiente objetivo de nuestro trabajo nos planteamos replicar los resultados obtenidos en la población española en otra población diferente. Para ello, realizamos una réplica del análisis genético realizado, en una cohorte de pacientes saharauis con enfermedad celíaca, divididos en los dos grupos ya descritos.

### 2.2. PACIENTES Y CONTROLES SANOS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO.

#### 2.2.1. Pacientes.

Ciento veinticinco pacientes celíacos se incluyeron de forma aleatoria en el estudio. Todos los pacientes fueron reclutados en los campamentos de refugiados de Tinduf en Argelia, durante una visita realizada en mayo de 2002. Debido a las

	EC atípica n=57	EC clásica n=67	Controles sanos n=98
Género			
Masculino	13	24	38
Femenino	44	43	60
Edad media	21.8±14.44	10.6±5	21.3±13.8
Historia familiar	32 (56%)	27 (40%)	-
Enfermedades autoinmunes asociadas	<b>9 (16%)<sup>a</sup></b>	1 (1.5%)	-
<sup>a</sup> p = 0.006; OR = 12,37; IC 95% = 1,51-100,97.			

**Tabla 2.1.** Características de los grupos de individuos saharauis seleccionados para el estudio.

## *Resultados*

dificultades inesperadas, no se pudieron obtener biopsias de cada paciente con el fin de establecer un diagnóstico. Del total de 124 pacientes, 82 habían sido diagnosticados previamente en un estudio realizado por el Dr. Carlo Catassi en el año 2001, estudio en el cual si se habían podido realizado biopsias. Los 43 nuevos casos de enfermedad que encontramos, fueron clasificados como celíacos ya que resultaron positivos para la determinación de auto-anticuerpos anti-TG2 antes de comenzar una dieta libre de gluten. La presencia de una historia familiar de enfermedad celíaca no fue tomada en consideración en la selección de los nuevos casos.

Todos los pacientes se clasificaron como celíacos clásicos y atípicos, de acuerdo con sus manifestaciones clínicas que presentaban al diagnóstico. Sesenta y siete tenían una sintomatología digestiva clásica, consistente en diarrea, flatulencia, pérdida de peso y fatiga. Estos pacientes se clasificaron como formas clásicas de enfermedad celíaca. Los cincuenta y siete restantes presentaban solo síntomas extraintestinales predominantes, o eran incluso asintomáticos, por lo que fueron clasificados como pacientes con formas atípicas de la enfermedad. La mayor parte de éstos presentaban anemia como manifestación predominante y fueron diagnosticados sólo por la presencia de anticuerpos anti-TG2.

### **2.2.2. Controles sanos.**

Se reclutaron para realizar la comparación genética noventa y ocho controles sanos de la población saharauí. Ninguno de estos individuos tenía relación familiar directa con los pacientes ni presentaban antecedentes familiares de enfermedad celíaca. Como requisitos clínicos y analíticos necesarios para su inclusión como controles se utilizaron los siguientes: no presentar antecedentes de intolerancia al gluten y sus derivados, no tener deficiencia de hierro, anemia o cualquier hallazgo anormal en los estudios bioquímicos y la negatividad para los anticuerpos anti-TG2.

Las autoridades sanitarias saharauí de Tinduf concedieron el adecuado permiso para la realización del estudio y todos los pacientes y controles dieron su consentimiento informado antes de ser reclutados.

### 2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES SAHARAUIS.

Del estudio clínico-epidemiológico de los dos grupos de enfermos y los controles sanos se obtuvieron los siguientes resultados:

- La edad media del grupo de pacientes con enfermedad celíaca atípica era mayor que la de la de los pacientes con formas clásicas de la enfermedad ( $21,8 \pm 14,44$  años vs.  $10,6 \pm 5$  años).
- La edad de aparición de la enfermedad no pudo establecerse debido a que es muy difícil de estimar cuando aparece la celíaca en pacientes con formas atípicas, especialmente en aquellos que presentan menos síntomas o en los que son totalmente asintomáticos.
- Se detectó un incremento notable en la proporción de mujeres en el grupo de pacientes con enfermedad atípica (4:1).
- Los pacientes con formas atípicas de la enfermedad tenían un aumento de la frecuencia de enfermedades autoinmunes concomitantes, tales como la diabetes mellitus tipo 1, la dermatitis herpetiforme, tiroiditis autoinmune, etc. La comparación con el grupo de pacientes con formas clásicas de la enfermedad resultó estadísticamente significativa (16% vs 1,5%,  $p < 0,01$ ).
- Se encontró un mayor grado de agregación familiar entre los pacientes con formas atípicas de la enfermedad (60% vs 40%).

### 2.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS HLA-DRB1\*, DQA1\* Y DQB1\* EN PACIENTES Y EN CONTROLES.

Del mismo modo que en la población española, El punto de este estudio fue realizar un análisis genético de los loci HLA de clase II. Dicho análisis presento los siguientes resultados (Tabla 2.2):

- Los alelos HLA-DQA1\*05:01/05 y DQB1\*02:01/02 estaban claramente asociados con la enfermedad celíaca en la población saharai ( $p < 10^{-5}$ , OR

= 10,63), tal y como ya se había descrito previamente.

- El heterodímero de susceptibilidad estaba incrementado en ambas formas de la enfermedad en comparación con los controles sanos. HLA-DQ2 estaba presente en el 86,5% ( $p < 10^{-5}$ ; OR = 9,34) de los pacientes con la forma clásica de la enfermedad y en el 91% ( $p < 10^{-5}$ , OR = 15,08) de los enfermos con la forma atípica (Tabla 2.2).

	Pacientes EC n=125	EC clásica n=67	EC atípica n=57	Controles n=98
<b>HLA-DQ2</b>	110 (88%)	58 (86.5%)	52 (91%)	40 (41%)
<b>HLA-DQ8 en DQ2 negativos</b>	6 of 15 (40%)	5 of 9 (55.5%)	1 of 5 (20%)	7 of 58 (12%)
$p < 10^{-5}$ ; OR = 10,63; IC 95% = 5,42 – 20,84. <i>DQ2 en EC vs. controles sanos.</i> $p < 10^{-5}$ , OR = 9,34; IC 95% = 4,16 – 20,99. <i>DQ2 en EC clásica vs. controles sanos.</i> $p < 10^{-5}$ ; OR = 15,08; IC 95% = 5,53 - 41,08. <i>DQ2 en EC atípica vs. controles sanos.</i>				
<b>Tabla 2.2.</b> Distribución de los heterodímeros de susceptibilidad en pacientes celíacos y en controles sanos.				

- Además, hemos encontrado que el número de controles sanos portadores del heterodímero de susceptibilidad HLA-DQ2 fue notablemente superior a la descrita en la población española (8) (41% vs. 21,5%;  $p < 0,05$ ) y en otros estudios en varias poblaciones caucásicas.
- El heterodímero HLA-DQ8 se encontró en el 41% de los pacientes saharauis con enfermedad celíaca y en sólo el 12% de los controles sanos, pero estas diferencias no alcanzaron significación estadística cuando se aplicó la corrección correspondiente ( $p = 0,01$ ,  $p < NS$ ).
- El heterodímero HLA-DQ8 resultó ser especialmente frecuente en pacientes con enfermedad celíaca clásica (55,5%;  $p = 0,007$ ;  $PC = NS$ ).
- Los alelos HLA-DRB1\* mostraron una distribución similar entre ambos grupos de pacientes.

## 2.5. ANÁLISIS DE LOS HAPLOTIPOS HLA EN PACIENTES Y EN CONTROLES SAHARAUIS.

A continuación decidimos analizar la distribución de los alelos de HLA-B\* en los tres grupos estudiados. De este modo se pudo evaluar la distribución de los diferentes haplotipos HLA en los pacientes y en los controles sanos de la población saharai.

	Pacientes EC n=125	EC clásica n=67	EC atípica n=57	Controles n=98
<b>DR3/DQ2</b>	100 (80%)	49 (73%)	51 (89%)	36 (37%)
<b>DRx/DQ2</b>	10 (7%)	9 (13%)	1 (2%)	4 (4%)
<b>B8/DR3/DQ2</b>	65 (52%)	24 (36%)	41 (72%)	21 (21%)
$p_c < 10^{-6}$ ; OR = 9,39; IC 95% = 4,43 – 19,94. <i>B8/DR3/DQ2 en EC atípica vs. controles sanos.</i>				
$p_c < 0.001$ ; OR = 4,59; IC 95% = 2,14 – 9,85. <i>B8/DR3/DQ2 en EC atípica vs. clásica.</i>				

**Tabla 2.3.** Distribución de los haplotipos de susceptibilidad en pacientes celíacos y en controles sanos.

De este estudio se dedujeron los siguientes resultados (Tabla 2.3):

- Como era de esperar, la presencia del haplotipo DR3/DQ2 estaba claramente incrementada en los pacientes con formas clásicas de la enfermedad (73%;  $p_c < 10^{-5}$ , OR = 9,34; IC 95% = 4,16 – 20,99) cuando se compararon con los controles sanos. Este incremento era especialmente importante en los pacientes con enfermedad atípica (89%;  $p_c < 10^{-5}$ ; OR = 15,08; IC 95% = 5,53 - 41,08) (Tabla 2.3).
- No se encontraron otras diferencias en la distribución de los haplotipos DR y DQ entre los diversos grupos de pacientes y controles estudiados.
- Como ya hemos visto previamente en la población española, existe una fuerte asociación del haplotipo HLA-B8/DR3/DQ2 con las formas atípicas de



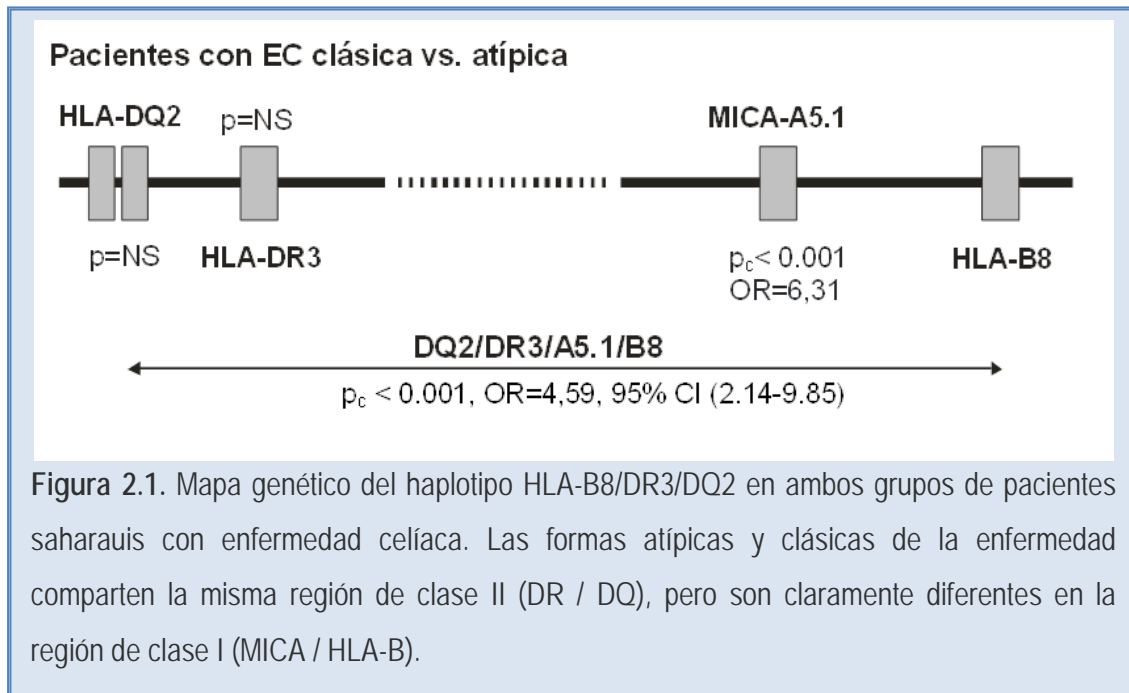


Figura 2.1. Mapa genético del haplotipo HLA-B8/DR3/DQ2 en ambos grupos de pacientes saharauis con enfermedad celíaca. Las formas atípicas y clásicas de la enfermedad comparten la misma región de clase II (DR / DQ), pero son claramente diferentes en la región de clase I (MICA / HLA-B).

la enfermedad cuando se compararon con el grupo de controles sanos ( $p_c < 10^{-5}$ , OR = 9,39).

- Este haplotipo (HLA-B8/DR3/DQ2) también estaba incrementado en los pacientes con celíaca clásica (37%), pero las diferencias no alcanzaron significación estadística.
- Sin embargo, cuando se comparó la distribución de este haplotipo entre los dos grupos de pacientes, se encontró que estaba significativamente incrementado en las formas atípicas de la enfermedad en comparación con las clásicas ( $p_c < 0,001$ , OR = 4,59) (Tabla 2.3, Figura 2.1).
- No se encontraron otros haplotipos HLA asociados con la celíaca en conjunto o con las diferentes formas de la enfermedad.

**2.6. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO TRANSMEMBRANA DE MICA EN PACIENTES Y EN CONTROLES SANOS DE LA POBLACIÓN SAHARAUI.**

El siguiente paso en nuestro trabajo consistió en comprobar si las diferencias observadas en la distribución de los haplotipos HLA podrían ser secundarias a la

presencia de determinados alelos del *locus* MICA. Como ya habíamos descrito previamente en la población española, el alelo transmembrana MICA-A5.1 estaba notablemente incrementado en los pacientes con formas atípicas de la enfermedad

MICA	Pacientes EC n=125	EC atípica n=57	EC clásica n=67	Controles sanos n=98
4	18 (14%)	10 (18%)	8 (11%)	17 (16.5%)
5	22 (18%)	6 (11%)	16 (23%)	22 (21%)
<b>5.1</b>	82 (66%)	<b>49 (86%)<sup>a, b</sup></b>	33 (49%)	46 (47%)
6	66 (53%)	22 (40%)	44 (63%)	57 (58%)
9	24 (19%)	10 (18%)	14 (20%)	29 (28%)

<sup>a</sup>Pc < 0,001; OR = 6,31; IC 95% = 2,60 - 15,33. *MICA-A5.1 EC atípica vs. EC clásica.*

<sup>b</sup>Pc < 0,00001; OR = 6,92; IC 95% = 2,97 - 16,14. *MICA-A5.1 EC atípica vs. Controles.*

**Tabla 2.4.** Distribución de los diferentes alelos transmembrana de MICA en los dos grupos de enfermos celíacos y en controles sanos.

celíaca.

El análisis de los polimorfismos de la región TM de MICA en la población saharauí mostró los siguientes resultados (Tabla 2.4):

- El alelo MICA-A5.1 estaba notablemente incrementado en las formas atípicas de la enfermedad (Tabla 2.4). Este alelo se encontró en 86% de los pacientes. Por el contrario, solamente el 49% de los pacientes con formas clásicas eran portadores del alelo MICA-A5.1, frecuencia similar a la encontrada en los controles sanos (47%).
- Las diferencias entre el grupo de enfermos con celíaca atípica y los controles sanos resultaron significativas (Pc < 10<sup>-5</sup>; OR = 6,92; IC 95% = 2,97 - 16,14).
- Existe una clara diferencia en la distribución del alelo MICA-A5.1 entre los

## Resultados

pacientes celíacos clásicos y los atípicos. Dichas diferencias también alcanzaron significación estadística ( $P_c < 0,001$ , OR = 6,31; IC 95% = 2,60 - 15,33).

- Sin embargo, cuando se comparó la distribución de este alelo en el grupo que incluye a todos los pacientes celíacos con el grupo de los controles sanos, las diferencias no alcanzaron significación estadística (66% vs. 47%) (Tabla 2.4).

### 2.7. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO TRANSMEMBRANA DE MICA EN RELACIÓN CON EL HAPLOTIPO HLA-DQ2/DR3/B8.

Se realizó una estratificación de los pacientes con el fin de estimar si la vinculación de este alelo de susceptibilidad a las formas atípicas de la enfermedad celíaca era independiente del haplotipo HLA-B8/DR3/DQ2, en el cual habitualmente está incluido

	n	MICA-A5.1
<b>B8/DR3/DQ2 positivos</b>		
Formas atípicas	41	41 (100%)
Formas clásicas	25	25 (100%)
<b>B8/DR3/DQ2 negativos</b>		
Formas atípicas	16	<b>8 (50%)*</b>
Formas clásicas	42	8 (19%)
*p < 0.05, OR=4,25; IC 95% = 1,57-21,57.		

**Tabla 2.5.** Distribución del alelo MICA-A5.1 en pacientes HLA-B8/DR3/DQ2 positivos y negativos.

el alelo MICA-A5.1, tal y como ya habíamos demostrado en la población española.

Los datos obtenidos a partir de dicho análisis fueron los siguientes:

- Todos los pacientes celíacos y los controles sanos portadores del haplotipo

HLA-DQ2/DR3/B8, también lo eran del alelo MICA-A5.1.

- Se analizó la distribución del alelo MICA-A5.1 en un grupo de pacientes positivos y negativos para el haplotipo HLA-B8/DR3/DQ2 con el fin de establecer si esta asociación con la forma atípica enfermedad celíaca se debía a desequilibrio de ligamiento con este haplotipo (Tabla 2.5). Para ello se compararon 42 pacientes clásicos y 16 atípicos que no portaban dicho haplotipo. En esta situación el alelo MICA-A5.1 estaba también significativamente incrementado en las formas atípicas de la enfermedad celíaca (50% vs 19%;  $p < 0,05$ ; OR = 4,25; IC 95% = 1,57-21,57).
- Esto confirma que el aumento de la frecuencia de A5.1 en formas atípicas es independiente de la inclusión de este alelo en el haplotipo HLA-B8/DR3/DQ2.

## 2.8. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO TRANSMEMBRANA DE MICA EN RELACIÓN CON LA HISTORIA FAMILIAR DE LOS PACIENTES.

Por último, los pacientes fueron estratificados de acuerdo con la presencia de antecedentes familiares de enfermedad celíaca. En ambos grupos se estudió la distribución de los diferentes alelos TM de MICA (Tabla 2.6).

Los resultados de dicho análisis fueron los siguientes:

- En el primer grupo, es decir, aquellos con historia familiar de enfermedad celíaca, el alelo MICA-A5.1 estaba incrementado en el grupo de pacientes con formas atípicas en comparación con los que presentan enfermedad celíaca clásica ( $p < 0,01$ , OR = 5,81).
- Una distribución similar de este alelo se encontró en el grupo de pacientes que no tienen familiares afectados ( $p < 0,01$ , OR = 7,33).
- De ese modo, nuestros resultados muestran que la asociación del alelo MICA-A5.1 con las formas atípicas de la enfermedad no estaba relacionada con la historia familiar de enfermedad celíaca en la población saharauí.

	n	MICA-A5.1
<b>Pacientes con historia familiar</b>		
Enfermedad celíaca atípica	32	27 (84%)
Enfermedad celíaca clásica	27	13 (48%)
p < 0,01; OR = 5,81; IC 95% = 1,72 – 19,73.		
<b>Pacientes sin historia familiar</b>		
Enfermedad celíaca atípica	25	22 (88%)
Enfermedad celíaca clásica	40	20 (50%)
p < 0.01; OR = 7,33; IC 95% = 1,88 – 28,46.		

**Tabla 2.6.** Distribución del alelo MICA-A5.1 en pacientes con y sin historia familiar de enfermedad celíaca en la población saharai.

## 2.9. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS ALELOS DE MICB CON LA ENFERMEDAD CELÍACA EN LA POBLACIÓN SAHARAI.

Una vez realizado el análisis de los alelos TM de MICA en pacientes y en controles, decidimos estudiar la distribución de 16 alelos de MICB en los mismos grupos. Al igual que en la población española, solamente se encontraron nueve alelos diferentes de MICB en la población saharai (Tabla 2.7).

Los resultados encontrados fueron semejantes a los encontrados en la población española, y se muestran a continuación:

- La distribución de los alelos MICB era claramente diferente entre pacientes y controles. Se encontró una fuerte asociación del alelo MICB\*0106 con la enfermedad celíaca (pc < 0,0001; OR = 5,5; IC 95% = 3,01 - 10,03) (Tabla 2.7).
- Tal y como ya se había realizado para MICA, la distribución de MICB también se analizó agrupando a los pacientes en formas clásicas y atípicas de la enfermedad. El alelo MICB\*0106 estaba significativamente incrementado en ambos grupos de pacientes al compararlos con el grupo de controles sanos;

formas clásicas ( $p_c < 0,01$ ; OR = 2,97; IC 95% = 1,50 a 5,88) y formas atípicas ( $p_c < 0,0001$ ; OR = 13,75; IC 95% = 6,18 – 30,57) (Tabla 2.7).

	Controles (n=98)	Celíacos totales (n=125)	Celíacos clásicos (n=67)	Celíacos atípicos (n=57)
<b>MICB*01021</b>	71 (72%)	83 (66%)	50 (75%)	33 (58%)
<b>MICB*01022</b>	13 (13%)	8 (6%)	5 (7%)	3 (5%)
<b>MICB*0103101</b>	30 (31%)	36 (29%)	16 (24%)	20 (35%)
<b>MICB*0103102</b>	2 (2%)	11 (9%)	8 (12%)	3 (5%)
<b>MICB*0104</b>	22 (23%)	21 (17%)	9 (13%)	12 (21%)
<b>MICB*0105</b>	5 (5%)	7 (6%)	3 (4%)	4 (7%)
<b>MICB*0106</b>	21 (21%)	<b>75 (60%)<sup>a</sup></b>	<b>30 (45%)<sup>b</sup></b>	<b>45 (79%)<sup>c</sup></b>
<b>MICB*01021v</b>	2 (2%)	1 (1%)	1(1%)	0 (0%)
<b>MICB*005d</b>	6 (6%)	6 (5%)	4 (6%)	1 (2%)
<sup>a</sup> $p_c < 0.0001$ ; OR = 5,5; IC 95% = 3,01 - 10,03. Celíacos totales vs controles sanos.				
<sup>b</sup> $p_c < 0.01$ ; OR = 2,97; IC 95% = 1,50 – 5,88. Celíacos clásicos vs controles sanos.				
<sup>c</sup> $p_c < 0.0001$ ; OR = 13,75; IC 95% = 6,18 – 30,57. Celíacos atípicos vs controles sanos.				
$p_c < 0.01$ ; OR = 4,62; IC 95% = 2,08 – 10,28. Celíacos atípicos vs clásicos.				

**Tabla 2.7.** Distribución de los diferentes alelos de MICB en pacientes con enfermedad celíaca y en controles sanos de la población saharai. Los pacientes celíacos se han dividido en dos grupos de acuerdo con las diferentes formas de la enfermedad.

- El alelo MICB\*0106 también estaba incrementado pacientes con enfermedad atípica en comparación con aquellos afectados por formas clásicas de la celíaca, tal y como sucedía en la población española ( $p_c < 0,01$ ; OR = 4,62; IC 95% = 2,08 – 10,28) (Tabla 2.7).
- Igual que en la población española, el análisis de la segregación de los alelos MICA y MICB demostró que MICB\*0106 era parte de la haplotipo extendido EH8.1 (HLA-B\*08:01 - MICA-A5.1 - MICB\*0106 -DRB1\*03:01 - DQA1\*05:01 - DQB1\*02:01) (Figura X).

## *Resultados*

- También en este estudio se observó un importante desequilibrio de ligamiento entre MICB\*0106, HLA-DQ2 ( $\lambda s = 0,56$ ) y MICA-A5.1 ( $\lambda s = 1$ ).

### 3. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE NKG2D Y SUS LIGANDOS MICA Y MICB EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA.

#### 3.1.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Tal y como ya habíamos señalado previamente, los ligandos de NKG2D no se expresan de forma constitutiva en la mayor parte de los tejidos sanos. Sin embargo, MICA se expresa a niveles bajos en las células epiteliales intestinales normales y se ha descrito además que su expresión esta notablemente incrementada en enterocitos de pacientes con enfermedad celíaca. Esta regulación positiva de la expresión de MICA en la celíaca parece estar directamente relacionada con el efecto tóxico directo de ciertos componentes del gluten.

Teniendo en cuenta que tanto estudios genéticos como funcionales previos sugerían claramente la implicación de NKG2D y sus ligandos en la patogenia de la enfermedad celíaca, nos propusimos analizar, como siguiente paso de este trabajo, la expresión de los genes MICA, MICB, NKG2D y de la citocina IL- 15 por RT-PCR y de la proteína MICA mediante inmunohistoquímica, en biopsias de pacientes con enfermedad celíaca activa, con la intención de evaluar una posible asociación con la gravedad de la lesión y por lo tanto de la enfermedad.

#### 3.2.PACIENTES

Para analizar la expresión de NKG2D, IL-15, MICA y MICB en la enfermedad celíaca se seleccionaron biopsias de 20 pacientes que habían sido diagnosticados previamente como celíacos. El diagnóstico de la enfermedad se estableció de acuerdo con los parámetros habituales ya comentados.



	Daño leve de la mucosa n=10	Daño severo de la mucosa n=10	Controles sanos n=5
Edad (Media ± DE)	17±13	11±10	16±12
Anti-TG2	10 (100%)	10 (100%)	-
HLA-DQ2	9 (90%)	10 (100%)	1 (20%)
HLA-DQ8	1 (10%)	2 (20%)	0
Síntomas digestivos	6 (60%)	9 (90%)	-
Síntomas extradigestivos			
Anemia	9 (90%)	10 (100%)	-
Dermatitis herpetiforme	1 (10%)	-	-
Otros	3 (30%)	2 (20%)	-

**Tabla 3.1.** Características clínicas y genéticas de los pacientes y de los controles sanos incluidos en los estudios de expresión de MICA, MICB, NKG2D e IL15 en la enfermedad celíaca.

En todos los casos se obtuvo una biopsia intestinal, y esta resulto compatible con la presencia de la enfermedad. Todas las biopsias se obtuvieron de al menos tres sitios diferentes en el duodeno proximal a distal, con un total de 72 muestras analizadas. Todas fueron realizadas antes de que los pacientes iniciasen una dieta libre de gluten.

Para garantizar un grupo homogéneo de muestras, todos los pacientes seleccionados para la realización de este estudio tenían el mismo tipo de lesión en todas las biopsias recogidas. Muestras de mucosa intestinal obtenidas de cinco individuos sin patología digestiva se utilizaron como controles sanos.

Las biopsias de los pacientes se dividieron en dos grupos teniendo en cuenta la clasificación de MARSCH:

- a. Daño de la mucosa leve (Marsh I, II y IIIa; DLM).
- b. Daño de la mucosa severo (Marsh IIIb y IIIc; DSM).

El Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias aprobó el protocolo, y todos los pacientes y los controles sanos dieron su consentimiento informado por escrito antes de ser enrolados en este estudio.

### 3.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

Las características clínicas de los pacientes se recogen en la tabla 3.1. De su análisis se dedujeron los siguientes resultados:

- La edad media del grupo de enfermos con daño severo de la mucosa era inferior ( $11 \pm 10$  años) en comparación con la del grupo de pacientes con daño leve ( $17 \pm 13$  años).
- Todos los pacientes presentaban anticuerpos anti-transglutaminasa 2.
- Todos los pacientes incluidos en el estudio eran portadores de al menos uno de los heterodímeros de susceptibilidad HLA-DQ2 o HLA-DQ8.
- El 60% de los pacientes con daño leve de la mucosa presentaban síntomas digestivos, frente al 90% de los enfermos con daño severo.
- La manifestación extradigestiva más frecuente ambos grupos de pacientes fue la anemia.

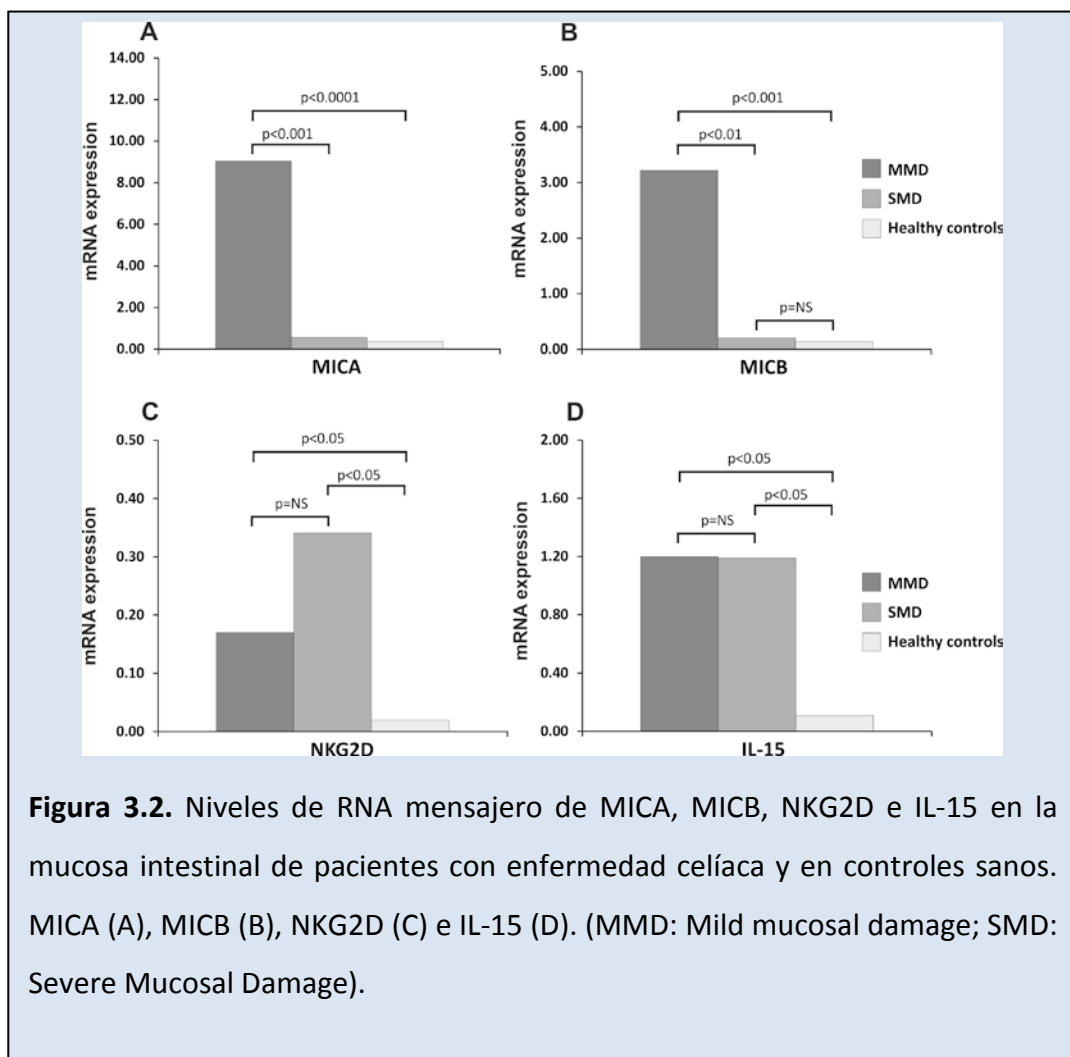
### 3.4. ANÁLISIS POR RT-PCR A TIEMPO REAL DE LA EXPRESIÓN DE MICA, MICB, NKG2D E IL15 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA.

El siguiente objetivo del estudio fue analizar la expresión de NKG2D y sus ligandos MICA y MICB en biopsias de pacientes con diagnóstico de enfermedad celíaca por PCR en tiempo real.

#### 3.4.1. *Expresión de MICA y MICB.*

## Resultados

- En primer lugar, los pacientes en general mostraron claramente un aumento de los niveles de expresión de MICA con respecto a los controles sanos (valor medio 4,96 vs 0,16,  $p < 0,001$ ).
- El nivel de expresión de MICA en el grupo de pacientes con enfermedad celíaca con daño leve de la mucosa estaba marcadamente aumentado comparado con los controles sanos (56 veces mayor; 9,04 vs 0,16,  $p < 0,0001$ ) (Figura 3.2).
- Cuando se analizaron los datos de los pacientes con daño de la mucosa leve, encontramos niveles medios de expresión de MICA notablemente más altos que en aquellos pacientes que presentaban daño severo en la biopsia (9,04 vs



0,34,  $p < 0,001$ ) (Figura 3.2).

- En relación con los niveles de expresión de MICB nos encontramos que el valor

medio en los pacientes con daño leve fue de 3,22, mientras que en las biopsias de los pacientes con daño severo fue de 0,14 ( $p < 0,001$ ) (Figura 3.2.B). Esto implica que el nivel de expresión de MICB es 27 veces superior en las muestras obtenidas de pacientes con lesiones de la mucosa en fase temprana.

- Encontramos también que la expresión de MICB era 46 veces mayor en pacientes con daño leve de la mucosa con respecto a los controles sanos (3,22 vs 0,07,  $p < 0,01$ ) (Figura 3.2.B).
- En los pacientes con daño severo era sólo 2 veces mayor que en controles sanos (0,14 vs 0,07,  $p = \text{NS}$ ) (Figura 3.2.B).

#### **3.4.2. Expresión de NKG2D.**

- En el caso del receptor NKG2D, el nivel medio de expresión en el grupo de pacientes con daño leve de la mucosa fue ligeramente menor que el de los pacientes con daño severo (0,17 vs 0,34,  $p = \text{NS}$ ) (Figura 3.2.C).
- El nivel medio de expresión de NKG2D fue marcadamente superior en los pacientes con daño grave de la mucosa intestinal que en controles sanos (0,34 vs. 0,003,  $p < 0,05$ ) (Figura 3.2).
- También fue claramente superior en los pacientes con daño leve de la mucosa intestinal (0,17 vs. 0,003,  $p < 0,05$ ) (Figura 3.2).
- Estos resultados podrían reflejar el mayor número de linfocitos infiltrantes de la mucosa en pacientes con EC que expresan NKG2D, pero no se pudo establecer ninguna relación con el nivel de daño.

#### **3.4.3. Expresión de Interleucina 15.**

Aunque se sabe que el nivel de secreción de la citocina IL-15 es muy baja en condiciones normales e incluso en condiciones patológicas, hemos sido capaces de medir los niveles de ARN mensajero por RT-PCR en biopsias de pacientes con enfermedad celíaca (Figura 3.2.D).

- Tanto el grupo con daño leve de la mucosa como el grupo con daño severo mostraron niveles medios de expresión similares con respecto a la IL-15.
- En el grupo de pacientes con daño leve los niveles resultaron significativamente

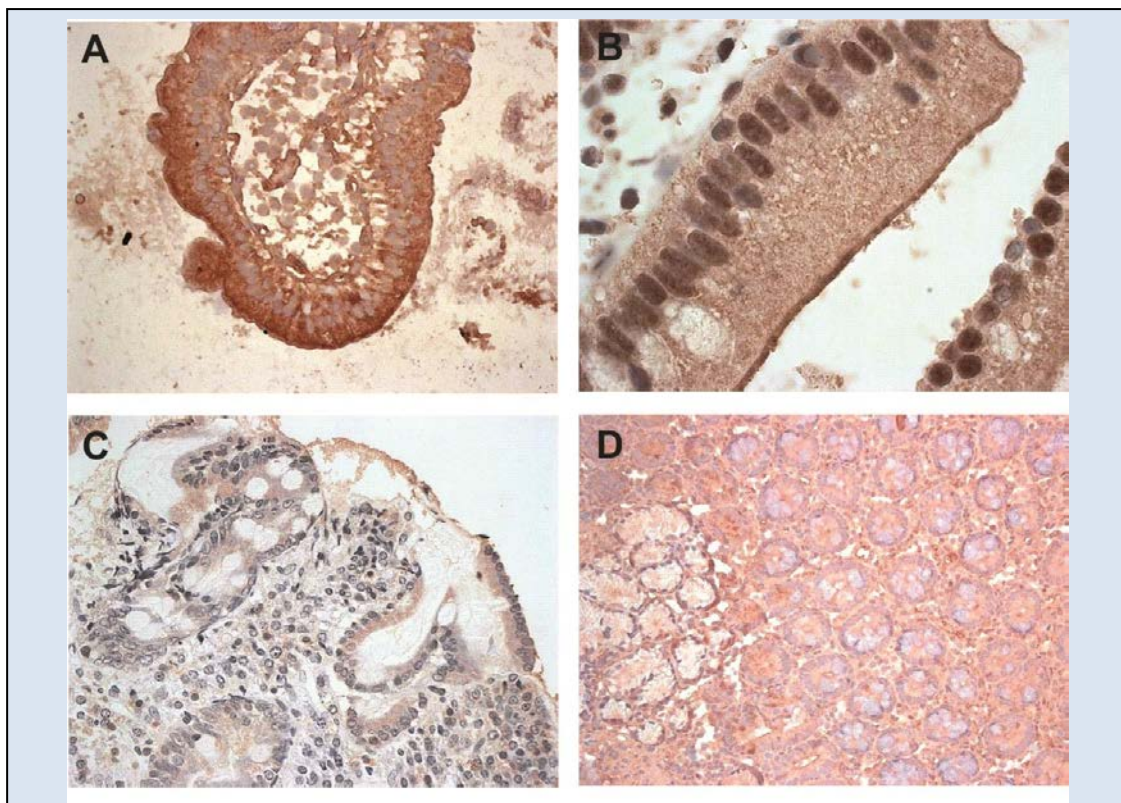
## Resultados

más elevados que los obtenidos al analizar las biopsias de los controles sanos (1,20 vs 0,07;  $p < 0,05$ ) (Figura 3.2.D).

- Lo mismo sucedió al analizar las biopsias de los pacientes con daño severo de la mucosa (1,19 vs. 0,07;  $p < 0.05$ ) (Figura 3.2.D).

### 3.5.EXPRESIÓN DE MICA POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA.

Después de analizar la expresión de estas moléculas a nivel de ARN mensajero, el siguiente paso fue identificar la proteína MICA en biopsias de pacientes con



**Figura 3.3.** Expresión de MICA en biopsias intestinales de pacientes con enfermedad celíaca. **A.** MICA tinción de alta intensidad en una vellosidad intestinal en un paciente con MMD. **B.** Detalle de un enterocito con expresión apical de MICA. **C.** Mucosa con daño severo. La tinción es claramente menos intensa que en los casos con MMD. **D.** Mucosa intestinal normal.

enfermedad celíaca. El estudio se llevó a cabo mediante el uso de técnicas de tinción por inmunohistoquímica de las muestras utilizando un anticuerpo policlonal anti-MICA desarrollado en nuestro laboratorio. Se realizaron las siguientes observaciones (Figura 3.3):

- En todos los pacientes se objetivó una tinción positiva epitelial, aunque no hubo diferencias notables en la intensidad y el patrón de tinción entre los dos grupos de muestras.
- Las biopsias de los pacientes con daño leve de la mucosa mostraron una intensa expresión de MICA que se localizó principalmente en los enterocitos, con distribución apical e intracelular.
- En las muestras del grupo de pacientes con daño grave de la mucosa intestinal, se observó que MICA presentaba una tinción menos intensa, distribuida principalmente en el citoplasma de los enterocitos.
- También se pudo observar un marcaje positivo en células mononucleares de la lámina propia, en ambos grupos de muestras.
- Las muestras estudiadas de controles sanos mostraron una tinción débil de MICA en el citoplasma de las células epiteliales.

Estos resultados son consistentes con el alto nivel de expresión de MICA demostrado por RT-PCR en las muestras de los pacientes con daño leve de la mucosa, y del mismo modo sugieren que la expresión de esta proteína puede estar implicada en el desarrollo de la enfermedad celíaca y especialmente relacionada con las fases iniciales de la lesión intestinal.

## 4. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-MICA EN LA ENFERMEDAD CELÍACA

### 4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

El daño en los tejidos y el aumento de la expresión en estos de determinadas proteínas puede ser un inductor del desarrollo de autoanticuerpos. Previamente hemos demostrado que MICA se sobre-expresa en la mucosa intestinal de los pacientes con enfermedad celíaca lo cual puede inducir también en estos casos el desarrollo de anticuerpos contra esta molécula. De hecho, autoanticuerpos frente a MICA se han descrito en el lupus eritematoso sistémico de inicio temprano [ref]. Además, como ya hemos comentado, los anticuerpos frente a esta proteína han sido implicados en el rechazo de órganos, tanto en el trasplante renal [19-21] como en el cardíaco [22, 23].

Para probar la hipótesis de que los cambios relacionados con la enfermedad en la mucosa intestinal pueden estar asociados con el desarrollo de anticuerpos contra MICA, nos propusimos, como siguiente objetivo de este estudio, analizar la presencia de estos anticuerpos en sueros obtenidos de pacientes con enfermedad celíaca activa. También consideramos la posibilidad de que estos anticuerpos jueguen un papel en el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes concomitantes, como la diabetes mellitus tipo 1, habitualmente asociadas con la enfermedad celíaca [24].

### 4.2. PACIENTES.

Para la realización de este estudio se seleccionó a un grupo de 383 pacientes con diagnóstico de enfermedad celíaca (241 mujeres, 142 hombres, con una edad media al diagnóstico  $22 \pm 21,96$  años). Para ello se contó con la colaboración de los Servicios de Gastroenterología y de Pediatría del Hospital Universitario Central de

Asturias y del Policlínico Sant'Orsola-Malpighi de Bolonia, y del Laboratorio de Inmunología de las Mucosas del Departamento de Pediatría e Inmunología de la Universidad de Valladolid. Todos los pacientes fueron reclutados entre los años 2002 y

	<b>Pacientes celíacos n = 383</b>	<b>Pacientes con EAI n = 428</b>	<b>Controles sanos n = 200</b>
Genero (mujeres/hombres)	241/142	280/148	112/88
Edad media ± DE	22 ± 21,76	39 ± 23,04	23 ± 18.74
Biopsia			
Marsh I	7 (1.8%)	-	-
Marsh II	32 (8.3%)	-	-
Marsh IIIa	63 (16.4%)	-	-
Marsh IIIb	70 (18.3%)	-	-
Marsh IIIc	211 (55.1%)	-	-
HLA-DQ2-positivos	338 (89,2%) <sup>b</sup>	182 (42%)	44 (22%)
HLA-DQ8-positivos	42 (11%)	152 (35%)	18 (9%)
HLA-DQ2 y DQ8-negativo	14 (3,6%)	136 (31,8%)	138 (69%)
Enfermedades autoinmunes	58 (15,1%)	428 (100%)	-
<sup>a</sup> p < 0000.1; OR = 24,19; IC 95% = 15,81 – 36,99.			

**Tabla 4.1.** Características clínicas y analíticas de los pacientes y los controles reclutados para el análisis de anticuerpos anti-MICA.

2012.

Además reunir las características clínicas necesarias para establecer el diagnóstico de enfermedad celíaca, en todos los pacientes se detectaron anticuerpos frente a la transglutaminasa tisular (tTG) y / o anticuerpos anti-endomisio (EMA). Todos ellos presentaron también un grado variable de daño de la mucosa intestinal (grados Marsh I a Marsh IIIc). Todos estos parámetros se establecieron antes de que los pacientes comenzasen una dieta sin gluten (DSG).



## Resultados

Una segunda muestra de suero se obtuvo de todos los pacientes después de al menos un año con dieta sin gluten. Esto se realizó con el fin de establecer el grado de cumplimiento del tratamiento y para evaluar el efecto de este sobre los títulos de

	<b>Pacientes celíacos</b> n = 58	<b>Pacientes no celíacos</b> n = 428
Diabetes tipo I	22 (37.9%)	106 (24.8%)
Tiroiditis autoinmune	9 (15.5%)	47 (11.0%)
Lupus eritematoso sistémico	7 (12.1%)	92 (21.5%)
Artritis reumatoide	6 (10.3%)	51 (11.9%)
Anemia perniciosa	3 (5.2%)	22 (5.1%)
Cirrosis biliar primaria	3 (5.2%)	17 (4.0%)
Artritis idiopática juvenil	1 (1.7%)	4 (1.0%)
Hepatitis autoinmune	3 (5.2%)	15 (3.5%)
Enfermedad de Crohn	2 (3.4%)	40 (9.3%)
Colitis ulcerosa	-	9 (2.1%)
Enfermedad mixta del tejido conectivo	1 (1.7%)	1 (0.2%)
Enfermedad de Addison	-	3 (0.7%)
Síndrome de Sjögren	1 (1.7%)	21 (4.9%)

**Tabla 4.2.** Diferentes enfermedades autoinmunes diagnosticadas en pacientes celíacos y en pacientes no celíacos.

anticuerpos anti-MICA.

Otro grupo de 428 pacientes afectados por otras enfermedades autoinmunes pero sin enfermedad celíaca, se seleccionó con el fin de establecer si la presencia de anticuerpos anti-MICA se relacionaba específicamente con la celíaca o si era otro marcador serológico de autoinmunidad. La composición de este grupo en relación con

las enfermedades autoinmunes representadas es similar a la del grupo de pacientes celíacos con una enfermedad autoinmune asociada (Tabla 4.2).

Por último, 200 individuos sanos emparejados por edad (23 años  $\pm$  18,74 años, 108 mujeres y 92 hombres) fueron seleccionados como grupo de control para las diversas comparaciones establecidas en este trabajo. Los individuos del grupo de control no presentaron antecedentes de intolerancia al gluten o derivados, deficiencia de hierro, anemia y alteraciones en los estudios bioquímicos y también fueron negativos para anticuerpos anti-transglutaminasa.

### 4.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

Las características clínicas de los pacientes se ilustran en la Tabla 4.1. Las diversas enfermedades autoinmunes detectadas en los pacientes celíacos se enumeran en la Tabla 4.2. Del análisis de estos datos se dedujo lo siguiente:

- El 73% de los pacientes con enfermedad celíaca seleccionados para este estudio presentaban daño severo de la mucosa intestinal (grados IIIb y IIIc de Marsh).
- El 96,4 % de los pacientes con enfermedad celíaca fueron positivos para al menos uno de los heterodímeros de susceptibilidad HLA-DQ2 y HLA-DQ8. HLA-DQ2 estaba presente en
- La distribución del heterodímero HLA-DQ2 entre los enfermos celíacos estaba notablemente incrementada con respecto a los enfermos con otras enfermedades autoinmunes ( $p < 0,0001$ ; OR=10,15; IC 95%=7,04-14,93) y con respecto a los controles sanos ( $p < 0,0001$ ; OR=24,19; IC 95%=15,81-36,99).
- La distribución del heterodímero HLA-DQ2 entre los enfermos con otras enfermedades autoinmunes estaba notablemente incrementada con respecto a los controles sanos ( $p < 0,0001$ ; OR=2,62; IC 95%=1,78-3,86).
- El 15,1% de los pacientes con enfermedad celíaca presentó otra

enfermedad autoinmune concomitante (Tabla 4.2).

- La patología autoinmune asociada con más frecuencia a celíaca en nuestro grupo de pacientes fue la diabetes mellitus tipo 1, que se encontró en el 5,7% de los pacientes celíacos (37,9% de los pacientes con enfermedad autoinmune asociada). El resto de las enfermedades se detallan en la tabla 4.2.

#### 4.4. LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA SON MÁS FRECUENTES EN LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA.

El siguiente objetivo de este trabajo fue analizar si la sobreexpresión de MICA en el epitelio de la mucosa intestinal descrita previamente, era capaz de inducir la generación de anticuerpos anti-MICA. Para ello, se realizó la determinación de éstos anticuerpos en el suero de pacientes diagnosticados de EC antes de comenzar el tratamiento y en sueros obtenidos de controles sanos. Una vez analizados los resultados, nos encontramos los siguientes datos:

##### ***4.4.1. La presencia de anticuerpos anti-MICA se asociaba claramente con la enfermedad celíaca.***

Se detectaron anticuerpos anti-MICA en 159 de los 383 pacientes con enfermedad celíaca estudiados (41,5%) en comparación con el 3,5% (7 de 200) de los controles sanos ( $p < 0,0001$ ; OR = 19,57; IC 95% = 8,96 – 42,74) (Tabla 4.3). La probabilidad de que un individuo con enfermedad celíaca desarrolle anticuerpos anti-MICA resultó ser 19 veces superior a la de los de controles sanos.

##### ***4.4.2. La presencia de anticuerpos anti-MICA es una característica típica de la enfermedad celíaca.***

Con el fin de establecer si los anticuerpos anti-MICA son un fenómeno asociado con otras enfermedades autoinmunes, se comparó la frecuencia en la que aparecían estos anticuerpos en los pacientes con enfermedad celíaca y en otro grupo de 428 pacientes diagnosticados con otra enfermedad autoinmune diferente (Tabla 4.2). Nuestros resultados demostraron que estos anticuerpos estaban claramente asociados a la enfermedad celíaca ya que sólo fueron detectados en 35 pacientes con otras enfermedades autoinmunes (41,5% vs 8,2%,  $p < 0,0001$ ; OR = 7,97; IC 95% = 5,38 – 11,90) (Tabla 4.3).

Anti-MICA	Pacientes con enfermedad celíaca n = 383	Pacientes con enfermedad autoinmune n = 428	Controles sanos n = 200
Positivos	159 (41.5%)	35 (8.2%) <sup>a</sup>	7 (3.5%) <sup>b</sup>
Negativos	224 (58.5%)	393 (91.8%)	193 (96.5%)
<sup>a</sup> $p < 0.0001$ ; OR = 7,97; IC 95% = 5,38 – 11,90.			
<sup>b</sup> $p < 0.0001$ ; OR = 19,57; IC 95% = 8,96 – 42,74.			

**Tabla 4.3.** Prevalencia de los anticuerpos anti-MICA en el grupo de pacientes con enfermedad celíaca, en el grupo con otra patología autoinmune y en los controles sanos. (IC: intervalo de confianza)

#### 4.4.3. Los anticuerpos anti-MICA están relacionados con el gluten de la dieta.

Se analizó un suero adicional obtenido de los pacientes con enfermedad celíaca tras un año completo con dieta sin gluten. Se comprobó que los anticuerpos anti-MICA ya no estaban presentes en el 75% de los pacientes celíacos. En este segundo suero se detectaron anticuerpos anti-tTG en diez pacientes (4,5%), de los cuales seis (60%) tenían también anticuerpos anti-MICA.

**4.4.4. La mayor parte de los anticuerpos anti-MICA detectados son específicos de MICA\*027.**

Se determinaron las especificidades de los anticuerpos anti-MICA utilizando el kit LABScreen® MICA Single Antigen, detectando como antígeno más frecuente MICA \* 027. Este alelo tiene una gran homología con MICA\* 008 y presenta como este el polimorfismo transmembrana MICA-A5.1 que, tal y como hemos demostrado previamente, está asociado a las formas atípicas de la enfermedad. El kit utilizado para la determinación no permite la detección del alelo MICA\*008.

**4.4.5. Los anticuerpos anti-MICA son auto-anticuerpos.**

En un grupo de 50 pacientes celíacos con anticuerpos se realizó además el tipaje de MICA mediante el kit LABType® SSO MICA. Se comprobó que en todos los casos estudiados los anticuerpos presentes reconocían antígenos propios del individuo, lo cual confirmaba que se trataba de auto-anticuerpos.

Del total de pacientes con anticuerpos anti-MICA positivos, 22 (13,8%) desarrollaron además anticuerpos frente a otros antígenos de MICA diferentes a los propios.

**4.5. LOS AUTO-ANTICUERPOS ANTI-MICA SE RELACIONAN CON LA EDAD AL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO.**

Una vez identificada la presencia de anticuerpos anti-MICA en los pacientes celíacos, y demostrada su asociación con la enfermedad así como su relación con el contenido de gluten en la dieta, procedimos a determinar si otros factores previamente relacionados con la enfermedad habían influido en la aparición de estos autoanticuerpos.

De este análisis se obtuvieron los siguientes resultados:

- En primer lugar, se analizó la influencia de la edad de los pacientes al momento del diagnóstico en el desarrollo de anticuerpos (Tabla 4.4). Claramente, los autoanticuerpos anti-MICA fueron más frecuentes a edades tempranas ya que se encontró que los individuos anti-MICA positivos tenían una edad media de 19,34 años, mientras que la media para los sujetos anti-MICA negativos fue de 24,93 años.

Grupos	Anti-MICA	n	Media	DE	Mediana	p
Todos	Negativo	508	24.93	20.988	22.00	-
	Positivo	172	19.34	21.302	10.00	< 0.001
Controles Sanos	Negativo	193	22.75	18.390	19.00	-
	Positivo	7	41.86	20.408	54.00	-
Pacientes con EC	Negativo	217	25.41	22.413	24.00	-
	Positivo	156	17.92	20.537	8.00	-
Pacientes con EAI	Negativo	98	28.16	22.223	23.00	-
	Positivo	9	26.44	25.991	12.00	-

**Tabla 4.4.** Distribución de los anticuerpos anti-MICA en los diferentes grupos de individuos seleccionados, en relación con la edad al diagnóstico.

- Además, la mediana de la edad fue menor en las sujetos positivos que en los negativos (10 vs. 22 años,  $p < 0,001$ ).
- La tendencia de los anticuerpos a aparecer a una edad más joven fue evidente tanto en todos los pacientes como en el grupo control (Tabla 4.4).
- No se encontró relación entre la presencia de anticuerpos anti-MICA y el género.
- No se encontró asociación entre los anticuerpos anti-MICA y el grado de Marsh de la lesión.

**4.6. EL RIESGO DE DESARROLLAR ENFERMEDADES AUTOINMUNES ADICIONALES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA ESTÁ ASOCIADO CON LA PRESENCIA DE AUTO-ANTICUERPOS ANTI-MICA.**

Seguidamente procedimos a estudiar si la presencia de auto-anticuerpos anti-MICA influía de alguna manera en el desarrollo de patología autoinmune adicional en los pacientes celíacos.

A partir del análisis de los datos obtenidos se dedujeron los siguientes resultados

	Sólo enfermedad celíaca n = 313	Celíaca con patología autoinmune n = 60
Anti-MICA positivo	110 (35,1%)	46 (76,7%)
Anti-MICA negativo	203 (64,9%)	14 (23,3%)

	p	OR	95% IC
Anti-MICA	< 0.0001	5,09	2,75 – 9,42
Anti-MICA <sup>a</sup>	< 0.0001	9,03	4,42 – 18,45

<sup>a</sup> Ajustado por la edad al diagnóstico.

**Tabla 4.5.** Riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune concomitante en pacientes con enfermedad celíaca en relación con la presencia de anticuerpos anti-MICA.

(Tabla 4.5):

- Los pacientes con enfermedad celíaca tuvieron una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes adicionales, especialmente diabetes mellitus tipo 1 (DM1).
- La prevalencia de patología autoinmune asociada a enfermedad celíaca fue relativamente alta en nuestra población, ya que se encontró que 60 pacientes

celíacos (16,1%) tenían además otra enfermedad autoinmune asociada (Tabla 4.1).

- Para identificar posibles factores de riesgo tales como la edad, el sexo, el índice de masa corporal, el grado de Marsh de la lesión intestinal y el tipaje HLA-DQ relacionados con la enfermedad celíaca y que podrían estar involucrados en el desarrollo de estas patologías, se realizó un análisis multivariante en el que se incluyeron todos estos factores. Este análisis demostró que el género, HLA-DQ y el grado de Marsh de la lesión de la mucosa no estaban asociados con el desarrollo de patología autoinmune adicional en estos pacientes.
- El grupo de pacientes que presentaban otra enfermedad autoinmune asociada tenían una edad media más alta que aquellos afectados solamente por la enfermedad celíaca (edad media,  $36 \pm 20,18$  vs  $18 \pm 20,33$  años,  $p < 0,001$ ).
- La mayoría de los pacientes celíacos con enfermedades autoinmunes concomitantes resultaron ser positivos para los auto-anticuerpos anti-MICA (46/60, 76,7%), mientras que sólo el 35,1% (110/313) de los pacientes afectados por EC presentaban estos anticuerpos (Tabla 4.5).
- Estos datos demostraron que el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes en los pacientes celíacos estaba claramente asociado con la presencia de auto-anticuerpos anti-MICA ( $p < 0,0001$ , OR = 5,09, IC 95% = 2,75 - 9,42).
- Cuando el análisis se ajustó por la edad al diagnóstico, el riesgo asociado con anti-MICA se incrementó notablemente ( $p < 0,0001$ , OR = 9,03, IC 95% = 4,42 - 18,45).

**4.7. EL RIESGO DE DESARROLLAR ENFERMEDADES AUTOINMUNES ADICIONALES RELACIONADO CON LA PRESENCIA DE AUTO-ANTICUERPOS ANTI-MICA ES MÁS IMPORTANTE EN PACIENTES PEDIÁTRICOS QUE EN ADULTOS.**

Como se mencionó anteriormente, la presencia de enfermedades autoinmunes concomitantes resultó ser más frecuente en los pacientes con EC diagnosticados a edad adulta, mientras que los anticuerpos anti-MICA fueron más frecuentes en pacientes diagnosticados a edad pediátrica. Por otra parte, dada la influencia bien



Grupos de edad	Enfermedad celíaca		Enfermedad celíaca con EAI	
	Pediátrico (n = 176)	Adultos (n = 137)	Pediátrico (n = 15)	Adultos (n = 45)
<b>Anti-MICA-positivos</b>	73 (41.5%)	27 (18%)	14 (93.3%)	32 (69.5%)
<b>Anti-MICA-negativos</b>	103 (58.5%)	110 (82%)	1 (6.7%)	13 (30.5%)

Anti-MICA	p	OR	95% CI
<b>Pediátrico</b>	< 0.01	15.69	2.019 - 121.881
<b>Adultos</b>	< 0.0001	7.97	3.790 - 16.766

**Tabla 4.6.** Riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes concomitantes asociado a la presencia de anticuerpos anti-MICA en pacientes pediátricos ( $\leq 14$  años) y en adultos ( $> 14$  años).

establecida de la edad de diagnóstico sobre el riesgo de desarrollar patología autoinmune asociada a causa de la presencia de anticuerpos anti-MICA, decidimos investigar como influían estos auto-anticuerpos en los pacientes diagnosticados a edad pediátrica y en adultos. Los resultados de dicho análisis fueron los siguientes (Tabla 24):

- Los autoanticuerpos anti-MICA estaban presentes en el 69,5% de los pacientes celíacos adultos con una enfermedad autoinmune adicional ( $p < 0,0001$ ).
- El riesgo de padecer una enfermedad autoinmune concomitante en adultos asociado a los anticuerpos anti-MICA fue de 7,97.
- Estos anticuerpos se detectaron en el 93,3% de los pacientes pediátricos con enfermedad celíaca diagnosticados con otra patología autoinmune asociada ( $p < 0,01$ ).

- El riesgo relacionado con la presencia de anticuerpos anti-MICA de padecer patología autoinmune adicional en niños fue de 15,69, notablemente más alto que en los pacientes adultos.



## DISCUSIÓN

## *Discusión*

Aunque la asociación de la enfermedad celíaca con la expresión del heterodímero DQ $\alpha$ 1\*05:01/05 DQ $\beta$ 1\*02:01/02 no puede ser puesta en duda, su elevada frecuencia en la población normal nos hace pensar en la existencia de factores adicionales implicados en el desarrollo la enfermedad. Se han barajado numerosas hipótesis sobre la influencia del medio ambiente; dieta, infecciones, duración de la lactancia materna, han sido algunos de los factores que se han analizado sin que en realidad se pueda afirmar hoy en día que alguno de ellos influye de manera determinante en el desarrollo de la enfermedad. Tal vez la única aportación clara de todos estos estudios, es el haber llegado a conocer que la introducción precoz del gluten en la dieta acelera la aparición de la enfermedad, e incluso parece aumentar su incidencia, mientras que la prolongación de la lactancia materna parece retrasarla<sup>35</sup>. Sin embargo la aparición de formas tardías de la enfermedad descarta este hecho como causa primaria de la celíaca y lo relega a un factor adicional de cierta importancia pero no absolutamente necesario. El enfrentamiento precoz al gluten de un sistema inmune inmaduro y genéticamente predispuesto, podría explicar de algún modo la aparición de la enfermedad antes del primer año de vida.

Esta pues bastante claro que la intolerancia al gluten es una patología condicionada genéticamente, aunque cabe suponer que no sólo DQ2, o en su defecto DQ8, están implicados en el desencadenamiento de la enfermedad. Otros genes localizados en el MHC podrían contribuir también a la susceptibilidad a esta enfermedad. Se han realizado numerosos trabajos con el fin de localizar esos genes adicionales, sin que hasta ahora los resultados permitan establecer conclusiones claras. Se ha querido implicar a algunos alelos de HLA-DPB1, pero en la totalidad de los casos estas asociaciones son explicables por el desequilibrio de ligamiento existente entre esos alelos implicados y HLA-DQ2. Otros genes de la zona, sobre todo los relacionados con el procesamiento de antígenos como TAP-1 y TAP-2, tapasina, HLA-DM, también ha sido estudiados, sin encontrar alguna asociación significativa con el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, si ha habido algunos estudios que han aportado alguna luz a este problema. Varios de estos estudios relacionan la presencia del genotipo DR5/DR7 en individuos DQ2 con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que aquellos que son

## *Discusión*

portadores de genotipos DR3/DRX, siempre y cuando X sea distinto de DR7 y DR3<sup>32</sup>. Estos mismos estudios parecen confirmar que el riesgo de padecer enfermedad celíaca es también mayor en presencia del genotipo DR3/DR7 que en portadores de DR3/DR3. Algunos autores han sugerido la posibilidad de que exista un gen de susceptibilidad adicional a DQ2 que forme parte del haplotipo DR7/DQ2, aunque también se ha apuntado que la existencia de un gen en el haplotipo DR3/DQ2 que posea algún alelo con una cierta capacidad protectora, podría tener el mismo efecto<sup>36</sup>.

Partiendo de estos trabajos anteriores, planeamos la realización de un estudio en el que decidimos plantearnos una nueva premisa: ¿Qué sucede en realidad con aquellas personas que presentan formas leves de la enfermedad? ¿Tienen diferencias genéticas con los enfermos con formas clásicas o más severas de la enfermedad? ¿Son portadores de algún gen con un cierto efecto protector?

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos afirmar que en ambos grupos el heterodímero codificado por los genes DQA1\*05:01/05 y DQB1\*02:01/02 se encuentra asociado con igual fuerza, descartando que sea la presencia o la ausencia de DQ2 la responsable de las diferencias clínicas existentes. En todos ellos se produciría la presentación de péptidos derivados del gluten por parte de DQ2 a linfocitos CD4+ en la lámina propia del ID, desencadenando la liberación de citocinas capaces de producir el daño en la mucosa.

Es interesante resaltar que siendo esta la base patogénica de la enfermedad, es posible que diferencias en los niveles de secreción de estas citocinas entre ambos grupos estén relacionados con la gravedad del cuadro clínico, planteamiento que ampliaremos más adelante.

Los genes DQA1\*05:01/05 y DQB1\*02:01/02 codifican como ya habíamos visto para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del heterodímero asociado a la enfermedad celíaca. Estos genes pueden formar parte del haplotipo DR3/DQ2, heredándose en este caso en “cis”, es decir en el mismo cromosoma. Existe también la posibilidad de que se hereden en distintos cromosomas (en “trans”) dentro de los haplotipos DR7/DQ2 y DR5/DQ7 (DQA1\*05:05, DQB1\*02:02). El resultado en ambos casos es el mismo, la formación de un heterodímero DQ2 asociado de igual manera a la enfermedad.

Como ya habíamos comentado, algunos trabajos sugieren que el genotipo que codifica el heterodímero en “trans” (DR5/DR7) parece estar asociado a una mayor incidencia de la enfermedad. Con el fin de confirmar o desmentir esta posible asociación, analizamos su presencia en el conjunto de los pacientes y de los controles, encontrando que su frecuencia estaba significativamente incrementada en los primeros. Estos pacientes sin embargo, son minoritarios si los comparamos con aquellos en los que el heterodímero está codificado en “cis”.

Cuando procedimos a comparar ambos grupos de enfermos comprobamos una clara tendencia de este genotipo a presentarse en los pacientes con formas clásicas de la enfermedad, sin alcanzar significación estadística, posiblemente a causa del limitado tamaño de la muestra. Esto podría inducir a pensar que este genotipo es marcador de este grupo de pacientes. Descartando de antemano que cualquiera de estas dos moléculas HLA-DR confiera mayor susceptibilidad a padecer formas más graves de la enfermedad, nos planteamos la posibilidad ya apuntada por otros autores, de que en los haplotipos DR7/DQ2 o DR5/DQ7 exista algún gen adicional que si esté asociado a celíaca, ya que esto explicaría la clara tendencia existente. El análisis de los datos revela que DR5/DQ7 aparece con la misma frecuencia en ambos grupos de pacientes, por lo que podemos descartar este haplotipo. Sin embargo, al observar la distribución de DR7/DQ2 nos encontramos con que existen diferencias notables entre ambos grupos, sin que lleguen a alcanzar grado de significación estadística (tabla 3 de resultados). Podemos pensar que esto apoya la hipótesis que sugiere la existencia de un gen que forma parte de este haplotipo, y que condiciona una susceptibilidad adicional a DQ2. Si extendemos el haplotipo hacia la región de clase I no encontramos ninguna asociación clara con ningún alelo de los genes estudiados, con la salvedad de que en la mayoría de los casos el alelo del promotor del gen TNFA asociado era G (datos no mostrados). Esto nos sugiere que, en el caso de que exista este gen adicional, deberíamos situarlo en la región comprendida entre TNFA y HLA-DQ descartando en principio la posibilidad apuntada por algunos autores de que este se encuentre entre TNFA y HLA-B<sup>33</sup>. La resolución de este problema se plantea como objetivo para futuros trabajos.



## Discusión

Los resultados comentados anteriormente parecen apuntar la presencia de un gen adicional a DQ2 dentro del haplotipo DR7/DQ2, que confiere mayor susceptibilidad a las formas graves de la enfermedad. Sin embargo algunos autores apuntan la posibilidad de que exista un alelo que de algún modo proteja de la enfermedad dentro del haplotipo DR3DQ2<sup>36</sup>. Para probar esta hipótesis comparamos la frecuencia de este haplotipo en ambos grupos de enfermos, comprobando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, aunque nos encontramos un ligero incremento dentro del grupo de pacientes con formas leves. Sin embargo, si extendemos el haplotipo hasta HLA de clase I, nos encontramos que las diferencias existentes entre la frecuencia del haplotipo B8-DR3-DQ2, conocido como 8.1 AH, y clásicamente asociado a enfermedades autoinmunes, en enfermos con formas leves y celíacos clásicos, aumentan hasta alcanzar significación estadística. Este haplotipo está aumentado también en enfermos clásicos si lo comparamos con los controles sanos, debido al desequilibrio de ligamiento existente entre HLA-DR3 y HLA-B8. Esto no permite desligarlo de la enfermedad celíaca, pero las diferencias existentes entre los dos grupos sugieren la presencia de un factor o factores adicionales en este haplotipo incapaz de impedir el desarrollo de la enfermedad, pero que de algún modo, hace que la frecuencia de formas graves entre los pacientes portadores sea considerablemente menor que entre los que no lo poseen.

La considerable cantidad de enfermedades autoinmunes asociadas al haplotipo 8.1 han motivado la existencia de numerosos estudios que han intentado explicar el porqué de esta asociación. Su elevada frecuencia en centroeuropa donde hasta un 10% de la población conserva todos los alelos comprendidos entre HLA-B8 y HLA-DQ2 sugiere la existencia de un ancestro común. Como se puede apreciar en las tablas correspondientes en el capítulo de resultados, en los controles analizados en este estudio encontramos también una notable frecuencia de este segmento del haplotipo.

Sin embargo, la mayor parte de los trabajos realizados sobre este haplotipo, son estudios de genética de poblaciones, habiendo pocos relacionados con las implicaciones funcionales de este. Entre estos trabajos se encuentran algunos que demuestran una disminución de la respuesta proliferativa de las células T “in vitro” a mitógenos<sup>37</sup>, interesante de cara a nuestro trabajo, ya que podría reflejar una

inhibición semejante “in vivo”. Una disminución de la capacidad proliferativa de células T, podría implicar que el incremento de IELs típico de la enfermedad celíaca, sea menor en portadores del 8.1 AH. La posible implicación patogénica de este fenómeno, caso de que sea real, entra dentro de los planes para una futura ampliación de este trabajo.

Otra característica definitoria de la funcionalidad de este haplotipo está relacionada con una producción alterada de ciertas citocinas<sup>38</sup>. Abraham et al demostraron en 1993 incrementos en la producción de TNF- $\alpha$  en líneas celulares portadoras del 8.1 AH, que podrían traducirse “in vivo” en incrementos de los niveles de esta citocina con elevada actividad proinflamatoria. Paralelamente, algunos trabajos han pretendido demostrar la existencia de una asociación entre este gen y la enfermedad celíaca que es independiente de DQ2. Como pequeño aporte de cara a descubrir la veracidad de este planteamiento, decidimos realizar el genotipaje de uno de los numerosos polimorfismos del promotor del gen TNFA. El polimorfismo -308 analizado en nuestro estudio tiene como particularidad que uno de sus alelos está asociado a notables incrementos en la producción de esta citocina. Concretamente se sabe que los portadores del genotipo AA presentan una producción de TNF- $\alpha$  10 veces superior al de los que presentan el genotipo GG. Se ha demostrado que los individuos homocigotos presentan también aumento de la producción. Como ya apuntamos en la introducción de este trabajo, la producción de esta citocina está incrementada en la lámina propia de la mucosa del ID de estos enfermos, por lo que la posibilidad de que existiesen diferencias genéticas entre los dos grupos a estudio resultaba muy interesante. Sin embargo, los resultados de nuestro trabajo, aunque muestran una clara asociación de este polimorfismo con la enfermedad, demuestran también que el alelo A forma parte del haplotipo 8.1 AH, estando ausente en los enfermos no portadores de este, lo que sugiere, como ya habían apuntado otros autores, que esta asociación no es independiente de DQ2. Además podemos también descartar que las formas clínicas más graves de la enfermedad se deban a un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  mediado por este polimorfismo, ya que su frecuencia es incluso mayor en aquellos enfermos con formas clínicas leves, debido al mayor número de portadores del haplotipo en cuestión. No podemos, sin embargo, dejar de lado la posibilidad de

## Discusión

que existan otros polimorfismos en este promotor capaces también de inducir niveles altos de TNF- $\alpha$ , que si estén relacionados con las formas clásicas de la enfermedad celíaca.

Pero de cara a explicar, de alguna manera, el posible efecto protector del 8.1 AH en los pacientes con formas leves de intolerancia al gluten, resulta muy interesante la notoria tendencia de los individuos portadores a producir una respuesta disminuida de IL-2, incluyendo una disminución de la expresión del receptor de esta citocina, y sobre todo de IFN- $\gamma$ <sup>38</sup>. Si consideramos, como ya habíamos apuntado en varias ocasiones, que el notable incremento de los niveles de IFN- $\gamma$  en la lámina propia del ID de estos enfermos, es el eje central en torno al cual gira la patogenia de la celíaca, resulta obvio que los efectos del 8.1 AH sobre la producción de esta citocina estarían en consonancia con la presencia de un mayor número de portadores de este haplotipo entre los pacientes con formas leves de la enfermedad.

Otros fenómenos adicionales relacionados con el 8.1 AH que podrían influir sobre la gravedad de la enfermedad celíaca se resumen en la tabla 1.

<b>Función inmunológica</b>	<b>Efecto del 8.1 AH</b>
Función de los macrófagos	Disminuida
Producción de anticuerpos	Disminuida
Actividad NK y de células LAK	Disminuida

*Tabla 1.*

En la introducción de este trabajo comentamos de una manera más extensa que en el caso de otras moléculas HLA de clase I “no clásicas”, las especiales características de la familia MIC. Desde que en 1998 Veronika Groh y Thomas Spies demostraron que MICA y MICB eran el ligando de los linfocitos T $\gamma\delta$  que expresaban la cadena variable del TCR V $\delta$ 1 en el epitelio del intestino. Más adelante se describió que actuaban además como ligandos del receptor NKG2D, que se expresa de forma constitutiva en

células NK y en linfocitos T CD8+. Estas moléculas se han convertido pues en firmes candidatas a estar implicadas en la patogénia de la enfermedad celíaca. Además de su particular patrón de expresión tisular, sus peculiaridades estructurales y la anómala distribución del polimorfismo en la molécula, el hecho de que su expresión aumente considerablemente en las situaciones de estrés celular, nos da una idea de cuáles pueden ser algunas de sus funciones. En el trabajo mencionado anteriormente, los autores demuestran la capacidad que tienen los linfocitos  $T\gamma\delta$  de lisar células reconociendo selectivamente MICA y/o MICB<sup>11</sup>. Esta capacidad de reconocer antígenos propios en situaciones muy particulares, casa muy bien con la idea que se tiene de estas células como centinelas capaces de destruir de una manera inespecífica pero selectiva, células infectadas por patógenos, que han sufrido transformación neoplásica o que simplemente han sido blanco de algún tipo de agresión que las induce a “hiperexpresar” en su membrana estas proteínas.

En el caso particular de la enfermedad celíaca es bien sabido que las poblaciones de linfocitos  $T\alpha\beta$  CD8+ y  $T\gamma\delta$  se encuentran expandidas en el epitelio de la mucosa del intestino delgado. Este hecho y la particular capacidad que tienen los enterocitos de expresar estas moléculas, sugiere que por mecanismos que poco a poco van siendo conocidos y que pueden muy bien estar mediados por citocinas como la IL15, podría producirse una situación de estrés en estas células que implicaría el aumento de la expresión en su membrana de MICA y MICB. Esto las convertiría en blanco de las abundantes células T CD8+ y tal vez de las  $\gamma\delta$  presentes, y provocaría la paulatina destrucción del epitelio. Es posible que este sea un mecanismo patogénico adicional al ya comentado y que depende de los linfocitos T CD4+ presentes en la lámina propia. Incluso, y como veremos más adelante, podría ser el fenómeno inicial de lesión de la mucosa.

Como también habíamos comentado anteriormente, el gen MICA presenta en la región codificante del dominio transmembrana (exón 5) un microsatelite consistente en repeticiones del triplete GCT. El análisis de estos alelos en enfermedades clásicamente ligadas a HLA de clase I ha encontrado claras asociaciones con algunos de ellos, lo que sugiere una posible implicación de MICA en la patogenia de estas patologías. Nuestro grupo por ejemplo ha descrito la asociación del alelo A9 de MICA

## *Discusión*

con la artritis psoriática, enfermedad claramente ligada a HLA de clase I. Por ello nos planteamos la posibilidad de que alguno de estos alelos estuviese también asociado a la celíaca. Sabíamos de antemano que el alelo A5.1, que posiblemente exprese una forma truncada o soluble de la proteína, formaba parte del haplotipo 8.1 AH, lo que lo convertía en una opción interesante como factor candidato en el estudio que nos habíamos planteado. Genotipamos con las técnicas descritas anteriormente un grupo de controles y dos de enfermos y, como era de esperar, MICA A5.1 resultó estar incrementado en ambos grupos de pacientes, pero especialmente entre los que presentaban formas leves de la enfermedad. La diferencia resultó ser estadísticamente significativa lo que apoyaba la asociación del haplotipo 8.1 a este grupo. Sin embargo, MICA 5.1 aparecía también en 7 de los 11 enfermos con formas leves de celíaca no portadores del haplotipo 8.1 AH.

Es posible que, en vista de los datos aportados, MICA A5.1 disminuya de alguna forma el riesgo de desarrollar formas más graves de la enfermedad, y sea al menos uno de esos posibles factores que parecen localizarse dentro del haplotipo 8.1. Una posible explicación de esta hipótesis la encontraríamos si nos planteamos que A5.1 codifica para una molécula MICA truncada y posiblemente soluble. Es conocida desde hace tiempo la existencia de otras moléculas de clase I solubles capaces de interactuar con el TCR de linfocitos T, cuya función, no del todo clara, parece ser la de inducir un estado de anérgia en estas células. En base a esto podemos plantearnos la posibilidad de que la proteína codificada por MICA A5.1 sea pues soluble, capaz de interactuar con NKG2D o con el TCR de las células  $\gamma\delta$  y de inducirles un estado de inactivación, o que simplemente se limite a bloquear receptores impidiendo la adecuada interacción entre estos linfocitos y las células sometidas a estrés. Si tal y como ya hemos apuntado previamente, la activación de los LIE CD8+ es independiente del TCR y se produce por otros mecanismos como la interacción de MIC y NKG2D, es posible que este mecanismo impida o al menos reduzca la destrucción de enterocitos en estos casos más leves, aunque está claro que la presencia de este alelo no impide, en otros muchos casos, el desarrollo de formas graves de la enfermedad.

Otra posible explicación de por qué este alelo podría favorecer el desarrollo de formas leves de la enfermedad podríamos encontrarla si suponemos que, como

sucede con otras moléculas HLA, la capacidad de MICA de activar linfocitos es dependiente de los niveles de expresión de esta proteína en la membrana celular. En el caso de los individuos portadores del alelo A5.1, es posible que la proteína que codifica sea incapaz de anclarse en la membrana, disminuyendo el número de moléculas capaces de ser reconocidas por el linfocito, especialmente si el individuo es homocigoto, lo que redundaría en una menor capacidad de activación de linfocitos T CD8+ y por lo tanto la destrucción de estas células.

Aunque está claramente establecido que la enfermedad celíaca está fuertemente asociada con el heterodímero DQ2.5 (DQA1\*05:01/05, DQB1\*02:01/02), este aparece en menos 90% de los pacientes celíacos. El papel de esta molécula en el desarrollo de la enfermedad es bien conocido, ya que la hendidura de unión de DQ2.5 es capaz de presentar de forma muy selectiva péptidos deamidados derivados de la gliadina a las células T CD4 + en la mucosa intestinal de los pacientes afectados. Más de un 10% de los pacientes celíacos son negativos para el heterodímero susceptibilidad DQ2.5. Existen numerosos estudios que han asociado otros heterodímeros HLA-DQ que, en mayor o en menor medida, están asociados con incremento en la susceptibilidad para la enfermedad en estos pacientes. La más relevante de dichas asociaciones es la de HLA-DQ8 (DQA1\*03, DQB1\*03:02). Más recientemente se han descrito asociaciones con los heterodímeros DQ2.2 (DQA1\*02:01, DQB1\*02:02) (Sollid y Lie 2005) y en menor medida con DQ7.5 (DQA1\*05, DQB1\*03:01) (Karell et al., 2003). Es importante resaltar que DQ2.5 comparte la  $\beta$ -cadena con DQ2.2 (con excepción de una diferencia de un residuo en la posición 135 en el dominio próximo a la membrana) y la  $\alpha$ -cadena con DQ7.5. Estas moléculas de HLA-DQ predispondrían a la enfermedad celíaca ya que serían capaces de presentar péptidos de gluten a las células T CD4+ del mismo modo que HLA-DQ2.5 y DQ8 (Sollid et al. 2014).

Tal y como ya hemos descrito existe una asociación entre el polimorfismo MICA-A5.1 y las formas atípicas de la enfermedad celíaca. Como ya hemos dicho, estos pacientes se caracterizan por la ausencia o la presencia de síntomas digestivos mínimos. Estos resultados sugieren que este gen puede modular el desarrollo de diversas formas clínicas de la enfermedad.

## Discusión

Con el fin de establecer si los resultados que habíamos obtenido eran independientes de HLA-DQ, decidimos replicar el estudio en un grupo de pacientes celíacos de la población española negativos para el heterodímero DQ2.5. De conformidad con las descripciones anteriores, la expresión casi exclusiva de MICA en el epitelio gastrointestinal puede funcionar como un ligando reconocido por un subconjunto de  $T\delta 1\gamma\delta$  células en el compartimiento de linfocitos intraepiteliales intestinales. De hecho, la expansión intraepitelial de células  $T\gamma\delta$  es un rasgo característico de la enfermedad celíaca. El alelo MICA-A5.1 lleva una inserción de un nucleótido que resulta en un codón de parada prematuro, que puede codificar una forma secretada de la molécula MICA. La forma MICA-A5.1 soluble puede proteger al inhibir el reconocimiento del tejido intestinal por t [a]. Esto b c

podría ser particularmente importante en pacientes HLA-DQ2 positivos, en el que hemos encontrado que MICA-A5.1 se asoció con formas atípicas de CD, y puede posiblemente explicar el mayor riesgo de DR3/DR7 en comparación con DR3/DR3, que llevan el MICA-A5.1 alelo en forma homocigótica. Una influencia modificadora por el gen MICA podría ser un mecanismo general que puede estar relacionada con otras enfermedades autoinmunes. De hecho, la enfermedad celíaca atípica se asocia frecuentemente con otras enfermedades autoinmunes tales como la dermatitis herpetiforme, diabetes mellitus tipo 1 y la enfermedad tiroidea autoinmune. Es notable que en la enfermedad de Addison APS-II, la combinación de alelo MICA-A5.1 y de alto riesgo haplotipos de clase II se asocian con un mayor riesgo genético (Gambelunghe et al. 1999).

En conclusión MICA-A5.1 podría ser de protección o puede modular la expresión fenotípica de CD tanto en los pacientes de CD-DQ2 positivos y negativos. El papel funcional de MICA en la patogénesis de CD Queda por aclarar.

Es bien sabido que la presentación clínica de la enteropatía sensible al gluten es muy variable, y esta variabilidad puede atribuirse a diversos factores, incluidos los genéticos y ambientales (10). El objetivo de este estudio fue investigar la implicación de la región del MHC en la susceptibilidad a la CD y en el desarrollo de formas típicas y atípicas de la enfermedad en una población occidental subsahariana. Los datos obtenidos en nuestro estudio demuestran la importante función que la genética juega

en el aumento del riesgo de EC en esta población. Esto podría estar relacionado con el aumento de la frecuencia del heterodímero HLA-DQ2 en saharai. Como se mencionó anteriormente, este heterodímero se realizó en un 41% de los controles sanos saharai, una frecuencia notablemente mayor que en otras poblaciones estudiadas.

Además de los factores genéticos, los ambientales pueden jugar un papel importante en el desarrollo del CD en esta población. Uno de estos factores pueden ser la alta prevalencia de infecciones parasitarias, como la amibiasis y giardiasis. Nuestro grupo encontró que casi el 10-15% de la población saharai se ve afectada por estos patógenos (datos no publicados). Otros estudios realizados en diversas poblaciones sugieren que algunos factores ambientales que podrían aumentar la susceptibilidad a la CD son la corta duración de la lactancia materna y la pronta inclusión de gluten en la dieta de los niños (19, 20, 21). Por el contrario nuestras observaciones en saharai sugieren que a pesar de la introducción temprana del gluten en la alimentación de niños saharais puede ser un factor de riesgo importante (5), la considerable prolongación de la lactancia materna no es de conformidad con la muy elevada prevalencia de la EC en esta población (datos no mostrados).

Nuestro análisis de HLA ha confirmado la asociación entre el HLA-DQ2 heterodímero y CD, resultado que concuerda con los datos reportados previamente en la población saharai. Por otra parte, el heterodímero HLA-DQ8, informó como otro factor de susceptibilidad en CD fue claramente mayor en los pacientes, pero las diferencias no fueron significativas, posiblemente debido al tamaño de la muestra. Como se informó anteriormente, no se encontraron diferencias entre los grupos, cuando se comparó la distribución de los heterodímeros susceptibilidad HLA-DQ. Estos resultados indican que las diferentes manifestaciones de CD no son modulados directamente por HLA-DQ2 o DQ8 heterodímeros, y puede ser debido a otros mecanismos diferentes a los que están directamente relacionados con el CD. Por lo tanto, los diferentes haplotipos portadores del heterodímero HLA-DQ2 (DQA1\*05:01/05 y DQB1\*02:01/02) tienen un efecto distinto sobre la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Nuestros resultados sugieren que, además de los HLA-DQ2 y DQ8 heterodímeros, otro gen posible presentes en clase I lado de la HLA-DQ2/DR3/B8 haplotipo puede modular la enfermedad, condicionando así el desarrollo



## Discusión

de una progresión lenta y menos agresiva formas de CD, es decir, las denominadas formas atípicas (Figura 1).

El gen MICA se encuentra cerca de HLA-B, y se expresa principalmente en las células intestinales (22) y puede estar relacionado con la patogénesis de la CD. Nuestros estudios previos en pacientes con EC españolas han demostrado que el polimorfismo MICA-A5.1 transmembrana se asocia con el riesgo para CD atípica y su asociación no es el resultado del desequilibrio de ligamiento con el HLA-DQ2 y HLA-B8 (8). El hallazgo de resultados muy similares en una población con un fondo genético diferente parece confirmar el papel de mica (o de otro gen cerca de este) en la modulación de CD.

Como antes mencionado, CD atípica se asocia frecuentemente con otras enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado recientemente que un gen no identificado en la clase I región modifica el riesgo de desarrollar la diabetes tanto de tipo I y la enfermedad celíaca (10). Es de destacar que en la diabetes mellitus tipo I el alelo MICA-A5.1 también se asocia con la latente o formas menos agresivas de esta enfermedad (23). Por otra parte, esta forma de DMID es claramente predominante en los adultos y también está infradiagnosticada. Teniendo en cuenta estas observaciones, es posible plantear la hipótesis de que el factor genético determinar DMID latente y la enfermedad celíaca oligosintomáticas o extradigestiva están cerca de MICA-A5.1 en desequilibrio de ligamiento con DR3/DQ2, y que esta combinación puede desempeñar un papel en la modulación de la sintomatología de ambas enfermedades. Además, otras enfermedades autoinmunes con afectación intestinal se han relacionado con los alelos MICA. Un estudio reciente ha informado de que las formas sin afectación intestinal de la enfermedad de Bechet juvenil también se asocian con MICA-A5.1 alelo (24), y que esto también está aumentado en las formas distales o menos agresivo de la colitis ulcerosa (25).

Estudios anteriores han sugerido que la molécula de MICA expresado en el epitelio gastrointestinal puede funcionar como un ligando reconocido por un subconjunto de células T CD8 + y T  $\delta 1$   $\gamma \delta$  células en los linfocitos intraepiteliales intestinales (IEL) compartimento (26). Otros estudios han proporcionado un apoyo directo a un papel funcional del receptor NKG2D de MICA reconocimiento por T CD8

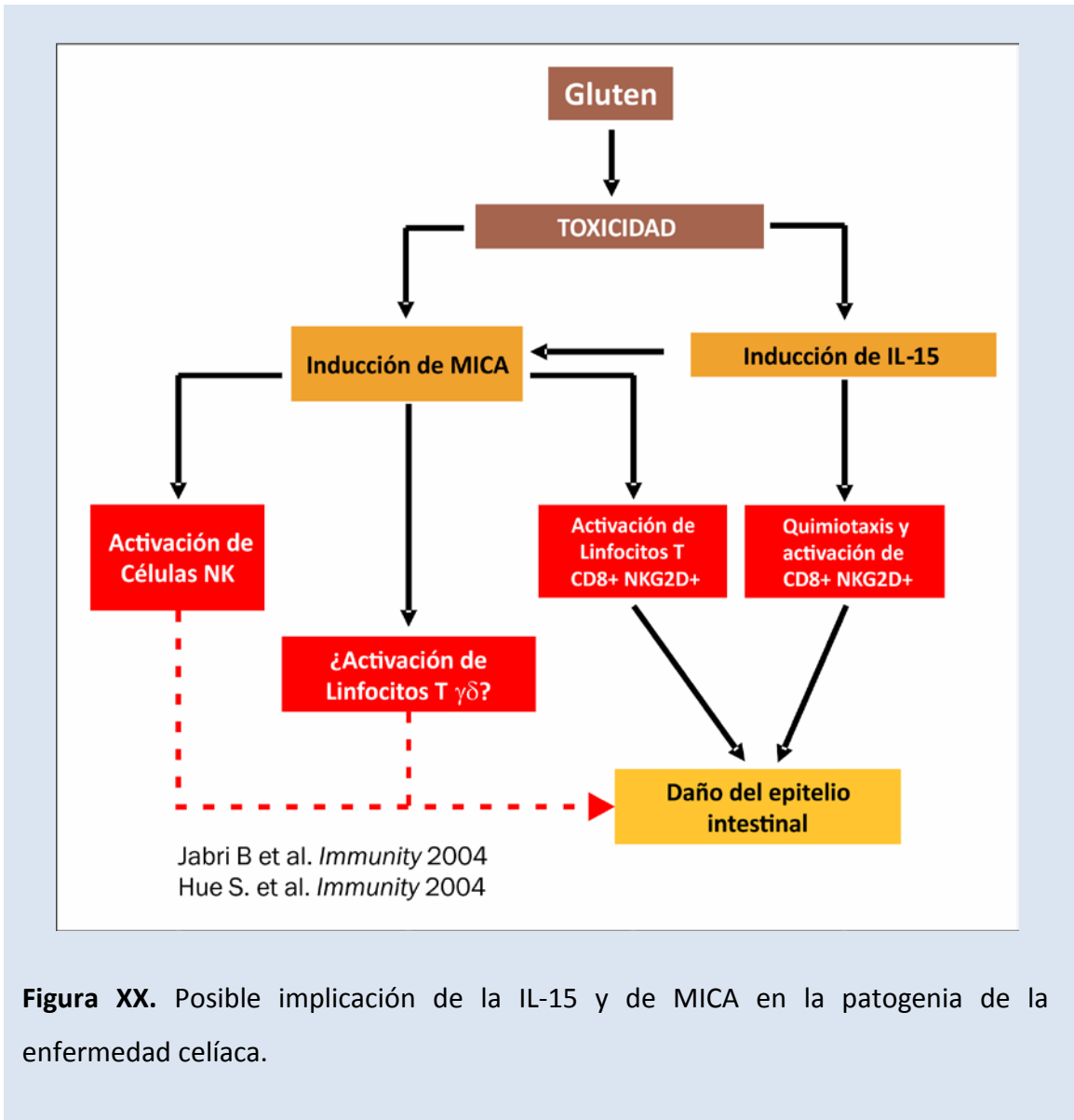


El patrón de expresión tisular MICA y la distribución de estas células podría correlacionar con las etapas iniciales de CD. De hecho, la contratación intraepitelial de  $T\gamma\delta$  células CD8 + y es un rasgo característico de estas etapas de CD (10). Hemos observado en nuestros estudios actuales una alta expresión de la molécula de MICA en algunas biopsias de pacientes con EC, especialmente en aquellos con menos daño estructural de la mucosa (datos no publicados).

Un estudio reciente sugiere que el alelo MICA-A5.1 podría codificar una forma alterada de la proteína MICA sin la cola intracitoplasmática de lo que podría ser expresada en la zona apical de los enterocitos, mientras que los otros alelos MICA TM podrían expresarse principalmente en baso-lateral región (27). Este patrón de expresión en particular puede afectar a la interacción con IEL y esto puede proporcionar un efecto protector en el epitelio intestinal, que podría explicar la ausencia de manifestaciones intestinales en pacientes atípicos. Otros autores se refieren a la posibilidad de que el alelo A5.1 puede codificar para una forma secretada de la molécula MICA (28). Estudios recientes han demostrado que algunas formas solubles de mica están implicados en la evasión inmune de los tumores mediante el bloqueo el reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos NK (29). Este mecanismo también puede proteger contra el desarrollo de los síntomas intestinales, mediante el bloqueo o la inhibición de reconocimiento enterocito y la destrucción por IELs activados en pacientes atípicos. A pesar de que MICA puede no ser un gen de susceptibilidad para el CD, estos resultados apoyan el posible papel de esta molécula en la patogénesis de CD y proporcionan una base para la investigación adicional en la posibilidad de que la expresión inducida de diferentes alelos podría afectar el desarrollo de diversas formas de esta enfermedad.

**EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NKG2D EN LA ENFERMEDAD CELÍACA**

Una vez establecido desde el punto de vista genético la asociación existente entre MICA y MICB y el desarrollo de diversas formas clínicas de la enfermedad, decidimos



**Figura XX.** Posible implicación de la IL-15 y de MICA en la patogenia de la enfermedad celíaca.

investigar cuales podrían ser algunos de los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la interacción de NKG2D y sus ligandos. Previamente se ha descrito que en la enfermedad celiaca los linfocitos intraepiteliales intestinales (LIE) expresan altos niveles de NKG2D y se expanden masivamente tras la exposición a la IL-15 en el compartimiento epitelial. La interleucina 15 se sobreexpresa en la mucosa de pacientes con enfermedad celíaca activa, y su nivel de expresión parece

correlacionarse con el grado de daño en los tejidos, según lo revelado por diversos análisis. Tanto la expresión de esta citocina como el daño de la mucosa disminuyen progresivamente tras la instauración de una dieta libre de gluten. Los enterocitos y las células mononucleares de la lámina propia (LPM) son la principal fuente de esta citocina. La IL-15 provoca entre otras cosas, una serie de cambios bioquímicos en la vía de señalización de NKG2D y la conversión de las células T citotóxicas (CTL) en linfocitos “killer” activados por linfocinas (LAK) que contribuyen al daño tisular en pacientes celíacos. Además, los ligandos de NKG2D, MICA y MICB igualmente se sobreexpresan en la mucosa intestinal en respuesta a estos cambios inmunológicos. Nuestro estudio confirma también que los niveles de ARN mensajero de MICA y MICB son más altos en las biopsias de pacientes con enfermedad celíaca aunque, de forma sorprendente, encontramos que estos niveles se correlacionaban inversamente con la severidad de la lesión de la mucosa.

Habitualmente, la infiltración intraepitelial por células T CD8 + se ha considerado secundaria a la activación de las células T CD4 + en la lámina propia, ya que no se han descrito linfocitos intraepiteliales restringidos por gliadina. Sin embargo, estos infiltrados celulares no están presentes en otros trastornos intestinales asociados con fenómenos inflamatorios de la lámina propia, tales como la enfermedad de Crohn y otras enteropatías autoinmunes. Este hallazgo sugiere que la activación de las células T CD4+ de la lámina propia por la exposición al gluten, no explica la expansión de los linfocitos intraepiteliales en la enfermedad celíaca.

Aunque la respuesta inmune de las células T suele estar dirigida frente a péptidos inmunogénicos a través de la interacción las moléculas HLA de clase I y el TCR, también es posible que esta respuesta se produzca por el reconocimiento de células dañadas que expresan moléculas inducidas por el estrés celular (MIC y HLA-E) e interferón- $\gamma$ . Varios trabajos anteriores han sugerido que estas alteraciones pueden ocurrir en el epitelio intestinal de los pacientes con enfermedad celíaca. MIC y HLA-E son reconocidos por los receptores de las células NK, NKG2D y CD94-NKG2C presentes ambos en los linfocitos intraepiteliales y cuya expresión está fuertemente inducida por la IL-15. El daño epitelial podría ser causado por la desregulación de este sistema en presencia de altas concentraciones de IL-15. La inducción de la activación de estos

## *Discusión*

receptores podría conducir a la activación incontrolada de los linfocitos intraepiteliales y, en última instancia, a la destrucción del epitelio y a la atrofia de las vellosidades. De hecho, la IL-15 permite el desarrollo en CTLs de actividad killer mediada por NKG2D y coopera con NKG2D para inducir la activación de la fosfolipasa citosólica A(2) (cPLA2) y la liberación de ácido araquidónico, lo que conduce a la inflamación del tejido. Nuestros resultados sugieren que los niveles de IL-15, determinados por RT-PCR, no se correlacionaron estrechamente con el grado de daño de la mucosa, pero eran claramente más altos en enfermos que en los controles sanos. Además estos niveles se mantuvieron elevados hasta las etapas finales del deterioro de la mucosa. La IL-15 puede ser liberada por los enterocitos como consecuencia de una proteólisis directa durante el curso de la enfermedad. El bloqueo de la actividad de esta citocina podría beneficiar a los pacientes celíacos, tal y como se ha demostrado en modelos animales.

En el presente estudio hemos analizado además la expresión de moléculas MIC en muestras intestinales de pacientes con enfermedad celíaca con diferentes grados de daño en la mucosa. Encontramos que los niveles más altos de MICA y MICB aparecían en muestras con lesiones tipo Marsh I, II y IIIa. El nivel de expresión fue progresivamente menor en muestras con lesiones más severas, es decir de grado Marsh IIIb y IIIC. Estos hallazgos sugieren que el aumento de la expresión de MIC podría ser un fenómeno inicial relacionado con la toxicidad del gluten y la aparición de daño en la mucosa. De hecho, los cambios patológicos en los enterocitos y la extensión de la lesión están inversamente correlacionados con los niveles de expresión de ligandos de NKG2D. El incremento en el nivel de expresión de las moléculas MIC en la superficie de los enterocitos, probablemente inducido por IL15, durante la etapa inicial de la enfermedad celíaca, actuaría como una diana para los linfocitos  $T\alpha\beta$  CD8+ que infiltran en el epitelio intestinal. El reconocimiento de MICA y MICB por el receptor NKG2D, cuya expresión también está inducida por la IL15, actuaría como una señal para los LIE, induciendo su activación lo cual conduciría al daño de los enterocitos, y finalmente, tras activar los mecanismos dependientes de la inmunidad adaptativa, provocando la atrofia de la mucosa intestinal. La regulación a la baja de la expresión de MIC durante el curso de la lesión de la mucosa puede actuar como un mecanismo de control para la activación de los LIE, limitando en cierto modo un mayor daño epitelial.

Además, encontramos que MICA también se expresaba en las células mononucleares, que se infiltran en la lámina propia. Bajo estas circunstancias, la interacción MICA/NKG2D podría actuar como una señal coestimuladora adicional para células T CD4+ NKG2D+. Aunque no hemos analizado la expresión de NKG2D en los linfocitos T CD4+, estudios previos han demostrado que esta molécula que habitualmente no está presente en estas células, aparece en ellas en algunas enfermedades autoinmune y en el envejecimiento.

En conclusión, es evidente que la interacción entre NKG2D y MICA/B juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad celíaca, y que este fenómeno es probablemente más importante en las fases iniciales de la enfermedad. El bloqueo de la interacción MIC/NKG2D durante las primeras etapas de la lesión de la mucosa podría prevenir la progresión de daño en el tejido y el establecimiento de una enfermedad celíaca clínicamente significativa.

## LA INMUNIDAD HUMORAL EN LA ENFERMEDAD CELÍACA.

Es bien sabido que la presencia de autoanticuerpos es una característica importante de todas las enfermedades autoinmunes y, a pesar de que en muchos casos no se ha establecido cual es el papel que juegan en la patogenia de estas enfermedades, su detección es muy útil para establecer el diagnóstico. Los anticuerpos anti-tTG son probablemente uno de los marcadores más importantes en el diagnóstico de la enfermedad celíaca, pero su presencia habitualmente ha sido considerada como un epifenómeno. Sin embargo, algunos estudios recientes han sugerido que estos anticuerpos pueden estar implicados directamente en la patogénesis de la enfermedad celíaca. Zanoni y col. han demostrado el papel que juegan estos anticuerpos en el daño de la mucosa intestinal en pacientes celíacos. Este estudio demuestra que son capaces de reconocer un epítipo común a TG2 y al receptor Toll-like 4 (TLR-4). Esta interacción entre los anticuerpos y este receptor conduce a la activación de la vía de TLR-4, un iniciador importante de la inmunidad innata. Otros estudios han demostrado que los anticuerpos anti-tTG pueden desempeñar un papel importante como inductores de la proliferación de células epiteliales e que también

## *Discusión*

pueden interferir con los mecanismos de adhesión celular en el epitelio intestinal. Además, estos autoanticuerpos son capaces de alterar la angiogénesis y de modular la permeabilidad vascular in vitro. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que es necesario un nuevo enfoque en el estudio de la patogénesis de la enfermedad celíaca, y que este nuevo enfoque debe tener muy en cuenta el papel de la inmunidad humoral.

A pesar de que los elementos implicados en el daño directo de la mucosa en la enfermedad celíaca son conocidos, al menos en una pequeña parte, los mecanismos que llevan a la agresión autoinmune sistémica en estos pacientes siguen siendo un misterio. Tal y como ya hemos apuntado previamente, existen un componente genético común a todas estas patologías que podría condicionar su desarrollo conjunto. Es probable también que NKG2D y sus ligandos puedan desempeñar un papel importante en el desarrollo de estos fenómenos. De hecho, estas moléculas están implicadas en la patogénesis de algunas enfermedades que se asocian comúnmente con la celíaca, como la diabetes tipo 1 y la artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, el bloqueo de NKG2D en la etapa de pre-diabética en diabéticos ratones no obesos (NOD) previene el desarrollo de la diabetes [33]. En la artritis reumatoide, MICA/B se expresan de forma aberrante en el tejido patológico de las articulaciones afectadas y podrían estar implicados en la continuación del proceso de autorreactivo [34].

En este estudio hemos encontrado que los anticuerpos anti-MICA están presente en la mitad de los pacientes con celíaca no tratada, pero en sólo el 3,5% de los controles sanos. Además, los anticuerpos anti-MICA estuvieron presentes en la mayoría de los pacientes diagnosticados de enfermedad celíaca y que también habían desarrollado otra enfermedad autoinmune concomitante. Estos anticuerpos eran in embargo poco frecuentes en los pacientes que habían sido diagnosticados solamente para una patología autoinmune sin celíaca. Asimismo, los anticuerpos anti-MICA desaparecieron de la mayoría de los pacientes celíacos después de un año con una dieta libre de gluten, de forma similar a lo que ocurre con los anticuerpos anti-tTG. Estos resultados implican que, en general, la relación entre los anticuerpos anti-MICA y las enfermedades autoinmunes se vincula directamente a la celíaca en lugar de ser un

fenómeno específicamente asociado con la autoinmunidad en general. Sin embargo, tal y como ya se ha mencionado anteriormente, el lupus eritematoso sistémico de aparición temprana puede ser una excepción a este patrón, ya que estos anticuerpos también se han descrito en esta enfermedad [18].

Tanto algunos estudios anteriores como el propio trabajo que estamos presentando demuestran que la proteína MICA se sobreexpresa en enterocitos obtenidos de la mucosa dañada de pacientes celíacos [13, 17]. Un alto nivel de expresión de MICA parece promover el daño de la mucosa mediante la infiltración de linfocitos intraepiteliales T CD8+, que expresan NKG2D, el receptor de MICA. De hecho, otros autores han sugerido que la sobreexpresión de MICA podría ser un suceso iniciador en la progresión de daño de la mucosa [35, 36, 37]. En esta fase inicial de la enfermedad, algunos péptidos derivados del gluten, que han sido caracterizados como no inmunogénicos, están directamente involucrados en el aumento de la expresión de MICA e IL-15. Estos péptidos "tóxicos" activan la inmunidad innata través de una vía desconocida, que conduce a la destrucción de la mucosa intestinal [35]. Como se ha demostrado en otros procesos inflamatorios, la destrucción celular masiva parece estar directamente implicada en el desarrollo de autoanticuerpos [38]. Por lo tanto en la enfermedad celíaca, un nivel de expresión inicial muy elevado de MICA directamente inducido por péptidos derivados del gluten estaría seguido de la destrucción de los enterocitos por los IELs, lo cual podría desencadenar el desarrollo posterior de anticuerpos frente a MICA en aquellos individuos que sean susceptibles.

El hecho de que menos de la mitad de los pacientes con celíaca desarrollen anticuerpos anti-MICA impide su utilización como un marcador adicional para el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, la mayor prevalencia de estos autoanticuerpos en pacientes con enfermedades autoinmunes adicionales que hemos observado en nuestro estudio implica que estos anticuerpos podrían ser útiles para predecir el riesgo de desarrollar alguna de estas patologías concomitantes. Como hemos visto, estas enfermedades se asocian frecuentemente con la enfermedad celíaca. Varios estudios previos han encontrado una estrecha relación entre un largo período de exposición al gluten [15, 39] y un fondo genético común, aunque otros trabajos no encontraron ninguna relación entre el desarrollo de autoinmunidad y la



## *Discusión*

ingesta de prolongada de gluten [40]. Hemos encontrado que el desarrollo de autoinmunidad adicional en nuestro grupo de pacientes fue más frecuente en los adultos que en los niños, aunque este fenómeno podría estar relacionado con el efecto de la edad sobre la prevalencia de estas enfermedades claramente establecido por numerosos estudios previos, más que a un largo tiempo de exposición al gluten. Por otra parte, la asociación de los autoanticuerpos anti-MICA con la presencia de patología autoinmune adicional se modifica sustancialmente según la edad. Sorprendentemente, a pesar de estas enfermedades son más frecuentes en adultos con celiaca, el riesgo de desarrollar enfermedad autoinmune concomitante asociado con los anticuerpos anti-MICA es claramente mayor en la infancia, por lo que la determinación de estos autoanticuerpos puede ser muy útil en la práctica clínica para establecer el riesgo en niños. De hecho, en nuestro estudio, sólo un paciente pediátrico con autoinmunidad adicional fue negativo para los autoanticuerpos anti-MICA. En los niños, tanto la celíaca como otras enfermedades autoinmunes son generalmente procesos más agresivos que en los adultos. En el caso de la enfermedad celíaca, esta mayor agresividad podría dar como resultado un incremento de la expresión de moléculas MIC en los pacientes más jóvenes, lo que favorecería la generación de autoanticuerpos. La presencia de anticuerpos anti-MICA podría aumentar la destrucción del tejido y conducir al desarrollo temprano de otra patología autoinmune. Algo similar podría estar sucediendo en el LES de inicio juvenil, ya que, tal y como se mencionó anteriormente, se demostró la presencia de autoanticuerpos anti-MICA en 27 pacientes con esta patología [18]. En nuestro grupo de 428 pacientes con patología autoinmune adicional se incluyeron 92 enfermos diagnosticados con LES. Seis de estos pacientes fueron clasificados como LES de inicio juvenil y en todos los casos se encontraron anticuerpos anti-MICA (datos no mostrados). Aunque estos anticuerpos no se han implicado directamente en la enfermedad, pueden ser un factor de riesgo adicional en el desarrollo de LES y un biomarcador interesante en el diagnóstico de esta enfermedad en la infancia.

Como hemos mencionado anteriormente, los autoanticuerpos anti-MICA estaban presentes en menos de la mitad de los pacientes con celíaca, lo cual los hace menos útiles como biomarcadores diagnósticos que otros autoanticuerpos, tales como

los anti-tTG o los que se desarrollan frente a la gliadina desamidada. Además, todos los pacientes incluidos en el estudio fueron positivos para anti-tTG aunque la ausencia de estos autoanticuerpos no descarta el diagnóstico de la enfermedad celíaca, especialmente en niños. Sería por lo tanto de gran interés en un futuro próximo analizar la presencia de anticuerpos anti-MICA en una población de pacientes con enfermedad celíaca pero sin autoanticuerpos anti-tTG. Otra limitación de este estudio es el pequeño número de pacientes con enfermedad celíaca que además han sido diagnosticados con una enfermedad autoinmune concomitante especialmente en el grupo de pacientes pediátricos.

En conclusión, hemos demostrado en este trabajo que el desarrollo de anticuerpos anti-MICA en pacientes celíacos se asocia con la presencia de gluten en la dieta. Además, los anticuerpos anti-MICA aparentemente están relacionados con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, especialmente en los pacientes más jóvenes, aunque el número de individuos en este grupo de estudio era pequeño. La determinación de estos autoanticuerpos podría ser menos útil que la de otros para el diagnóstico de la enfermedad, pero podría ser muy ventajosa en la práctica clínica diaria para predecir el desarrollo de enfermedades autoinmunes asociadas en pacientes celíacos, especialmente en los niños.

El mecanismo por el cual estos anticuerpos podrían influir en el desarrollo de la autoinmunidad podría estar relacionado con el daño tisular directo mediante la activación del complemento, la activación de la inmunidad celular u otro mecanismo similar a lo que se ha demostrado para los anticuerpos anti-tTG en otros estudios [8-12]. Es necesario seguir trabajando para establecer el papel y la importancia de estos autoanticuerpos en la enfermedad celíaca y, posiblemente, en otras enfermedades autoinmunes como el LES, especialmente en pacientes con una edad de inicio temprana.

## *Discusión*

## CONCLUSIONES

## *Conclusiones*

1. La frecuencia de portadores del heterodímero de susceptibilidad HLA-DQ2 en las formas clásicas y en las formas atípicas de la enfermedad celíaca es la misma. Por lo tanto se descarta la implicación del heterodímero en el desarrollo de las diversas formas clínicas de esta.
2. Al analizar las frecuencias del genotipo DRB1\*07,11 en ambos grupos de enfermos, resultó evidente la fuerte tendencia existente en el grupo de enfermos con formas clásicas de la enfermedad (16,45%) a ser portadores de este genotipo en comparación con el grupo de enfermos atípicos (3,70%).
3. Las diferencias en la distribución del haplotipo AH8.1 en enfermos atípicos con respecto a las formas clásicas resultaron ser estadísticamente significativas. De esto se deduce que puede existir un gen dentro de este haplotipo que favorezca el desarrollo de formas extradigestivas de la enfermedad.
4. Las diferencias existentes entre las frecuencias del alelo MICA A5.1 en enfermos con formas atípicas y clásicas de la enfermedad resultaron ser estadísticamente significativas. Este alelo forma parte del haplotipo AH8.1 por lo que puede inferirse que tal vez sea responsable del desarrollo de formas atípicas de la enfermedad.
5. El alelo MICB\*0106 también estaba incrementado pacientes con enfermedad atípica en comparación con aquellos afectados por formas clásicas de la celíaca. Dicho alelo forma también parte del haplotipo AH8.1.
6. Los resultados obtenidos en el grupo de pacientes general son perfectamente extrapolables al grupo de pacientes seleccionado por no ser portadores del haplotipo HLA-DQ2 en sus diferentes formas. En estos pacientes el haplotipo EH8.1 y el alelo MICA A5.1 estaban también asociados al desarrollo de formas atípicas de la enfermedad.
7. Los resultados anteriores se confirmaron en una cohorte de pacientes celíacos saharauis procedentes de los campos de refugiados de Tindouf en Argelia.
8. MICA y MICB se sobre-expresan en la mucosa de los pacientes con daño leve de

## Conclusiones

la mucosa intestinal (grados I, II y IIIa de Marsh) con respecto a los que presentan daño severo (grados IIIb y IIIc) y con respecto a controles sanos. La expresión de IL15 esta incrementada en ambos grupos de pacientes.

9. Puede deducirse que el incremento de la expresión de MICA y MICB es un proceso inicial en el desarrollo de la enfermedad celíaca, mientras que la expresión de IL15 se mantiene elevada durante todas las fases de la enfermedad.
10. Casi la mitad de los pacientes con enfermedad celíaca desarrollan anticuerpos anti-MICA, lo cual no sucede en los controles sanos ni en un grupo de pacientes con otras patologías autoinmunes.
11. La presencia de anticuerpos anti-MICA es más frecuente en los pacientes pediátricos que en los adultos.
12. La presencia de anticuerpos anti-MICA se relaciona con el desarrollo de patología autoinmune adicional, sobre todo diabetes mellitus tipo 1, en ambos grupos de pacientes, aunque esta asociación es especialmente relevante en los niños.

**RESUMEN**





El planteamiento inicial de esta tesis doctoral surgió al observar que, a pesar de compartir la asociación con HLA-DQ2 o HLA-DQ8 existen, desde el punto de vista clínico, fenotipos diferentes de enfermedad celíaca que se diferencian simplemente por el desarrollo o no de ciertas manifestaciones clínicas. Sin descartar una posible influencia del entorno, el desarrollo de un estudio con el fin de establecer si existe un condicionamiento genético de estas diferencias, nos pareció especialmente relevante.

Por ese motivo nos planteamos inicialmente analizar si las diferentes formas de herencia del heterodímero HLA-DQ2 en el seno de diferentes haplotipos HLA, condicionaba de algún modo el desarrollo de estas diferentes formas de la enfermedad. Nos encontramos que las formas heredadas en trans, es decir el heterodímero codificado por HLA-DQA1\*05:05 y DQB1\*02:02 estaba más asociado a las formas clásicas de la enfermedad, es decir, aquellas con sintomatología predominantemente digestiva.

A continuación decidimos investigar si existían otros genes candidatos en la región MHC que condicionen el desarrollo de las diferentes formas clínicas. Dentro de los posibles genes candidatos, han cobrado especial importancia tanto por su situación en el genoma, como a su papel funcional en la respuesta inmune, los ligandos de NKG2D, MICA y MICB. Estos ligandos y su receptor han sido implicados tanto en la propia enfermedad celíaca como en el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes, por lo que decidimos investigar la posible implicación de dichos genes. Nos encontramos que el alelo transmembrana MICA A-5.1, que codifica para una proteína truncada y posiblemente soluble, estaba asociado al desarrollo de formas atípicas predominantemente extradigestivas de la enfermedad celíaca. En el caso de MICB encontramos que el alelo asociado con estas formas de la enfermedad era MICB\*01:06. Ambas asociaciones resultaron ser independientes de HLA-DQ2. Estos resultados se confirmaron en otra cohorte de pacientes y controles procedentes de los campamentos saharauis en Tindouf (Argelia). Esta población resulta especialmente interesante ya que previamente se había descrito que presenta la mayor prevalencia descrita de la enfermedad celíaca.

Una vez que habíamos establecido la asociación de genética de MICA y MICB con las formas atípicas de la enfermedad celíaca, decidimos investigar si la expresión

## *Resumen*

de ambas moléculas, así como de su receptor NKG2D y de la citocina IL15, principal inductor de su expresión en la mucosa intestinal, estaban relacionadas con el desarrollo de las diferentes formas clínicas. Nos encontramos que MICB y sobre todo MICA se sobre-expresaba en la mucosa de los pacientes con daño leve de la mucosa intestinal (grados I, II y IIIa de Marsh) con respecto a los que presentaban daño severo (grados IIIb y IIIc) y con respecto a controles sanos. NKG2D sin embargo presentaba mayores niveles de expresión en pacientes con daño severo y la IL15 estaba incrementada en ambos grupos de pacientes con respecto a los controles. Estos resultados sugieren que el incremento de la expresión de MICA y MICB es un proceso inicial en el desarrollo de la patogenia de la enfermedad celíaca, mientras que la expresión de IL15 se mantiene elevada durante todas las fases de la enfermedad.

Una vez que nuestro trabajo y el de otros autores demostró que la proteína MICA está sobre-expresada en la mucosa de los pacientes con enfermedad celíaca, especialmente en aquellos que presentan estadios iniciales de la lesión, decidimos investigar si esto inducía la formación de anticuerpos anti-MICA, que ya habían sido descritos en el LES de inicio juvenil y en el rechazo del trasplante de órganos sólidos. Nos encontramos con que casi la mitad de los pacientes con enfermedad celíaca desarrollaban anticuerpos anti-MICA con respecto al 3% detectado en un grupo de 200 controles sanos y al 8% detectado en un grupo de 428 pacientes con otras patologías autoinmunes. Nos encontramos también que estos anticuerpos eran más frecuentes en un grupo de pacientes pediátricos (>15 años). Además su aparición se relacionaba con el desarrollo de patología autoinmune adicional, sobre todo diabetes mellitus tipo 1, en ambos grupos de pacientes, aunque esta asociación era especialmente relevante en los niños.

**SUMMARY**



The initial approach of this thesis arose from observations that, despite sharing the association with HLA-DQ2 or HLA-DQ8, from a clinical point of view, there are different phenotypes of celiac disease which differ in the development or not of some clinical manifestations. Taking in account the possible influence of the environment, we found particularly relevant the developing of a study to establish whether there is a genetic conditioning of these clinical differences.

For this reason initially we investigate whether different forms of genetic heredity of HLA-DQ2 heterodimer within different HLA haplotypes, somehow conditioned the development of these different forms of the disease. We found that the forms in trans such as the heterodimer encoded by HLA-DQA1\*05:05 and DQB1\*02:02 was associated to classical forms of the disease, those forms with predominantly gastrointestinal symptoms.

Then, we decided to investigate whether other candidate genes in the MHC region influence in the progression of different clinical forms of celiac. Among the candidate genes, NKG2D ligands MICA and MICB have become particularly important both for its location in the genome, and its functional role in the immune response. These ligands and their receptor have been implicated both in celiac disease itself and in the development of other autoimmune diseases, so we decided to investigate the possible influence of these genes in the clinical phenotype of celiac disease. We found that MICA transmembrane allele A-5.1, which encodes a truncated and possibly soluble protein, was associated with development of predominantly extradigestive atypical celiac disease. For MICB we found that the allele MICB 01:06 was also associated with these forms of the disease. Both associations were found to be independent of HLA-DQ2. These results were confirmed in another cohort of patients and controls from the Saharawi camps in Tindouf (Algeria). This population is particularly interesting as previously described which has the highest reported prevalence of celiac disease in world.

Once we had established the genetic association of MICA and MICB with atypical forms of celiac disease, we decided to investigate whether the expression of both molecules, its receptor NKG2D and IL15 cytokine, principal inducer of expression

for both in the intestinal mucosa, were related to the development of different clinical forms. We found that MICB and especially MICA is over-expressed in the mucosa of patients with mild damage of the intestinal mucosa (grades I, II and IIIa of Marsh) relative to those with severe damage (grade IIIb and IIIc) and with respect to healthy controls. However, NKG2D showed higher expression levels in patients with severe damage and IL15 was increased in both groups of patients with respect to healthy controls. These results suggest that the increased expression of MICA and MICB is an initial process in the development of the pathogenesis of celiac disease, whereas IL15 expression remains elevated during all phases of the disease.

Our work and other studies from some authors demonstrated that MICA protein is over-expressed in the mucosa of patients with celiac disease, especially in those with early stages of the injury, we decided to investigate whether this induced the formation of antibodies against MICA, which had already been described in juvenile-onset SLE and in rejection of solid organ transplantation. We found that nearly half of patients with celiac disease developed anti-MICA antibodies, comparing with the 3% detected in a group of 200 healthy controls and 8% detected in a group of 428 patients with other autoimmune diseases. We also found that these antibodies were more frequent in a group of pediatric patients (> 15 years). Moreover, we also found that the presence of these antibodies was related with the development of additional autoimmune diseases, especially diabetes mellitus type 1, in both groups of patients, although this association was especially important in children.

**REFERENCIAS**



## *Referencias*

Dicke WK. Investigation of the harmful effects of certain types of cereal on patients with coeliac disease. (Tesis doctoral), Universidad de Utrecht, Holanda 1950.

Van de Kamer JH, Weyers HA, Dicke WK. Coeliac disease IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr Scand* 1953; 42:223-231.

Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ("celiac sprue"). *Gastroenterology* 1992; 102:330-345.

Katz SI, Falchuk ZM, Dahl MV, Rogentine GN, Strober W. HL-A8: a genetic link between dermatitis herpetiformis and gluten-sensitive enteropathy. *J CLIN INVEST* 1972 Nov; 51(11):2977-80

Stokes PL, Asquith P, Holmes GK, Mackintosh P, Cooke WT. Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. *Lancet* 1972 Jul 22; 2(7769):162-4

Keuning JJ, Pena AS, van Leeuwen A, van Hooff JP, van Rood JJ. HLA-Dw3 associated with coeliac disease. *Lancet*. 1: 506-8

Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 1994 Jul 5;91(14):6259-63

Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 1996 Oct 29;93(22):12445-50

Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *IMMUNOGENETICS* 1996; 44(5): 351-7

Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H. Triplet repeat polymorphism in the

## Referencias

transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 1997 Feb 18; 94(4): 1298-303

Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *SCIENCE* 1998 Mar 13; 279(5357):1737-40

Kutlu T, Brousse N, Rambaud C, Le Deist F, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. Numbers of T cell receptor (TCR) alpha beta+ but not of TcR gamma delta+ intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *GUT* 1993 Feb; 34(2): 208-14

Lundqvist C, Melgar S, Yeung MM, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J IMMUNOL* 1996 Sep 1;157(5):1926-34

Oberhuber G, Vogelsang H, Stolte M, Muthenthaler S, Kummer AJ, Radaszkiewicz T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in coeliac disease but not in giardiasis. *AM J PATHOL* 1996 May;148(5):1351-7

Halstensen TS, Farstad IN, Scott H, Fausa O, Brandtzaeg P. Intraepithelial TcR alpha/beta+ lymphocytes express CD45RO more often than the TcR gamma/delta+ counterparts in coeliac disease. *IMMUNOLOGY* 1990 Dec; 71(4): 460-6

Halstensen TS, Brandtzaeg P. Activated T lymphocytes in the coeliac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ alpha/beta cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of alpha/beta and gamma/delta cells in the epithelium. *EUR J IMMUNOL* 1993 Feb;23(2):505-10

Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with coeliac disease. *GASTROENTEROLOGY* 1998 Sep;115(3):551-63

Kwok WW, Domeier ML, Raymond FC, Byers P, Nepom GT. Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J IMMUNOL* 1996 Mar 15;156(6):2171-7

Godkin A, Friede T, Davenport M, Stevanovic S, Willis A, Jewell D, Hill A, Rammensee HG. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2). *INT IMMUNOL* 1997 Jun;9(6):905-11

Halstensen TS, Scott H, Fausa O, Brandtzaeg P. Gluten stimulation of coeliac mucosa in vitro induces activation (CD25) of lamina propria CD4+ T cells and macrophages but no crypt-cell hyperplasia. *SCAND J IMMUNOL* 1993 Dec;38(6):581-90

Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1\*0501,beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J EXP MED* 1993 Jul 1;178(1):187-96

Molberg O, Lundin KE, Nilsen EM, Scott H, Kett K, Brandtzaeg P, Thorsby E, Sollid LM. HLA restriction patterns of gliadin- and astrovirus-specific CD4+ T cells isolated in parallel from the small intestine of celiac disease patients. *TISSUE ANTIGENS* 1998 Nov;52(5):407-15

Lundin KE, Sollid LM, Anthonsen D, Noren O, Molberg O, Thorsby E, Sjostrom H. Heterogeneous reactivity patterns of HLA-DQ-restricted, small intestinal T-cell clones from patients with celiac disease. *GASTROENTEROLOGY* 1997 Mar;112(3):752-9

van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Pena S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J IMMUNOL* 1998 Aug 15; 161(4): 1585-8

Molberg O, Mcadam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjostrom H, Sollid LM. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *NAT MED* 1998 Jun; 4(6): 713-7

## Referencias

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *NAT MED* 1997 Jul;3(7):797-801

Bunce M, Fanning GC, Welsh KI. Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). *TISSUE ANTIGENS* 1995 Feb;45(2):81-90

Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *TISSUE ANTIGENS* 1992 May; 39(5): 225-35

Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *TISSUE ANTIGENS* 1993 Mar;41(3):119-34

Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E, Martin J. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *TISSUE ANTIGENS* 1997 Jan;49 (1):74-8

Meddeb-Garnaoui A, Zeliszewski D, Mougenot JF, Djilali-Saiah I, Caillat-Zucman S, Dormoy A, Gaudebout C, Tongio MM, Baudon JJ, Sterkers G. Reevaluation of the relative risk for susceptibility to celiac disease of HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1, and -TAP2 alleles in a French population. *HUM IMMUNOL* 1995 Jul;43(3):190-9

Fernandez-Arquero M, Figueredo MA, Maluenda C, de la Concha EG. HLA-linked genes acting as additive susceptibility factors in celiac disease. *Hum Immunol.* 42: 295-300

de la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo MA. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *HUM IMMUNOL* 2000 May;61(5):513-7

Grubic Z, Zunec R, Cecuk-Jelicic E, Kerhin-Brkljacic V, Kastelan A Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *EUR J IMMUNOGENET* 2000 Feb;27(1):47-51

Ivarsson A, Persson LA, Nystrom L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, Danaeus A, Lindberg T, Lindquist B, Stenhammar L, Hernell O. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *ACTA PAEDIATR* 2000 Feb;89(2):165-71

Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *ANNU REV IMMUNOL* 2000;18:53-81.

Garcia-Merino A, Alper CA, Usuku K, Marcus-Bagley D, Lincoln R, Awdeh Z, Yunis EJ, Eisenbarth GS, Brink SJ, Hauser SL. Tumor necrosis factor (TNF) microsatellite haplotypes in relation to extended haplotypes, susceptibility to diseases associated with the major histocompatibility complex and TNF secretion. *HUM IMMUNOL* 1996 Sep 15;50(1):11-21

Candore G, Cigna D, Gervasi F, Colucci AT, Modica MA, Caruso C. In vitro cytokine production by HLA-B8,DR3 positive subjects. *AUTOIMMUNITY* 1994;18(2):121-32

Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, et al. Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. *Scan J Gastroenterol* 2000;35:398-402.

Catassi C, Ratsch I-M, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994 ; 343 : 200-203.

Not T, Horvath K, Hill ID, et al. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 494-498.

Ivarsson A, Persson LA, Juto P, et al. High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults : a Swedish population-based study. *J Intern Med* 1999; 245 : 63-68.

Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999;354(9179):647-8.

Sollid L, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105: 910-922.

## Referencias

Bolognesi E, Karell K, Percopo S, et al. Additional factor in some HLA DR3/DQ2 haplotypes confers a fourfold increased genetic risk of celiac disease. *Tissue Antigens* 2003;61(4):308-316.

Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *ANNU REV IMMUNOL* 2000; 18:53-81.

Schupan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 234-242.

Das G, Janeway CA Jr. MHC specificity of iIELs. *Trends Immunol* 2003;24(2):88-93.

Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 2003;24(2):82-7.

Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut* 1.993; 34: 150-151.

Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, et al. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterology* 1999; 94: 691-696.

Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *TISSUE ANTIGENS* 1993;41(3):119-34.

Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, et al. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw\*0602 in psoriasis. *ARTHRITIS RHEUM* 1999;42(5):1010-6

Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, et al. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens* 2001 Dec;58(6):402-6.

Challacombe DN, Mecrow IK, Elliott K, et al. Changing infant feeding practices and declining incidence of coeliac disease in West Somerset. *Arch Dis Child* 1997;77(3):206-9.

Persson LA, Ivarsson A, Hernell O. Breast-feeding protects against celiac disease in childhood--epidemiological evidence. *Adv Exp Med Biol* 2002;503:115-23.

Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, et al. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2002;75(5):914-21.

Groh V, Bahram S, Bauer S, et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 1996;93:12445-50.

Gambelunghe G, Ghaderi M, Tortoioli C, et al. Two distinct MICA gene markers discriminate major autoimmune diabetes types. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(8):3754-60.

Picco P, Porfirio B, Gattorno M, et al. MICA gene polymorphisms in an Italian paediatric series of juvenile Behcet disease. *Int J Mol Med* 2002;10(5):575-8.

Juan Luis Fdez-Morera, Luis Rodrigo, Antonio López-Vázquez, et al. MHC class I chain related gene A (MICA) transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Human Immunol* 2003;66(8): 816-22.

Groh V, Steinle A, Bauer S, et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *SCIENCE* 1998;279:1737-40.

Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, et al. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(5):2977-82.

Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 1997 18;94:1298-303.

Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419(6908):734-8.



## Referencias

Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003;362(9377):30-7.

Roberts AI, Lee L, Schwarz E, et al. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol*. 2001;167(10):5527-30.

Catassi C, Räscher I-M, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994;**343**:200-03.

Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease – active, silent, latent, potential. *Gut* 1993;**34**:150-51.

Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;**120**:636-51.

Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, et al. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterology* 1999;**94**:691-96.

Corazza GR, Frisoni M, Treggiari EA, et al. Subclinical celiac sprue. Increasing occurrence and clues to its diagnosis. *J Clin Gastroenterol* 1993;**16**:16-21.

Farre C, Humbert P, Vilar P, et al. Serological markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. *Dig Dis Sci* 1999;**44**:2344-49.

Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:53-81.

Sollid LM. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews* 2002;**2**:647-65.

Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 1997;**61**:307-17.

Greco L, Romino R, Coto I, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002;**50**:624-8.

Sollid LM, Markussen G, Ek J, *et al.* Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ $\alpha\beta$  heterodimer. *J Exp Med* 1989; **169**:345-50.

Sollid L, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;**105**:910-22.

14-Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, *et al.* Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. *Scan J Gastroenterol* 2000;**35**:398-402

Powis SH, Rosenberg WM, Hall M, *et al.* TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* 1993;**38**:345-50.

Meddeb-Garnaoui A, Zeliszewski D, Mougnot JF, *et al.* *Hum Immunol* 1995; **43**:190-9.

McManus R, Moloney M, Borton M, *et al.* Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factor genes. *Hum Immunol* 1996;**45**:24-31.

Lie BA, Sollid LM, Ascher H, *et al.* A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* 1999;**54**:162-8.

Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, *et al.* A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91**:6259-63.

Groh V, Bahram S, Bauer S, *et al.* Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:12445-50

Groh V, Steinle A, Bauer S, *et al.* Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;**279**:1737-40

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, *et al.* Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;**65**:909-11.

## Referencias

González S, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, *et al.* MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP). *Immunogenetics* 2003 (in press).

Fischer G, Arguello JR, Perez-Rodriguez M, *et al.* Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 2000;51:591-9.

Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, *et al.* The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw\*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1010-16.

Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, *et al.* Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev* 1999;167:275-304.

Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, *et al.* A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2971-6

Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, *et al.* Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:359-62.

Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB: Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2012, 18(42):6036-6059.

Ludvigsson JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ, 3rd, Zinsmeister AR, Lahr BD, Murray JA: Increasing incidence of celiac disease in a North American population. *American Journal of Gastroenterology* 2013.

DePaolo RW, Abadie V, Tang F, Fehlner-Peach H, Hall JA, Wang W, Marietta EV, Kasarda DD, Waldmann TA, Murray JA *et al.*: Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature* 2011, 471(7337):220-224.

Marsh MN: Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A

molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 1992, 102(1):330-354.

Londei M, Maiuri L, Quarantino S: A search for the holy grail: non-toxic gluten for celiac patients. *Gastroenterology* 2005, 129(3):1111-1113.

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine* 1997, 3(7):797-801.

Molberg O, McAdam SN, Sollid LM: Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2000, 30(3):232-240.

Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R et al: In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Medicine* 2006, 3(9):e358.

Barone MV, Caputo I, Ribecco MT, Maglio M, Marzari R, Sblattero D, Troncone R, Auricchio S, Esposito C: Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology* 2007, 132(4):1245-1253.

Teesalu K, Panarina M, Uibo O, Uibo R, Utt M: Autoantibodies from patients with celiac disease inhibit transglutaminase 2 binding to heparin/heparan sulfate and interfere with intestinal epithelial cell adhesion. *Amino Acids* 2012, 42(2-3):1055-1064.

Myrsky E, Kaukinen K, Syrjanen M, Korponay-Szabo IR, Maki M, Lindfors K: Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clinical and Experimental Immunology* 2008, 152(1):111-119.

Myrsky E, Caja S, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabo IR, Nadalutti C, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Maki M, Kaukinen K et al: Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 2009, 66(20):3375-3385.

## Referencias

Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T et al: Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004, 21(3):357-366.

Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, 91(14):6259-6263.

Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S: The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends in Molecular Medicine* 2008, 14(4):179-189.

Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T: Costimulation of CD8 $\alpha$ beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology* 2001, 2(3):255-260.

Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N et al: A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004, 21(3):367-377.

Dai Z, Turtle CJ, Booth GC, Riddell SR, Gooley TA, Stevens AM, Spies T, Groh V: Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *Journal of Experimental Medicine* 2009, 206(4):793-805.

Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, Stastny P: Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Human Immunology* 2006, 67(3):230-237.

Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G: Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *New England Journal of Medicine* 2007, 357(13):1293-1300.

Terasaki PI, Ozawa M, Castro R: Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *American Journal of Transplantation* 2007, 7(2):408-415.

Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Gonzalez MZ, Fdez-Morera JL, Diaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, Pascual D, Martinez-Borra J, Muro M, Alvarez-Lopez MR et al: The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *American Journal of Transplantation* 2007, 7(7):1842-1848.

Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Diaz-Pena R, Diaz-Molina B, Blanco-Garcia RM, Alvarez-Lopez MR, Lopez-Larrea C: Post-transplant soluble MICA and MICA antibodies predict subsequent heart graft outcome. *Transplant Immunology* 2006, 17(1):43-46.

Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot JP, Ginies JL, Dabadie A, Mouterde O et al: Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2008.

McNeish AS, Harms HK, Rey J, Shmerling DH, Visakorpi JK, Walker-Smith JA: The diagnosis of coeliac disease. A commentary on the current practices of members of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). *Archives of Disease in Childhood* 1979, 54(10):783-786.

Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C et al: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2012, 54(1):136-160.

Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, Greco L, Cohen H, Ciacci C, Eliakim R et al: World Gastroenterology Organisation global guidelines on celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2013, 47(2):121-126.

Tinto N, Ciacci C, Calcagno G, Gennarelli D, Spanpanato A, Farinaro E, Tortora R, Sacchetti L: Increased prevalence of celiac disease without gastrointestinal symptoms in adults MICA 5.1 homozygous subjects from the Campania area. *Digestive and Liver*

## Referencias

Disease 2008, 40(4):248-252.

Salardi S, Volta U, Zucchini S, Fiorini E, Maltoni G, Vaira B, Cicognani A: Prevalence of celiac disease in children with type 1 diabetes mellitus increased in the mid-1990 s: an 18-year longitudinal study based on anti-endomysial antibodies. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2008, 46(5):612-614.

Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R, Salerno G, Salvatore F, Sacchetti L: IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. *Journal of Pediatrics* 1999, 134(2):166-171.

Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, Lanier LL: NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 2004, 20(6):757-767.

Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T: Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(16):9452-9457.

Martin-Pagola A, Ortiz L, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Castano L, Bilbao JR: Analysis of the expression of MICA in small intestinal mucosa of patients with celiac disease. *Journal of Clinical Immunology* 2003, 23(6):498-503.

Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, Geraghty D, Groh V, Spies T, Jabri B et al: Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007, 13(3):298-307.

Makhlouf L, Kishimoto K, Smith RN, Abdi R, Koulmanda M, Winn HJ, Auchincloss H, Jr., Sayegh MH: The role of autoimmunity in islet allograft destruction: major histocompatibility complex class II matching is necessary for autoimmune destruction of allogeneic islet transplants after T-cell costimulatory blockade. *Diabetes* 2002, 51(11):3202-3210.

Ventura A, Magazzu G, Greco L: Duration of exposure to gluten and risk for

autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 1999, 117(2):297-303.

Sategna Guidetti C, Solerio E, Scaglione N, Aimò G, Mengozzi G: Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. *Gut* 2001, 49(4):502-505.

Catassi C, Räscher I-M, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994;343:200-03.

Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease – active, silent, latent, potential. *Gut* 1993;34:150-51.

Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636-51.

Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, et al. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterology* 1999;94:691-96.

Corazza GR, Frisoni M, Treggiari EA, et al. Subclinical celiac sprue. Increasing occurrence and clues to its diagnosis. *J Clin Gastroenterol* 1993;16:16-21.

Farre C, Humbert P, Vilar P, et al. Serological markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. *Dig Dis Sci* 1999;44:2344-49.

Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;18:53-81.

Sollid LM. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews* 2002;2:647-65.

Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 1997;61:307-17.

Greco L, Romino R, Coto I, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002;50:624-8.



## Referencias

Sollid LM, Markussen G, Ek J, et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ $\alpha\beta$  heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169:345-50.

Sollid L, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;105:910-22.

Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, et al. HC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201. *Gut* 2002;50:336-40.

Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, et al. Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. *Scan J Gastroenterol* 2000;35:398-402

Powis SH, Rosenberg WM, Hall M, et al. TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* 1993;38:345-50.

Meddeb-Garnaoui A, Zeliszewski D, Mougnot JF, et al. *Hum Immunol* 1995; 43:190-9.

McManus R, Moloney M, Borton M, et al. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factor genes. *Hum Immunol* 1996;45:24-31.

Lie BA, Sollid LM, Ascher H, et al. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* 1999;54:162-8.

Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6259-63.

Groh V, Bahram S, Bauer S, et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12445-50

Groh V, Steinle A, Bauer S, et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;279:1737-40

Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, et al. MICA-A5.1 allele is associated with

atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics* 2002;53:989-91.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909-11.

González S, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, et al. MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP). *Immunogenetics* 2003 (in press).

Fischer G, Arguello JR, Perez-Rodriguez M, et al. Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 2000;51:591-9.

Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, et al. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw\*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1010-16.

Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, et al. Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev* 1999;167:275-304.

Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2971-6

Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, et al. Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:359-62.

## *Referencias*

**PUBLICACIONES**



**PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL**

1. López-Vázquez A, Mozo L, Alonso-Arias R, Suárez-Álvarez B, Vidal-Castiñeira JR, Arranz E, Volta U, Bousoño C, López-Hoyos M, Rodrigo L, López-Larrea C. Autoantibodies against MHC class I polypeptide-related sequence A are associated with increased risk of concomitant autoimmune diseases in celiac patients. *BMC Med.* 2014 Feb 25;12:34.
2. López-Vázquez A, Rodrigo L, González S, López-Larrea C. NKG2D ligands expression patterns in gut mucosa from patients with coeliac disease. *Inmunologia.* 2013; 32(2):43–49.
3. González S, Rodrigo L, López-Vázquez A, Fuentes D, Agudo-Ibáñez L, Rodríguez-Rodero S, Fdez-Morera JL, Martínez-Borra J, López-Larrea C. Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2004 Apr;99(4):676-80.
4. López-Vázquez A, Fuentes D, Rodrigo L, González S, Moreno M, Fernández E, Martínez-Borra J, López-Larrea C. MHC class I region plays a role in the development of diverse clinical forms of celiac disease in a Saharawi population. *Am J Gastroenterol.* 2004 Apr;99(4):662-7.
5. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201. *Gut.* 2002 Mar;50(3):336-40.

*Publicaciones*

6. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics*. 2002 Feb;53(10-11):989-91.

**OTRAS PUBLICACIONES DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS DOCTORAL**

1. Bondar C, Plaza-Izurietta L, Fernandez-Jimenez N, Irastorza I, Withoff S, Wijmenga C, Chirido F, Bilbao JR; CEGEC group. THEMIS and PTPRK in celiac intestinal mucosa: coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge. *Eur J Hum Genet.* 2014 Mar;22(3):358-62.
2. Rodrigo-Sáez L, Fuentes-Álvarez D, Pérez-Martínez I, Alvarez-Mieres N, Niño-García P, de-Francisco-García R, Riestra-Menéndez S, Bousoño-García C, Alonso-Arias R, López-Vázquez A. Differences between pediatric and adult celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2011 May;103(5):238-44.
3. Suárez-Álvarez B, Fernández-Sánchez A, López-Vázquez A, Coto E, Ortega F, López-Larrea C. NKG2D and its ligands: active factors in the outcome of solid organ transplantation? *Kidney Int Suppl (2011).* 2011 Aug;1(2):52-57.
4. Rodrigo L, Hernández-Lahoz C, Fuentes D, Alvarez N, López-Vázquez A, González S. Prevalence of celiac disease in multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2011 Mar 7;11:31.
5. Lucendo AJ, Arias Á, Pérez-Martínez I, López-Vázquez A, Ontañón-Rodríguez J, González-Castillo S, De Rezende LC, Rodrigo L. Adult patients with eosinophilic esophagitis do not show an increased frequency of the HLA-DQ2/DQ8 genotypes predisposing to celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2011 Apr;56(4):1107-11.
6. Suárez-Alvarez B, Alonso-Arias R, Bravo-Mendoza C, López-Vázquez A, Ortega T, Baltar JM, Coto E, Ortega F, López-Larrea C. Identification of epitopes and immunodominant regions on the MICA protein defined by alloantibodies from kidney transplant patients. *Transplantation.* 2009 Aug 15;88(3 Suppl):S68-77.
7. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Baltar JM, Ortega F, López-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant.* 2009 Feb;9(2):251-7.



8. Rodrigo L, Alvarez N, Riestra S, de Francisco R, González Bernardo O, García Isidro L, López Vázquez A, López Larrea C. Relapsing acute pancreatitis associated with gluten enteropathy. Clinical, laboratory, and evolutive characteristics in thirty-four patients. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008 Dec;100(12):746-51.
9. Fernandez-Morera JL, Rodriguez-Rodero S, Tunon A, Martinez-Borra J, Vidal-Castineira JR, Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Rodrigo P, González S, Lahoz CH, Lopez-Larrea C. Genetic influence of the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule MICB in multiple sclerosis susceptibility. *Tissue Antigens.* 2008 Jul;72(1):54-9.
10. Fernández-Morera JL, Rodríguez-Rodero S, Lahoz C, Tuñón A, Astudillo A, Garcia-Suarez O, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Rodrigo L, Gonzalez S, López-Larrea C. Soluble MHC class I chain-related protein B serum levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Immunol.* 2008 Apr-May;69(4-5):235-40.
11. Rodríguez-Rodero S, González S, Rodrigo L, Fernández-Morera JL, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, López-Larrea C. Transcriptional regulation of MICA and MICB: a novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. *Eur J Immunol.* 2007 Jul;37(7):1938-53.
12. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Gonzalez MZ, Fdez-Morera JL, Díaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, Pascual D, Martínez-Borra J, Muro M, Alvarez-López MR, López-Larrea C. The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *Am J Transplant.* 2007 Jul;7(7):1842-8.
13. Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Niño P, Alvarez N, López-Vázquez A, López-Larrea C. Increased prevalence of celiac disease in first and second-grade relatives. A report of a family with 19 studied members]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007 Mar;99(3):149-55.
14. López-Arbesu R, Ballina-García FJ, Alperi-López M, López-Soto A, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Fernández-Morera JL, Riestra-

- Noriega JL, Queiro-Silva R, Quiñones-Lombraña A, López-Larrea C, González S. MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Mar;46(3):426-30.
15. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, Díaz-Molina B, Blanco-García RM, Alvarez-López MR, López-Larrea C. Post-transplant soluble MICA and MICA antibodies predict subsequent heart graft outcome. *Transpl Immunol*. 2006 Dec;17(1):43-6.
16. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Díaz-Molina B, Bernardo-Rodríguez MJ, Alvarez-López R, Pascual D, Astudillo A, Martínez-Borra J, Lambert JL, González S, López-Larrea C. The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft rejection. *Transplantation*. 2006 Aug 15;82(3):354-61.
17. Fdez-Morera JL, Tunon A, Rodriguez-Rodero S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Vazquez A, Lahoz CH, Lopez-Larrea C. Clinical behavior of multiple sclerosis is modulated by the MHC class I-chain-related gene A. *Tissue Antigens*. 2006 May;67(5):409-14.
18. Rodriguez-Rodero S, Rodrigo L, Fdez-Morera JL, Martinez-Borra J, Lopez-Vázquez A, Fuentes D, Lopez-Arbesu R, Lopez-Soto A, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MHC class I chain-related gene B promoter polymorphisms and celiac disease. *Hum Immunol*. 2006 Mar;67(3):208-14.
19. González S, Rodrigo L, Salas-Puig J, Astudillo A, Fuentes D, López-Vázquez A, López-Larrea C. Progressive myoclonic ataxia associated with antibodies against Purkinje cells in a celiac patient. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005 Dec;97(12):918-21.
20. Fernández E, Riestra S, Rodrigo L, Blanco C, López-Vázquez A, Fuentes D, Moreno M, López-Larrea C. Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 28;11(24):3762-6.

21. Rodrigo L, Riestra S, Fuentes D, González S, López-Vázquez A, López-Larrea C. Diverse clinical presentations of celiac disease in the same family. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004 Sep;96(9):612-6; 416-9.
22. López-Vázquez A, Rodrigo L, Miña-Blanco A, Martínez-Borra J, Fuentes D, Rodríguez M, Pérez R, González S, López-Larrea C. Extended human leukocyte antigen haplotype EH18.1 influences progression to hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2004 Mar 15;189(6):957-63.
23. Fdez-Morera JL, Rodrigo L, López-Vázquez A, Rodero SR, Martínez-Borra J, Niño P, González S, López-Larrea C. MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Hum Immunol.* 2003 Aug;64(8):816-22.
24. González S, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Rodrigo L, López-Larrea C. MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers. *Immunogenetics.* 2003 Mar;54(12):850-5.
25. González S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, García-Fernández S, Torre-Alonso JC, López-Larrea C. MICA rather than MICB, TNFA, or HLA-DRB1 is associated with susceptibility to psoriatic arthritis. *J Rheumatol.* 2002 May;29(5):973-8.
26. González S, Brautbar C, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Segal R, Blanco-Gelaz MA, Enk CD, Safriman C, López-Larrea C. Polymorphism in MICA rather than HLA-B/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. *Hum Immunol.* 2001 Jun;62(6):632-8.

## COELIAC DISEASE

## MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201

A Lopez-Vazquez, L Rodrigo, D Fuentes, S Riestra, C Bousoño, S Garcia-Fernandez, J Martinez-Borra, S Gonzalez, C Lopez-Larrea

Gut 2002;50:336-340

**Background and aims:** Coeliac disease (CD) is an enteropathic disorder characterised by a strong association with major histocompatibility complex (MHC) heterodimer HLA-DQ2. It has been suggested that other HLA class I genes in combination with DQ may also contribute to CD susceptibility. The aim of this study was to investigate whether other candidate genes modify the risk of developing different clinical forms of CD.

**Patients and methods:** We studied 133 Spanish coeliac patients, divided according to their clinical presentation into typical and atypical groups, and 116 healthy controls. All were typed by polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) at HLA-B, DRB1, DQA1, and DQB1 loci and for exon 5 of the MHC class I chain related gene A (MICA).

**Results:** No differences were found in the frequency of the DQA1\*0501/DQB1\*0201 heterodimer in either group. The risk of typical CD was significantly associated with the DR7/DQ2 haplotype ( $p_e=0.02$ , odds ratio (OR)=3.4, ethiological fraction (EF)=0.4). Extended haplotype (EH) 8.1 (B8/DR3/DQ2) was found to be overrepresented in the atypical form compared with the typical form ( $p_e=0.001$ , OR=4.19, EF=0.56). The trinucleotide repeat polymorphism MICA-A5.1 was found to be increased in the atypical group of patients compared with the typical group ( $p_e=0.00006$ , OR=8.63, EF=0.81). This association was independent of linkage disequilibrium with EH8.1 as this was also found to be increased in EH8.1 negative atypical patients compared with the typical group ( $p_e=0.004$ , OR=6.66, EF=0.56).

**Conclusions:** Our results showed that the risk of developing typical forms of CD was associated with DR7/DQ2 haplotype, and the presence of B8/DR3/DQ2 was significantly increased in atypical patients. In these, the MICA-A5.1 allele confers an additive effect to the DR3/DQ2 haplotype that may modulate the development of CD.

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:  
Dr C López-Larrea, Servicio de Inmunología, Hospital Central de Asturias, C/Celestino Villamil, s/n, 33.006. Oviedo, Spain; [inmuno@hca.es](mailto:inmuno@hca.es)

Accepted for publication  
20 June 2001

Coeliac disease (CD) is an enteropathy induced by wheat gliadins and related prolamins of other cereals in genetically susceptible individuals.<sup>1</sup> In these patients, gluten induces an immune response in the small bowel mucosa which causes villous atrophy and crypt hyperplasia. Recent serological screening studies performed in the general population of different countries have clearly shown that the real prevalence of CD is higher than classical reports.<sup>2-5</sup>

Pathological and clinical presentation of gluten sensitivity is variable.<sup>6</sup> From a clinical point of view, coeliac patients may present a clear digestive symptomatology and the so-called "typical form" of the disease. However, in some cases CD may be subclinical or oligosymptomatic and in other cases it can be completely asymptomatic.<sup>7</sup> These latter types of clinical presentation may be grouped together as "atypical forms" of CD and are more common among subjects included in several risk groups for CD, such as those represented by autoimmune diseases and first degree relatives of coeliac patients.<sup>8</sup> Better knowledge of the extradigestive manifestations of the disease together with the performance of screening in risk groups have largely increased the number of patients diagnosed with CD in recent years.<sup>9</sup>

There is a strong association between CD and the major histocompatibility complex (MHC). Previous studies have shown that CD is associated with HLA class I molecule B8. This association has been found to be secondary to the stronger association to the DR3 bearing haplotype. In Caucasians, DR3/DQ2 haplotypes carry the allele encoding B8 in linkage disequilibrium (extended haplotype (EH) 8.1). It has

been established that CD is strongly associated with the DQ2 heterodimer (DQA1\*0501/DQB1\*0201) that is encoded by more than 90% of coeliac patients.<sup>10</sup> The DQA1\*0501 and DQB1\*0201 genes are carried in the *cis* position in the DR3 bearing haplotype and in the *trans* position in the DR5/DR7 genotype. It has been suggested that the DR5/DR7 genotype confers a higher risk for developing the disease than the DR3/X genotype.<sup>11,12</sup> These haplotypes are different outside the HLA class II region. Another gene(s) in addition to class II haplotypes encoding DQA1\*0501/DQB1\*0201 may also contribute to the genetic predisposition to CD and can explain the observed associations.<sup>11-13</sup> Additionally, other genes, in different chromosomes, may play a role in the development of the disease.<sup>14</sup>

The pathogenesis of CD is relatively well known but some important questions remain unanswered. The role of intraepithelial TCR $\gamma\delta$  T cells, notably increased in coeliac patients, is one of these unanswered questions.<sup>11</sup> Recently, Groh and colleagues proved that a group of these T cells, expressing diverse V $\delta\gamma\delta$  T cell receptors (TCR), recognise MHC class I chain related molecules MICA and MICB,<sup>15</sup> two non-classic HLA

**Abbreviations:** MHC, major histocompatibility complex; HLA, human leucocyte antigen; MIC, MHC class I chain related gene; CD, coeliac disease; EH, extended haplotype; TCR, T cell receptor; PCR, polymerase chain reaction; SSP, sequence specific primers; OR, odds ratio; EF, ethiological fraction.

**Table 1** Distribution of the HLA-DQ2 heterodimer in patients with typical and atypical coeliac diseases (CD) and healthy controls

	Controls (n=116)	Atypical CD (n=54)	Typical CD (n=79)
DQA1*0501/DQB1*0201	25 (21.55%)	47 (87%)*	68 (86%)†

\* $p < 10^{-6}$ , odds ratio=24.44, 95% confidence interval (9.87–59.73), ethiological fraction=0.83.† $p < 10^{-6}$ , odds ratio=22.50, 95% confidence interval (10.48–47.94), ethiological fraction=0.82.

proteins mainly expressed by enterocytes under stressful conditions.<sup>16</sup> MICA is a polymorphic gene located 47 kb centromeric to HLA-B.<sup>17</sup> The high degree of linkage disequilibrium between MICA and HLA-B, and the particular tissue expression pattern of this molecule, are important in considering MICA as an additional gene in the development of CD.<sup>11,13</sup> In fact, recent studies show a clear relation between MICA TM polymorphism and type I diabetes,<sup>18</sup> autoimmune Addison's disease,<sup>19</sup> and psoriatic arthritis.<sup>20</sup>

The aim of this study was to examine whether MICA confers additional susceptibility to the classical DR/DQ haplotypes in patients with typical and atypical CD.

## METHODS

### Subjects

A total of 133 coeliac patients were included in the study (females 82, males 51; mean age 23.7 (18.2) years). All were ambulatory patients, recruited consecutively over a two year period (from January 1998 to December 1999) from two Spanish hospitals. These patients were followed up yearly at their respective adult and paediatric gastroenterology outpatient clinics and represented 100% of the total number of ambulatory coeliac patients followed up during this period. The ethics committees of our hospitals approved the protocol and all patients gave written informed consent before enrolling in the study.

Diagnosis of CD was made according to the revised European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) criteria.<sup>21</sup> All patients presented villous atrophy of variable degrees, with crypt hyperplasia of the small bowel mucosa, prior to commencement on a gluten free diet. Mean time of the gluten suppression period was 5.8 (4.6) years.

Coeliac patients were classified into typical and atypical, according to their clinical manifestations.<sup>2–8</sup> Seventy nine of the 133 patients (59.4%) had a clear digestive symptomatology, consisting of diarrhoea, flatulence, weight loss, and fatigue, and these patients were included in the typical form. Fifty four patients (40.6%) had extraintestinal, atypical, single predominant symptoms, or were symptomless, and were classified as atypical forms. The initial reason for consultation of these patients was anaemia (17), herpeticiform dermatitis (14), familial studies of coeliac patients (12), iron deficiency alone (6), and hypertransaminasaemia of unknown origin (5).

Mean age of the typical group was younger (18.2 (16.2) years) compared with the atypical group (31.6 (18.2) years) ( $p < 0.001$ ). Sex distribution in the typical group was 43 females and 34 males compared with 39 females and 17 males in the atypical group, with a greater proportion of females in the atypical group (NS). Mean age at the onset of symptoms was lower in the typical group (8.9 (13.9) years), compared with the atypical group (25.1 (18.1) years) ( $p < 0.001$ ). Age at diagnosis in the typical group was lower (11.5 (16.1) years) compared with the atypical group (29.4 (19.4) years) ( $p < 0.001$ ). Mean time on a gluten free diet was longer in the typical group (7.6 (6.7) years) than in the atypical group (3.2 (2.7) years) ( $p < 0.001$ ). Body mass index (BMI) was lower in the typical group (19.8 (3.7)) compared with the atypical group (22.4 (7.9)) ( $p < 0.01$ ).

No significant differences were found between the two groups of patients for concentration of haemoglobin, iron levels, serum ferritin, serum folic acid, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, serum IgA, or positivity of IgA antigliadin or antiendomysium antibodies, or in the degree of villous atrophy found in duodenal biopsies.

A total of 116 random healthy blood donors from the Spanish population, not related to the patients and with no history of intolerance to gluten or its derivatives, iron deficiency, anaemia, or any abnormality in biochemical studies and who were negative for antigliadin and antiendomysium antibodies, were included in the study for genetic comparison (50 males and 67 females; mean age 35.3 (12.4) years (range 18–62)).

### Laboratory methods

#### HLA typing

Analysis for typing class I antigens was performed using standard methods, and DNA polymerase chain reaction (PCR) amplification with sequence specific primers (SSP) was used to genotype the HLA-B allele<sup>22</sup> described as in linkage disequilibrium with DR3 and DR7. HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 class II alleles were typed by PCR/SSP<sup>23,24</sup> and by sequence specific oligonucleotide probes (PCR/SSOP; INNO-LiPA, Innogenetics NV Ghent, Belgium).

#### MICA-TM allele typing

For analysis of microsatellite repeat polymorphism in the MICA gene, PCR was carried out by the same procedure as described by Ota and colleagues<sup>25</sup> except for the use of the primers flanking the TM region: sense MICA 5'-ACATTCATGTTTCTGCTGTTG (MICA located 33 bp 3'- of exon 5) and the antisense primer 5'-TCACCTGG ACCCTCTGCAG (MICA exon/intron 5 boundary region).<sup>20</sup> The antisense primer was marked with Cy5'-amidite. Allele designation was based on the number of repeat units present in the PCR products and was detected using an automatic sequencer ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech). Four distinct alleles consisting of CGT repetitions were designated as A4 (104 bp), A5 (107 bp), A6 (110 bp), and A9 (119). One additional A5 (A5.1) with one nucleotide insertion (G) was also detected (108 bp).

### Statistics

Descriptive analyses were used to characterise the study population. The Fisher exact test was used to compare dichotomous variables, and an unpaired *t* test was used to compare differences in the means of continuous variables.

Allelic and haplotypic frequencies were calculated by direct counting and the significance of the association was determined using the  $\chi^2$  test (with Yates' correction). Haplotypic distribution was derived from molecular typing of HLA-B, HLA-DR, and the MICA gene. EHs were deduced according to the previously reported linkage disequilibrium.<sup>26</sup> The odds ratio (OR) was calculated by the cross product ratio. Exact confidence intervals (CI) of 95% were obtained. The *p* values were corrected (*p<sub>c</sub>*) by multiplying by the number of comparisons: five for MICA TM alleles, 15 for MICA genotypes, 26 for HLA-DR/DQ genotypes, 16 for HLA-DQA/DQB haplotypes, and 26 for HLA-DQA/DQB/DRB haplotypes. A *p<sub>c</sub>* value  $< 0.05$  was considered significant. The potential

**Table 2** Frequency of the diverse HLA haplotypes in patients with coeliac disease (CD) and in healthy controls

	Healthy controls (n=116)	Typical CD (n=79)	Atypical CD (n=54)	Typical versus atypical		
				p <sub>c</sub>	OR (95% CI)	EF
DR7/DQB1*0201	28 (24.13%)	41 (51.89%)*	13 (24%)	0.02	3.4 (1.58–7.29)	0.40
B8/DR3/DQB1*0201	12 (10.34%)	32 (40.5%)†	40 (74%)‡	0.001	4.19 (1.97–8.84)	0.56

OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval; EF, ethiological fraction.

\*p<sub>c</sub>=0.0026, OR=3.38, 95% CI (1.84–6.11), EF=0.36 (typical CD v healthy controls).

†p<sub>c</sub>=0.00003, OR=5.78, 95% CI (2.74–12.06), EF=0.33 (typical CD v healthy controls).

‡p<sub>c</sub><10<sup>-6</sup>, OR=24.28, 95% CI (10.27–56.26), EF=0.71 (atypical CD v healthy controls).

**Table 3** Major histocompatibility complex class I chain related gene A (MICA) TM alleles in Spanish coeliac disease (CD) patients and controls

Allele genotype	Atypical (n=54)	Typical (n=79)	Controls (n=116)	Atypical versus typical		
				p <sub>c</sub>	OR (95% CI)	EF
5.1	49 (90.74%)*	42 (53%)	51 (44%)	0.00006	8.63 (3.11–23.94)	0.81
4	9 (16.66%)	19 (24%)	30 (25.86%)	—	—	—
5	7 (13%)	20 (25%)	33 (28.44%)	—	—	—
6	21 (39%)	42 (53%)	50 (43.1%)	—	—	—
9	6 (11.11%)	13 (16%)	35 (30.17%)	—	—	—

OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval; EF, ethiological fraction.

\*p<sub>c</sub><10<sup>-6</sup>, OR=12.5, 95% CI (4.66–33.11), EF=0.84 (atypical v healthy controls).

impact for each marker was estimated by the ethiological fraction (EF) which indicates the proportion of disease cases among the total population that are attributable to one allele when OR > 1.

## RESULTS

### Distribution of DRB1/DQA1/DQB1 haplotypes in typical and atypical forms of coeliac disease

The DQA1\*0501/DQB1\*0201 heterodimer was carried by 86% of patients with the typical form and 87% with the atypical form of CD (table 1). No differences were found between the groups for distribution of the HLA-DR genotypes (data not shown). However, the distribution of haplotypes carrying the heterodimer was different between the two groups (table 2). EH8.1 (B8/DR3/DQB1\*0201) encodes the DQA1\*0501/DQB1\*0201 heterodimer in the *cis* position. A strong association of EH8.1 was found in atypical patients compared with healthy controls (p<sub>c</sub><10<sup>-6</sup>, OR=24.28, EF=0.71). This haplotype was also significantly increased in typical patients (p<sub>c</sub>=0.00003, OR=5.78, EF=0.33). However, when we compared the frequencies of EH8.1 in both groups of patients, we found that this haplotype was significantly increased in atypical forms compared with typical CD (p<sub>c</sub>=0.001, OR=4.19, EF=0.56). The incidence of the DR5/DR7 genotype carrying DQA1\*0501/DQB1\*0201 in the *trans* position was greater in the typical than in the atypical form of CD (17% v 1.85%; NS). The DR7/DQB1\*0201 haplotype (encoding a β chain of the heterodimer) was found in 51.8% of typical patients (p<sub>c</sub>=0.0026, OR=3.38, EF=0.36) whereas it was carried by only 24% of the atypical group (p<sub>c</sub>=0.02, OR=3.4, EF=0.4, atypical v typical).

### MICA-A5.1 allele is associated with atypical coeliac disease

We also investigated whether the differences observed with EH8.1 could be secondary to HLA class I genes, particularly at the MICA locus which has been suggested to be a candidate in the development of CD. Analysis of microsatellite polymorphism in the TM region of MICA showed a strong association between atypical forms and MICA-A5.1 (table 3). This allele was found in 91% of atypical patients and was carried by 44% of controls (p<sub>c</sub><10<sup>-6</sup>, OR=12.5, EF=0.84) and 53% of typical

patients (this latter finding was not significantly different from controls). Furthermore, significant differences were found in the distribution of the MICA-A5.1 allele among atypical and typical coeliac patients (p<sub>c</sub>=0.00006, OR=8.63, EF=0.81). Analysis of the MICA genotypes showed that A5.1/5.1 was present in 29% of atypical and in 13% of typical patients whereas it was carried by only 7% of controls (data not shown). Differences between atypical patients and controls for the A5.1/5.1 genotype reached statistical significance (p<sub>c</sub>=0.002, OR=5.68, EF=0.23).

### Increase in MICA-A5.1 in atypical coeliac disease is independent of B/DR/DQ linkage disequilibrium

Because MICA-A5.1 is associated with the EH8.1 haplotype, stratification was necessary to estimate the contribution of this allele independently of this linkage to susceptibility to the atypical CD form. All subjects, both patients and controls, who carried EH8.1 also carried the MICA-5.1 allele thus confirming the strong disequilibrium described between HLA-B and MICA. We investigated the MICA-A5.1 allele in a group of patients positive and negative for EH8.1 to establish whether MICA-A5.1, which predisposes to atypical CD, is due to linkage disequilibrium with EH8.1 (table 4). We examined 47 typical and 17 atypical patients not carrying the EH8.1 haplotype. The MICA-A5.1 allele was significantly increased in the atypical form (64.28% v 21.27%; p=0.004, OR=6.66,

**Table 4** Distribution of major histocompatibility complex class I chain related gene A (MICA)-A5.1 allele in extended haplotype (EH) 8.1 positive and negative coeliac disease (CD) patients

	n	MICA-A5.1
EH 8.1 positive		
Typical	32	32 (100%)
Atypical	40	40 (100%)
EH 8.1 negative		
Typical	47	10 (21.2%)
Atypical	14	9 (64.3%)*

\*p=0.004, odds ratio=6.66, 95% confidence interval (1.82–24.36), ethiological fraction=0.56.

EF=0.56). This confirms that the increased frequency of A5.1 in atypical forms is independent of EH8.1 association.

## DISCUSSION

It is well known that the clinical presentation of gluten sensitive enteropathy is highly variable and this variability can be attributed to diverse factors including genetic and environmental influences. The aim of this study was to investigate the involvement of the MHC region in the development of typical and atypical forms of CD.

The abovementioned typical form is often encountered in infants between 9 and 18 months of age. However, when CD appears in childhood or in adults, other digestive or extradigestive symptoms are more common. These patients may be symptomless and diagnosed only because of a systematic search through family studies or other risk groups. All of these late and frequently mild clinical forms of the disease must be included in the so-called "atypical" forms of the disease. In our study, the characteristics of both coeliac patient groups were in agreement with those previously described. Patients with a typical clinical presentation were younger, had a longer mean follow up time, and were on a gluten free diet for longer than those patients in the atypical group. We observed a more pronounced female predominance and a higher body mass index among atypical patients.

Our analysis of HLA confirms the association between DQA1\*0501/DQB1\*0201 and CD, a finding consistent with previously data.<sup>10,12</sup> No differences were found between groups for the distribution of the HLA-DR genotypes, as has been reported previously in other studies.<sup>27</sup> However, differences were found when we compared DR/DQ haplotype distribution. DR7/DQB1\*0201 was increased in typical patients and EH8.1 was strongly associated with atypical forms. Previous studies have suggested that these haplotypes confer an increased risk of developing CD.<sup>12</sup> Our results suggest that in addition to DQA1\*0501/DQB1\*0201, another possible gene present in EH8.1 and/or DR7/DQB1\*0201 haplotypes may modulate the development of CD. It has been suggested that an additional susceptibility gene(s) telomeric to class II contributes to CD susceptibility.<sup>11</sup> MICA is located 47 kb centromeric to HLA-B, is expressed on intestinal cells, and can be tested as a candidate gene in CD susceptibility. It has been reported that expression of this molecule is likely to be stress induced by promoter elements similar to heat shock protein (HSP70).<sup>17</sup> Our study showed that MICA-A5.1 transmembrane polymorphism was associated with a risk of atypical CD. This association could be the result of linkage disequilibrium with EH8.1. However, CD atypical patients carrying MICA-A5.1, but lacking EH8.1, were also significantly overrepresented compared with the group of typical patients. Thus the association found between MICA-A5.1 and atypical CD cannot be attributed exclusively to linkage disequilibrium with EH8.1.

Atypical CD is frequently associated with other autoimmune and endocrine diseases such as dermatitis herpetiformis, type 1 diabetes mellitus, and autoimmune Addison's disease. It has recently been shown that an unidentified gene in the class I region modifies the risk of developing both type 1 diabetes and CD.<sup>28</sup> It is notable that in APS-II Addison's disease and type 1 diabetes, a combination of MICA polymorphism and at risk class II haplotypes were associated with the highest genetic risks.<sup>18,19</sup> Furthermore, it has been described that autoimmunity to transglutaminase is prevalent among patients with type 1 diabetes expressing DQ2/DQ2 homozygous genotypes.<sup>29</sup> This result suggests that this prevalence probably corresponds with the predominance of DR3,3/DQ2,2 genotypes found in the atypical form. In addition, a significant number of the relatives of patients with type 1 diabetes have the silent form of CD associated with DRB1\*03/DQA1\*0501/DQB1\*0201.<sup>30</sup> Considering all of these observations, we hypothesise that the genetic factors determining type 1

diabetes and oligosymptomatic CD are closely linked with MICA-A5.1 in linkage disequilibrium with DR3/DQ2, and that this combination may play a role in the pathogenesis of both diseases.

In accordance with previous descriptions, the almost exclusive expression of MICA in gastrointestinal epithelium suggests that it may function as a ligand recognised by a subset of T $\delta\gamma\delta$  cells in the intestinal intraepithelial lymphocyte compartment.<sup>15</sup> Several studies have provided direct support for a functional role of the NKG2D receptor for MICA recognition on NK, T $\gamma\delta$ , and recently, CD8+ T cells.<sup>31</sup> The pattern of MICA tissue expression and the distribution of these cells correlate with the stage of mucosal transformation. In fact, intraepithelial recruitment of CD8+ and T $\gamma\delta$  cells is a characteristic feature of CD<sup>11</sup> which could participate in the destruction of the mucosa. This could be related to induced expression of MICA on intestinal epithelial cells that may be triggered by cellular stress mechanisms, infection, or inflammation. Recently, histological studies have demonstrated high expression of MICA molecule in biopsies of patients with active CD (S Caillat-Zucman, personal communication). The MICA-A5.1 allele carries a nucleotide insertion resulting in a premature stop codon which may encode a secreted form of the MICA molecule.<sup>32</sup> The MICA-A5.1 soluble form may protect against the development of typical CD by blocking or inhibiting enterocyte recognition and destruction by T $\delta\gamma\delta$  or CD8+ activated cells. This may be particularly important in patients DR3/DQ2 homozygous carrying the MICA-A5.1/5.1 genotype. In addition to DQ2 heterodimers, the presence of the MICA-A5.1 allele could explain the finding that DR3/DQ2 was found to be associated with the atypical form, and that DR5/DR7 was found to be prevalent in typical CD. These results provide a basis for further functional investigation of the roles that induced expression of MICA-A5.1 could play in the development of CD.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank David H Wallace (Member of the Council of Biology Editors and the Association of European Science Editors) for critical revision of the manuscript. This work was supported in part by a Spanish grant FIS 00/0208.

## Authors' affiliations

**A Lopez-Vazquez, S Garcia-Fernandez, J Martinez-Borra, C Lopez-Larrea**, Department of Immunology, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain  
**I Rodrigo, D Fuentes**, Department of Gastroenterology, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain  
**C Bousoño**, Department of Paediatrics, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain  
**S Riestra**, Gastroenterology Section, Hospital Valle del Nalón, Sama de Langreo, Asturias, Spain  
**S Gonzalez**, Functional Biology Department, University of Oviedo, Spain

## REFERENCES

- 1 Godkin A, Jewell D. The pathogenesis of coeliac disease. *Gastroenterology* 1998;**115**:206-10.
- 2 Catassi C, Rätsch JM, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994;**343**:200-3.
- 3 Not T, Horvath K, Hill ID, et al. Coeliac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol* 1998;**33**:494-8.
- 4 Ivarsson A, Persson LA, Juto P, et al. High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults: a Swedish population-based study. *J Intern Med* 1999;**245**:63-8.
- 5 Riestra S, Fernández E, Rodrigo I, et al. Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. *Scand J Gastroenterol* 2000;**35**:398-402.
- 6 Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease—active, silent, latent, potential. *Gut* 1993;**34**:150-1.
- 7 Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, et al. The clinical pattern of subclinical/silent coeliac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterol* 1999;**94**:691-6.
- 8 Corazza GR, Frisoni M, Treggiari EA, et al. Subclinical coeliac sprue. Increasing occurrence and clues to its diagnosis. *J Clin Gastroenterol* 1993;**16**:16-21.

- 9 **Farre C**, Humbert P, Vilar P, *et al*. Serological markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. *Dig Dis Sci* 1999;**44**:2344-9.
- 10 **Sollid L**, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;**105**:910-22.
- 11 **Sollid LM**. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:53-81.
- 12 **Fernandez-Arquero M**, Figueredo MA, Maluenda C, *et al*. HLA-linked genes acting as additive susceptibility factors in celiac disease. *Hum Immunol* 1995;**42**:295-300.
- 13 **Schuphan D**. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;**119**:234-42.
- 14 **Zhong F**, McCombs CC, Olson JM, *et al*. An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western counties of Ireland. *Nat Genet* 1996;**14**:329-33.
- 15 **Groh V**, Steinle A, Bauer S, *et al*. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;**279**:1737-40.
- 16 **Groh V**, Bahram S, Bauer S, *et al*. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:12445-50.
- 17 **Bahram S**, Bresnahan M, Geraghty DE, *et al*. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:6259-63.
- 18 **Gambelunghe G**, Ghaderi M, Cosentino A, *et al*. Association of MHC class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2000;**43**:507-14.
- 19 **Gambelunghe G**, Falorni A, Ghaderi M, *et al*. Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:3701-7.
- 20 **Gonzalez S**, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, *et al*. The MIC-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw\*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999;**42**:1010-16.
- 21 **Walker-Smith JA**, Guandalini S, Schmitz J, *et al*. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;**65**:909-11.
- 22 **Bunce M**, Fanning GC, Welsh KI. Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;**45**:81-90.
- 23 **Olerup O**, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;**39**:225-35.
- 24 **Olerup O**, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993;**41**:119-34.
- 25 **Ota M**, Katsuyama Y, Mizuki N, *et al*. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MIC-A gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uyghur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 1997;**49**:448-54.
- 26 **Dawkins R**, Leelayuwat C, Gaudieri S, *et al*. Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev* 1999;**167**:275-304.
- 27 **Greco L**, Percopo S, Clot F, *et al*. Lack of correlation between genotype and phenotype in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;**26**:286-90.
- 28 **Lie BA**, Sollid LM, Ascher H, *et al*. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* 1999;**54**:162-8.
- 29 **Bao F**, Yu L, Babu S, *et al*. One third of HLA DQ2 homozygous patients with type 1 diabetes express celiac disease-associated transglutaminase autoantibodies. *J Autoimmun* 1999;**13**:143-8.
- 30 **Hummel M**, Bonifacio E, Stern M, *et al*. Development of celiac disease-associated antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2000;**43**:1005-11.
- 31 **Groh V**, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, *et al*. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001;**2**:255-60.
- 32 **Mizuki N**, Ota M, Kimura M, *et al*. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MIC-A gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:1298-303.



Antonio Lopez-Vazquez · Luis Rodrigo  
Dolores Fuentes · Sabino Riestra · Carlos Bousoño  
Sonia Garcia-Fernandez · Jesús Martínez-Borra  
Segundo Gonzalez · Carlos Lopez-Larrea

## ***MICA-A5.1* allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients**

Received: 13 August 2001 / Revised: 26 November 2001 / Published online: 26 January 2002  
© Springer-Verlag 2002

**Abstract** We selected 38 consecutive celiac disease (CD) patients (from a group of 316 consecutive CD patients) and 91 healthy blood donors, all of whom were HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201) negative, and investigated the presence of the classically associated alleles *HLA-DQ8* and *HLA-DRB4*. We also studied the distribution of MICA transmembrane alleles in the two clinical forms of the disease. For this reason, these 38 DQ2-negative patients were subdivided into two groups: 18 typical CD patients and 20 atypical CD patients. No differences were found in the distribution of the *DRB4* allele between DQ2-negative patients and controls. The HLA-DQ8 heterodimer (DQA1\*03xx/DQB1\*0302) was increased in CD patients (29%) compared with controls (10%), but no statistical differences were found. No differences were observed in the frequency of these alleles between either group of CD DQ2-negative patients. *MICA-A5.1* was increased in atypical CD patients when compared with the typical forms of disease ( $P_c=0.03$ ) and with healthy controls ( $P_c=0.002$ ). No other MICA allele was found to be significantly increased in the groups under study. The presence of *MICA-A5.1* in

atypical CD DQ2-negative patients may indicate a possible role of this allele in the development of CD.

**Keywords** Celiac disease · DQ2-negative · *HLA-DQ* alleles · *MICA* alleles

Celiac disease (CD) is one of the most frequent chronic diseases found in Caucasians. It is characterized by digestive manifestations (diarrhea, abdominal pain and distension) and an associated malabsorption syndrome. It has been established that CD is strongly associated with the DQ2 heterodimer (DQA1\*0501/DQB1\*0201), which is expressed by more than 90% of celiac patients. The role of this molecule in development of the disease is well known. HLA-DQ2 presents deaminated peptides derived from gliadin to T CD4+ cells in the gut mucus of affected patients. This results in an important mucosal destruction that characterizes the clinical manifestations. A small percentage of celiac patients are negative for the susceptibility heterodimer. Several studies have associated other HLA alleles, especially *HLA-DQ8* and *HLA-DRB4* (Clot et al. 1999), to disease susceptibility in these patients, but these associations have not been observed in other studies in different populations (Partanen 2000; Garrote et al 2000).

It has been suggested (Sollid 2000) that an additional susceptibility gene(s) telomeric to class II may contribute to CD susceptibility. Recently, we have demonstrated an association between an *MICA5.1* polymorphism and atypical forms of CD in patients carrying the HLA-DQ2 heterodimer (Lopez-Vazquez et al. 2002). These patients are characterized by minimal or absence of digestive symptoms. Our results suggest that this gene may modulate the development of diverse forms of CD. MICA is located 47 kb centromeric to HLA-B and is expressed on the surface of intestinal epithelium cells and can be tested as a candidate gene in CD susceptibility (Sollid 2000). This stress molecule has been described as a ligand for T-cell antigen receptor (TCR)  $\gamma\delta$  lymphocytes

A. Lopez-Vazquez · S. Garcia-Fernandez · J. Martínez-Borra  
C. Lopez-Larrea (✉)  
Department of Immunology, Hospital Central de Asturias,  
C/ Celestino Villamil, 33.006 Oviedo, Spain  
e-mail: inmuno@hca.es  
Tel.: +34-985106130, Fax: +34-985106142

L. Rodrigo · D. Fuentes  
Department of Gastroenterology, Hospital Central de Asturias,  
Oviedo, Spain

C. Bousoño  
Department of Pediatrics, Hospital Central de Asturias,  
Oviedo, Spain

S. Riestra  
Gastroenterology Section, Hospital Valle del Nalón,  
Sama de Langreo, Asturias, Spain

S. Gonzalez  
Functional Biology Department, University of Oviedo, Spain

**Table 1** Differences in distribution of DQ8 heterodimer, *DRB4* and relevant *DRB1* alleles between CD patients and healthy controls

	CD DQ2-negative patients (n=38)	Healthy controls (n=91)
HLA-DQ8 (DQA1*03xx,DQB1*0302)	11 (29%)*	9 (10%)
HLA-DQA1*0501 (one susceptibility chain)	13 (34%)	21 (23%)
HLA-DQB1*0201 (one susceptibility chain)	14 (37%)	27 (30%)
<i>HLA-DRB1*0301</i>	1 (2.6%)	3 (3.3%)
<i>HLA-DRB1*04xx</i>	10 (26%)	23 (25%)
<i>HLA-DRB1*0701</i>	14 (37%)	26 (29%)
<i>HLA-DRB4</i>	22 (58%)	47 (52%)

\* $P_c=0.01$ ;  $P_c=NS$

**Table 2** Distribution of MICA transmembrane alleles in a Spanish population of healthy controls and in both typical and atypical forms of celiac disease (CD)

MICA allele	Typical CD (n=18)	Atypical CD (n=20)	Healthy controls (n=91)
<i>A5.1</i>	7 (39%)	17 (85%)* **	37 (40.6%)
<i>A6</i>	13 (72%)	10 (50%)	42 (46.1%)
<i>A5</i>	5 (27%)	4 (20%)	26 (28%)
<i>A4</i>	3 (16.6%)	4(20%)	23 (25%)
<i>A9</i>	1 (5.5%)	4 (20%)	27 (29.6%)

\* $P_c=0.002$ , OR=8.27, 95%CI (2.26–30.23), EF=0.75 (atypical versus healthy controls); \*\* $P_c=0.03$ , OR=8.9, 95%CI (1.89–41.94), EF=0.76 (atypical versus typical CD patients)

and the NK-G2D receptor (Groh et al. 1998), and may explain the role of TCR  $\gamma\delta$  T cells in CD.

The aim of this work was to analyze the distribution of diverse HLA alleles in a Spanish celiac DQ2-negative population, and to investigate the influence of the MICA gene polymorphism for genetic susceptibility to CD. We selected a group of 38 unrelated DQ2-negative individuals from a group of 316 consecutive CD patients, diagnosed in our hospital as celiac patients according to the ESPGAN criteria. They were divided into two groups according to their clinical manifestations: typical CD ( $n=18$ ) and atypical CD ( $n=20$ ). Ninety-one DQ2-negative unrelated blood donors were selected as healthy controls. All of these were typed by PCR-SSO for *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5* and *HLA-B* with RELI™-SSO typing kits (Dynal, Norway), and by PCR-SSP for *HLA-DQA1* and for *HLA-DQB1\*0201/02* ambiguity according to a previously described method (Olerup et al. 1993). MICA transmembrane alleles were typed by PCR with labeled primers as previously described (Lopez-Vazquez et al. 2002). Direct counting determined the phenotypic frequency, and the significance of the association was determined using the chi-squared test with Yate's correction. The  $P$  values were corrected ( $P_c$ ) by multiplying these by the number of comparisons. A  $P_c$  value  $<0.05$  was considered significant. The odds ratio (OR) was calculated by the cross-product ratio. Exact confidence intervals (CI) of 95% were obtained.

The average age at diagnosis in the typical group was lower ( $9.88\pm 6.65$  years) compared to the atypical group ( $20.05\pm 10.60$  years). This result reached statistical significance ( $P<0.01$ ). Therefore, these differences may be due to nonspecific symptoms of atypical forms of CD, which delay its diagnosis for several years.

No statistical significance was found when comparing the frequency of *HLA-DRB4* in DQ2-negative celiac pa-

tients with that of healthy controls in our study. This allele was found in 52% of our control population and in 58% of our CD patients. The frequency of the HLA-DQ8 heterodimer (DQA1\*03xx, DQB1\*0302) was clearly increased in patients (29%) compared with controls (10%), but this was not statistically significant (Table 1). No differences were found on comparing the different forms of the disease with each other. *HLA-B8* was more frequent in atypical than in typical patients (3 out of 20 versus 0 out of 18), but the differences did not reach statistical significance (data not shown). No differences were found in the distribution of these and other HLA alleles, between healthy controls and CD patients or between either of the CD groups.

A strong association of the *MICA-A5.1* allele with the atypical CD group of patients was found. This allele was found in 85% of the *HLA-DQ2*-negative atypical group, in 40% of controls [ $P_c=0.002$ , OR=8.27, etiologic fraction (EF)=0.75], and in 39% of the typical group ( $P_c=0.03$ , OR=8.90, EF=0.76). The *MICA-A6* allele was increased in the typical group of patients and *MICA-A9* was notably decreased, but the differences did not reach statistical significance (Table 2).

*MICA-A5.1* contributes to susceptibility in the atypical CD form independently of *HLA-DRB1*, *-DRB4*, *-DQA1*, *-DQB1* and *HLA-B* linkage disequilibrium (data not shown).

In agreement with previous reports, the almost exclusive expression of MICA in gastrointestinal epithelium may suggest that it functions as a ligand recognized by a subset of T $\delta 1$   $\gamma\delta$  cells in the intestinal intraepithelial lymphocyte compartment. In fact, intraepithelial recruitment of T $\gamma\delta$  cells is a characteristic feature of CD. The *MICA-A5.1* allele carries a nucleotide insertion, resulting in a premature stop codon, that may encode a secreted form of the MICA molecule. The *MICA-A5.1* soluble form may protect from CD by inhibiting the recognition

of intestinal tissue by T $\delta$ 1 $\gamma$  $\delta$  or NK-activated cells. This might be particularly important in *HLA-DQ2*-positive patients, in which we found that *MICA-A5.1* was associated with atypical forms of CD, and it may possibly explain the greater risk for patients with *HLA-DR3/DR7* genotype as compared with *DR3/DR3*, who are homozygous for the *MICA-A5.1* allele. A modifying influence by the MICA gene might be a general mechanism that can be related to other autoimmune diseases. In fact, atypical CD is frequently associated with other autoimmune diseases such as dermatitis herpetiformis, type I diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease. It is notable that in APS-II Addison's disease, the combination of *MICA-A5.1* allele and high-risk class II haplotypes is associated with a higher genetic risk (Gambelunghé et al. 1999).

In conclusion, *MICA-A5.1* may be protective or may modulate the phenotypic expression of CD in both DQ2-positive and -negative CD patients. The functional role of MICA in the pathogenesis of CD remains to be clarified.

**Acknowledgements** We wish to thank David H. Wallace (member of the Council of Biology Editors and the Association of European Science Editors) for critical revision of the manuscript. This work was supported in part by a Spanish grant FIS 00/0208.

## References

- Clot F, Gianfrani C, Babron M-C, Bouguerra F, Southwood S, Kagnoff MF, Troncone R, Percoppo S, Eliaou J-F, Clerget-Darpoux F, Sette A, Greco L (1999) HLA-DR53 molecules are associated with susceptibility to celiac disease and selectively bind gliadin-derived peptides. *Immunogenetics* 49:800–807
- Gambelunghé G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi CB (1999) Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3701–3707
- Garrote JA, Arranz E, Blanco-Quiros A (2000) The *HLA-DRB4* gene is present in half of the Spanish HLA-DQ2 negative celiac patients. *Immunogenetics* 51:1045–1046
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells. *Science* 279:1737–1740
- López-Vázquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, García-Fernández S, Martínez-Borra J, González S, Lopez-Larrea C (2002) MHC class I chain-related gene A (MICA) modulates the development of celiac disease in patients with the high-risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201. *Gut* 50:336–340
- Olerup O, Aldener A, 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
- Partanen J (2000) The HLA-DRB4 gene does not explain genetic susceptibility in *HLA-DQ2*-negative patients. *Immunogenetics* 51:249–250
- Sollid LM (2000) Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 18:53–81

# MHC Class I Region Plays a Role in the Development of Diverse Clinical forms of Celiac Disease in a Saharawi Population

Antonio López-Vázquez, M.D.,\* Dolores Fuentes, M.D., Luis Rodrigo, M.D., Segundo González, M.D., María Moreno, M.D., Eloy Fernández, M.D., Jesús Martínez-Borra, Bs.C., and Carlos López-Larrea, M.D.  
*Department of Immunology; Department of Gastroenterology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo; Department of Functional Biology, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain; and Department of Clinical Biochemistry, Hospital de Cabueñes, Gijón, Spain*

- OBJECTIVE:** The aim of this study was to investigate the association of MHC genes in the development of celiac disease (CD) and its diverse clinical forms in a Saharawi population.
- METHODS:** One hundred and twenty-five CD patients and 98 healthy controls were selected from the Saharawi refugee camps in Tindouf. All were investigated for the presence of antitransglutaminase 2 antibodies. Patients were divided into two groups according to their clinical manifestations: 70 *typical* and 55 *atypical*. Patients and controls were typed for HLA-B, DRB1, DQB1, and DQA1, and for MICA transmembrane polymorphism.
- RESULTS:** The frequency of HLA-DQ2 in Saharawi controls was notably increased compared with other populations. No differences in the distribution of DQ2 in either group of patients were found. However, the haplotype B8/DR3/DQ2 was notably overrepresented in *atypical* patients compared to *typical* ones ( $p_c = 0.001$ ). The MICA-A5.1 allele was increased in *atypical* CD patients compared to those with *typical* forms ( $p_c = 0.0006$ ). Finally, we found that the increased frequency of MICA-A5.1 in the *atypical* group was independent of the linkage disequilibrium with B8/DR3/DQ2 haplotype ( $p = 0.02$ ).
- CONCLUSIONS:** The elevated prevalence of CD in Saharawi seems to be related to the high frequency of HLA-DQ2 in this population. However, the development of *atypical* or *typical* forms of the disease may be due to a gene or genes located in the class I side of the haplotype B8/DR3/DQ2, especially MICA. This appears not to be implicated in the susceptibility to CD but may play an important role in the development of the different forms of the disease.

## INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is one of the most prevalent enteropathies in developed countries. This disease is induced by gluten contained in wheat and other cereals, such as barley, rye, and oats, in genetically susceptible individuals. The immune system of the small bowel mucosa of these patients reacts against gluten and induces an immune response that causes villous atrophy and crypt hyperplasia. The pathogenesis of CD seems to be directly related to an abnormal immune response against glutamin-rich gliadin-derived peptides, previously deamidated by tissue transglutaminase (1). This enzyme has been recognized as the target of antiendomysium antibodies, the most characteristic serological marker of CD (2). The interaction of the HLA-DQ2 heterodimer binding these peptides with TCR of CD4+ T lymphocytes in the lam-

ina propria of the small bowel mucosa induces secretion of interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and other cytokines (1). This mechanism may explain most of the pathological changes in mucosa, but other important alterations remain unclear.

Recent screening studies performed in several populations of different origin have shown that the real prevalence of CD is higher than that reported in classical studies (3–6). However, the real impact of this pathology in the underdeveloped world is not well studied, and CD could really be a serious health problem in these countries. One exceptional case is that of the Saharawi people of the Tindouf refugee camps in southwest Algeria. These people are native to the former Spanish colony of the Western Sahara and are of Arab and Berber origin, and have previously been well studied by Catassi *et al.* Such studies have demonstrated that the prevalence of CD in this population (5.6% of the children are celiac) is the highest described worldwide (7).

It is well known that CD is strongly associated with the HLA-DQ2 heterodimer (DQA1\*0501/DQB1\*0201) that is

\*The contribution to this study of Antonio López-Vázquez and Dolores Fuentes is equal and the order of authorship is arbitrary.

carried by more than 90% of the patients (8). Some patients are DQ2-negative, and these are classically associated with HLA-DQ8\*. However, some recent studies have suggested that an additional susceptibility gene(s) telomeric to class II contribute(s) to CD susceptibility, especially the alleles MICA-A5.1, MICB-CA24, and MIB-350 all characteristic of the B8-DR3 extended haplotype (9). We have also recently demonstrated an association between MHC class I chain-related gene A (MICA) allele 5.1 and *atypical* forms of CD in both DQ2 positive and negative patients (10, 11). Our results suggest that this gene may modulate the development of diverse forms of CD, especially those without digestive manifestations. This gene is located 47 Kb centromeric to HLA-B locus and is in strong linkage disequilibrium with it. MICA is expressed on intestinal epithelium cells and has been suggested as a candidate gene in CD susceptibility (1, 12). This molecule acts as a natural ligand of NK,  $\gamma\delta$ , and  $\alpha\beta$  CD8+ T cells through the NKG2D receptor, and plays an important role in immune surveillance against infections and tumor transformation (13, 14).

The aim of this study was to investigate the distribution of diverse HLA haplotypes and MICA-TM alleles in two groups of celiac Saharawi patients and the possible relationship of these with increased prevalence of CD in this population. Moreover, we have investigated the possible association of MICA-TM alleles with the development of *atypical* or *typical* forms of celiac disease.

## METHODS

### Subjects

One hundred and twenty-five celiac patients were included in the study. All patients were recruited by two members of our group in the Tindouf refugee camps during a visit in May 2002. Due to unexpected difficulties, we were unable to obtain biopsies from each patient in order to establish a diagnosis. However, 82 patients had been diagnosed previously by Catassi *et al.* (7) and the 43 new patients, of a total of 650 studied, were classified as celiacs by their clinical features and by the presence of IgA anti-TG2 autoantibodies, prior to commencement on a gluten-free diet. Moreover, all patients studied were screened for IgA deficiency, with the aim of evaluating the presence of anti-TG2 IgG class antibodies in those who were negative for IgA class. Only two patients had IgA deficiency, but both were negative for IgG anti-TG2 antibodies. The presence of a familial history of CD was not taken into consideration in the screening of new cases. All CD patients were classified into *typical* and *atypical*, according to their clinical manifestations. Sixty-seven patients had a classical digestive symptomatology, consisting of diarrhea, flatulence, weight loss, and fatigue. These patients were classified as having *typical* forms of CD. Fifty-seven had extraintestinal, single-predominant symptoms, or were even symptomless (silent or latent CD), and were thus classified as *atypical* forms (4, 15, 16). Most of these patients

presented anemia as the predominant manifestation and were diagnosed only by the presence of anti-TG2 antibodies.

Ninety-eight healthy controls from the Saharawi population, all of whom were without direct familial relationship with CD patients, without history of intolerance to gluten and derivatives, without iron deficiency, anemia, or any abnormal finding in the biochemical studies, and with negativity for anti-TG2 antibodies, were included in the study for genetic comparison.

Saharawi's Tindouf Health Authorities granted permission for the study, and all patients and controls gave informed consent before enrollment.

### Laboratory Methods

**DNA EXTRACTION.** Two milliliters of peripheral blood was obtained from each patient and control and was mixed with 2 ml ethanol for storage until the specimens were processed. Ethanol was removed by washing twice with PBS (phosphate-buffered saline). Finally, genomic DNA was obtained with Nucleospin Blood L<sup>TM</sup> kits from Macherey-Nagel, Düren, Germany.

**DETERMINATION OF TRANSGLUTAMINASE 2 AUTOANTIBODIES.** Five milliliters of blood serum were obtained from each individual and anti-TG2 antibodies were determined by ELISA (enzyme-linked immunoassay) with Celikey<sup>TM</sup> kits (Pharmacia Diagnostics, Piscataway, NJ). Reference values were established between 5 U/ml and 8 U/ml: a measurement less than 5 U/ml was considered negative and one greater than 8 U/ml was considered as positive. Values between these were not considered.

**HLA TYPING.** All patients and healthy controls were typed by PCR-SSO for HLA-DQB1, HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-B with RELI<sup>TM</sup>-SSO typing kits (Dynal, Norway), and by PCR-SSP for HLA-DQA1 and HLA-DQB1\*0201/02 ambiguity according to a previously described method (17).

**MICA-TM ALLELE TYPING.** Microsatellite repeat polymorphism in the transmembrane region of MICA gene was analyzed by PCR with a method previously described (18). Four distinct alleles consisting of CGT repetitions were designated as A4 (104 bp), A5 (107 bp), A6 (110 bp), and A9 (119 bp). One additional A5 (A5.1) with one nucleotide insertion (G) was also detected (108 bp).

**STATISTICAL ANALYSIS.** Descriptive analyses were used to characterize the study population. The Fisher exact test was used to compare dichotomous variables, and an unpaired *t*-test was used to compare differences in the means of the continuous variables. Allelic and haplotypic frequencies were calculated by direct counting and the significance of the association was determined using the  $\chi^2$  test (with Yates' correction). Haplotypic distribution was derived from molecular typing of the HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ, and MICA gene.

**Table 1.** Characteristics of both the Groups of CD Patients and Healthy Controls Included in the Study

	Atypical CD n = 57	Typical CD n = 67	Healthy Controls n = 98
Gender			
Male	13	24	38
Female	44	43	60
Mean age	21.8 ± 14.44	10.6 ± 5	21.3 ± 13.8
Familial history	32 (56%)	27 (40%)	–
Associated autoimmune diseases	9 (16%)*	1 (1.5%)	–

\* $p = 0.006$ , OR = 12.37, 95% CI (1.51–100.97).

Extended haplotypes (EH) were deduced according to the previously reported linkage disequilibrium. The odds ratio (OR) was calculated by the cross-product ratio. Exact confidence intervals (CI) of 95% were obtained. The  $p$ -values were corrected ( $p_c$ ) by multiplying these by the number of comparisons: 20 for HLA-B alleles, 5 for MICA TM alleles, and 16 for HLA-DQA/DQB haplotypes. A  $p_c$  value less than 0.05 was considered significant.

## RESULTS

The mean age of the *atypical* group was greater than that of the *typical* one (21.8 ± 14.44 yr vs. 10.6 ± 5 yr). The age of disease onset was not established because it is very difficult to estimate when CD appears in *atypical* patients, especially in those presenting few symptoms or in asymptomatic ones. A notably increased proportion of females was found in this group (4:1). Moreover, patients with *atypical* forms of CD had an increased frequency of associated autoimmune diseases such as diabetes mellitus, dermatitis herpetiformis, thyroiditis, etc. compared to the *typical* group (16% vs 1.5%,  $p = 0.006$ ), and familial aggregation was also more frequent (60% vs 40%) (Table 1).

Our findings demonstrate that the DQA1\*0501/DQB1\*0201 heterodimer was clearly associated with CD in the Saharawi population ( $p_c < 10^{-5}$ , OR = 10.63), as has been

previously described (18). In addition, the susceptibility heterodimer was increased in both forms of the disease when these were compared with the healthy controls. HLA-DQ2 was carried by 86.5% ( $p_c < 10^{-5}$ , OR = 9.34) of the patients with a *typical* form of the disease and by 91% ( $p_c < 10^{-5}$ , OR = 15.08) with the *atypical* form (Table 2). Furthermore, we found that the number of healthy controls who carried the HLA-DQ2 heterodimer was notably higher than that described in our previous study in a Spanish population (8) (41% vs 21.5%;  $p_c = 0.04$ ) and in other studies in several Caucasian populations (data not shown). The HLA-DQ8 heterodimer was found in 41% of Saharawi CD patients and in only 12% of the healthy controls but these differences did not achieve statistical significance when  $p$ -correction was applied ( $p = 0.01$ ,  $p_c = \text{NS}$ ). HLA-DQ8 was also increased in *typical* CD patients (55.5%,  $p = 0.007$ ,  $p_c = \text{NS}$ ) (Table 2).

HLA-DR alleles showed a similar distribution between the groups of patients. As expected, the DR3/DQ2 haplotype was clearly increased in *typical* patients (73%) and in *atypical* ones (89%) when these were compared with healthy controls. No other differences in the distribution of DR/DQ haplotypes were found among the diverse groups studied.

We then analyzed the distribution of HLA-B alleles among the groups. As our previous study in a Spanish population demonstrates, a strong association of the haplotype HLA-DQ2/DR3/B8 exists in *atypical* patients compared to healthy controls ( $p_c < 10^{-5}$ , OR = 9.39). This haplotype was also overrepresented in *typical* patients (37%) but differences did not reach statistical significance. However, its frequency was significantly increased in *atypical* forms compared with *typical* ones ( $p_c = 0.001$ , OR = 4.59) (Table 2, Fig 1). No other HLA haplotypes were found to be associated with CD or with different forms of the disease.

We also investigated whether the differences observed with this haplotype could be secondary to the MICA locus, which has been suggested as a candidate gene in the development of CD. Analysis of microsatellite polymorphism in the TM region of MICA showed a similar result. MICA-A5.1 was increased in the *atypical* forms of the disease (Table 3). This allele was found in 86% of Saharawi *atypical* patients and was carried by only 47% of the controls

**Table 2.** Distribution of the Susceptibility Heterodimers and Haplotypes in CD Patients and Healthy Controls

	CD Patients n = 125	Typical CD Patients n = 67	Atypical CD Patients n = 57	Healthy Controls n = 98
HLA-DQ2	110 (88%)	58 (86.5%)	52 (91%)	40 (41%)
HLA-DQ8 in DQ2 negative	6 of 15 (40%)	5 of 9 (55.5%)	1 of 5 (20%)	7 of 58 (12%)
DR3/DQ2	100 (80%)	49 (73%)	51 (89%)	36 (37%)
DRx/DQ2	10 (7%)	9 (13%)	1 (2%)	4 (4%)
B8/DR3/DQ2	65 (52%)	24 (36%)	41 (72%)	21 (21%)

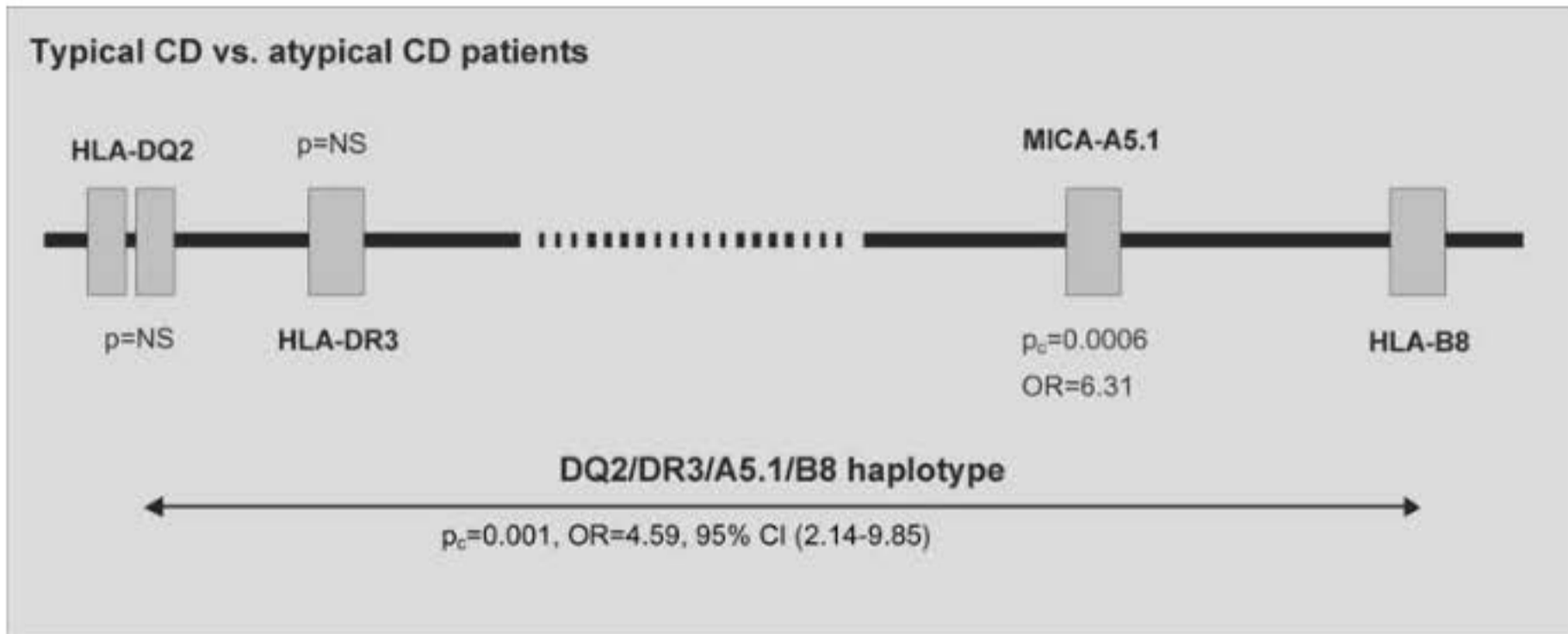
$p_c < 10^{-5}$ , OR = 10.63, 95% CI (5.42–20.84) DQ2 in CD vs healthy controls.

$p_c < 10^{-5}$ , OR = 9.34, 95% CI (4.16–20.99). DQ2 in typical CD vs healthy controls.

$p_c < 10^{-5}$ , OR = 15.08, 95% CI (5.53–41.08). DQ2 in atypical CD vs healthy controls.

$p_c < 10^{-6}$ , OR = 9.39, 95% CI (4.43–19.94) B8/DR3/DQ2 in atypical CD vs healthy controls.

$p_c = 0.001$ , OR = 4.59, 95% CI (2.14–9.85). B8/DR3/DQ2 in atypical vs typical CD.



**Figure 1.** Genetic map of HLA-B8/DR3/DQ2 haplotype in both groups of Saharawi CD patients. *Atypical* and *typical* forms of the disease share the same class II region (DR/DQ) but are clearly different on the class I side of the haplotype (MICA/HLA-B).

( $p_c < 10^{-5}$ , OR = 6.92) and 49% of the *typical* patients. These frequencies show a clear difference in the distribution of the MICA-A5.1 allele among *atypical* and *typical* celiac patients and such differences achieved statistical significance ( $p_c = 0.0006$ , OR = 6.31). Nevertheless, when the distribution of this allele in a group, which includes all CD patients independently of the disease form, was compared with healthy controls, the differences did not reach statistical significance (Table 3).

Stratification was necessary to estimate whether the linkage of this allele's susceptibility to the *atypical* CD form was independent of HLA-DQ2/DR3/B8 haplotype, which habitually included MICA-A5.1. All subjects, both patients and controls, who carried this haplotype, also carried the MICA-5.1 allele. We investigated the MICA-A5.1 allele in a group of patients positive and negative for HLA-DQ2/DR3/B8 in order to establish whether MICA-A5.1, which predisposes for *atypical* CD, is due to linkage disequilibrium with this haplotype (Table 4). We compared 42 *typical* and 16 *atypical* patients who did not carry the haplotype. The MICA-A5.1 allele was significantly increased in the *atypical* form (50% vs 19%;  $p = 0.02$ , OR = 4.25). This confirms that the increased frequency of A5.1 in *atypical* forms is independent of the inclusion of this allele in the DQ2/DR3/B8 haplotype.

Finally, patients were classified according to the presence of a family history of CD. In the first group, that is, those with a family history, the MICA-A5.1 allele was increased in patients who had *atypical* CD compared to those presenting *typical* CD ( $p = 0.007$ , OR = 5.81) (data not shown). A similar distribution of this allele was found in the group of patients with no affected family members ( $p = 0.004$ , OR = 7.33) (data not shown). As our results show, the association of the MICA-A5.1 allele with *atypical* forms of the disease was not related to the family history of CD.

## DISCUSSION

Although the presentation of CD is very variable, it can be classified into *typical* or *classical* CD and *atypical* CD, according to the clinical point of view. The *atypical* forms of the disease could be considered very heterogeneous, but can be characterized by a lack of gastrointestinal manifestations. Our findings show a clear difference in mean age between both groups of patients, but these differences may be due to the considerable delay in diagnosing *atypical* patients, and is therefore possibly not related to a late onset of the disease.

The variability of CD can be attributed to diverse factors, including genetic and environmental ones (1). The aim of this study was to investigate the involvement of the MHC region

**Table 3.** Distribution of the MICA-TM Alleles in CD Patients and Healthy Controls

MICA	Saharawi CD n = 125	Atypical CD n = 57	Typical CD n = 67	Healthy Controls n = 98
4	18 (14%)	10 (18%)	8 (11%)	17 (16.5%)
5	22 (18%)	6 (11%)	16 (23%)	22 (21%)
5.1	82 (66%)	49 (86%)*	33 (49%)	46 (47%)
6	66 (53%)	22 (40%)	44 (63%)	57 (58%)
9	24 (19%)	10 (18%)	14 (20%)	29 (28%)

\* $p_c = 0.0006$ , OR = 6.31, 95% CI (2.6–15.33), MICA-A5.1 Atypical vs typical CD patients.

\* $p_c < 0.00001$ , OR = 6.92; 95% CI (2.97–16.14), MICA-A5.1 Atypical vs healthy controls.

**Table 4.** Distribution of MICA-A5.1 Allele in B8/DR3/DQ2 Positive and Negative Patients in Both Groups of CD Patients

	n	MICA-A5.1
B8/DR3/DQ2 positive		
Atypical	41	41 (100%)
Typical	25	25 (100%)
B8/DR3/DQ2 negative		
Atypical	16	8 (50%)*
Typical	42	8 (19%)

\* $p = 0.02$ , OR = 4.25; 95% CI (1.57–21.57).

in the susceptibility to CD and in the development of *typical* and *atypical* forms of the disease in a western Saharan population. The data obtained in our study demonstrate the considerable role that genetics plays in the increased risk of CD in this population. This could be related to the elevated frequency of the HLA-DQ2 heterodimer in Saharawi. As previously mentioned, this heterodimer was carried by 41% of the Saharawi healthy controls.

Our analysis of HLA has confirmed the association between HLA-DQ2 heterodimer and CD, a finding consistent with data previously reported in the Saharawi population (19). Moreover, the HLA-DQ8 heterodimer, reported as another susceptibility factor in CD, was clearly increased in patients, but differences were not significant, possibly due to the size of the sample. As reported above, no differences were found between groups when the distribution of the HLA-DQ susceptibility heterodimers was compared. These results indicate that the different manifestations of CD are not modulated directly by HLA-DQ2 or DQ8 heterodimers, and may be due to other mechanisms different from those that are directly related with CD. Thus, the different haplotypes carrying DQA\*0501/DQ1\*0201 have a distinct effect on the susceptibility to CD. This study suggests that, in addition to the HLA-DQ2 and DQ8 heterodimers, another possible gene present on the class I side of the HLA-DQ2/DR3/B8 haplotype may modulate the disease, thus conditioning the development of a slow progression and less aggressive forms of CD, that is, the so-called *atypical* forms (Fig. 1).

Our previous studies on Spanish CD patients have demonstrated that the MICA-A5.1 transmembrane polymorphism is associated with the risk for *atypical* CD and its association is not the result of linkage disequilibrium with HLA-DQ2 and HLA-B8 (10). The finding of very similar results in a population with a different genetic background seems to confirm the role of MICA (or another gene close to this) in the modulation of CD. A recent study has shown that an unidentified gene in the class I region modifies the risk of developing both type I diabetes and CD (20). It is notable that in type I diabetes mellitus the MICA-A5.1 allele is also associated with latent or less aggressive forms of this disease (21). Moreover, this form of IDDM is clearly predominant in adult-like *atypical* CD forms, and is also underdiagnosed. Bearing in mind these observations it is possible to hypothesize that the genetic factor determining latent IDDM and oligosymptomatic

or extradiagnostic CD is close to MICA-A5.1 in linkage disequilibrium with DR3/DQ2, and that this combination may play a role in the modulation of the symptomatology of both diseases. Moreover, a recent study has reported that the forms without intestinal involvement of juvenile Beçhet's disease are also associated with the MICA-A5.1 allele (22), and that this is also increased in the distal or less aggressive forms of ulcerative colitis (23).

Previous studies have suggested that the MICA molecule expressed in the gastrointestinal epithelium may function as a ligand recognized by a subset of CD8+ T cells and T $\delta$ 1  $\gamma\delta$  cells in the intestinal intraepithelial lymphocyte (IEL) compartment (24). Other studies have provided direct support for the functional role of the NKG2D receptor for MICA recognition on T CD8+, NK, and T $\gamma\delta$  cells. The pattern of MICA tissue expression and the distribution of these cells could correlate with the initial stages of CD. In fact, intraepithelial recruitment of CD8+ and T $\gamma\delta$  cells is a characteristic feature of these stages of CD (1). We have observed in our current studies a high expression of the MICA molecule in the biopsies of some patients with CD, especially in those with less structural damage of the mucosa (unpublished data).

A recent study suggests that the MICA-A5.1 allele could encode an altered form of the MICA protein without the intracytoplasmic tail that could be expressed in the apical zone of enterocytes, whereas the other MICA TM alleles could be expressed mainly in the baso-lateral region (25). This particular expression pattern may affect the interaction with IELs and this may provide a protective effect in gut epithelium, which could explain the absence of intestinal manifestations in *atypical* patients. Other authors refer to the possibility that the A5.1 allele may encode a secreted form of the MICA molecule (26). Other studies in relation to the functional role of these molecules have demonstrated that some soluble forms of MICA are implicated in the immune evasion of tumors by blocking the recognition of tumoral cells by NK lymphocytes (27). This mechanism may also protect against the development of intestinal symptoms, by blocking or inhibiting enterocyte recognition and destruction by activated IELs in *atypical* patients. Additionally, Maiuri *et al.* (28) demonstrate that a nonimmunodominant gliadin fragment can activate the innate immune system by inducing the release of IL-15, a cytokine that can selectively upregulate the production and the function of the NKG2D receptor (29). All these results support the possible role of the MICA molecule in the pathogenesis of CD, and provide a real basis for further investigation into the possibility that the induced expression of different alleles of MICA could affect the development of diverse forms of this disease.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Maana El Kounti and his team, and Begoña García Martín for their invaluable collaboration. We also wish to thank David H. Wallace (member of the Council of Science Editors and the European Association of Science



Editors) for critical revision of the manuscript. This work was supported in part by Spanish grants FIS PI020058 and FICYT PC-REC01-03, and was done with the collaboration of CAJASTUR.

**Reprint requests and correspondence:** Dr. Carlos López-Larrea, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias, Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain

Received July 4, 2003; accepted January 5, 2004.

## REFERENCES

- Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;18:53–81.
- Dieterich W, Laag E, Schopper H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115(6):1317–21.
- Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, et al. Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:398–402.
- Catassi C, Ratsch I-M, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: Exploring the iceberg. *Lancet* 1994;343:200–3.
- Not T, Horvath K, Hill ID, et al. Celiac disease risk in the USA: High prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:494–8.
- Ivarsson A, Persson LA, Juto P, et al. High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults: A Swedish population-based study. *J Intern Med* 1999;245:63–8.
- Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999;354(9179):647–8.
- Sollid L, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: Genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;105:910–22.
- Bolognesi E, Karell K, Percopo S, et al. Additional factor in some HLA DR3/DQ2 haplotypes confers a fourfold increased genetic risk of celiac disease. *Tissue Antigens* 2003;61(4):308–16.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, et al. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201. *Gut* 2002;50(3):336–40.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, et al. MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics* 2002;53(10–11):989–91.
- Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:234–42.
- Das G, Janeway CA, Jr. MHC specificity of iIELs. *Trends Immunol* 2003;24(2):88–93.
- Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 2003;24(2):82–7.
- Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut* 1993;34:150–1.
- Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, et al. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: An analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterology* 1999;94:691–6.
- Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993;41(3):119–34.
- Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, et al. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw\*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999;42(5):1010–6.
- Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, et al. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens* 2001;58(6):402–6.
- Lie BA, Sollid LM, Ascher H, et al. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* 1999;54(2):162–8.
- Gambelunghe G, Ghaderi M, Tortoioli C, et al. Two distinct MICA gene markers discriminate major autoimmune diabetes types. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(8):3754–60.
- Picco P, Porfirio B, Gattorno M, et al. MICA gene polymorphisms in an Italian paediatric series of juvenile Behcet disease. *Int J Mol Med* 2002;10(5):575–8.
- Fdez-Morera JL, Rodrigo L, López-Vázquez A, et al. MHC class I chain related gene A (MICA) transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Human Immunol* 2003;66(8):816–22.
- Groh V, Steinle A, Bauer S, et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells. *Science* 1998;279:1737–40.
- Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, et al. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(5):2977–82.
- Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;18(94):1298–303.
- Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419(6908):734–8.
- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 2003;362(9377):30–7.
- Roberts AI, Lee L, Schwarz E, et al. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* 2001;167(10):5527–30.

## Association of MHC Class I Related Gene B (MICB) to Celiac Disease

Segundo González, M.D., Luis Rodrigo, M.D., Antonio López-Vázquez, M.D., Dolores Fuentes, M.D., Lorena Agudo-Ibáñez, Bs.C., Sandra Rodríguez-Rodero, Bs.C., Juan Luis Fdez-Morera, M.D., Jesús Martínez-Borra, Bs.C., and Carlos López-Larrea, Ph.D.

Department of Functional Biology, University of Oviedo, Spain; Department of Gastroenterology, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain; and Department of Immunology, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain

- BACKGROUND AND AIMS:** Celiac disease (CD) is an enteropathic disorder characterized by strong association with HLA-DQ2. Our aim was to investigate whether MICB, a gene located in the MHC class I region, may contribute to CD susceptibility.
- PATIENTS AND METHODS:** Total of 133 CD patients, previously reported to be associated with MICA-A5.1, and 116 controls were initially analyzed. Twenty-eight additional DQ2-negative CD patients were also studied. MICB was typed by PCR using sequence-specific primers. HLA-B, -DRB1, -DQA1, -DQB1, and MICA were also typed.
- RESULTS:** The allele MICB0106 was strongly associated with CD ( $p_c < 0.000001$ , odds ratio (OR) = 5.6, 95% confidence interval (CI) = 3.1–10.1) and it was overrepresented in atypical patients compared with typical ones ( $p_c = 0.04$ , OR = 2.9, CI = 1.4–6.1). MICB0106 was part of DR3-DQ2 haplotype (B8-MICA-A5.1-MICB0106-DR3-DQ2), and consequently a strong linkage disequilibrium between MICB0106 with DQ2 ( $\lambda_s = 1$ ) and MICA-A5.1 ( $\lambda_s = 0.55$ ) was found. To analyze whether the association of MICB is independent of this haplotype, its association was also studied in DQ2-negative patients ( $n = 46$ ). DQ8 (28% vs 9%,  $p = 0.0085$ ,  $p_c = NS$ ) and MICB0104 (52% vs 30%,  $p = 0.01$ ,  $p_c = NS$ ) were increased in DQ2-negative patients. MICA-A5.1 was significantly increased in atypical patients ( $p_c = 0.001$ , OR = 6.4, CI = 2.2–18.4), and this association was independent of DQ2 and DQ8 ( $p_c = 0.02$ , OR = 2.6, CI = 1.1–6.1).
- CONCLUSIONS:** The expression of MIC genes on enterocytes under stressful conditions and their function as ligands of intraepithelial  $\gamma\delta$  and CD8 T cells, together with the data presented here suggest a potential role of MIC genes in the pathogenesis of CD.

### INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is a chronic inflammatory disease triggered by intolerance to wheat gliadins and related prolamins that result in villus atrophy in the small intestine. CD is one of the most prevalent chronic diseases found in Caucasians (one in 200–400 individuals), but only 20–50% of those affected have subjective symptoms (1–3). CD patients, who have clear digestive symptomatology, such as diarrhea and malabsorption, have been classified as having the *typical* forms of disease. Oligosymptomatic or completely asymptomatic CD patients have been grouped together as *atypical* forms (4), which are more common among subjects included in several risk groups for CD, such as those represented by autoimmune disease and first degree relatives (5, 6).

The etiology of CD is multifactorial and involves genetic and environmental factors (7–10). Many predisposing genes, which may influence the immune response to gluten, are supposed to be involved in the pathogenesis

of CD, the HLA-linked genes being the most strongly associated (11, 12). The primary HLA association is with DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201), which is found in more than 85% of CD patients in our population (13, 14). DQ8 (DQA1\*0301–DQB1\*0302) is also strongly associated with CD in those patients who are DQ2-negative. DQ2 and probably DQ8 present deaminated peptides derived from gliadin to CD4+ T cells in the submucosa of affected patients resulting in an important destruction of the mucosa, which triggers the clinical manifestations of the disease (8).

It has been suggested that an additional susceptibility gene(s) telomeric to MHC class II region may contribute to the development to CD susceptibility, and the association of several genes and polymorphic markers located near to the MHC class I region with CD susceptibility have also been described (15–18). However, this type of study is particularly difficult in CD due to the strong conservation of DR3-DQ2 haplotypes observed in these patients and many associations are simply explained by linkage disequilibrium with DQ2.

A new family of polymorphic genes, termed MIC, has been described in the MHC class I region (19). Two members of this family, MICA and MICB, are interesting candidates for being susceptibility genes in CD. They are expressed in enterocytes under stressful conditions and are ligands for intraepithelial  $\gamma\delta$  and CD8+ T cells (20, 21). The MICA gene is located 47 Kb centromeric to HLA-B in the MHC class I region (19). We have recently reported that one MICA allele, termed MICA-A5.1 (MICA\*008) is independently associated with CD and may modulate the clinical manifestation of the disease, because it is strongly associated with the susceptibility to atypical forms of CD (13, 22). The MICB gene is also located in close proximity to MICA 19 and it also has the same structure, the same pattern of expression, and is a ligand for intraepithelial T cells (20, 21). Thus, the role of MICA in the pathogenesis of CD needs to be clarified in association with MICB in order to draw definite conclusions about the role of MIC genes in the pathogenesis of the disease.

The aim of this study was to analyze whether MICB confers additional susceptibility in a population of CD Spanish patients, which we have reported to be associated with MICA-A5.1 (13). To avoid spurious association due to linkage disequilibrium with DQ2, we have also analyzed the associations of these genes in a matched population of DQ2-negative patients.

## METHODS

### Subjects

One hundred and thirty-three reported CD patients were initially included in this study (females: 82, males: 51; mean age:  $23.7 \pm 18.2$  yr) (13). These represent all available CD patients diagnosed in our hospital from January 1998 to December 1999. Patients were classified into typical and atypical forms according to their clinical presentation (1-3). Seventy-nine (43 females, mean age:  $18.2 \pm 16.2$  yr) had a typical symptomatology at the time of diagnosis. Fifty-four patients (39 females, mean age:  $31.6 \pm 18.2$  yr) had extraintestinal, atypical, single-predominant symptoms, or were even symptomless at diagnosis, and were classified as atypical forms.

To avoid spurious associations due to linkage disequilibrium with DQ2, we decided to also analyze the association of MICB in DQ2-negative patients. Only 18 out of 133 patients analyzed were DQ2-negative. Thus, the population of DQ2-negative patients was further increased with 28 additional patients, which represents all DQ2-negative patients from a larger population of 238 consecutive additional CD patients diagnosed from January 1999 to December 2002. Thus, 46 DQ2-negative patients were analyzed and were also divided in typical ( $n = 19$ ) and atypical patients ( $n = 27$ ). All patients were diagnosed according to the revised European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) criteria (23). All presented a villus atrophy of variable degree, with crypt hyperplasia of the small bowel mucosa, prior to commencement on a gluten-free diet.

One hundred and sixteen random matched blood donors, not related to patients, without a history of intolerance to gluten and derivatives, without ferropernia, anemia, or any abnormality in the biochemical studies, and with negativity for antigliadin and antiendomysium antibodies, were included in this study. Ninety-one of these controls were DQ2-negative.

## LABORATORY METHODS

### HLA and MIC Typing

MICB typing was performed by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) as previously described (24). Sixteen alleles were analyzed in our population (25). For the analysis of microsatellite repeat polymorphism in the MICA gene, PCR was carried out using primers labeled at 5'-end with the fluorescent reagent Cy5 as previously described (26). Fragment sizes were determined automatically using Alif express II (Amersham Pharmacia Biotech).

High resolution HLA-B typing was made using RELI™-SSO typing kit (DYNAL Biotech, Oslo, Norway). HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 class II alleles were typed by sequence-specific oligonucleotide probes (PCR/SSOP, INNO-LiPA, Innogenetics N.V. Ghent, Belgium).

### Statistical Analysis

Allelic frequencies were calculated by direct counting and the significance of the association was determined using the  $\chi^2$ -test (with Yates' correction). The  $p$  values were corrected ( $p_c$ ) by multiplying these by the number of comparisons. The odds ratio (OR) was calculated by the cross-product ratio. Exact confidence intervals (CI) of 95% were obtained. The potential impact for each marker was estimated by the etiological fraction (EF), which indicates the proportion of disease cases among the total population that are attributable to one allele when  $OR > 1$ .

Haplotypic distribution was derived from molecular typing of HLA-B, HLA-DR, and MICA gene. Extended haplotypes (EH) were deduced according to the previously reported linkage disequilibrium (27). The extent of linkage disequilibrium between the two loci is expressed as the observed disequilibrium value ( $\lambda_s$ ), that is, a proportion of the theoretical maximum disequilibrium value ( $\lambda_{max}$ ) achievable for this combination of alleles. The  $\lambda_s$  were calculated using the formula:  $\lambda_s = \lambda/\lambda_{max} = P_{ab} - (P_a \cdot P_b)/P_a(1 - P_b)$ .

## RESULTS

### MICB0106 was Strongly Associated with Celiac Disease

A total of 133 CD patients, previously reported to be associated with HLA-DQ2 and MICA-A5.1, and 116 controls were initially included in this study (13). Sixteen MICB alleles were analyzed by PCR using sequence-specific primers, but only nine alleles were found in our population (Table 1). The distribution of MICB alleles was clearly dissimilar between patients and controls. A strong association of MICB0106 with CD was found ( $p_c < 0.000001$ ,  $OR = 5.6$ ,  $CI = 3.1-10.1$ ,  $EF = 0.47$ ). The distribution of MICB

**Table 1.** MICB Distribution in Celiac Disease Patients and Controls

	Control (n = 116)	Celiac (n = 133)	Typical (n = 79)	Atypical (n = 54)
MICB01021	87 (75%)	90 (67%)	61 (77%)	29 (51%)
MICB01022	13 (11%)	4 (3%)	3 (3%)	1 (1%)
MICB0103101	28 (24%)	25 (18%)	14 (17%)	11 (20%)
MICB0103102	8 (6%)	13 (9%)	10 (12%)	3 (5%)
MICB0104	32 (27%)	18 (13%)	9 (11%)	9 (16%)
MICB0105	7 (6%)	6 (4%)	3 (3%)	3 (5%)
MICB0106	22 (18%)	76 (57%)*	37 (46%)**	39 (72%)*
MICB01021v	6 (5%)	4 (3%)	1 (1%)	3 (5%)
MICB005d	2 (1%)	1 (1%)	1 (1%)	0

CD patients were further grouped into patients with typical and atypical manifestation of the disease.

\*CD patients versus controls:  $p_c < 0.00001$ , OR = 5.6 (from 3.1 to 10.1), EF = 0.47.

\*\*Typical patients versus controls:  $p_c = 0.0033$ , OR = 3.7 (from 1.9 to 7.1), EF = 0.34.

\*\*\*Atypical versus typical patients:  $p_c = 0.04$ , OR = 2.9 (from 1.4 to 6.1), EF = 0.47.

\*\*\*\*Atypical versus controls:  $p_c < 0.00001$ , OR = 11.1 (from 5.2 to 23.6), EF = 0.65.

was also analyzed by grouping the patients in typical and atypical forms. MICB0106 was significantly increased in both typical ( $p_c = 0.0033$ , OR = 3.7, CI = 1.9–7.1, EF = 0.34) and atypical patients ( $p_c < 0.000001$ , OR = 11.1, CI = 5.2–23.6, EF = 0.65). However, MICB0106 was also significantly overrepresented in atypical patients compared with typical ones ( $p_c = 0.04$ , OR = 2.9, CI = 1.4–6.1, EF = 0.47). Analysis of the segregation of MICA and MICB alleles in some available families of these patients indicated that MICB0106 was part of the B8-DR3-DQ2 haplotype (HLA-B\*0802-MICA-A5.1-MICB0106-DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201) (Fig. 1). In accordance, a strong linkage disequilibrium of MICB0106 with DQ2 ( $\lambda_s = 1$ ) and MICA-A5.1 ( $\lambda_s = 0.55$ ) was observed.

#### MICB0104 and MICA-A5.1 were Associated with CD in DQ2-Negative Patients

To analyze whether MICB is associated with CD independently of DQ2, we decided to analyze such in a population

**Table 2.** HLA-DQ8 (DQA1\*03xx, DQB1\*0302), MICA-A5.1, and MICB Alleles Distribution in DQ2-Negative Patients and Controls

	Control (n = 91)	Celiac (n = 46)	Typical (n = 19)	Atypical (n = 27)
HLA-DQ8	9 (9%)	13 (28%)*	5 (26%)	8 (29%)
MICA-A5.1	37 (40%)	29 (63%)**	7 (36%)	22 (81%)*
MICB01021	71 (78%)	35 (76%)	17 (89%)	18 (66%)
MICB01022	12 (13%)	2 (4%)	0	2 (7%)
MICB0103101	22 (24%)	6 (13%)	1 (5%)	5 (29%)
MICB0103102	5 (5%)	4 (8%)	3 (15%)	1 (3%)
MICB0104	28 (30%)	24 (52%)*	10 (52%)	14 (51%)
MICB0105	5 (5%)	1 (2%)	0	1 (3%)
MICB0106	12 (13%)	4 (8%)	2 (10%)	2 (7%)
MICB01021v	3 (3%)	2 (4%)	0	2 (7%)
MICB005d	2 (2%)	0	0	0

The patients were further grouped into patients with typical and atypical manifestation of the disease.

\*DQ8 in CD patients versus controls:  $p = 0.0085$ ,  $p_c = NS$ .

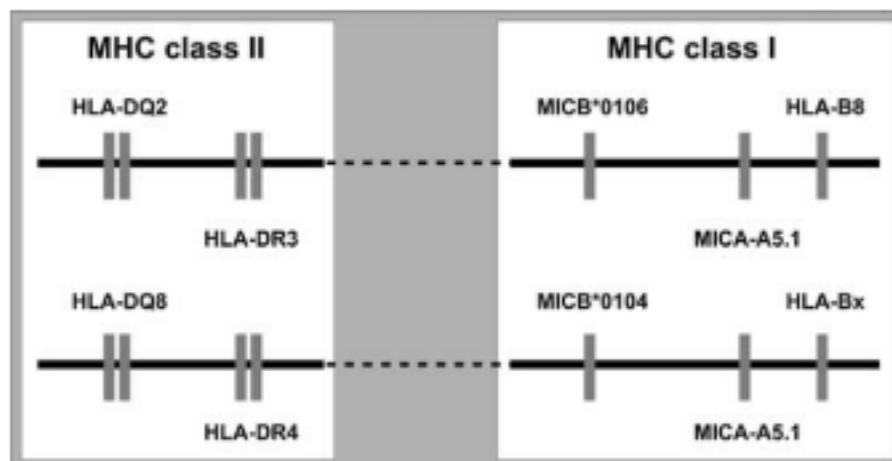
\*\*MICA-A5.1 in atypical patients versus controls:  $p_c = 0.001$ , OR = 6.4 (from 2.2 to 18.4), EF = 0.68.

\*\*\*MICA-A5.1 in typical versus typical patients:  $p_c = 0.016$ , OR = 7.5 (from 1.9 to 28.9), EF = 0.70.

\*\*\*\*MICB0104 in CD patients versus controls:  $p = 0.01$ ,  $p_c = NS$ .

of DQ2-negative patients. The allele distribution in these patients (n = 46) was compared with DQ2-negative controls (n = 91). DQ8 (DQA1\*03xx, DQB1\*0302) was increased in DQ2-negative patients, but not significantly (28% vs 9%,  $p = 0.0085$ ,  $p_c = NS$ , OR = 3.5, CI = 1.4–9.1, EF = 0.20) (Table 2). The distribution of DQ8 was similar in typical and atypical patients (26% vs 29%). Fourteen DQ2-negative patients were DQB1\*0201 without DQA1\*0501 (30%), and 10 patients had DQA1\*0501 alone (21%).

MICA-A5.1 was also increased in DQ2-negative CD patients (63% vs 40% of the controls,  $p = 0.017$ ,  $p_c = NS$ ) (Table 2). However, the distribution of MICA-A5.1 was dissimilar between different forms of CD. MICA-A5.1 was overrepresented in atypical patients compared with both controls ( $p_c = 0.001$ , OR = 6.4, CI = 2.2–18.4, EF = 0.68) and typical patients ( $p_c = 0.016$ , OR = 7.5, CI = 1.9–28.9,



**Figure 1.** Map of the MHC showing the different alleles and the two different HLA haplotypes which are associated with celiac disease in our population.

EF = 0.70). MICB0104 was also increased in CD patients, but not significantly (52% vs 30%,  $p = 0.01$ ,  $p_c = \text{NS}$ ). Analysis of linkage disequilibrium among MICB, MICA, and HLA-DQ indicated that MICB0104 was in linkage disequilibrium with MICA-A5.1 ( $\lambda_s = 0.21$ ) and DQ8 ( $\lambda_s = 0.23$ ) (Fig. 1). However, the association of MICA-A5.1 was independent of HLA-DQ, since it was also significantly associated in DQ2- and DQ8-negative patients ( $p_c = 0.02$ , OR = 2.6, CI = 1.1–6.1, EF = 0.37).

## DISCUSSION

Several associations between different polymorphic markers located in the MHC region and CD have been reported (15–18). However, many of these associations can be explained by linkage disequilibrium with DQ2. Thus, it is still an open question whether there is another gene(s) in the MHC region, which may contribute to CD susceptibility. The comparison of the distribution of DQ2 haplotypes (B8-DR3-DQ2 and B18-DR3-DQ2) in our population clearly suggests that a gene(s) in the MHC region is involved in the pathogenesis of CD. Forty-four percent of DQ2 healthy individuals in our population were B8 and 28% were B18, whereas among the atypical patients 87% were B8 and only 1% were B18, which clearly suggests that only the B8-DR3-DQ2 haplotype is associated to CD. Both haplotypes are identical in the DQ-DR region, however they are quite dissimilar outside the MHC class II region (27), suggesting that an additional gene(s) to HLA-DQ is associated with the pathogenesis of CD. Furthermore, in spite of the fact that there is no difference in DQ2 distribution between typical and atypical patients (86% vs 87%), the haplotype B8-DR3-DQ2 was significantly associated with the atypical ones, suggesting that this putative additional gene(s) may modulate the development of the disease rather than the overall susceptibility to CD.

A new family of genes located in the MHC class I region, termed MIC, are interesting candidate genes for CD susceptibility (8). They are mainly expressed on enterocytes in the small intestine (19) and their expression is upregulated under biologically stressful conditions. In agreement MICA is, at least, highly expressed in the mucosa of CD patients (Caillat-Zucman, personal communication). MICA and MICB are recognized by  $\gamma\delta$  and CD8 intraepithelial T cells (20, 21), which are expanded in CD patients, and this recognition may contribute to the destruction of enterocytes (7). One MICA allele, MICA-A5.1, is particularly interesting since it is part of the B8-DR3-DQ2 haplotype and carries an insertion in the transmembrane region resulting in a premature stop codon, which denies the molecule of its 42-aa cytoplasmic tail and induces the aberrant transport of this molecule to the apical surface, in spite of the basolateral surface where MICA can contact with the intraepithelial T cells (28). The lack of recognition MICA-A5.1 by intraepithelial T cells may limit or protect CD patients from the destruction of the mucosa. This

can explain the strong association of MICA-A5.1 with those oligosymptomatic or completely asymptomatic CD patients grouped together as *atypical* forms of CD (4). This association of MICA-A5.1 with CD has also been recently confirmed in family studies (29).

MICB shares an identical structure, pattern of expression, and a redundant function with MICA (20, 21). However, nothing is known about its association with CD or its expression and function in the mucosa of CD patients. MICB may also induce the destruction of enterocytes independently of the absence of MICA-A5.1 expression. Thus, to consider MICA as a candidate for CD susceptibility, it is also particularly important to consider it together with the role of MICB. The distribution of MICB alleles in CD patients showed a strong association of MICB0106 with CD susceptibility. Analysis of the haplotypic distribution in these patients indicated that MICB0106 is part of B8-DR3-DQ2 extended haplotype (B8-MICB0106-MICA-A5.1-DR3-DQ2). Thus, the association of MICB0106 is in agreement with the stronger association of MICA-A5.1-DR3-DQ2 haplotype with atypical forms of disease (13). Due to the strong linkage disequilibrium of MICB with DQ2 (all MICB0106 individuals were also DQ2), it was not possible to elucidate whether MICB is independently associated with CD in these patients. To analyze whether the association of MICB is independent of the haplotypic context, it was also studied in a population of DQ2-negative patients. Our results clearly confirmed that MICA-A5.1 was independently associated with CD and it may modulate the clinical manifestation of the disease. MICB0104 was also found to be overrepresented in DQ2-negative CD patients, but due to the strong linkage disequilibrium between MICB0104 and MICA-A5.1, it would be difficult to elucidate whether MICB may also contribute or modulate CD susceptibility independently of MICA. However, a potential role of MICB in the pathogenesis of CD can be suggested. Little is known about the potential functionality of MICB variants, nevertheless, the majority of polymorphisms of MICB are nonsynonymous, suggesting the influence of selection pressure. Thus, a functional significance of MICB alleles can be assumed, and might involve, for example, a quantitative influence on the receptor/ligand interaction. It would be expected that a normal individual expresses both MICA and MICB, and MICB may also contribute to increase or limit the damage of the mucosa mediated by MICA. Thus, it is necessary to analyze whether MICB0106 or MICB0104 have any particular characteristic, which for example may contribute together with MICA-A5.1 to limit the cytotoxic activity of intraepithelial T cells. Thus, the hypothetical presence in the DQ2 haplotype of MICA-A5.1 and MICB0106, which potentially may limit or protect the cytotoxicity mediated by intraepithelial T cells, may justify the association of this haplotype to atypical forms of CD. Due to the strong linkage disequilibrium of MICB with DQ and MICA, it is quite difficult to elucidate whether MICB may play a role in CD susceptibility independent of or additional to MICA. Thus, we believe that it is also necessary to analyze the expression and function of MICB in the mucosa

of CD patients in order to draw definite conclusions about its role in CD.

## ACKNOWLEDGMENT

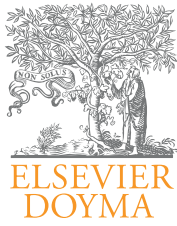
This work was supported in part by Spanish grants number FICYT PC-REC01-03 and FIS02/0058, and with the collaboration of CAJASTUR. We wish to thank David H. Wallace (Member of the Council of Science Editors and the Association of European Science Editors) for critical revision of the manuscript.

Reprint requests and correspondence: Carlos López Larrea, Ph.D., Department of Immunology, Hospital Central de Asturias, Julián Clavería s/n. 33006, Oviedo, Spain.

Received June 9, 2003; accepted December 8, 2003.

## REFERENCES

- Catassi C, Ritsch I-M, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: Exploring the iceberg. *Lancet* 1994;343:200-3.
- Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease—active, silent, latent, potential. *Gut* 1993;34:150-1.
- Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636-51.
- Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, et al. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: An analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterol* 1999;94:691-6.
- Corazza GR, Frisoni M, Treggiari EA, et al. Subclinical celiac sprue. Increasing occurrence and clues to its diagnosis. *J Clin Gastroenterol* 1993;16:16-21.
- Farre C, Humbert P, Vilar P, et al. Serological markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. *Dig Dis Sci* 1999;44:2344-9.
- Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;18:53-81.
- Sollid LM. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Rev* 2002;2:647-65.
- Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 1997;61:307-17.
- Greco L, Romino R, Coto I, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002;50:624-8.
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ $\alpha\beta$  heterodimer. *J Exp Med* 1989;169:345-50.
- Sollid L, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: Genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;105:910-22.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, et al. HLA class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201. *Gut* 2002;50:336-40.
- Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, et al. Prevalence of coeliac disease in the general population of Northern Spain. *Scan J Gastroenterol* 2000;35:398-402.
- Powis SH, Rosenberg WM, Hall M, et al. TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* 1993;38:345-50.
- Meddeb-Garnaoui A, Zeliszewski D, Mougenot JF, et al. *Hum Immunol* 1995;43:190-9.
- McManus R, Moloney M, Borton M, et al. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factor genes. *Hum Immunol* 1996;45:24-31.
- Lie BA, Sollid LM, Ascher H, et al. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* 1999;54:162-8.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6259-63.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12445-50.
- Groh V, Steinle A, Bauer S, et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells. *Science* 1998;279:1737-40.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, et al. MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics* 2002;53:989-91.
- Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909-11.
- González S, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, et al. MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP). *Immunogenetics* 2003;54:850-5.
- Fischer G, Arguello JR, Perez-Rodriguez M, et al. Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 2000;51:591-9.
- Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, et al. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw\*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1010-6.
- Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, et al. Genomics of the major histocompatibility complex: Haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev* 1999;167:275-304.
- Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2971-6.
- Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, et al. Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:359-62.



# Inmunología

[www.elsevier.es/inmunologia](http://www.elsevier.es/inmunologia)



## Original

# NKG2D ligands expression patterns in gut mucosa from patients with coeliac disease

Antonio López-Vázquez<sup>a</sup>, Luis Rodrigo<sup>b</sup>, Segundo González<sup>c</sup>, Carlos López-Larrea<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Department of Gastroenterology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>c</sup> Department of Functional Biology, University of Oviedo, Spain

<sup>d</sup> Fundación "Iñigo Álvarez de Toledo", Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 31 January 2013

Accepted 1 March 2013

Available online 10 April 2013

### Keywords:

Coeliac disease

MICA

MICB

NKG2D

IL-15

## ABSTRACT

**Introduction:** The activating MICA/NKG2D interaction is involved in the response of intraepithelial lymphocytes (IELs) in coeliac disease (CD). The aim of this study was to investigate the expression of NKG2D ligands (MICA, MICB), IL-15 and NKG2D receptor in gut mucosa of CD patients and the correlation with the severity of histological damage.

**CD patients and methods:** Intestinal biopsies from 20 CD patients and five healthy controls were selected. All patients were positive for anti-transglutaminase 2 antibodies and for DQ2 or DQ8. Patients were divided into two groups according to their grade of mucosal impairment: ten each with mild and severe mucosal damage (MMD and SMD, respectively). The expression of proposed genes was determined at mRNA level. MICA expression was also determined by immunohistochemistry.

**Results:** Overexpression of MICA and MICB was observed in biopsies from coeliac patients compared to healthy controls ( $P < 0.001$ ). Nevertheless, the expression was considerably higher in the group of patients with MMD ( $P < 0.0001$ ) than in those with SMD. The levels of NKG2D receptor and IL-15 were also higher in patients than in controls, but no relationship with the severity of the mucosal lesion was found.

**Conclusions:** Our results suggest that NKG2D ligands may play an important role during the onset of the inflammatory process in the early stages of the development of coeliac disease.

© 2013 Sociedad Española de Inmunología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Patrones de expresión de los ligandos de NKG2D en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad celiaca

## RESUMEN

**Introducción:** La interacción de MIC/NKG2D participa en la respuesta de los linfocitos intraepiteliales (LIE) en la enfermedad celiaca (EC). El objetivo de este estudio fue investigar la expresión, en la mucosa intestinal de pacientes con EC, de los ligandos de NKG2D (MICA, MICB), de la IL-15 y del receptor NKG2D, y relacionarla con la severidad del daño.

### Palabras clave:

Enfermedad celiaca

MICA

\* Corresponding author.

E-mail address: [inmuno@hca.es](mailto:inmuno@hca.es) (C. López-Larrea).

0213-9626/\$ – see front matter © 2013 Sociedad Española de Inmunología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2013.03.001>

MICB  
NKG2D  
IL-15

**Pacientes y métodos:** Seleccionamos biopsias intestinales de 20 pacientes con EC y de cinco controles sanos. Todos los pacientes resultaron positivos para anticuerpos anti-transglutaminasa 2 y para HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Los pacientes fueron divididos en dos grupos según el grado de deterioro de la mucosa: diez con daño leve y otros 10 con daño grave (denominados MMD y SMD, respectivamente). En todos ellos se analizó la expresión de MICA, MICB, NKG2D y IL-15 a nivel de ARN mensajero, y en el caso de MICA se completó el estudio analizando su expresión por inmunohistoquímica.

**Resultados:** Se observó sobreexpresión de MICA y MICB en biopsias de pacientes celíacos en relación con los controles sanos ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, la expresión fue notablemente mayor en el grupo de pacientes MMD que en aquellos del grupo SMD ( $p < 0.001$ ). Los niveles de receptor NKG2D y IL-15 también fueron mayores en pacientes que en controles, pero no se encontró relación con la gravedad de la lesión de la mucosa.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que los ligandos de NKG2D pueden desempeñar un papel importante durante el inicio del proceso inflamatorio en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad celíaca.

© 2013 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Introduction

For a long time coeliac disease was thought to be a relatively rare pathology that only appeared in childhood. Now, however, it is recognized as being a very common disease that can be diagnosed at any age.<sup>1,2</sup> Among the most typical characteristics of the disease are a strong genetic association with the HLA alleles DQ2 and DQ8 and its onset being precipitated by an environmental factor, namely, gluten.<sup>3</sup> Gliadin, the alcohol-soluble fraction of the protein, has been identified as the cause of this intolerance, but the great majority of gluten proteins are also probably toxic in coeliac disease.<sup>4,5</sup> These proteins induce an inflammatory process in the intestine, although the process regresses when they are removed from the diet, thereby restoring the proper structure and function of the mucosa.<sup>6</sup>

The intraepithelial infiltration by lymphocytes is the first stage in the pathogenic process of CD. In the epithelium of an exposed coeliac patient, the populations of CD8+ T cells and  $\gamma\delta$ + T cells become more numerous, and both express markers of cellular proliferation and activation. When treatment with a gluten-free diet is instigated, the number of CD8+ lymphocytes returns to normality, whereas intraepithelial lymphocytes (IELs)  $\gamma\delta$ + remain permanently increased. The role of such populations is one of the main unresolved matters in the pathogenesis of the CD.<sup>7</sup>

MHC class I chain-related molecules A and B (MICA and MICB) are homologous with classical HLA-class I but have no role in antigen presentation.<sup>8</sup> These are cell surface glycoproteins that are mainly expressed in endothelial, epithelial cells, fibroblasts and activated monocytes. MICA expression is induced by stress situations and is upregulated in infection and tumour transformation. This protein is a ligand for the NKG2D-activating receptor, which is mainly expressed in Natural Killer (NK) and CD8+ T cells. In NK cells, the interaction between MICA and NKG2D induces the cytolytic capacity of these cells, while in CD8+ it acts as a costimulatory signal that complements antigen recognition by T cell receptor (TCR).<sup>9</sup>

MICA and MICB are both polymorphic, and some variants are associated with coeliac disease. The transmembrane variant MICA 5.1, equivalent to the MICA 008 allele, is associated

with atypical forms of CD<sup>10</sup> independently of the presence of HLA-DQ2.<sup>11</sup> Additionally, the MICB allele 0106 is also overrepresented in patients with atypical forms of CD.<sup>12</sup>

These ligands are largely unexpressed in most healthy tissues. However, aberrant expression of NKG2DL has been detected in some autoimmune diseases, for example in the prediabetic pancreas islet of NOD mice<sup>13</sup> and the synovocytes of rheumatoid arthritis patients.<sup>14</sup> Furthermore, MICA is constitutively expressed at low levels in normal intestinal epithelial cells (IECs). MIC is induced at very high levels on the surface and in the crypts of the small bowel of CD patients.<sup>15</sup> It has also been reported that the gliadin-derived peptide 31-49 upregulates MICA expression in epithelial cells as a consequence of IL-15 induction.<sup>16</sup> Another study has demonstrated the direct involvement of the MICA-NKG2D interaction in the activation of intraepithelial lymphocytes in response to the direct toxic effect of gluten.<sup>17</sup> This activation damages the enterocytes, and could be the initial event that ultimately leads to villous atrophy.

The aim of this study was to investigate the expression of MICA, MICB, NKG2D and IL-15 by RT-PCR and immunohistochemistry in biopsies of patients with active CD, and to evaluate the association with the severity of the lesion.

## Materials and methods

### Patients

The levels expression of NKG2D, IL-15, MICA and MICB were measured in biopsies from 20 patients diagnosed with coeliac disease. All biopsies were obtained from at least three different sites in the proximal-to-distal duodenum, yielding 72 samples in total. All biopsies were obtained before a gluten-free diet was initiated (Table 1). To ensure a homogeneous group of samples, the patients selected for this study had the same lesion type in all the biopsies collected. Five samples from individuals with no digestive pathology were used as healthy controls.

Biopsies from patients were divided into two groups on the basis of the MARSH classification: those with minimal or mild



**Table 1 – Clinical and genetic features of coeliac patients and healthy controls.**

	Slight to mild mucosal damage n = 10	Severe mucosal damage n = 10	Healthy controls n = 5
Age (Mean ± SD)	17 ± 13	11 ± 10	16 ± 12
Anti-TG2	10 (100%)	10 (100%)	–
HLA-DQ2	9 (90%)	10 (100%)	1 (20%)
HLA-DQ8	1 (10%)	2 (20%)	0
Digestive symptoms	6 (60%)	9 (90%)	–
Extradigestive symptoms			
Anaemia	9 (90%)	10 (100%)	–
Dermatitis herpetiformis	1 (10%)	–	–
Other	3 (30%)	2 (20%)	–

mucosal damage (Marsh I, II and IIIa; MMD) and those with severe mucosal damage (Marsh IIIb and IIIc; SMD). Additionally, all patients and controls were typed for HLA-DQ using the PROTRANS Domino System HLA Celiac Disease kit (PROTRANS GmbH, Ketsch, Germany).

All patients and controls gave informed consent and the study was approved by ethics committee of our Hospital.

#### Real-time RT-PCR

Total RNA was derived from tissue samples using NucleoSpin RNA II from Macherey-Nagel (Düren, Germany) and reverse-transcribed using the First Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (AMV) from Roche Diagnostics, GmbH (Mannheim, Germany), following the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was amplified with specific primer pairs (Table 2) in duplicate (40 cycles: 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min), monitoring the amplification using SYBRGreen chemistry with the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Primers, listed in Table 2, were selected to flank introns whenever possible. Data were analysed using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method for relative quantification. Briefly, threshold cycles (CTs) for GAPDH, MICA-MICB, NKG2D and IL-15 were determined in duplicate. We chose arbitrary values for healthy donor 1 (HD1) as standard values and calculated the relative increase (rI) in copy number in relation to this standard values according to the formula:

$$rI = 2 - [(CT \text{ Sample} - CT \text{ Reference}) - (CT \text{ Standard Sample} - CT \text{ Standard Reference})].$$

Similar amplification efficacy for MICA, MICB, NKG2D, IL-15 and GAPDH was determined by analyzing serial cDNA

dilutions with values of the slope of the log of the amount of cDNA compared with a CT of <0.1. Amplicons were examined on 3% agarose gels to ensure they were of the correct size.

#### Immunohistochemistry

A polyclonal serum against the  $\alpha 2$  domain of the MICA molecule was generated by immunising rabbits with a synthetic peptide of the 140–160 (MNVRNFLKEDAMKTKTHYHAM) translated sequence of MICA, as described previously.<sup>18</sup> This serum, known as s8p, was purified on an AFFI-T gel affinity column (KE-MEN-TEC, Copenhagen, Denmark), following the manufacturer's instructions, and then tested in parallel with a negative control of preimmune rabbit serum. For immunohistochemistry staining, 5- $\mu\text{m}$ -thick sections of small gut biopsies from paraffin blocks were cut and mounted on polylysine-coated slides. Deparaffinised samples were blocked with 10% normal human serum in PBS for 30 min at room temperature to eliminate non-specific bindings. Sections were incubated with polyclonal serum anti-MICA s8p, for 1 h at room temperature in a humid chamber. Antibody binding was detected using the peroxidase EnVision System (Dako, CA, USA). In negative controls, the primary antibody was omitted or replaced by a preimmune rabbit serum at the same dilution.

#### Statistical analysis

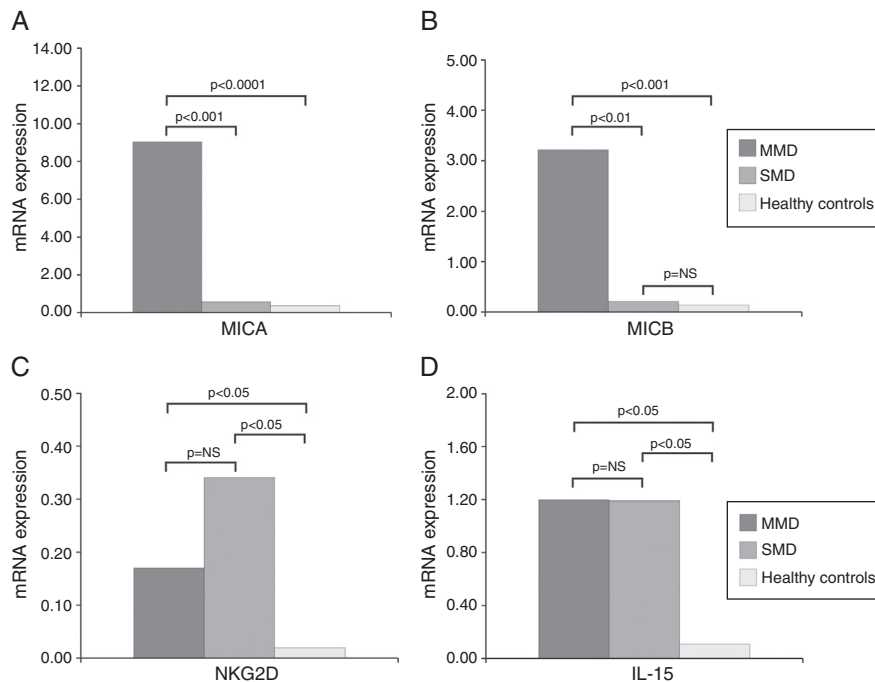
Univariate analyses were used to describe the characteristics of the study sample. Student's t test was used to compare differences between the means of continuous variables, statistical significance being concluded for values of  $p < 0.05$ .

## Results

The primary aim of our study was to analyse the expression of MICA in biopsies of patients diagnosed with CD by real-time PCR. First, patients clearly showed increased expression levels than healthy controls (mean value 4.96 vs. 0.16;  $p < 0.001$ ). When we analysed data from CD patients with mild mucosal damage, we found higher mean levels of MICA than those with severe damage (9.04 vs. 0.34;  $p < 0.001$ ). MMD group had increased expression level of MICA mRNA comparing healthy controls (56 times greater; 9.04 vs. 0.16;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1A). Similarly, the level of expression of MICB was also higher in the same group of biopsies. The average value in MMD patients was 3.22 while the values of SMD patients had a mean value

**Table 2 – Real-time PCR primers.**

Primers	Sequence
GADPH 5'	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TC-3'
GADPH 3'	5'-ATTCATATTGGAACATGTAACCATGTAG-3'
MICA/B 5'	5'-CACCTGCTACATGGAACACAGC-3'
MICA 3'	5'-TATGGAAGTCTGTGCCGTTGACTCT-3'
MICB 3'	5'-ACATGGAATGTCTGCCAATGATC-3'
NKG2D 5'	5'-GAGGTCTCGACACAGCTGG-3'
NKG2D 3'	5'-GCAGCAGAAAAAAATGGAGATG-3'
IL-15 5'	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
IL-15 3'	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'



**Fig. 1 – Levels of mRNA of MICA, MICB, NKG2D and IL-15 in gut mucosa of CD patients and healthy controls.**  
**Footnote: Expression of MICA (A), MICB (B), NKG2D (C) and IL-15 (D) by RT-PCR in biopsies of celiac patients and healthy controls.**  
**(MMD: Mild mucosal damage; SMD: Severe Mucosal Damage).**

of 0.14 ( $p < 0.001$ ). This implies that the expression level of MICB is 27 times that of samples obtained from CD patients with early-stage lesions. We also found that the expression of MICB was 46 times that in MMD (3.22 vs. 0.07;  $p < 0.01$ ) and only 2 times that in the SMD group (0.14 vs. 0.07;  $p = \text{NS}$ ) compared with healthy control group in both cases (Fig. 1B).

Nevertheless, in the case of NKG2D, the mean level of expression in the MMD group of biopsies was slightly lower than that of the SMD patients (0.17 vs. 0.34;  $p = \text{NS}$ ), although the stronger in both groups of patients than in healthy controls (0.003;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1C). These results could reflect the greater number of lymphocytes expressing NKG2D, which infiltrate the mucosa in CD patients, but it is nevertheless clear that there were no associations with the degree of damage.

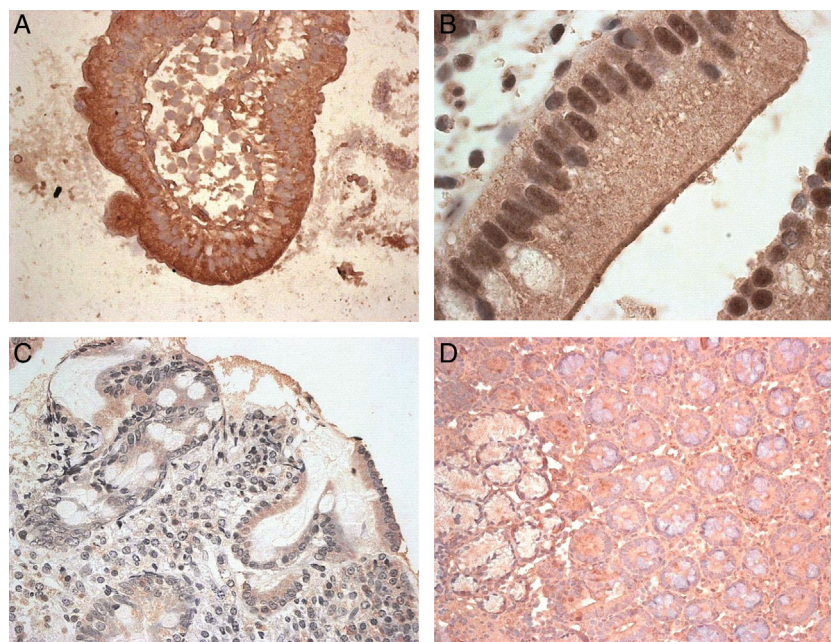
Although IL-15 is known to be a poorly secreted cytokine, we were able to measure mRNA levels by RT-PCR from CD patients (Fig. 1). Both MMD and SMD groups showed similar mean levels of IL-15 expression; these were significantly higher on average than in healthy controls (MMD = 1.20, SMD = 1.19, HC = 0.07;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1D).

After analysing the expression of these molecules at the mRNA level, the next step was to identify the MICA protein in biopsies of CD patients. The immunohistochemical analysis of the samples showed a positive epithelial stain in all patients, although there were striking differences in the intensity and pattern of staining between the two groups of samples (Fig. 2). First, biopsies from the MMD group showed an intense expression of MICA that was mainly localised in enterocytes, with apical and intracellular distribution. In samples from the SMD group, less intense MICA staining, mainly distributed

in the cytoplasm, was observed. Moreover, there was a positive stain of mononuclear cells within the lamina propria in both groups of samples. Healthy control samples exhibited weak MICA staining in the cytoplasm of the epithelial cells. These results are consistent with the high level of expression of MICA revealed by RT-PCR in samples from patients with mild mucosal damage, and suggest that the expression of this protein may be associated with the initial phases of the lesion.

## Discussion

It has previously been reported that, in coeliac disease (CD), intraepithelial intestinal lymphocytes (IELs) express high levels of NKG2D and expand massively under strong exposure to IL-15 in the epithelial compartment.<sup>19</sup> IL-15 is overexpressed in active CD mucosa, where its level is correlated with the degree of tissue damage, as revealed by morphometric analysis, and progressively decreased upon instigation of a gluten-free diet.<sup>20</sup> Enterocytes and lamina propria mononuclear (LPM) cells are the main source of this cytokine. IL-15 elicits a series of biochemical changes in the NKG2D signalling pathway, converting cytotoxic T cells (CTL) into lymphocyte activating killer (LAK) cells that contribute to tissue damage in coeliac patients.<sup>21</sup> Additionally, the NKG2D ligands MICA and MICB are overexpressed in gut mucosa in response to these immunological changes, in accordance with previous reports.<sup>15,17</sup> Our study also confirms that levels of MICA and MICB mRNA are higher in biopsies of CD patients, although, unexpectedly, we found that the levels were inversely correlated with the severity of mucosal damage.



**Fig. 2 – Expression of MICA in gut biopsies of CD patients.**

**Footnote:** A. MICA high-intensity stain in an intestinal villus from a patient with mild mucosal damage. B. Detailed image of enterocytes with an apical MICA expression pattern. C. Gut mucosa with severe damage. The level of expression of MICA is clearly lower than that in the MMD image. D. Normal gut mucosa.

Customarily, intraepithelial infiltration by T CD8<sup>+</sup> cells has been considered to be secondary to the activation of T CD4<sup>+</sup> cells in the lamina propria because no intraepithelial lymphocytes are restricted by gliadin.<sup>7</sup> However, these infiltrates are not present in other intestinal disorders associated with inflammation of the lamina propria, such as Crohn's disease and other autoimmune enteropathies. This finding suggests that the activation of the CD4<sup>+</sup> T cells of the lamina propria does not explain the expansion of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease.<sup>7</sup> The immune response of the T cells may be directed not only against peptides, but possibly also towards recognising damaged cells that express molecules induced by cellular stress (MIC and HLA-E) and gamma-interferon.<sup>6</sup> It has been suggested that these alterations of the intestinal epithelium can occur in coeliac disease. MIC and HLA-E are recognised by the NK cell receptors NKG2D and CD94 present in the intraepithelial lymphocytes and whose expression is strongly induced by IL-15.<sup>8,9</sup> Epithelial damage could be caused by the deregulation of this system in the presence of high concentrations of IL-15. The induction of these activating receptors could lead to the uncontrolled activation of the intraepithelial lymphocytes and, ultimately, to villous atrophy.<sup>21</sup> In fact, IL-15, which enables NKG2D-mediated lymphokine killer activity in CTLs, cooperates with NKG2D to induce cytosolic phospholipase A(2) (cPLA2) activation and arachidonic acid release, which leads to tissue inflammation and determination.<sup>22</sup> Our results suggest that the levels of IL-15, determined by RT-PCR, were not closely correlated with the degree of mucosal damage, but were clearly higher than in healthy controls, and were maintained at this high level until the final stages of mucosal impairment. IL-15 may be released by enterocytes as a

consequence of proteolytic shedding during the course of CD.<sup>23</sup> The blockade of the activity of this cytokine could benefit coeliac patients, as has been demonstrated in animal models.<sup>24</sup>

In the present study we have analysed the expression of MIC molecules in samples from the mucosa of CD patients with varying degrees of damage. We found the highest levels of MICA and MICB in samples with Marsh I, II and IIIa. The corresponding level of expression was progressively lower in samples with Marsh IIIb and IIIc type lesions. These findings suggest that the increased expression of MIC could be an initial phenomenon related to gluten toxicity and the onset of mucosal damage. In fact, the pathological changes in the enterocytes and the extent of the lesion are inversely correlated with the levels of expression of NKG2D ligands. The increases in the level of expression of MIC molecules on the surface of the enterocytes during the initial stage of coeliac disease make them a target for T $\alpha$  $\beta$ /CD8<sup>+</sup> lymphocytes, which infiltrate the epithelium. The recognition of MICA and MICB by the NKG2D receptor, whose expression is induced by IL-15, acts as a signal for IELs, inducing its activation and leading to damage of enterocytes, thereby causing villous atrophy. The downregulation of MIC expression during the course of mucosal damage may act as a control mechanism for IEL activation, which is involved in the epithelial damage. Additionally, we found that MICA was also expressed in mononuclear cells, which infiltrate the lamina propria. Under these circumstances, the MICA/NKG2D interaction could act as an additional costimulatory signal for NKG2D-positive CD4 T cells. Although we have not analysed the expression of NKG2D in CD4 T lymphocytes, previous studies have shown

this molecule to be habitually present in these cells in some autoimmune diseases<sup>25,26</sup> and in ageing people<sup>27</sup>.

In conclusion, it is clear that the interaction between NKG2D and MICA/B plays an important role in the pathogenesis of CD, and that this is probably more important in the initial phases of the disease. Blockade of the MIC/NKG2D interaction during the early stages of mucosal injury may prevent the progression of tissue damage and the establishment of clinically significant coeliac disease.

## Ethical disclosures

**Protection of human and animal subjects.** The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this investigation.

**Confidentiality of Data.** The authors declare that they have followed the protocols of their work centre on the publication of patient data and that all the patients included in the study have received sufficient information and have given their informed consent in writing to participate in that study.

**Right to privacy and informed consent.** The authors have obtained the informed consent of the patients and /or subjects mentioned in the article. The author for correspondence is in possession of this document.

## Financial disclosure

This work was supported by grants from Instituto de Salud "Carlos III" FIS PI08/0566 and PI12/02587, and by "Fondos FEDER" from European Union

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2012;107:1538-44, quiz 1537, 1545.
- Riestra S, Fernandez E, Rodrigo L, Garcia S, Ocio G. Prevalence of coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35:398-402.
- Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992;102:330-54.
- De Re V, Caggiari L, Tabuso M, Cannizzaro R. The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. *Clin Biochem*. 2012, pii: S0009-9120(12)00617-0.
- Li J, Wang S, Li S, Ge P, Li X, Ma W, et al. Variations and classification of toxic epitopes related to celiac disease among alpha-gliadin genes from four *Aegilops* genomes. *Genome*. 2012;55:513-21.
- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunologic insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:493-525.
- Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:53-81.
- Gonzalez S, Lopez-Noto A, Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C. Trends in celiac disease: a review of the immune response. *Trends Immunol*. 2008;29:397-403.
- Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*. 2008;14:179-89.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernandez S, et al. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201. *Gut*. 2002;50:336-40.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernandez S, et al. MICA-A5.1 allele is associated with atypical celiac disease. *Immunogenetics*. 2002;53:989-91.
- Gonzalez S, Rodrigo L, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Agudo-Ibanez L, Rodriguez-Rodero S, et al. Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:676-80.
- Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, et al. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity*. 2004;20:757-67.
- Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligand in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9452-7.
- Martin-Pagola A, Ortiz L, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Castano L, Bilbao JR. Analysis of the expression of MICA in small intestinal mucosa of patients with celiac disease. *J Clin Immunol*. 2003;23:498-503.
- Martin-Pagola A, Ortiz L, Perez de Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R, et al. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics*. 2004;56:549-54.
- Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004;21:367-77.
- Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Gonzalez MZ, Fernandez-Morera JL, Diaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, et al. The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *Am J Transplant*. 2007;7:1842-8.
- Abadie V, Discepolo V, Jabri B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2012;34:551-66.
- Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003;125:730-45.
- Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent-NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*. 2004;21:357-66.
- Tang F, Chen Z, Ciszewski C, Setty M, Solus J, Tretiakova M, et al. Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *J Exp Med*. 2009;206:707-19.
- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*. 2006;55:469-77.

- 
24. Yokoyama S, Watanabe N, Sato N, Perera PY, Filkoski L, Tanaka T, et al. Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:15849-54.
  25. Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev*. 2010;235:267-85.
  26. Caillat-Zucman S. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol*. 2006;67:204-7.
  27. Alonso-Arias R, Moro-Garcia MA, Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Baltar J, Garcia FM, et al. NKG2D expression in CD4+ T lymphocytes as a marker of senescence in the aged immune system. *Age (Dordr)*. 2011;33:591-605.



# Autoantibodies against MHC class I polypeptide-related sequence A are associated with increased risk of concomitant autoimmune diseases in celiac patients

Antonio López-Vázquez<sup>1</sup>, Lourdes Mozo<sup>1</sup>, Rebeca Alonso-Arias<sup>1</sup>, Beatriz Suárez-Álvarez<sup>1</sup>, José Ramón Vidal-Castiñeira<sup>1</sup>, Eduardo Arranz<sup>2</sup>, Umberto Volta<sup>3</sup>, Carlos Bousoño<sup>5</sup>, Marcos López-Hoyos<sup>6,7</sup>, Luís Rodrigo<sup>4</sup> and Carlos López-Larrea<sup>1,7\*</sup>

## Abstract

**Background:** Overexpression of autologous proteins can lead to the formation of autoantibodies and autoimmune diseases. MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) is highly expressed in the enterocytes of patients with celiac disease, which arises in response to gluten. The aim of this study was to investigate anti-MICA antibody formation in patients with celiac disease and its association with other autoimmune processes.

**Methods:** We tested serum samples from 383 patients with celiac disease, obtained before they took up a gluten-free diet, 428 patients with diverse autoimmune diseases, and 200 controls for anti-MICA antibodies. All samples were also tested for anti-endomysium and anti-transglutaminase antibodies.

**Results:** Antibodies against MICA were detected in samples from 41.7% of patients with celiac disease but in only 3.5% of those from controls ( $P < 0.0001$ ) and 8.2% from patients with autoimmune disease ( $P < 0.0001$ ). These antibodies disappeared after the instauration of a gluten-free diet. Anti-MICA antibodies were significantly prevalent in younger patients ( $P < 0.01$ ). Fifty-eight patients with celiac disease (15.1%) presented a concomitant autoimmune disease. Anti-MICA-positive patients had a higher risk of autoimmune disease than MICA antibody-negative patients ( $P < 0.0001$ ; odds ratio = 6.11). The risk was even higher when we also controlled for age (odds ratio = 11.69). Finally, we found that the associated risk of developing additional autoimmune diseases was 16 and 10 times as high in pediatric patients and adults with anti-MICA, respectively, as in those without.

**Conclusions:** The development of anti-MICA antibodies could be related to a gluten-containing diet, and seems to be involved in the development of autoimmune diseases in patients with celiac disease, especially younger ones.

**Keywords:** Autoantibodies, Autoimmune diseases, Celiac disease, MICA, NKG2D, Type 1 diabetes mellitus

## Background

Celiac disease (CD) was previously considered a relatively rare pathology that appeared only in childhood, but is now recognized as being a very common disease that can be diagnosed at any age [1,2]. Its most typical characteristics are a strong genetic association with the human leukocyte

antigen (HLA) alleles DQ2 and DQ8 [3,4] and its triggering by an environmental factor, the intake of gluten. The soluble fraction of gliadin has been identified as the cause of this intolerance, but many other gluten proteins can be toxic in CD [5]. These proteins induce an inflammatory process in the intestine of susceptible people, but inflammation regresses after elimination of gluten-containing foods from the diet, leading to the recovery of the structure and function of the mucosa [3].

Autoantibodies, especially those directed against the tissue transglutaminase (tTG) enzyme, commonly appear in

\* Correspondence: inmuno@hca.es

<sup>1</sup>Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo 33006, Spain

<sup>7</sup>Fundación Renal "Iñigo Álvarez de Toledo", Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

CD [6]. These antibodies are very important in the diagnosis of CD, but their role in the pathogenesis of the disease remains controversial [7]. Several studies have suggested that these antibodies are directly involved in the pathogenesis of CD. Zanoni *et al.* demonstrated the role of anti-TG2 antibodies in gut mucosal damage in patients with CD [8]. Their study showed that these antibodies are able to recognize an epitope that is common to TG2 and the Toll-like receptor 4. This interaction leads to the activation of the Toll-like receptor 4 pathway, an important initiator of innate immunity. Other studies have shown that anti-tTG antibodies may play an important role in epithelial cell proliferation [9] and interfere with intestinal epithelial cell adhesion [10]. Additionally, these autoantibodies disturb angiogenesis and modulate vascular permeability *in vitro* [11,12]. Taken together, these observations suggest that future approaches to the study of CD should take the role of humoral immunity into account.

Other mechanisms, such as the MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA)- Natural killer group 2, member D (NKG2D) interaction, are directly involved in the pathogenesis of the disease [13]. MICA and MICB show homology with classical HLA-class I, but have no role in antigen presentation. MICA and MICB are cell surface glycoproteins that are constitutively expressed in enterocytes [14]. These proteins are ligands for the killer cell lectin-like receptor subfamily K member 1, also known as NKG2D, which is an activating receptor that is mainly expressed in natural killer, CD8+ and  $\gamma\delta$ T cells [15]. The MICA-NKG2D interaction in natural killer cells induces their cytolytic capacity, while in CD8+ T cells it acts as a co-stimulatory signal and complements antigen recognition by the T cell receptor [16]. MICA is strongly expressed in the enterocytes of patients with CD in response to the indirect toxic effect of gluten [17]. Furthermore, MICA binds the NKG2D receptor expressed on CD8+ intraepithelial lymphocytes and activates these T cells. This activation causes damage to the enterocytes, and could be the initiating event that ultimately leads to villous atrophy.

The tissue damage and increased expression of MICA may also induce the development of antibodies against this molecule. In fact, anti-MICA autoantibodies have been described in early-onset systemic lupus erythematosus (SLE) [18]. Moreover, these antibodies have been implicated in organ rejection in patients with renal [19-21] and cardiac transplants [22,23].

To test the hypothesis that the CD-related changes in gut mucosa may be associated with the development of antibodies against MICA, we investigated the presence of these antibodies in sera obtained from patients with active CD. We also considered the possibility that these antibodies play a role in the development of the additional autoimmune diseases (ADs) customarily associated with CD [24].

## Methods

### Study participants

A group of 383 patients diagnosed with CD (241 females, 142 males; mean age at diagnosis  $22 \pm 21.96$  years) by the Gastroenterology and Paediatric Departments of two Spanish and one Italian hospital between 2002 and 2012 were selected for this study. The diagnosis of CD was made in accordance with the revised criteria of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition [25,26] and World Gastroenterology Organisation guidelines [27,28] In addition to clinical features, all patients were positive for anti-tTG and/or anti-endomysium antibodies. They also presented with a variable degree of intestinal mucosal damage (Marsh I to Marsh IIIc), before starting a gluten-free diet (GFD). A second serum sample was obtained from all patients after at least one year on a GFD. These samples were analyzed to establish treatment compliance and to assess the influence of a GFD on titers of anti-MICA antibodies.

All patients were typed for HLA-DQA1\* and HLA-DQB1\* alleles. Similar to the prevalence noted in Caucasian populations [29], 88% of the patients were HLA-DQ2+ and 11% were HLA-DQ8+. The clinical features of the patients are illustrated in Table 1. Additionally, the various ADs detected in these patients are listed in Table 2.

Another group of 428 patients (mean age  $39 \pm 3.04$  years, 65.4% females) diagnosed for several ADs but without CD were selected to establish whether the presence of anti-MICA antibodies is related to CD or if they are another serological marker of autoimmunity. The composition of this group with respect to represented ADs is similar to that for patients with CD and ADs (Table 2).

**Table 1 Clinical and analytical features of patients and healthy controls**

	Patients with celiac disease n = 383	Patients with autoimmune disease n = 428	Healthy controls n = 200
Gender (female/male)	241/142	280/148	112/88
Mean age (SD)	22 (21.76)	39 (23.04)	23 (18.74)
Biopsy			
Marsh I	7 (1.8%)	-	-
Marsh II	32 (8.3%)	-	-
Marsh IIIa	63 (16.4%)	-	-
Marsh IIIb	70 (18.3%)	-	-
Marsh IIIc	211 (55.1%)	-	-
HLA-DQ2-positive <sup>a</sup>	338 (89.2%) <sup>b</sup>	182 (42%)	44 (22%)
HLA-DQ8-positive <sup>a</sup>	42 (11.0%)	152 (35%)	18 (9%)
HLA-DQ2 and DQ8-negative	14 (3.6%)	136 (31.8%)	138 (69%)
Autoimmune diseases	58 (15.1%)	428 (100%)	-

<sup>a</sup>Includes DQ2-DQ8-positive patients; <sup>b</sup>P <0000.1; odds ratio = 24.19; 95% confidence interval = 15.815, 36.997.

**Table 2 Autoimmune diseases in patients with and without celiac disease**

	With celiac disease n = 58	Without celiac disease n = 428
Type 1 diabetes	22 (37.9%)	106 (24.8%)
Autoimmune thyroiditis	9 (15.5%)	47 (11.0%)
Systemic lupus erythematosus	7 (12.1%)	92 (21.5%)
Rheumatoid arthritis	6 (10.3%)	51 (11.9%)
Pernicious anemia	3 (5.2%)	22 (5.1%)
Primary biliary cirrhosis	3 (5.2%)	17 (4.0%)
Juvenile idiopathic arthritis	1 (1.7%)	4 (1.0%)
Autoimmune hepatitis	3 (5.2%)	15 (3.5%)
Crohn's disease	2 (3.4%)	40 (9.3%)
Ulcerative colitis	-	9 (2.1%)
Mixed connective tissue disease	1 (1.7%)	1 (0.2%)
Addison's disease	-	3 (0.7%)
Sjögren's syndrome	1 (1.7%)	21 (4.9%)

Finally, 200 healthy individuals matched by age (mean age 23 ± 18.74 years, 54% females) were selected for comparison to patients with CD. Control individuals had no history of intolerance to gluten or derivatives, iron deficiency, anemia, or abnormalities in biochemical studies, and were negative for anti-TG antibodies. To match healthy controls and patients with CD by age, the proportion of individuals aged ≤ 14 years was similar in both groups (47% versus 52%). Children used as healthy controls were selected from those with suspected allergic reactions who were studied in the Allergy Department of Hospital Universitario Central de Asturias.

The study was approved by the Ethics Committee of each hospital (Regional Ethics Committee of Clinical Research of Principado de Asturias; Ethical Committee of S. Orsola Malpighi Hospital, University of Bologna; Ethical Committee of Clinical Research from the Clinic Hospital, University of Valladolid; Cantabria Ethics Committee for Biomedical Research). All patients and controls or their parents gave written informed consent.

#### Determining anti-endomysium and anti-transglutaminase autoantibodies

Anti-endomysium antibodies were detected by indirect immunofluorescence using tissue sections from monkey esophagus (Biosystems, Barcelona, Spain). A titer of 1:10 or more was considered positive. Anti-tTG autoantibodies were detected using an ELISA kit from Orgentec (Mannheim, Germany). A value greater than 10 units was considered positive. Patients' sera were tested for total immunoglobulins (Ig) to detect IgA deficiency. In participants with IgA deficiencies, IgG equivalents of the above tests were used.

#### HLA and MICA typing

Genomic DNA from all patients was isolated and typed for the HLA-DQ allele using DNA PCR amplification with sequence-specific primers with the PROTRANS™ Domino System HLA Celiac Disease kit (Protrans, Ketsch, Germany). Additionally, MICA gene polymorphisms from 100 patients were typed with a LABType® SSO MICA typing kit (One-Lambda, Los Angeles, CA, USA). All determinations were done in accordance with the manufacturers' protocols.

#### Anti-MICA antibody detection

MICA antibodies were identified by LABScreen® assays (One-Lambda) using Luminex xMAP technology (Luminex Corp., Austin, TX, USA), following the manufacturer's specifications. Serum samples from patient with CD and controls were tested against MICA alleles using the LABScreen® Mixed kit for general screening. Positive sera were re-tested using LABScreen® MICA Single Antigen to measure the specificity of the antibodies. The fluorescent signal for each MICA allele-coated bead was measured using LABScan 100™ Flow Cytometry and analyzed by HLA-Fusion™ software (One-Lambda). Antibodies against MICA alleles were considered positive when the mean fluorescent intensity (MFI) of each bead was above a cut-off value of 500 in LABScreen® Mixed and 2000 in LABScreen® MICA Single Antigen, as suggested by the manufacturer. In all cases, anti-MICA antibodies detected by this technique were of the IgG isotype.

#### Statistics

Descriptive analyses were used to characterize the study population. The chi-square contingency test was used to compare dichotomous variables and the unpaired t-test was used to compare group differences of continuous variables. Multivariate logistic regression was used to model the variables that were significant in univariate analyses or that were of clinical relevance. All analyses were done using SPSS v.15.0. Values of  $P < 0.05$  were considered significant in all cases.

#### Results

##### Anti-MICA autoantibodies are more prevalent in patients with celiac disease

Our initial aim was to analyze anti-MICA antibodies in sera obtained from patients diagnosed with CD and from healthy controls. We found that their presence was clearly associated with CD. Anti-MICA antibodies were detected in 159 of 383 patients with CD (41.5%) compared with 3.5% of the healthy controls ( $P < 0.0001$ ; Table 3). In other words, the odds of individuals with CD presenting anti-MICA antibodies were 19 times those of healthy controls. Next, to establish whether anti-MICA autoantibodies are a characteristic of CD but not a frequent feature of other



**Table 3 Prevalence of anti-MICA autoantibodies in patients and healthy controls**

Anti-MICA	Patients with celiac disease n = 383	Patients with autoimmune disease n = 428	Healthy controls n = 200
Positive	159 (41.5%)	35 (8.2%) <sup>a</sup>	7 (3.5%) <sup>b</sup>
Negative	224 (58.5%)	393 (91.8%)	193 (96.5%)

<sup>a</sup>*P* <0.0001; odds ratio = 7.97; 95% CI = 5.38, 11.90. <sup>b</sup>*P* <0.0001; odds ratio = 19.57; 95% confidence interval = 8.96, 42.74.

ADs, we compared their frequency in patients with CD with the group who were diagnosed only with ADs. Our results demonstrated that these autoantibodies were associated with CD (41.5% in the CD group versus 8.2% in the AD group; *P* <0.0001; odds ratio = 7.97; 95% confidence interval: 5.38, 11.90). Anti-MICA antibodies were no longer present in the additional sample of 75% of the patients with CD who had been on a GFD for at least one year. The second serum was positive for anti-tTG antibodies in ten patients, six of whom had anti-MICA antibodies (data not shown).

We compared the maximum MFI of anti-MICA autoantibodies with the values of anti-tTG ones, but found no correlation between them (Additional file 1: Figure S1). The distribution of maximum MFI among the different groups of patients was also analysed, but revealed no statistically significant differences (Additional file 1: Figure S2).

The specificities of the anti-MICA antibodies were determined in 50 randomly selected patients, combining Luminex single antigen analysis with MICA genotyping. In all cases, the antibodies recognized self-MICA alleles. Moreover, 22 patients also developed antibodies against other MICA variants. The most frequent MICA antigen detected was MICA\*027, which corresponds to the MICA A5.1 transmembrane polymorphism, which has previously been associated with CD [29-31]. The allele was present in 74% of patients (data not shown).

#### Anti-MICA autoantibodies are related to age at diagnosis

Having identified the presence of anti-MICA antibodies, we investigated whether other factors related to CD had influenced their induction. First, we analyzed the influence of patient age at diagnosis on the development of antibodies (Table 4). Clearly, anti-MICA autoantibodies were more prevalent at early ages: the mean age of people positive for anti-MICA was 21.03 years compared to 31.60 years for people negative for anti-MICA; and the median age was significantly lower in positive compared to negative individuals (12 versus 31 years; *P* <0.01). The tendency of antibodies to appear at a younger age was apparent in all patient and control groups (Table 4).

No relationship was found between the presence of anti-MICA antibodies and gender or the degree of the Marsh lesion (see Additional file 1: Tables S1 and S2).

**Table 4 Distribution of anti-MICA autoantibodies in different patient groups included in the study by age at diagnosis**

Groups	Anti-MICA	n	Mean	SD	Median	<i>P</i>
All	Negative	810	31.60	23.14	31	-
	Positive	201	21.03	21.89	12	< 0.01
Healthy controls	Negative	193	22.75	18.390	19	-
	Positive	7	41.86	20.408	54	-
Patients with celiac disease	Negative	224	24.85	22.320	23	-
	Positive	159	17.74	20.309	7	-
Patients with autoimmune disease	Negative	393	39.81	22.88	41	-
	Positive	35	31.86	23.85	26	-

#### The risk of developing additional autoimmune diseases in patients with celiac disease is associated with anti-MICA autoantibodies

Patients with CD had a higher incidence of additional ADs, mainly type 1 diabetes [22,24,32]. The prevalence of these diseases was relatively high in our population; 58 patients with CD (15.1%) were found to have concomitant disease (Table 1). To identify possible risk factors related to CD that could be involved in the development of these pathologies, a multivariate analysis was performed. This indicated that gender, HLA-DQ and Marsh type were not associated with the presence of ADs in these patients. However, patients with an additional autoimmune pathology were older, on average, than those who were affected by CD alone (mean age, 36 ±20.18 versus 18 ±20.62 years, *P* <0.001; data not shown).

We investigated the possible influence of anti-MICA autoantibodies on the development of additional ADs (Table 5). The majority of patients with CD and ADs were positive for anti-MICA antibodies (79.3%; 46 out of 58), whereas only 34.8% (113 out of 325) of patients affected by CD alone had anti-MICA (Table 5), demonstrating that the development of ADs in patients with CD was clearly associated with the presence of anti-MICA autoantibodies (*P* <0.0001; odds ratio = 6.11; 95% confidence interval:

**Table 5 Risk of developing concomitant autoimmune diseases in patients with celiac disease with respect to the presence of anti-MICA autoantibodies**

	Celiac disease only n = 325	Celiac disease with autoimmune disease n = 58
Anti-MICA-positive	113 (34.8%)	46 (79.3%)
Anti-MICA-negative	212 (65.2%)	12 (20.7%)
	<b><i>P</i></b>	<b>Odds ratio</b>
Anti-MICA	<0.0001	6.11
Anti-MICA <sup>a</sup>	<0.0001	11.69
		<b>95% confidence interval</b>
Anti-MICA		3.22, 11.59
Anti-MICA <sup>a</sup>		5.49, 24.90

Risk associated with the presence of anti-MICA in all patients with CD.

<sup>a</sup>Adjusted by age at diagnosis.

3.22, 11.59). When the analysis also adjusted for age, the risk associated with anti-MICA was notably higher ( $P < 0.0001$ ; odds ratio = 11.69; 95% confidence interval: 5.49, 24.90).

As previously mentioned, ADs were more prevalent in patients diagnosed with CD as adults, whereas anti-MICA autoantibodies were more frequent in those diagnosed with CD at pediatric age. Given the well-established influence of age at diagnosis on the risk of developing concomitant ADs due to anti-MICA, we decided to investigate the influence of these autoantibodies in pediatric and adult patients. The distribution in the two groups indicated that autoantibodies were present in 74.4% of adult patients with concomitant ADs, with an associated risk of 10.03 ( $P < 0.0001$ ), whereas 93.3% of pediatric patients with CD and an additional autoimmune pathology had anti-MICA antibodies ( $P < 0.01$ ). The risk associated with anti-MICA in children was 16.28, which was higher than that in adult patients (Table 6).

## Discussion

The mechanisms leading to systemic autoimmune aggression in patients with CD remain unknown. NKG2D and their ligands could play a significant role in the development of autoimmunity. In fact, these molecules are involved in the pathogenesis of some ADs that are commonly associated with CD, such as type 1 diabetes and rheumatoid arthritis. For example, blockage of NKG2D in the pre-diabetic stage in non-obese diabetic mice prevents the development of diabetes [33]. In rheumatoid arthritis, MICA and MICB are aberrantly expressed in pathological tissue from affected joints and could be involved in the continuation of the autoreactive process [34].

We found anti-MICA antibodies to be present in half of the patients with untreated CD but in only 3.5% of healthy controls. Moreover, anti-MICA antibodies were present in most patients diagnosed with CD plus other ADs, but were rare in patients solely with ADs. Furthermore, anti-MICA antibodies disappeared from most patients after a year on a GFD, similar to what occurs with anti-tTG antibodies. These results imply that, generally, the relationship between anti-MICA and associated ADs

is directly linked to CD rather than being a phenomenon specifically associated with autoimmunity. However, as previously mentioned, early-onset SLE may be an exception to this pattern, since these antibodies have also been described in this disease [18].

Previous studies of CD show that MICA protein is overexpressed in enterocytes obtained from the damaged mucosa of patients [13,17]. A high level of MICA expression seems to promote mucosal damage by infiltrating intraepithelial CD8+ T lymphocytes, which express the MICA receptor, NKG2D. In fact, other authors have suggested that overexpression of MICA could be an initiating event in the progression of mucosal damage [35-37]. In the early phase of CD, some gluten-derived peptides, which have been characterized as non-immunogenic, are directly involved in increasing expression of MICA and IL-15. These 'toxic' peptides activate the innate immunity through an unknown pathway, leading to the destruction of the gut mucosa [35]. As has been demonstrated in other inflammatory processes, massive cellular destruction may be involved in the development of autoantibodies [38]. In CD, an initially higher level of expression of MICA due to gluten-derived peptides followed by the destruction of enterocytes by intraepithelial lymphocytes could trigger the subsequent development of anti-MICA antibodies in susceptible individuals.

The fact that fewer than half of patients with CD have anti-MICA prevents the use of this antibody as a diagnostic marker. However, the greater prevalence of these autoantibodies in patients with additional ADs observed in our study implies that anti-MICA antibodies might be useful for predicting the risk of AD development. ADs are diseases that are frequently associated with CD. Several studies have found a close association between a long period of gluten exposure [15,39] and a common genetic background, although others found no relationship between ADs and prolonged gluten intake in CD [40]. We found that ADs in our group of patients were more frequent in adults than in the young, but this could be related to the established effect of age on the prevalence of these diseases, rather than due to the duration of gluten

**Table 6 Risk of developing concomitant autoimmune diseases in patients with celiac disease with respect to the presence of anti-MICA autoantibodies, according to age at diagnosis**

Age groups	Celiac disease only		Celiac disease with autoimmune diseases	
	Pediatric (n = 186)	Adult (n = 139)	Pediatric (n = 15)	Adult (n = 43)
Anti-MICA-positive	76 (40.9%)	26 (18.7%)	14 (93.3%)	32 (74.4%)
Anti-MICA-negative	110 (59.1%)	113 (81.3%)	1 (6.7%)	11 (25.6%)
Anti-MICA		<b>P</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>95% confidence interval</b>
Pediatric		<0.01	16.28	2.10, 126.34
Adult		<0.0001	10.03	4.64, 21.66

Risk associated with the presence of anti-MICA in pediatric ( $\leq 14$  years) and adult ( $> 14$  years) groups.

exposure. Moreover, the association of anti-MICA autoantibodies with the presence of additional ADs is substantially modified by age. Surprisingly, although ADs are more frequent in adults with CD, the risk associated with anti-MICA antibodies of developing concomitant AD is clearly greater in childhood, so the determination of these autoantibodies may be very useful in clinical practice to establish the risk in children. In our study, only one pediatric patient with ADs was negative for anti-MICA autoantibodies. In children, CD and other ADs are usually more aggressive processes than in adults. In CD, this could result in increased expression of MIC molecules in younger patients, which would favor the generation of autoantibodies. The presence of anti-MICA autoantibodies could augment tissue destruction and lead to the early development of ADs. As mentioned previously, Dai *et al.* also demonstrated the presence of anti-MICA autoantibodies in 27 patients with juvenile-onset SLE [18]. Our group of 428 patients with AD included 92 diagnosed with SLE. Six of these patients were classified as juvenile-onset SLE and all had anti-MICA (data not shown). Although these antibodies have not been directly implicated in the disease, they might be an additional risk factor in the development of SLE and an interesting biomarker in the diagnostic of this disease in childhood.

### Limitations

Anti-MICA autoantibodies were present in fewer than half of patients with CD, which make them less useful than other autoantibodies, such as anti-tTG or anti-deamidated gliadin, as a diagnostic biomarker. Moreover, all patients included in the study were positive for anti-tTG although the absence of these autoantibodies does not discard the diagnosis of CD, especially in children. Therefore, it would be of great interest to analyze anti-MICA in a population of patients with CD patients who do not have anti-tTG autoantibodies.

Another limitation of this study is the small number of patients with CD and a concomitant AD, which is especially relevant in the group of pediatric patients.

### Conclusions

We have shown here that the development of anti-MICA antibodies is associated with a gluten-containing diet in patients with CD. In addition, anti-MICA antibodies are apparently related to the development of ADs, especially in younger patients although the number of individuals in this study group was small. The determination of these autoantibodies might be less suitable than others for the diagnosis of the disease, but it could be very useful in clinical practice for predicting the development of associated ADs in patients with CD.

The mechanism by which these antibodies could influence the development of autoimmunity might be related

to direct tissue damage, the activation of cellular immunity, or another mechanism similar to that demonstrated for anti-tTG in other studies [8-12]. Further work is needed to establish the role and significance of these autoantibodies in CD and, possibly, in other ADs such as SLE, especially in patients with a young age of onset.

### Additional file

**Additional file 1: Figure S1.** Titration curves of anti-tTG autoantibodies and anti-MICA autoantibodies in three representative patients with CD. **Figure S2.** Dot box plot representing the distribution of maximum MFI in the distinct groups of patients. No comparisons exhibited statistically significant differences between the groups. **Table S1.** (A) Distribution of MICA in patients with CD according to gender. (B) Distribution of genders in patients with CD according to the presence or absence of anti-MICA autoantibodies. **Table S2.** (A) Distribution of genders in patients with CD according to the presence or absence of anti-MICA autoantibodies. (B) Severity of mucosal lesion (Marsh classification) in patients with CD according to the presence or absence of anti-MICA autoantibodies.

### Abbreviations

AD: autoimmune disease; CD: celiac disease; CI: confidence interval; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GFD: gluten-free diet; HLA: human leukocyte antigen; Ig: immunoglobulin; IL: interleukin; MFI: mean fluorescence intensity; MICA: MHC class I polypeptide-related sequence; NK: natural killer lymphocyte; PCR: polymerase chain reaction; SLE: systemic lupus erythematosus; tTG: tissue transglutaminase.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

ALV: study concept and design, analysis and interpretation of data and writing of manuscript. LM: acquisition of data, technical and material support. RAA: statistical analysis. BSÁ: acquisition of data, technical and material support. JRVC: acquisition of data, technical and material support. EA: acquisition of data, critical revision of the manuscript. UV: acquisition of data, critical revision of the manuscript. CB: acquisition of data, critical revision of the manuscript. MLH: acquisition of data, technical and material support. LR: acquisition of data, critical revision of the manuscript and study supervision. CLL: study concept and design, analysis and interpretation of data, writing of manuscript and study supervision. All authors read and approved the final version of the manuscript for submission.

### Acknowledgements

We wish to thank Pablo Martínez Cambor for the critical review of the statistical part of the study. This work is supported by Spanish grants PI12-02587 from the Instituto de Salud Carlos III, RETICS REDINREN (RD12/0021/0021) from the Instituto de Salud Carlos III and by the European Union Fondos FEDER.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo 33006, Spain. <sup>2</sup>Mucosal Immunology Laboratory, Department of Paediatrics and Immunology-IBGM, University of Valladolid, Valladolid, Spain. <sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Internal Medicine, S. Orsola-Malpighi Hospital, University of Bologna, Bologna, Italy. <sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>5</sup>Department of Paediatrics, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>6</sup>Department of Immunology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain. <sup>7</sup>Fundación Renal "Iñigo Álvarez de Toledo", Madrid, Spain.

Received: 16 December 2013 Accepted: 23 January 2014  
Published: 25 February 2014

## References

- Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB: **Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment.** *WJG* 2012, **18**:6036–6059.
- Ludvigsson JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ 3rd, Zinsmeister AR, Lahr BD, Murray JA: **Increasing incidence of celiac disease in a North American population.** *Am J Gastroenterol* 2013, **108**:818–824.
- DePaolo RW, Abadie V, Tang F, Fehlnner-Peach H, Hall JA, Wang W, Marietta EV, Kasarda DD, Waldmann TA, Murray JA, Semrad C, Kupfer SS, Belkaid Y, Guandalini S, Jabri B: **Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens.** *Nature* 2011, **471**:220–224.
- Marsh MN: **Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue').** *Gastroenterology* 1992, **102**:330–354.
- Londei M, Maiuri L, Quarantino S: **A search for the holy grail: non-toxic gluten for celiac patients.** *Gastroenterology* 2005, **129**:1111–1113.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: **Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease.** *Nat Med* 1997, **3**:797–801.
- Molberg O, McAdam SN, Sollid LM: **Role of tissue transglutaminase in celiac disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000, **30**:232–240.
- Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R, Puccetti A: **In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes.** *PLoS Med* 2006, **3**:e358.
- Barone MV, Caputo I, Ribocco MT, Maglio M, Marzari R, Sblattero D, Troncone R, Auricchio S, Esposito C: **Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease.** *Gastroenterology* 2007, **132**:1245–1253.
- Teesalu K, Panarina M, Uiho O, Uiho R, Utt M: **Autoantibodies from patients with celiac disease inhibit transglutaminase 2 binding to heparin/heparan sulfate and interfere with intestinal epithelial cell adhesion.** *Amino Acids* 2012, **42**:1055–1064.
- Myrsky E, Kaukinen K, Syrjanen M, Korponay-Szabo IR, Maki M, Lindfors K: **Celiac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis.** *Clin Exp Immunol* 2008, **152**:111–119.
- Myrsky E, Caja S, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabo IR, Nadalutti C, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Maki M, Kaukinen K, Lindfors K: **Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA.** *CMLS* 2009, **66**:3375–3385.
- Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulat DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B: **Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease.** *Immunity* 2004, **21**:357–366.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T: **A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:6259–6263.
- Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S: **The NKG2D receptor: sensing stressed cells.** *Trends Mol Med* 2008, **14**:179–189.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T: **Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.** *Nat Immunol* 2001, **2**:255–260.
- Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S: **A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease.** *Immunity* 2004, **21**:367–377.
- Dai Z, Turtle CJ, Booth GC, Riddell SR, Gooley TA, Stevens AM, Spies T, Groh V: **Normally occurring NKG2D + CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus.** *J Exp Med* 2009, **206**:793–805.
- Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, Stastny P: **Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry.** *Hum Immunol* 2006, **67**:230–237.
- Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G: **Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection.** *N Engl J Med* 2007, **357**:1293–1300.
- Terasaki PI, Ozawa M, Castro R: **Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival.** *Am J Transplant* 2007, **7**:408–415.
- Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Gonzalez MZ, Fdez-Morera JL, Diaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, Pascual D, Martinez-Borra J, Muro M, Alvarez-Lopez MR, Lopez-Larrea C: **The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection.** *Am J Transplant* 2007, **7**:1842–1848.
- Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Diaz-Pena R, Diaz-Molina B, Blanco-Garcia RM, Alvarez-Lopez MR, Lopez-Larrea C: **Post-transplant soluble MICA and MICA antibodies predict subsequent heart graft outcome.** *Trans Immunol* 2006, **17**:43–46.
- Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot JP, Ginies JL, Dabadie A, Mouterde O, Allez M, Nion-Larmurier I: **Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008, **6**:753–758.
- McNeish AS, Harms HK, Rey J, Shmerling DH, Visakorpi JK, Walker-Smith JA: **The diagnosis of coeliac disease. A commentary on the current practices of members of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN).** *Arch Dis Child* 1979, **54**:783–786.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Leigeman M, Maki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP: **European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012, **54**:136–160.
- Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, Greco L, Cohen H, Ciacci C, Eliakim R, Fasano A, Gonzalez A, Krabshuis JH, LeMair A: **World gastroenterology organisation global guidelines on celiac disease.** *J Clin Gastroenterol* 2013, **47**:121–126.
- Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, Greco L, Cohen H, Ciacci C, Fasano A, Gonzalez A, Krabshuis JH, LeMair A: **Celiac Disease. WGO Global Guidelines.** 2012, [http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012\\_Celiac%20Disease\\_long\\_FINAL.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012_Celiac%20Disease_long_FINAL.pdf).
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C: **MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients.** *Immunogenetics* 2002, **53**:989–991.
- Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C: **MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1\*0501/DQB1\*0201.** *Gut* 2002, **50**:336–340.
- Tinto N, Ciacci C, Calcagno G, Gennarelli D, Spampinato A, Farinaro E, Tortora R, Sacchetti L: **Increased prevalence of celiac disease without gastrointestinal symptoms in adults MICA 5.1 homozygous subjects from the Campania area.** *Digest Liver Dis* 2008, **40**:248–252.
- Salardi S, Volta U, Zucchini S, Fiorini E, Maltoni G, Vaira B, Cicognani A: **Prevalence of celiac disease in children with type 1 diabetes mellitus increased in the mid-1990s: an 18-year longitudinal study based on anti-endomysial antibodies.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008, **46**:612–614.
- Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, Lanier LL: **NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice.** *Immunity* 2004, **20**:757–767.
- Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T: **Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:9452–9457.
- Martin-Pagola A, Ortiz L, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Castano L, Bilbao JR: **Analysis of the expression of MICA in small intestinal mucosa of patients with celiac disease.** *J Clin Immunol* 2003, **23**:498–503.
- Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, Geraghty D, Groh V, Spies T, Jabri B, Mayer L: **Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells.** *Inflamm Bowel Dis* 2007, **13**:298–307.
- Lopez-Vazquez ARL, Gonzalez S, Lopez-Larrea C: **NKG2D ligands expression patterns in gut mucosa from patients with coeliac disease.** *Immunologia* 2013, **32**:43–49.
- Makhoulouf L, Kishimoto K, Smith RN, Abdi R, Koulmanda M, Winn HJ, Auchincloss H Jr, Sayegh MH: **The role of autoimmunity in islet allograft destruction: major histocompatibility complex class II matching is necessary for autoimmune destruction of allogeneic islet transplants after T-cell costimulatory blockade.** *Diabetes* 2002, **51**:3202–3210.

39. Ventura A, Magazzu G, Greco L: Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterol* 1999, **117**:297–303.
40. Sategna Guidetti C, Solerio E, Scaglione N, Aimò G, Mengozzi G: Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. *Gut* 2001, **49**:502–505.

doi:10.1186/1741-7015-12-34

**Cite this article as:** López-Vázquez *et al.*: Autoantibodies against MHC class I polypeptide-related sequence A are associated with increased risk of concomitant autoimmune diseases in celiac patients. *BMC Medicine* 2014 **12**:34.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

