

**Universidad de Montemorelos**

**Facultad de Ciencias de la Salud**



**TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS QUE PREDISPONEN A ENFERMEDAD  
CELIACA EN SANGRE DE CORDON UMBILICAL DE NIÑOS SONORENSES**

**Tesis**

**Presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de  
Licenciada en Nutrición y Dietética**

**Por**

**Karla Melissa Ruiz Dyck**

**CIB  
Ej.1**



**73518**

**Montemorelos, N.L.**

**Julio de 2010**

# Universidad de Montemorelos

## Facultad de Ciencias de la Salud



### TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS QUE PREDISPONEN A ENFERMEDAD CELIACA EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NIÑOS SONORENSES

#### Tesis

Presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de  
Licenciada en Nutrición y Dietética

Por:

**Karla Melissa Ruiz Dyck**

TL  
616.34  
R934T  
2010  
21

# Universidad de Montemorelos

## Facultad de Ciencias de la Salud



### TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS QUE PREDISPONEN A ENFERMEDAD CELIACA EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NIÑOS SONORENSES

Tesis

presentada en cumplimiento parcial  
de los requisitos para el título de  
Licenciada en Nutrición y Dietética

por

**Karla Melissa Ruiz Dyck**

**RESUMEN**

**TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS QUE PREDISPONEN  
A ENFERMEDAD CELIACA EN SANGRE  
DE CORDÓN UMBILICAL DE  
NIÑOS SONORENSES**

por

**Karla Melissa Ruiz Dyck**

**Asesor principal: Dra. Ana María Calderón de la Barca**

## RESUMEN DE TESIS DE LICENCIATURA

Universidad de Montemorelos

Facultad de Ciencias de la Salud

**Título: TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS QUE PREDISPONEN A ENFERMEDAD CELIACA EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NIÑOS SONORENSES**

**Nombre del investigador: Karla Melissa Ruiz Dyck**

**Nombre y título del asesor principal: Dra. Ana María Calderón de la Barca**

**Fecha de terminación: Julio de 2010**

**Antecedentes.** La enfermedad celiaca (EC) está asociada a la expresión de genes de los alelos que codifican para las moléculas HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8. Por eso su tipificación es una herramienta útil para detectar susceptibilidad a EC.

**Objetivo.** Identificar la predisposición genética a enfermedad celiaca estimando la frecuencia de los alelos DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201 y DQB1\*0302, que dan lugar a los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en sangre de cordón umbilical de niños sonorenses recién nacidos.

**Métodos.** Se tipificaron por PCR convencional, haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 a partir de ADN genómico extraído de sangre de cordón umbilical en 153 recién nacidos.

**Resultados.** La prevalencia de haplotipos que predisponen a la EC fue del 28.1%, con una relación 1:1 para HLA-DQ2: HLA-DQ8. El alelo DQA1\*0301 tuvo una frecuencia de 0.24, seguida de los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0302/3, ambos con 0.22 y finalmente DQB1\*0201 con 0.13 de frecuencia. Estas frecuencias, son las mismas que las de una población mexicana mestiza, mientras que los haplotipos que predisponen a la EC corresponden a una mezcla que coincide con el origen europeo-indígena en Sonora.

**Conclusión.** Hay predisposición genética a la EC en los recién nacidos sonorenses, en la misma proporción que en cualquier población del mundo en donde la prevalencia de EC es del 1%. Se debe prevenir el riesgo para evitar la enfermedad a partir de la realización de exámenes de antecedentes génicos y/o tipificación.

# **Universidad de Morelos**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS QUE PREDISPONEN A ENFERMEDAD  
CELIACA EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NIÑOS SONORENSES**

**Tesis**

**presentada en cumplimiento parcial**

**de los requisitos para el título de**

**Licenciada en Nutrición y Dietética**

**por**

**Karla Melissa Ruiz Dyck**

**Morelos, N.L.**

**Julio de 2010**

TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS QUE PREDISPONEN A ENFERMEDAD  
CELIACA EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NIÑOS  
SONORENSES

Tesis

presentada en cumplimiento parcial  
de los requisitos para el título de  
Licenciatura en Nutrición y Dietética


por

Karla Melissa Ruiz Dyck

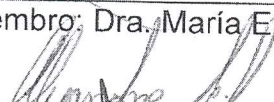
APROBADA POR LA COMISIÓN:




Asesor principal: Dra. Ana María  
Calderón de la Barca



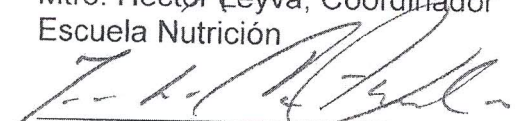
Miembro: Dra. María Elena Acosta



Miembro: Dr. Alejandro Gil



Mtro. Héctor Leyva, Coordinador  
Escuela Nutrición



Dr. Zeno-Charles Marcel, Director  
Facultad de Ciencias de la Salud

12 de Julio del 2010

Fecha de aprobación



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo, a todas las personas que aquí en Hermosillo, Montemorelos y Monterrey, me apoyaron a pesar de la distancia y que hicieron posible la terminación del mismo. De forma especial a:

Adolfo Ruiz y Arlene de Ruiz, mis padres.

Saritza y Juan Ruiz, mis hermanos.

Mis tíos, tías, primos y primas, que gracias a su ayuda pude sentirme como en casa, estando fuera.

“Bendice, alma mía, a Jehová, y no olvides ninguno de sus beneficios.

Él es quien perdona tus iniquidades, el que sana todas tus dolencias, el que rescata de la fosa tu vida, el que te corona de favores y misericordias, el que sacia de bien tu boca.”

Salmo 103:2-5

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por permitir realizar el presente trabajo en sus instalaciones, con la colaboración del Dr. Norberto Sotelo y personal de Ginecoobstetricia del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado como parte del proyecto con Ref. SALUD-01-2009-115212: "Desarrollo de tecnologías para la prevención y diagnóstico de la enfermedad celiaca en los niños".

A la Doctora Ana María Calderón de la Barca, por aceptarme en su larga lista de estudiantes y darme la atención y tiempo como si fuera la única. Gracias por todas las experiencias de conocimiento que durante este año compartió conmigo.

A los compañeros de laboratorio; Adriana, René, Oscar, Dina, Frank, Noé, Liliana y las PYY (Elsa, Edna, Paola y Marisela), gracias por su amistad. Aprender de ustedes fue tan emocionante cómo disfrutar de una tosti-reunión.

A cada uno de mis maestros y compañeras de la Escuela de Nutrición en la Universidad de Morelos, porque lo que se vive esos 4 años, nunca se olvida.

A mis padres y hermanos: Adolfo Ruiz, Arlene de Ruiz, Saritza y Juan; somos un equipo!!!. Gracias por cada esfuerzo a favor de mi bienestar. A la extensa familia que de alguna u otra forma me adoptó como una hija, Abue Mery, tía Ángeles y tía Deepy, Los Mazariegos, Los Cooper y a todos Los Dyck.

A Fili, a pesar de la distancia, tu apoyo me motivó a seguir adelante a cada momento, gracias por estar a mi lado.

A ti Dios porque todo lo que soy lo debo a Ti, gracias por tantas bendiciones que pude ver y por las que no, también.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
Patogénesis.....	4
Factores inmunológicos.....	6
Factores ambientales.....	7
Gluten.....	7
Regímenes de alimentación infantil.....	9
Factores genéticos y su prevalencia.....	9
Prevalencia de la enfermedad celiaca.....	11
Estado nutricional y enfermedad celiaca.....	13
Tratamiento de la enfermedad celiaca.....	14
Características de la dieta exenta de gluten.....	15
Dieta exenta de gluten en niños pequeños.....	16
Riesgos de la enfermedad celiaca no tratada.....	17
Prevención de la enfermedad celiaca.....	18
Tipificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8.....	19
Análisis de haplotipos.....	20
Combinaciones predisponentes a la enfermedad celiaca.....	22
Métodos para estudiar los haplotipos.....	23
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
General.....	28
Específicos.....	28
<b>SUJETOS Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>

Población de estudio.....	29
Muestras de sangre y procesamiento.....	29
Toma de muestras de sangre.....	29
Extracción de ADN genómico.....	30
Cuantificación de la concentración de ADNg.....	30
Identificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8.....	31
Reacción en cadena de la polimerasa.....	31
Electroforesis en gel de agarosa.....	32
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
Población de estudio.....	33
Tipificación y distribución de haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8.....	34
Detección de los alelos.....	34
Distribución de los alelos DQA1* y DQB1*.....	35
Haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8.....	35
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
Población de estudio.....	37
Tipificación y distribución de haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8.....	38
Detección de los alelos.....	38
Distribución de alelos DQA1* y DQB1*.....	38
Haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8.....	43
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Iniciadores específicos de alelos de HLA para las reacciones de PCR.....	31
2. Condiciones óptimas de alineación, extensión y amplificación de las combinaciones DQA1*0501, DQB1*0201, DQA1*0301 y DQB1*0302/3.....	32
3. Distribución de los alelos DQA1 y DQB1 asociados a enfermedad celiaca.....	35
4. Frecuencia de alelos en los neonatos sonorenses y en otras poblaciones mexicanas.....	39
5. Frecuencia de alelos en neonatos sonorenses y en otras poblaciones europeas y estadounidense.....	40
6. Frecuencia de alelos de neonatos sonorenses, en comparación con poblaciones de enfermos celíacos.....	42
7. Prevalencia de haplotipos relacionados a enfermedad celiaca en diversas poblaciones (%)......	44
8. Comparación de haplotipos de riesgo con otras poblaciones (%)......	45

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es una compleja enteropatía autoinmune inducida por la intolerancia permanente al gluten del trigo, en personas genéticamente susceptibles (Niewinski, 2008). Los genes que predisponen a esta enfermedad son los que codifican para los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés) DQ2 y DQ8. Las moléculas de este tipo, son las receptoras de los péptidos del gluten, en las células presentadoras de antígenos del sistema inmune. Alrededor de un 30% de cualquier población presenta HLA DQ2 ó DQ8 y sólo una pequeña proporción sufre EC. Por esto, dichas moléculas o haplotipos son necesarios pero no suficientes para el desarrollo de la EC (Briani *et al.*, 2008).

Así, se considera que hay factores que se conjugan con los genéticos, para dar origen a la enfermedad. Entre los factores involucrados, se encuentran los ambientales relacionados con los regímenes de lactancia e introducción de alimentos durante el primer año de vida, las infecciones por rotavirus y el uso de algunos antibióticos (Green y Cellier, 2007; Tack *et al.*, 2010).

Hasta hace pocos años, se consideraba a la EC un problema de solo algunas poblaciones sajonas. Actualmente, se estima su prevalencia en un 1% en diversas poblaciones alrededor del mundo (Briani *et al.*, 2008). Esta prevalencia coloca a la EC como uno de los desórdenes autoinmunes y con carga genética más comunes (Torres *et al.*, 2007). En México existen pocos estudios publicados sobre EC; sin embargo, se reconoce como un problema latente, actualmente existen laboratorios especializados en su diagnóstico y el Instituto Nacional de Ciencias de Médicas y de

la Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), tiene una clínica disponible para su manejo y tratamiento nutricional. Sin embargo, no se ha publicado ningún estudio sobre la predisposición genética de nuestra población, a la EC.

Tal y como se hace en la prevención de otras enfermedades, algunos especialistas recomiendan, cuando existe alto riesgo genético a la EC, cuidar los regímenes de alimentación infantil y prevenir infecciones virales (Cranney *et al.*, 2007; Olsson *et al.*, 2008). Por lo que es indispensable identificar al nacimiento la expresión génica de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, lo cual es el objetivo principal de la presente tesis.

## ANTECEDENTES

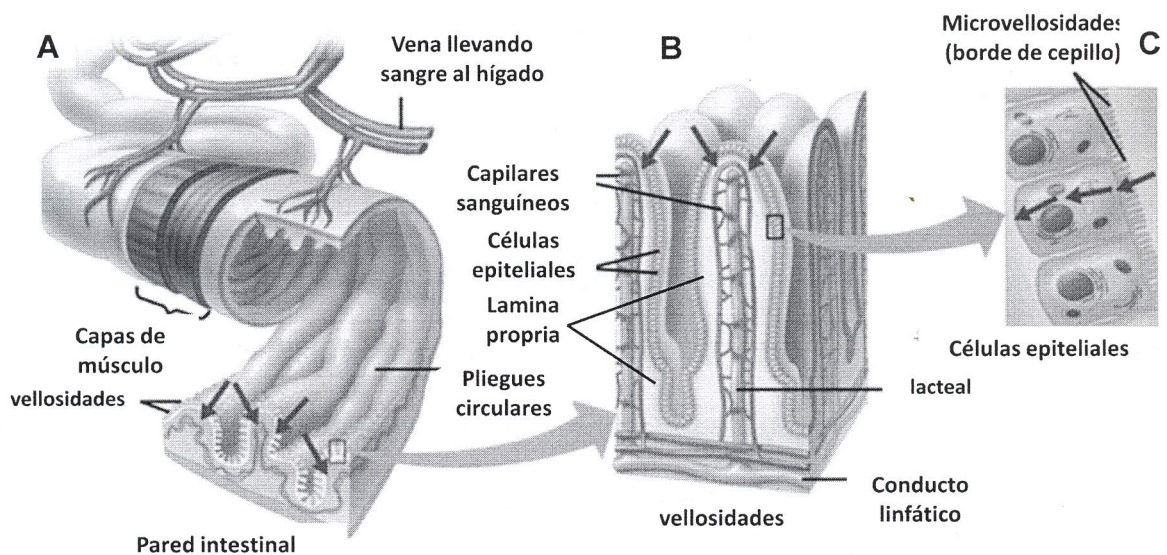
La EC se manifiesta después de la ingestión de proteínas derivadas del gluten de trigo y otros cereales taxonómicamente relacionados, como cebada y centeno. La lesión que caracteriza a la EC involucra una respuesta inflamatoria en el intestino delgado, atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas, así como infiltración de linfocitos (Alaedini *et al.*, 2005).

Originalmente considerada como un síndrome de malabsorción raro en la infancia, hoy la EC es reconocida como un desorden frecuente que puede surgir a cualquier edad. Se manifiesta en su forma típica, por lo común en la infancia, con síntomas gastrointestinales como diarrea crónica, distensión y dolor abdominal. También se presenta con síntomas atípicos como osteoporosis, anemia, infertilidad y cefaleas. Aunque puede ser silente, sin manifestaciones clínicas, pero con pruebas clínicas positivas (Briani *et al.*, 2008; Cranney *et al.*, 2007; Mengiorni *et al.*, 2009).

Antes de entrar en materia, conviene describir la mucosa intestinal, sitio en donde se desarrolla la EC. En la Fig. 1, se muestra en A, una sección del intestino con sus pliegues, repliegues y vellosidades, todo lo cual sirve para aumentar la superficie de absorción intestinal. En la parte B de la misma figura, se observan las vellosidades recubiertas de células epiteliales o enterocitos, así como los conductos linfáticos y capilares en la lamina propia, que conducen los nutrimentos hacia y desde, un órgano o sistema a otros órganos. En la Fig. 1 C, se esquematizan tres células epiteliales, con sus microvellosidades, núcleos y otros organelos. Aunque no se señalan en la figura, las células epiteliales se encuentran una junta a otra, ligadas



por las llamadas uniones estrechas, por lo que normalmente no pueden pasar nutrimentos o compuestos por los espacios intersticiales. La única forma de transporte de nutrimentos desde el lumen del intestino hacia la lámina propia, es a través de moléculas transportadoras específicas en la membrana celular (Groschwitz y Hogan, 2009).



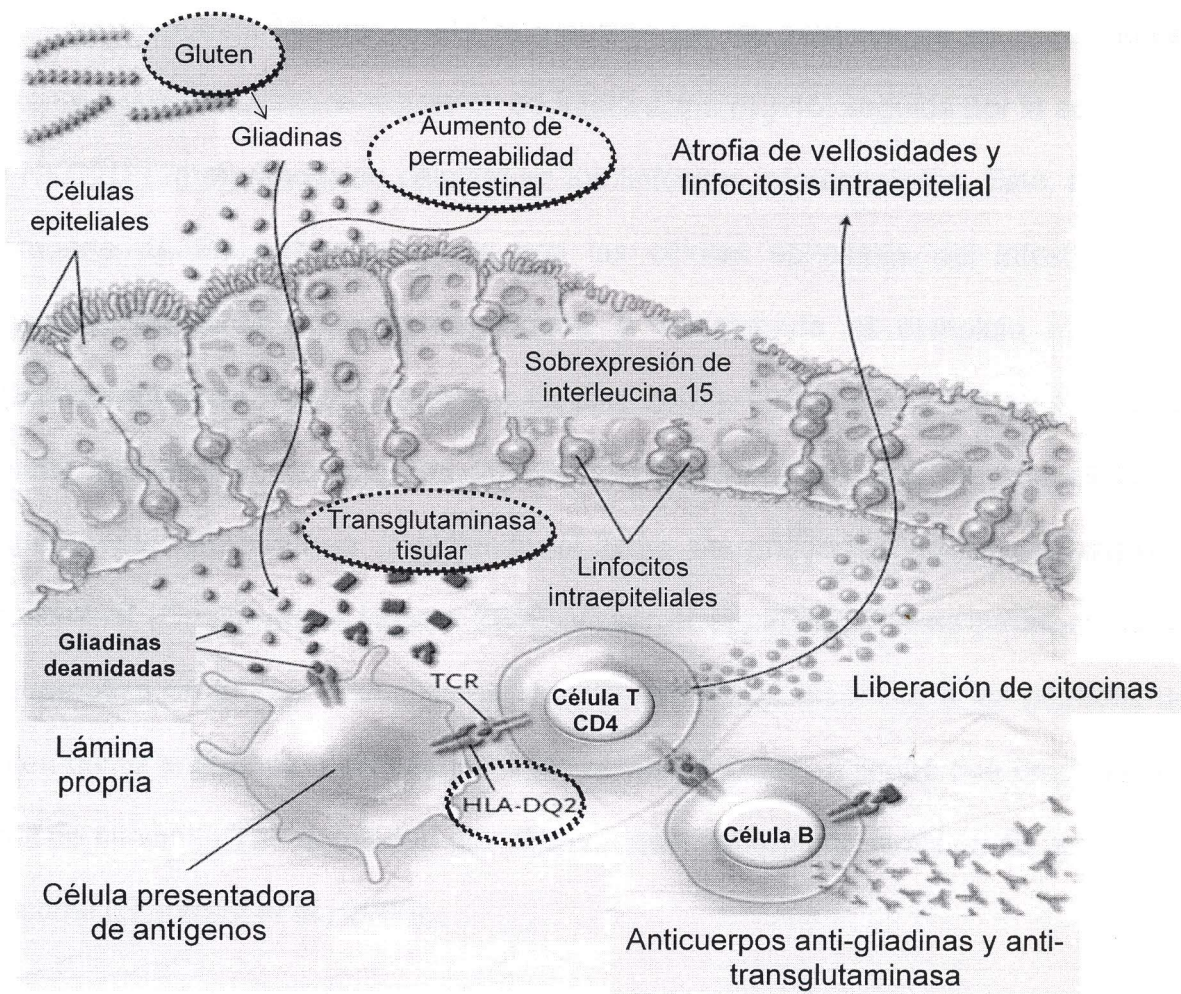
**Figura 1. Esquema de la mucosa intestinal.** En **A**, se muestra una sección de intestino con sus pliegues y vellosidades. **B**: Vellosidades cubiertas de células epiteliales y con conductos linfáticos y sanguíneos en la lamina propia. **C**: Células epiteliales con núcleo y microvellosidades.

## Patogénesis

La EC es el resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales e inmunológicos (Green y Cellier, 2007). En la Fig. 2 se esquematizan los elementos principales del mecanismo de patogénesis de la EC, que inicia cuando algunos péptidos de las gliadinas, que son proteínas del gluten (descritas en una sección

posterior) resisten a las proteasas gástricas, pancreáticas y duodenales (García, 2003), y atraviesan la barrera intestinal. Dichos péptidos, se introducen a la lámina propia probablemente después de una serie de cambios en los espacios intercelulares, con marcado incremento en la permeabilidad intestinal (Alaedini *et al.*, 2005). Allí en la lámina propia, se convierten en sustrato de la transglutaminasa tisular (TGt), que es el autoantígeno responsable de la respuesta inmune en la EC (Briani *et al.*, 2008; Casellas, 2006).

La TGt es una enzima dependiente de calcio que desempeña un papel importante en la estabilización de la matriz extracelular. Forma enlaces covalentes resistentes a proteólisis y además es capaz de desaminar los múltiples residuos de glutamina en los péptidos del gluten, confiriéndoles carga negativa. Como se muestra en la Fig. 2, una vez con carga, dichos péptidos aumentan su afinidad hacia las moléculas HLA-DQ2 o DQ8, en las células presentadoras de antígenos (Green *et al.*, 2005; Koning *et al.*, 2005b). Al unirse a estas moléculas, se desencadena una respuesta inflamatoria mediada por células T del tipo CD4, produciendo citocinas proinflamatorias. Las células T a su vez, inducen a células B específica a la producción de anticuerpos anti-proteínas del gluten y anti-TGt (Koning *et al.*, 2005a).



**Figura 2. Elementos indispensables en la patogénesis de la enfermedad celíaca.** Las gliadinas del gluten no se hidrolizan completamente, sus péptidos atraviesan la barrera intestinal debido a pérdida de las uniones estrechas entre células. Una vez en la lamina propia, la transglutaminasa tisular desamina las glutaminas en los péptidos, confiriéndoles carga. Por eso, se unen con mayor afinidad a las moléculas HLA-DQ2 ó DQ8 en las células presentadoras de antígenos, que las presentan a las células T del tipo CD4, dando inicio a una respuesta inmune que lleva al daño de las vellosidades y a la producción de anticuerpos. (Modificado de Green y Cellier, 2007).

## Factores inmunológicos

En la EC, se activa tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa en epitelio y lámina propia, de las vellosidades del intestino delgado (Green *et al.*, 2005).

La respuesta inmune innata es inducida por los péptidos de las gliadinas del gluten e involucra la sobre-expresión de interleucina (IL)-15, seguida por la activación de NKG2D (un marcador de células) en los linfocitos intraepiteliales. Esto, ocasiona la muerte de los enterocitos, que son las células epiteliales del intestino, con expresión de MICA, que es la cadena A relacionada al complejo mayor de histocompatibilidad clase I (Green y Cellier, 2007). En este tipo de respuesta, el epitelio intestinal no cumple con una de sus funciones primordiales que es la de actuar como una barrera impidiendo el paso de entidades nocivas al espacio intraluminal (Groschwitz y Hogan, 2009; Visser *et al.*, 2009). Por su parte, como se esquematiza en la Fig. 2, el sistema inmune adaptativo reconoce a los péptidos de gluten como antígenos, estimulando a las células T CD4+, mismas que producen un perfil de citocinas Th1 dominado por INF- $\gamma$ , desencadenando la lesión de la mucosa intestinal (Gianfrani *et al.*, 2005).

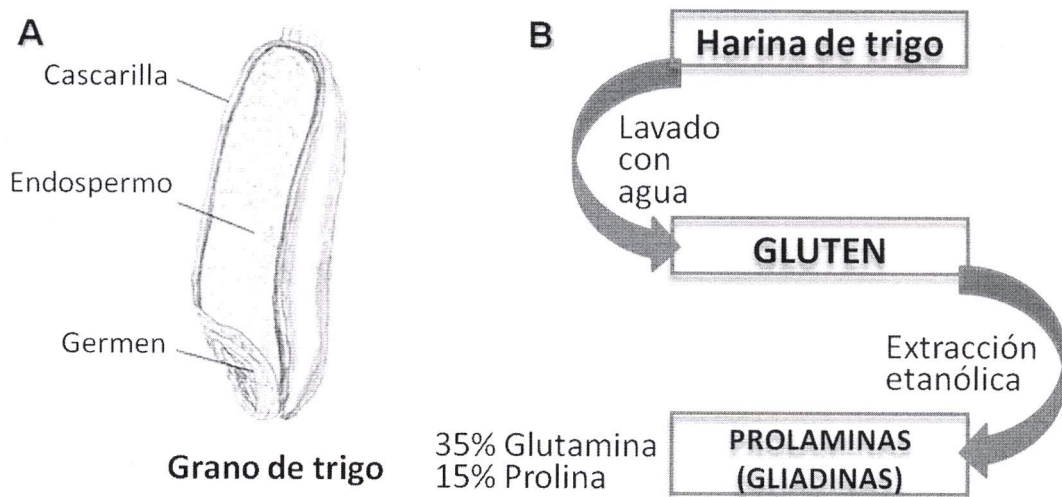
## **Factores ambientales**

### **Gluten**

En el endospermo del trigo (Fig. 3A), se encuentra un complejo proteico denominado gluten, que por extensión se denomina igual en cereales relacionados como centeno y cebada (Heap y Van Heel, 2009). El gluten es el responsable de las propiedades de panificación, así como de la calidad de las pastas y otros productos de repostería. Por su capacidad de absorción de agua, cohesividad, viscosidad y elasticidad, el

gluten tiene muchas aplicaciones en la industria de los alimentos, en donde se usa como extensor o aditivo (Di Sabatino y Corazza, 2009).

El complejo llamado gluten, probablemente incluya a más de 100 diferentes proteínas (Briani *et al.*, 2008; Koning *et al.*, 2005a), insolubles en agua, que se pueden dividir en dos grandes clases. Las que se extraen con soluciones ácidas o alcalinas y se denominan gluteninas, y la fracción soluble en alcohol, conocidas como gliadinas (Fig. 3B). Esta fracción en general corresponde a las prolaminas en cualquier cereal, tiene una composición de aminoácidos muy particular; el 35% está conformado por glutamina y el 15% por prolina (Casellas, 2006). Tan especial es dicha composición de aminoácidos, que las enzimas del tracto gastrointestinal humano no pueden romper muchos de los enlaces, dejando péptidos hasta de 33 aminoácidos, sin hidrolizar.



**Figura 3. El grano de trigo y sus proteínas.** En A se muestran las partes del grano de trigo. B: se muestra el proceso por medio del cual se separan el gluten y las gliadinas de la harina de trigo obtenida del endospermo del grano de trigo.

## **Regímenes de alimentación infantil**

Más que un factor ambiental desencadenante, como en el caso del gluten, los regímenes durante la lactancia y el inicio de la edad de introducción de los cereales, participan como factores protectores o inductores, en el desarrollo de la EC.

La introducción del gluten a la dieta en pequeñas cantidades desde los 4 meses de edad, mientras el niño aún es alimentado con leche materna al menos hasta los 6 meses, podría aumentar la tolerancia oral al gluten, debido a las propiedades inmunológicas y protección de la leche materna (Di Sabatino y Corazza, 2009; Ivarsson *et al.*, 2000). Otra posibilidad sería que las proteínas de la leche de vaca en las fórmulas infantiles, indujeran la respuesta celiaca en niños predispuestos, ya que los anticuerpos de algunos celíacos las reconocen en forma similar a las proteínas del gluten (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2009).

Hay otros factores ambientales, además del gluten y los regímenes de lactancia y alimentación complementaria, que pudieran estar implicados en el desarrollo de la EC. Tal es el caso de algunas infecciones virales y gastrointestinales, así como el uso de algunos antibióticos (Green *et al.*, 2005; Green y Cellier, 2007; Olsson *et al.*, 2008).

## **Factores genéticos y su prevalencia**

La EC se ha asociado a los haplotipos HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201) o DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302), que presentan prácticamente todos los enfermos celíacos. Por ejemplo, en Italia y Libia el 91.1 y el 97%, respectivamente, de los

pacientes con EC codificaron para los heterodímeros DQ2 y/o DQ8, mientras el resto presentaron la mitad del heterodímero de DQ2 (Alarida *et al.*, 2010; Mengiorni *et al.*, 2009). Sin embargo, casi una tercera parte de la población general presenta estos mismos genes y solo alrededor del 1% padece EC (Collin *et al.*, 2005; Ollikka *et al.*, 2009; Vidales *et al.*, 2004). Estos genes confieren menos del 50% de la susceptibilidad genética a EC (Green *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2005). Por lo tanto, la expresión de las moléculas HLA-DQ2 y/o DQ8 es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad (Briani *et al.*, 2008; Green y Jabri, 2003).

Diversos estudios demuestran que la prevalencia de haplotipos así como la frecuencia de las combinaciones de alelos que predisponen a EC, varían de una población a otra (Alarida *et al.*, 2010). Aproximadamente el 90% de los celíacos del norte de Europa, expresan el heterodímero de DQ2 codificado por los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0201 y casi todos los pacientes negativos para DQ2, tienen DQ8 o una combinación de ambos (Catassi *et al.*, 2002; Kaukinen *et al.*, 2002). En Holanda se encontró una prevalencia para DQ2 del 87%, para DQ8 del 6% y para DQ2/DQ8 del 6% (Hadithi *et al.*, 2007). A medida que los rasgos caucásicos se mezclan, se reduce la expresión de HLA-DQ2. El 78% de un grupo de pacientes de Estados Unidos codificaron para la molécula HLA-DQ2, mientras que el 16% presentó DQ8 y sólo el 6% HLA-DQ2/DQ8 (Fasano *et al.*, 2003).

Estudios realizados en Chile, revelaron el predominio de la combinación para HLA-DQ8, que está relacionada con el patrón genético Español-Mapuche de la población (Araya *et al.*, 2000; Pérez-Bravo *et al.*, 1999). Por otra parte, en una población de 55 niños celíacos en Argentina, con mínima o nula contribución de

genes amerindios, se encontró HLA-DQ2 en 95% de los pacientes y solo el 5% presentó el heterodímero HLA-DQ8 (Herrera *et al.*, 1994).

De los pocos estudios realizados en América Latina, se puede observar que sí existe predisposición genética a la EC, contrario a lo que se estimaba hasta hace poco tiempo. Sin embargo, a partir de los datos para una población chilena y otra de argentinos, antes citadas, no se puede inferir nada sobre las demás poblaciones de América Latina, con mezclas étnicas muy diversas. Es necesario realizar estudios sobre la predisposición genética a la EC para cada población. En México la carga genética varía, con alta frecuencia por genes ancestrales europeos (0.62) y baja de amerindios (0.32) en Sonora, en Guerrero ocurre lo opuesto (0.35 vs 0.65) (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009), se puede encontrar cualquier combinación.

### **Prevalencia de la enfermedad celiaca**

La EC se había considerado como un padecimiento de baja prevalencia y con predominio en la población caucásica, antes del uso de marcadores serológicos, como anticuerpos antigliadinas, antiendomiso o antitransglutaminasa tisular. Gracias a esta herramienta, se ha podido detectar la posibilidad de ocurrencia de EC y se han facilitado los estudios epidemiológicos en todo el mundo. La aplicación de marcadores específicos, ha hecho posible el diagnóstico de la EC en sus formas atípica y silente (Barker y Liu., 2008; Dubois y van Heel., 2008; Koning *et al.*, 2005b). Como resultado de dichos estudios, se ha ubicado a la EC como uno de los desórdenes autoinmunes más comunes alrededor del mundo (Torres *et al.*, 2007).



La presencia de la EC se ha documentado en Norte y Sudamérica, Europa, África y Australia (Alaedini *et al.*, 2005), estimándose que 1 de cada 100 personas, la padece (Briani *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2007). A pesar de la prevalencia estimada, es difícil establecer con certeza la prevalencia real, porque se considera que la mayoría de las personas afectadas son asintomáticas o muestran síntomas y signos leves, que no relacionan a priori con la EC (Silano *et al.*, 2010). Esto implica una tasa significativa de morbilidad para cualquier población (Heap y van Heel., 2009; Monsuur *et al.*, 2008).

Los estudios basados en marcadores serológicos en sangre de donadores de diferentes poblaciones, han mostrado una prevalencia de EC de 1:136 en caucásicos de Islandia, 1:124 en población pediátrica de Jordania, 1:133 en población estadounidense, mientras que en España de 1:266 (Johannsson *et al.*, 2009; Nusier *et al.*, 2010; Fasano *et al.*, 2003; Mariné *et al.*, 2009)

Hasta hace poco, la prevalencia de EC en América Latina era desconocida, pero en los últimos años se ha encontrado una prevalencia de 1:167 en adultos de una población de Argentina, así como 1:417 en Brasil (Pereira *et al.*, 2006). Un estudio en banco de sangre de donadores en México, cuantificó anticuerpos antitransglutaminasa tisular y encontró una prevalencia de 1:37 (Remes-Troche *et al.*, 2006). De estos estudios se puede inferir que en países de América Latina, existe un subdiagnóstico de EC.

En Hermosillo, Sonora, se han presentado varios casos de EC en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), en los últimos años (Cabrera-Chávez *et al.*, 2009; Hurtado-Valenzuela *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha publicado un estudio formal de prevalencia, aunque sabemos de los estudios hechos por nuestro grupo de

trabajo en CIAD, que 1: 67 de los niños que acuden al HIES, presentan marcadores serológicos indicativos de EC.

## **Estado nutricio y enfermedad celiaca**

Las personas afectadas con EC muestran diversos grados de inflamación y daño en la mucosa del intestino delgado (Björck *et al.*, 2010; Schuppan *et al.*, 2009). Ocasionando el aplanamiento de las vellosidades intestinales, mermando drásticamente la capacidad de absorción del intestino y como consecuencia final, se afecta el estado nutricio del enfermo (Koning *et al.*, 2005b).

La lesión en la EC primeramente se localiza en la sección proximal del intestino delgado, donde existe una pérdida incrementada de células epiteliales, pero no se limita a esa región, por lo que puede extenderse a lo largo del intestino (Sollid, 2000; Niewinski, 2008). Cuando la lesión se presenta en la región proximal del intestino es común la malabsorción de hierro, folato y calcio, lo que dará como resultado anemia y una disminución en la densidad ósea. Si la lesión progresa hasta el intestino delgado distal, disminuye la absorción de otros macro- y micronutrientes, como hidratos de carbono, grasas, vitaminas liposolubles como A, D, E y K y zinc. El problema se agrava por las pérdidas de nutrientes debidas a episodios diarreicos (Cranney *et al.*, 2007; Niewinski, 2008; Barker y Liu, 2008). Aunado a lo anterior, más del 46% de los pacientes con EC subclínica, padecen deficiencia de hierro, el desorden más común asociado a esta enfermedad (Fernández-Bañares *et al.*, 2009).

El estado nutricional de los recién diagnosticados con EC, depende del tiempo de evolución de la enfermedad activa pero sin diagnosticar, la extensión del daño al tracto gastrointestinal y el grado de malabsorción (Niewinski, 2008).

La EC, también se ha relacionado a desórdenes físicos y neurológicos que incluyen depresión, ansiedad, irritabilidad, neuropatía periférica, ataxia cerebral y migrañas (Barker y Liu, 2008). Algunos de estos problemas están ligados a deficiencias nutricionales; la depresión se puede dar por una deficiencia en vitamina B6 (piridoxina) y es característica de la EC, aún bajo tratamiento. Además, los niveles bajos de folato en sangre, están asociados con una respuesta pobre al tratamiento antidepresivo (Hallert *et al.*, 2002). Si se mantiene la enfermedad en su forma activa a largo plazo, los pacientes pueden presentar una deficiencia severa de vitamina D, resultando en raquitismo o hipocalcemia y tetania o coagulopatía secundaria a deficiencia de vitamina K (Barker y Liu, 2008).

### **Tratamiento de la enfermedad celiaca**

En la última década se han buscado alternativas de uso continuo o intermitente para los pacientes con EC. Dichas modalidades están basadas en el conocimiento sobre la patogénesis (Fig. 2) y se dirigen a la alteración de los alimentos con trigo, la reducción de la exposición al gluten por una degradación enzimática rápida, la inhibición de la permeabilidad de la barrera intestinal o la modulación de la respuesta inmune. Los ensayos clínicos para algunas de las terapias están en marcha; mientras tanto, los pacientes con EC se deben apegar a una estricta dieta exenta de

gluten, como la única terapia efectiva que alivia los síntomas y reduce el riesgo de complicaciones (Tack *et al.*, 2010).

### **Características de la dieta exenta de gluten**

El tratamiento más viable para la EC, implica la eliminación de por vida de alimentos que contengan gluten (Green y Cellier, 2007; Schuppan *et al.*, 2009). Dicho tratamiento inicia la restauración paulatina de las características morfológicas normales de la mucosa, elimina la sintomatología y revierte las deficiencias nutricionales (Olsson *et al.*, 2008; Silvester y Rashid, 2007; Niewinski, 2008).

En la dieta libre de gluten, se evita el consumo de trigo, centeno, cebada y posiblemente avena (Ciclitira *et al.*, 2005). Implicando un reto para el enfermo porque debe evitar estrictamente el consumo de uno de los cereales más utilizados en la industria alimentaria (Green *et al.*, 2005; Koning *et al.*, 2005a). Debe además, superar la dificultad para obtener alimentos industrializados etiquetados como “libres de gluten”, así como financiar el costo elevado que implica su compra. El costo de una canasta básica para el celíaco en Chile, aumenta un 89% con respecto a la convencional (Castillo y Rivas, 2008). De acuerdo a un estudio realizado en Estados Unidos, los productos etiquetados como libres de gluten son 242% más onerosos que los productos regulares (Stevens y Rashid, 2008).

Por otra parte, una amplia variedad de alimentos procesados, como productos cárnicos, salsa de tomate, salsas, dulces y medicamentos, contienen gluten como ingrediente oculto (Koning *et al.*, 2005a; Niewinski, 2008).

Por medio del apego a la dieta exenta de gluten se logrará la normalización del peso, del contenido mineral óseo así como la restauración de la composición

corporal (Bardella *et al.*, 2000). Es esencial una ingestión adecuada de calcio y vitamina D. Algunas fuentes de estos nutrimentos naturalmente libres de gluten, son la leche y los productos lácteos (o sustitutos como la leche de soya fortificada con calcio, leche de arroz), tofu, frijoles, salmón y sardinas, espinacas cocidas, col y brócoli. Algunos otros alimentos que no contienen gluten son las frutas y vegetales frescos, congelados o enlatados, carnes frescas, pescado, pollo, huevos, leguminosas, semillas, nueces, maíz y arroz (Niewinski, 2008).

### **Dieta exenta de gluten en niños pequeños**

Uno de los grupos más vulnerables a las complicaciones de la EC, son los niños. Cuando se les diagnostica esta enfermedad, es conveniente tomar las medidas necesarias para llevar a cabo una alimentación correcta, pero es más trascendente lograr instruirlos tanto a ellos como a los responsables de su alimentación. A fin de que comprendan la importancia de saber elegir alimentos apropiados, omitir o sustituir aquellos que implican un riesgo para su salud; además de desarrollar el gusto por los alimentos permitidos, siendo que a partir del momento de diagnóstico, el tratamiento dietético se convierte en un estilo de vida (Hallert *et al.*, 2002).

Así como la conducta, los hábitos alimentarios se forman en los primeros años, de ahí la importancia de establecer pautas dietéticas adecuadas para toda la vida, desde temprana edad. Esto permitirá que el niño sea capaz de apegarse a la dieta libre de gluten, aun cuando en la niñez sea difícil sostenerla porque la mayoría de los alimentos enfocados a la población infantil, se basan en el trigo.

En un estudio de celíacos, los niños diagnosticados tempranamente en la niñez y educados en el tratamiento dietético para EC, fueron consistentes con la

dieta y mostraron el más alto porcentaje de cumplimiento. Más del 80% se apegó a la dieta libre de gluten en la niñez, así como a lo largo de la vida adulta. El porcentaje de apego a la dieta disminuye con la edad de diagnóstico. Cuando la EC se diagnosticó en la adolescencia, el apego a la dieta fue del 56 al 83%; mientras que cuando se diagnosticó en la edad adulta, el apego fue menor a 50% (Silvester y Rashid, 2007).

En nuestro grupo de trabajo de CIAD, se diseñó una guía alimentaria para niños celíacos de 1 a 6 años de edad, para población mexicana. Se tomaron en cuenta los ingredientes de fácil acceso en cada hogar y se recomienda ampliamente el consumo de amaranto. Dicho grano a diferencia de otros cereales, está naturalmente exento de gluten, aporta mayor cantidad de fibra dietética y contiene más proteína y de una mejor calidad, por el balance adecuado de aminoácidos y su biodisponibilidad (Rojas, 2009). En la guía, se sugiere el consumo de una amplia variedad de alimentos sin procesamiento industrial, exentos naturalmente de gluten. De esa forma, se podrían prevenir las deficiencias de macro- y micronutrientes, comunes en dietas basadas en alimentos procesados libres de gluten.

### **Riesgos de la enfermedad celíaca no tratada**

Además del impacto negativo en el tracto gastrointestinal, la EC no tratada puede afectar otros sistemas corporales, tales como el sanguíneo y esquelético, endócrino, neurológico y reproductivo (Cranney *et al.*, 2007). El riesgo de desarrollar complicaciones a largo plazo como anemia, osteoporosis, infertilidad y cáncer, se ve incrementado en la EC (Sollid, 2000; Bardella *et al.*, 2000; Catassi *et al.*, 2002). Los pacientes sin tratamiento o con poco apego a la dieta, tienen de 30 a 40 veces más

la posibilidad de desarrollar linfomas que los sujetos sanos (Silvester y Rashid, 2007; Remes-Troche, 2008). Sin embargo, hay un bajo porcentaje de pacientes, que aun siguiendo una dieta estricta, no experimentan un restablecimiento de su mucosa intestinal, siendo considerados como los casos con enfermedad celiaca refractaria (Schuppan *et al.*, 2009).

### **Prevención de la enfermedad celiaca**

Las estrategias de prevención de la enfermedad celiaca, son dirigidas a incidir en los regímenes de alimentación infantil en población susceptible genéticamente. Una de las estrategias propuestas para evitar la aparición de la EC a edades tempranas, incluye el amamantar de forma exclusiva, al momento de iniciar la introducción de gluten. El continuar amamantando provocaría un consumo menor de alimentos con gluten, reduciendo con ello la posibilidad de que el niño desarrolle síntomas de EC. Además, el contenido de anticuerpos IgA de la leche materna, podría disminuir la respuesta inmune al gluten ingerido, aglutinando los antígenos e impidiendo su captación debido a su unión a complejos inmunes, en la superficie de la mucosa intestinal (Selimoglu y Karabiber, 2010).

Uno de los principales antecedentes a la estrategia descrita anteriormente, es la evolución en la incidencia de EC en Suecia. Dicha incidencia aumentó abruptamente de 50 a casi 200 casos por 100,000 personas, entre 1985 y 1987. Los factores involucrados en tal aumento, fueron que solo un 50% de los niños eran amamantados hasta 6 meses y se había duplicado el contenido de trigo en los

alimentos infantiles. Además, en 1982 se pospuso la introducción de gluten a los 6 meses de edad, cuando antes se hacía a los 4. Entre 1995 y 1997, se logró reducir la incidencia a los valores previos; lo cual se relacionó con varios cambios. Se incrementó el porcentaje de niños amamantados hasta los 6 meses, de 54 a 76% y se disminuyó a un tercio el contenido de trigo en las fórmulas de seguimiento. También hubo un cambio en las políticas de salud para introducir el gluten en pequeñas cantidades desde los 4 meses, mientras se continuaba amamantando. La suma de estas modificaciones en los regímenes de alimentación infantil, en una población genéticamente estable, mostró la importancia de la prevención (Selimoglu y Karabiber, 2010).

La Sociedad Europea Pediátrica de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN por sus siglas en inglés) recomienda evitar anticipadamente (menos de 4 meses) y tardíamente (más de 7 meses) la introducción de gluten y fomentan la introducción de pequeñas cantidad de gluten y su aumento gradual mientras el niño aún es amamantado. Esto permite la posible modulación de la respuesta inmune en la mucosa al tiempo de la disminución progresiva en el amamantamiento y maduración del sistema gastrointestinal, lo cual es clave en la prevención primaria de la EC (Olsson *et al.*, 2008; Silano *et al.*, 2010).

### **Tipificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8**

Para aplicar una estrategia de prevención de la EC, se requiere primero conocer el riesgo genético. Aunque alrededor del 30% de casi cualquier población presenta los



haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, su detección en sangre de cordón umbilical es el único indicador para recurrir a un programa de prevención. Mantener el amamantamiento durante los primeros 6 meses de vida e introducir alimentos con gluten paulatinamente, entre los 4 y 5 meses de edad, cuando se continúa amamantando, será de mucho beneficio no solo en la prevención de la EC, sino en la alimentación de cualquier niño, de acuerdo a la recomendación de los organismos internacionales de salud e indicado en la Norma Oficial Mexicana: NOM-043-SSA2-2005.

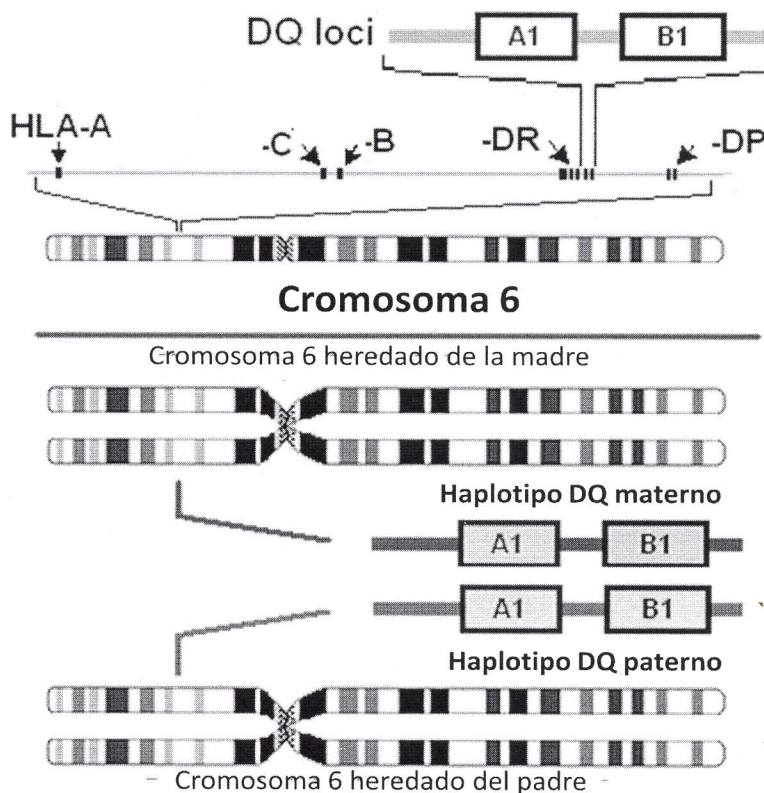
Otra aplicación del análisis de HLA-DQ2 y DQ8, es para ofrecer apoyo en el diagnóstico de EC. Actualmente dicho diagnóstico requiere la realización de al menos una biopsia intestinal, con el hallazgo de atrofia vellositaria, seguido de remisión clínica e histológica después del tratamiento dietario (Vargas *et al.*, 2005; Catassi *et al.*, 2002; Fernández-Bañares *et al.*, 2005). El procedimiento es invasivo, costoso y siempre conlleva un riesgo (Vidales *et al.*, 2004), por lo tanto se han considerado otros acercamientos; como son los estudios de anticuerpos específicos en sangre, la remisión de síntomas al eliminar el gluten de la dieta y la tipificación de la presencia de haplotipos HLA-DQ2 o DQ8, debido a que su ausencia, excluye casi en 100% el diagnóstico de EC (Mengiorni *et al.*, 2009). Por otra parte, un resultado positivo permite identificar a sujetos genéticamente susceptibles a la EC antes de presentar las posibles manifestaciones clínicas o serológicas (Mengiorni *et al.*, 2009; Ollikka *et al.*, 2009).

### **Análisis de haplotipos**

Los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) localizados en una región muy polimórfica de 4 Mb ubicada en el cromosoma 6p21.3 (Fig. 4), son muy importantes

para interpretar las relaciones de las poblaciones y sus movimientos migratorios alrededor del mundo (Balladares *et al.*, 2002). Así mismo, especialmente los DQ, están involucrados en múltiples desórdenes autoinmunes de naturaleza crónica, como enfermedad celiaca, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y psoriasis (Sollid, 2000; Monsuur *et al.*, 2008; Heap y van Heel, 2009).

Actualmente, la tipificación de los haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 se realiza por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es una técnica molecular muy poderosa y para la cual se requieren solamente 200  $\mu$ L de sangre completa. Esta técnica es además sencilla de aplicar y relativamente barata, comparable en costos a los análisis de anticuerpos por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Casi cualquier laboratorio equipado cuenta con un termociclador para realizar la PCR. Recientemente se ha propuesto que este tipo de examen genético sea utilizado como un algoritmo para seleccionar y analizar poblaciones prospectivamente, para el riesgo de EC (Björck *et al.*, 2010).



**Figura 4. Genética de haplotipos HLA-DQ.** El complejo HLA es una porción de aprox. 3 millones de nucleótidos en el cromosoma 6, región en la que hay un gran número de genes. DQ representa dos loci muy cercanos uno a otro. Un gen se llama DQA1 y el otro DQB1, con muchos alelos cada uno.

### Combinaciones predisponentes a la enfermedad celiaca

En la superficie de casi todas las células, incluyendo a las presentadoras de antígenos se generan diferentes combinaciones de los alelos HLA-DQ, dependiendo del genotipo heredado por los padres (Fig. 4). La configuración exacta de estas moléculas influye directamente en el riesgo para desarrollar la EC (Heap y van Heel, 2009; Alarida *et al.*, 2010). Las moléculas HLA-DQ son dímeros que consisten en una cadena alfa y otra beta (Koning *et al.*, 2005b). El dímero DQ2 está codificado por los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0201 (también conocido como DQ2.5), mientras que el dímero DQ8 es codificado por los alelos DQA1\*0301 y DQB1\*0302.

Se ha estudiado el riesgo de los haplotipos HLA-DQ2, aunque no se sabe mucho de los DQ8, en EC. Debido a la elevada frecuencia de celíacos con DQ2 en las regiones más desarrolladas del mundo. Entre los que presentan DQ2, el riesgo más importante para EC es la presencia del haplotipo DQ2.5 (Fallang *et al.*, 2009), riesgo que se incrementa en individuos homocigotos para este haplotipo (Fig. 4), o aquéllos que tienen una copia de la molécula DQ2.5 y una copia de la molécula DQ2.2, formada por DQA1\*0201 y DQB1\*0202 (Monsuur *et al.*, 2008). El incremento en el riesgo se debe a que DQ2.5 se une con mayor afinidad a los epítopes de las gliadinas que el heterodímero DQ2.2 (DQA1\*0201 y DQB1\*0202) (Heap y van Heel, 2009). Los homocigotos para el alelo DQB1\*0201 también están relacionados con la elevada severidad en los resultados histológicos y con el riesgo elevado de padecer EC refractaria (Alarida *et al.*, 2010).

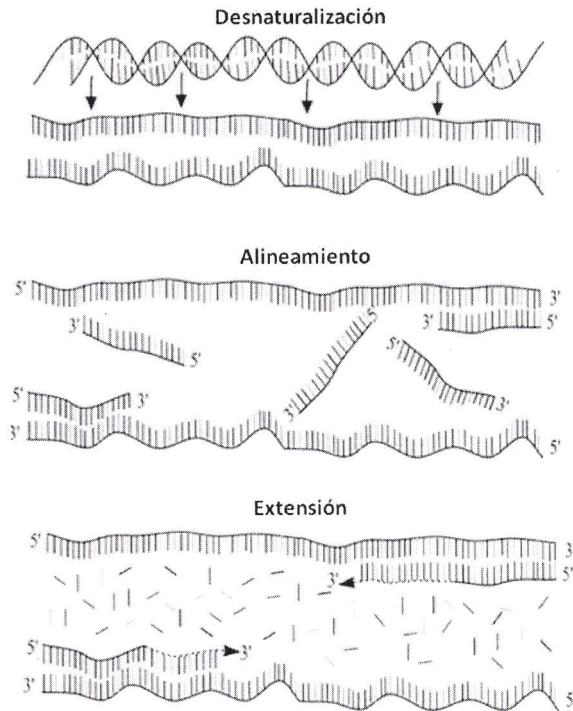
La mayoría de los pacientes celíacos negativos para DQ2, presentan uno de los alelos que codifican para DQ2, generalmente DQB1\*0201 y rara vez DQA1\*0501 (Monsuur *et al.*, 2008; Alarida *et al.*, 2010; Mariné *et al.*, 2009). Así, tener una parte de las moléculas de riesgo, tiene implicaciones funcionales en el riesgo de EC. Por otro lado, se ha especulado que la presencia de sólo la cadena beta o la cadena alfa del heterodímero DQ2, podría impedir la progresión de una enteropatía leve a atrofia vellositaria en los individuos que las poseen (Mariné *et al.*, 2009).

### **Método para estudiar los haplotipos**

Para tipificar los haplotipos, se usan técnicas de biología molecular. Actualmente el método con más o menos variantes, es la amplificación del material genético en las células sanguíneas que contienen núcleo, por medio de la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). El principio de la técnica es la síntesis de un gran número de copias de un fragmento de ADN, partiendo de una pequeña cantidad o copia del fragmento original en el material de estudio.

Los pasos para amplificar el fragmento por PCR, se muestran en la Figura 5. En la primera fase, conocida como desnaturalización, las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan quedando en forma de cadenas sencillas, esto ocurre a una temperatura de 95°C. Después, en la fase de alineamiento, se regula la temperatura en un intervalo entre 40° y 60°C. A esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables (las que son complementarias) durarán mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. Después, en la fase de extensión, la temperatura sube a 72°C y la polimerasa continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado. Como cada fragmento sintetizado sirve como base para sintetizar otros en el siguiente ciclo, el número de copias aumentará en forma exponencial.



**Figura 5. Fases de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** La PCR se lleva a cabo mediante la repetición de 3 fases; desnaturalización, alineamiento y extensión.

## JUSTIFICACIÓN

La EC es una enfermedad crónica, que afecta la calidad de vida del enfermo. Su prevalencia a nivel mundial va en aumento y recientemente, se ha sugerido la tipificación de haplotipos para EC (HLA-DQ2 y DQ8) como una herramienta que ayude a identificar a personas con un riesgo elevado de desarrollar EC (Fernández-Bañares *et al.*, 2005; Björck *et al.*, 2010). Esto porque más del 95% de los pacientes con la enfermedad expresan esos haplotipos, comparado con un 30% de la población en general (Hoffenberg *et al.*, 2003).

Los estudios de riesgo genético se han realizado prácticamente en pacientes celíacos europeos en donde HLA-DQ2 es preponderante. Con los resultados recientes de poblaciones de celíacos con mayor contribución de HLA-DQ8, se tendrán que reanalizar los datos; razón por la cual es muy importante generar información al respecto, en poblaciones mestizas.

Los casos de EC encontrados en el HIES en Sonora, se pueden deber a la colonización de una población precolombina con baja densidad y su actual dinámica de población. El resultado es una población con el estimado más alto de genes ancestrales europeos y el más bajo de genes amerindios, entre las regiones mexicanas estudiadas (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009). Por esto, es importante analizar los haplotipos en un grupo vulnerable como los niños sonorenses, para conocer su propensión a la EC y poder tomar medidas preventivas. Una de estas sería promover el amamantamiento al menos durante 6 meses y evitar la introducción temprana de alimentos conteniendo trigo, ya que actualmente es una práctica común en esta población (Cruz-Ángeles, 2007).

En cuanto a la metodología seguida, la muestra de sangre de cordón umbilical en recién nacidos ofrece mayores ventajas, por ser sencilla de realizar y un método no invasivo. Esto, a diferencia del muestreo venoso en niños pequeños, que involucra problemas éticos así como prácticos (Ludvigsson *et al.*, 2001).



## HIPÓTESIS

La prevalencia de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 que predisponen a la enfermedad celiaca, así como las combinaciones de alelos correspondientes, en una población de recién nacidos sonorenses, reflejan su herencia con predominancia de genes europeos sobre los amerindios.

## OBJETIVOS

### General

Identificar oportunamente la predisposición genética a enfermedad celiaca mediante análisis de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en sangre de cordón umbilical de niños nacidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES).

### Específicos

1. Tipificar por PCR convencional, haplotipos HLA DQ2 y DQ8 en sangre de cordón umbilical en una muestra de niños nacidos en el HIES.
2. Estimar la frecuencia con la que se presentan las combinaciones DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201 y DQB1\*0302 en los recién nacidos en el HIES.
3. Comparar la prevalencia de haplotipos y la frecuencia de los alelos, con los datos encontrados para poblaciones europeas y americanas.

## **SUJETOS Y MÉTODOS**

### **Población de estudio**

Los sujetos de estudio fueron recién nacidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) entre marzo y junio del 2010, a los que se les tipificaron los haplotipos a partir de ADN genómico (ADNg) extraído de sangre de cordón umbilical.

### **Muestras de sangre y procesamiento**

#### **Toma de muestras de sangre**

Se colectaron intencionalmente muestras cada día de entre semana y ocasionalmente los fines de semana en horario corrido de las 21:00h hasta las 08:30h, de todos los niños que nacieron vivos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) durante ese periodo. Todas las muestras fueron tomadas por Liliana Valenzuela tesista de la carrera de Químico Clínico Biólogo, a quien se agradece su colaboración en la realización de este procedimiento.

Inmediatamente después del alumbramiento la placenta fue colocada sobre una bolsa plástica y puesta aparte en una mesa del quirófano (Rubinstein *et al.*, 1995). El exterior del cordón ligado a la placenta se limpió de restos de membrana y sangre, con solución salina y etanol al 70% (Hall *et al.*, 1995). Se tomaron ~2 mL de sangre utilizando aguja y jeringa (Urciuoli *et al.*, 2010). La sangre fue colocada en tubos con anticoagulante EDTA previamente etiquetados y refrigerada a 4°C para su posterior transporte y análisis en un periodo no mayor de 24 h.

## **Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADNg, a partir de sangre de cordón umbilical, se realizó en base al protocolo del juego de reactivos comercial QIAGEN "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (QIAGEN, USA). Se agregaron 20  $\mu$ L de QIAGEN proteasa (proteínasa K) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Después se añadieron 200  $\mu$ L de sangre completa y 200  $\mu$ L de buffer AL. Se incubó a 56° C por 10 min y se centrifugó a 1700 *g* (Eppendorf 5417R, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y.) durante 30 seg. Se adicionaron 200  $\mu$ L de etanol (96-100%) y se centrifugó nuevamente a 1700 *g* durante 30 seg. Después, se pasó cuidadosamente la mezcla a una columna de separación QIAamp y se centrifugó a 6800 *g* durante 1 min. La columna de separación se transfirió a un nuevo tubo de colección de 2 mL. Se añadieron 500  $\mu$ L de buffer AW1 y se centrifugó a 6800 *g* durante 1 min. Se pasó la columna de separación a un nuevo tubo de colección de 2 mL, se agregaron 500  $\mu$ L de buffer AW2 y se centrifugó a 20000 *g* durante 3 min. Finalmente el DNA se resuspendió en 200  $\mu$ L de buffer AE en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. El material utilizado para la extracción del ADNg fue esterilizado en una cámara de UV para evitar contaminación tanto de las muestras como de los reactivos.

## **Cuantificación de la concentración de ADNg**

A todos los extractos se les determinó concentración y pureza midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260/280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

## Identificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8

### Reacción en cadena de la polimerasa

La tipificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, en un termociclador (MJ Mini™, Bio-Rad, Hercules CA, EUA). Las reacciones de amplificación se prepararon conteniendo 2.5 µL de buffer de PCR 10X (Tris-HCL 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), 1.0 µL de MgCl<sub>2</sub> 15 mM, 0.5 µL de la mezcla de dNTPs 0.2 mM, 0.5 µL de cada iniciador de secuencia específica, 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y ~200 ng de ADNg de cada sujeto en estudio, para obtener un volumen final de 25 µL por microtubo de reacción.

Se utilizaron los iniciadores de secuencia específica para las combinaciones de alelos DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201 y DQB1\*0302/3 (IDT-Integrated DNA Technologies, Tucson-AZ, USA), diseñados por Olerup *et al.* (1993) y que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Iniciadores específicos de alelos de HLA para las reacciones de PCR**

Iniciador	Secuencia	Dirección	Tamaño	Haplotipo
DQA1*0501	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTA3' 5'AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC3'	Sentido Antisentido	186 pb	HLA-DQ2
DQB1*0201	5'GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG3' 5'GCAAGGTCGTGCGGAGCT3'	Sentido Antisentido	205pb	HLA-DQ2
DQA1*0301	5'TTCACTCGTCAGCTGACCAT3' 5'CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT3'	Sentido Antisentido	183pb	HLA-DQ8
DQB1*0302/3	5'GACGGAGCGCGTGCGTTA3' 5'AGTACTCGGCGTCAGGCG3'	Sentido Antisentido	122pb	HLA-DQ8

En la Tabla 2, se muestran las condiciones de amplificación utilizadas para cada iniciador específico. La optimización de condiciones se realizó paso a paso, hasta obtener seguridad en la replicación, con los debidos controles negativos y positivos.

**Tabla 2. Condiciones óptimas de alineación, extensión y amplificación de las combinaciones DQA1\*0501, DQB1\*0201, DQA1\*0301 y DQB1\*0302/3**

Fase	DQA1*0501	DQB1*0201	DQA1*0301	DQB1*0302/3
Iniciación	95°C 7 min	95°C 7 min	95°C 7 min	95°C 7 min
Desnaturalización	95°C 30seg	95°C 30seg	95°C 30seg	95°C 30seg
Alineamiento	63°C	62°C	62°C	62.5°C
Elongación	72°C 5 seg	72°C 5 seg	72°C 5 seg	72°C 5 seg
Ciclos	30	39	39	35
Elongación final	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min
Conservación	4°C	4°C	4°C	4°C
Terminación	Fin	Fin	Fin	Fin

### Electroforesis en gel de agarosa

La ausencia o presencia de productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8%, preteñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). La separación se realizó durante 2.5 h a 97 V en buffer TBE 0.5X (89 mM Tris base/89 mM, ácido bórico 2 mM EDTA, pH 8.0). Los geles fueron examinados bajo rayos UV y documentados por medio de una fotografía (Max™ Horizontal Agarose submarine electrophoresis unit, Piscataway, NJ, USA).

## RESULTADOS

### Población de estudio

Se colectaron 153 muestras de sangre de cordón umbilical entre el 18 de marzo y el 3 de junio del 2010, periodo en que nacieron 1290 niños en el Hospital Integral de la Mujer del Estado de Sonora (HIMES), unidad operativa del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES). Como se describió en la sección de métodos, estas muestras provenían del cordón umbilical de todos los niños nacidos vivos en el periodo señalado, entre las 21:00 h de un día, hasta las 08:30 h del día siguiente. Así, aunque el muestreo fue intencional, la muestra colectada para analizar es representativa ya que corresponde al 12% de los nacimientos totales, y hasta donde se sabe, no hay diferencia genética por hora de nacimiento. Todos los recién nacidos examinados fueron mexicanos, el 42.5% pertenecía al sexo femenino y el 57.5% restante al sexo masculino. El 63% de las madres eran residentes de la ciudad de Hermosillo, mientras que el resto procedía de las diversas ciudades, municipios o comunidades del Estado de Sonora.

El HIES, es un Hospital de Especialidades que atiende niños desde el nacimiento hasta antes de los 19 años de edad, así como mujeres embarazadas en su unidad operativa HIMES. Atiende usuarios de todo tipo, sin tomar en cuenta su condición socioeconómica o de otra índole. De allí, se puede inferir que sus usuarios son mestizos, como lo es la población de Sonora.

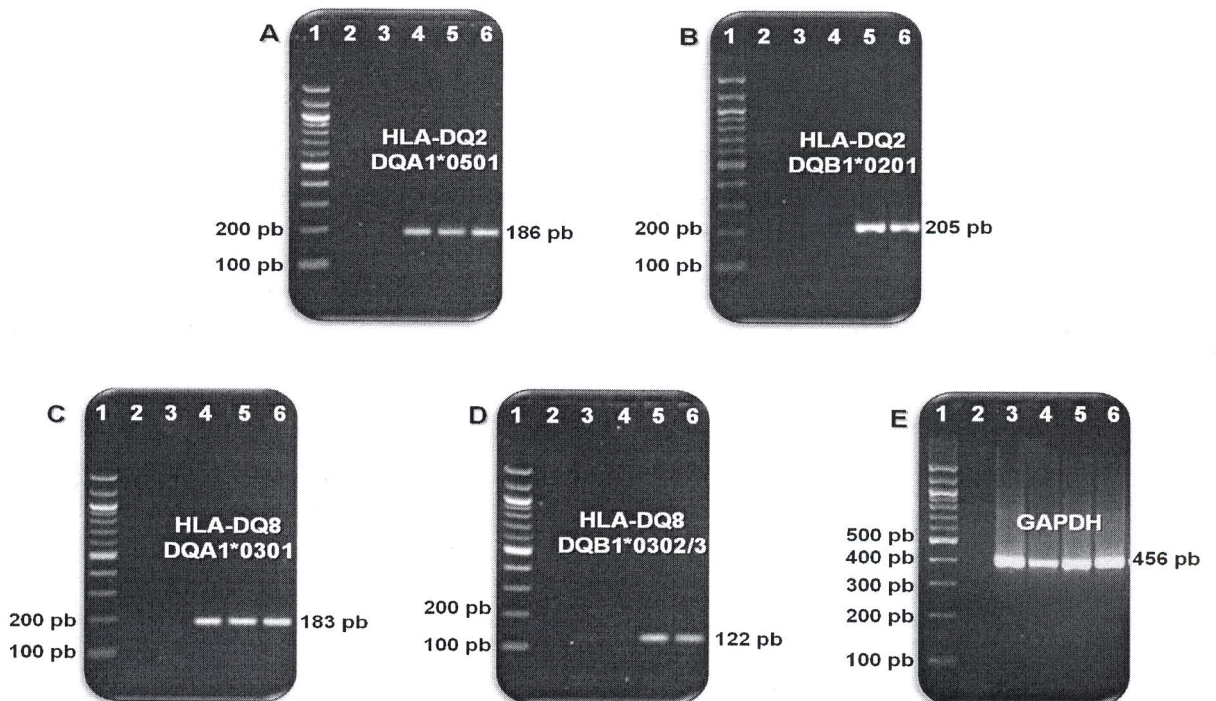
Sonora, cuya capital es Hermosillo, es un estado ubicado en el noroeste del país integrado por 72 municipios y que colinda al norte con los EUA, al este con

Chihuahua, al oeste con el Golfo de California y al sur con Sinaloa. Su territorio representa el 9.2% de la superficie del país, ocupando el segundo lugar en extensión, aunque sólo representa un 2.5% de la población mexicana (INEGI, 2005).

## Tipificación y distribución de haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8

### Detección de los alelos

La Fig. 6, muestra los productos de PCR obtenidos para cada alelo de los heterodímeros asociados con la predisposición a enfermedad celiaca, así como para el gen constitutivo gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH).



**Figura 6. Productos de amplificación por PCR convencional de los alelos DQA1\*, DQB1\* y el gen GAPDH.** En cada parte A, B, C, D y E, el carril 1 corresponde al marcador de 100 pb y el carril 2 a un control negativo de agua. Los carriles 3 a 6 en cada parte, corresponden a muestras de sangre analizadas para: A) DQA1\*0501; B) DQB1\*0201; C) DQA1\*0301; D) DQB1\*0302/3 y E) GAPDH.

Se obtuvieron los productos esperados de 186 pb para DQA1\*0501 y de 205 pb (Fig.6A) para DQB1\*0201 (Fig. 6B), que codifican para el heterodímero HLA-DQ2. Así mismo, se obtuvieron los fragmentos de 183 y 122 pb, que corresponden a los alelos DQA1\*0301 (Fig. 6C) y DQB1\*0302/3 (Fig. 6D), respectivamente, que codifican para el haplotipo HLA-DQ8. El producto esperado para el gen GAPDH era de 456 pb, como se muestra en la Fig. 6E.

### Distribución de los alelos DQA1\* y DQB1\*

Se analizó la forma en que se distribuyen los alelos en la población sonoreNSE estudiada. En la Tabla 3 se puede observar una mayor frecuencia para el alelo DQA1\*0301 con 0.24, seguida de los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0302/3, ambos con 0.22 y finalmente DQB1\*0201 con 0.13 de frecuencia.

**Tabla 3. Distribución de los alelos DQA1 y DQB1 asociados a enfermedad celiaca**

Alelo	N	Frecuencia*
DQA1		
0301	73	0.24
0501	66	0.22
DQB1		
0201	40	0.13
0302/3	66	0.22

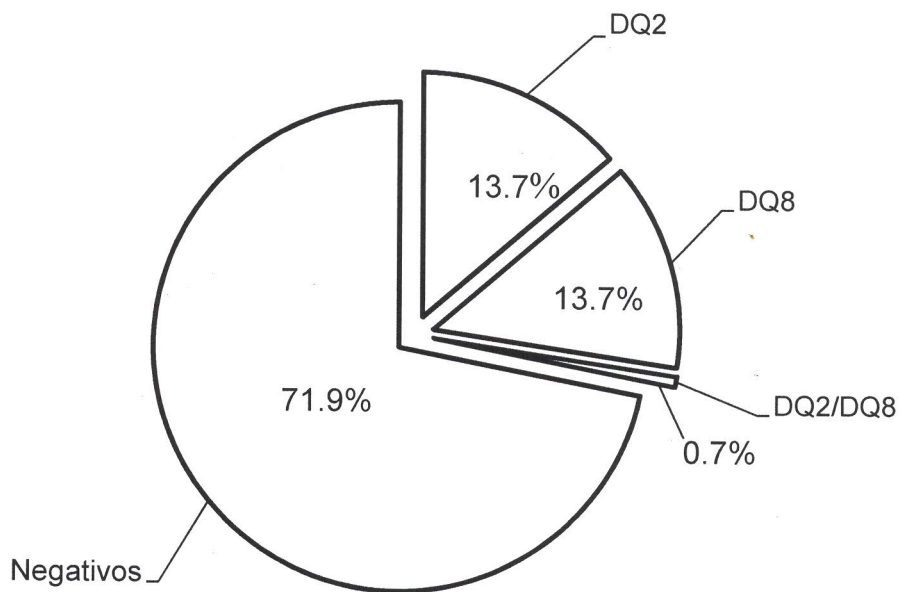
\*Calculada como proporción de la muestra total de cromosomas

### Haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8

Los sujetos identificados como positivos para las combinaciones DQA1\*0501 y DQB1\*0201 fueron considerados como HLA-DQ2, mientras que los positivos para las



combinaciones DQA1\*0301 y DQB1\*0302/3 fueron considerados como HLA-DQ8, aquellos que presentaron una mezcla de las 4 combinaciones se consideraron como HLA-DQ2/DQ8. En la Figura 7 se esquematiza la prevalencia de haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8, así como el porcentaje de negativos.



**Figura 7. Haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 en sonorenses recién nacidos del Hospital Infantil del Estado de Sonora.**

## DISCUSIÓN

### Población de estudio

La muestra estudiada, es representativa de la población sonoreense y es importante contextualizarla, ya que el estudio es de haplotipos, los cuales son característicos de cada población. Ésta, es una población conformada por el mestizaje entre varias tribus indígenas autóctonas, de las cuales aún subsisten los Mayos, Yaquis, Seris, Pápagos, Pimas y Guarijios, y la población europea que llegó a la región a partir del siglo XVII. Los primeros colonos europeos que se asentaron cercanos a la sierra en el este del actual estado, procedían de las regiones de Extremadura, Andalucía y principalmente del País Vasco. La ocupación de la costa sonoreense se dio por españoles y sus descendientes, hasta el siglo XVIII, segregando a las etnias originales. Así, los actuales sonorenses surgieron hasta el siglo XIX, con ancestros tanto europeos como indígenas (Castro, 2008; Parra *et al.*, 2009).

El número total de habitantes en la capital ha variado de unos 14,000 a principios del siglo XX, a 400,000 en 1990. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), en el 2005 la cifra aumentó hasta llegar a 701,838 habitantes. Por lo tanto, se estima que en los últimos 20 años, casi se ha duplicado la población de Hermosillo, variando mucho más la mezcla racial, con población proveniente de otras regiones del país, atraída por el desarrollo industrial en la región (INEGI, 2005; Castro, 2008).

## **Tipificación y distribución de haplotipos HLA-DQ2 y/o DQ8**

### **Detección de los alelos**

En cuanto a la técnica que se usó para el análisis de los haplotipos, la PCR, fue necesario adecuarla para el estudio. Para obtener las condiciones más efectivas de amplificación de los iniciadores, se siguieron las condiciones recomendadas por la compañía fabricante. Sin embargo, hubo poca especificidad en los productos para los alelos DQA1\*0501 y DQB1\*0302/3, por lo que se optó por elevar la astringencia aumentando la temperatura de alineamiento y disminuyendo los ciclos de reacción. Así se obtuvieron productos de DQA1\*0501 con un ajuste de 30 ciclos y 63°C, en lugar de 39 ciclos y 60°C. Los productos de DQB1\*0302/3 se obtuvieron con 35 ciclos y 62.5°C, en lugar de 60.5°C y 39 ciclos. Estos, fueron más específicos, sin dar lugar a productos inesperados (Fig. 6).

Esta evaluación se hizo en base a los datos encontrados en población europea, que da el concepto de alelos susceptibles a la EC (DQA1\*0301, DQA1\*0501, DQB1\*0201 y DQB1\*0302), de acuerdo a Sollid y Thorsby (1993).

### **Distribución de los alelos DQA1\* y DQB1\***

En la Tabla 4, se presenta la distribución de los alelos de los haplotipos en estudio, en la población de neonatos sonorenses, en comparación a la ocurrencia en otras poblaciones mexicanas. En los neonatos sonorenses, la frecuencia del alelo DQA1\*0301 fue de 0.24, de 0.22 para DQA1\*0501 y DQB1\*0302/3 y de 0.13 para DQB1\*0201. Las frecuencias de alelos en las otras poblaciones mexicanas, fueron tomadas de estudios publicados, cuya finalidad era tipificar haplotipos en general

para evaluar origen de las poblaciones y estado actual, sin relacionar los resultados con algún riesgo de enfermedad.

**Tabla 4. Frecuencia de alelos en los neonatos sonorenses y en otras poblaciones mexicanas**

Alelo	Neonatos Sonora n=153	Mayos n=60	Seris n=31	Mestizos Guadalajara n=54	Mestizos México, DF n=99
DQ2					
α0501	0.22			0.22	0.23
β0201	0.13			0.17	0.17
DQ8					
α0301	0.24			0.30	0.26
β0302/3	0.22	0.62	0.50	0.34	0.24

Los datos de frecuencia de los alelos de los neonatos sonorenses en estudio, se asemejan mucho a los encontrados en población abierta de mexicanos mestizos (Tabla 4). Así, la frecuencia para DQA1\*0501 de 0.22, es prácticamente la misma que la encontrada en los estudios de mestizos de Guadalajara y Ciudad de México. Para DQB1\*0201 que en los neonatos sonorenses fue de 0.13, en ambos estudios de mestizos resultó de 0.17.

En cuanto a los alelos que codifican para HLA-DQ8, la frecuencia del DQA1\*0301 con 0.24 en los neonatos sonorenses, fue menor que la de los mestizos, especialmente los del estudio de Guadalajara, con 0.30 para este alelo. Por último, la diferencia más notable es la mayor frecuencia del alelo DQB1\*0302/3 en el estudio de Guadalajara (0.34), con respecto al 0.22 para ese alelo en el presente trabajo en neonatos sonorenses (Cortes *et al.*, 2004). Con esta información, se puede inferir

que el mestizaje de los neonatos sonorenses es mucho más cercano al obtenido del análisis de un grupo de 99 mexicanos mestizos (Vargas-Alarcón *et al.*, 2010).

En general, en las poblaciones amerindias tiene muy alta frecuencia el alelo DQB1\*0302, como se puede ver de los valores de 0.62 y 0.50 para mayos (Arnaiz-Villena *et al.*, 2007) y seris (Alaez *et al.*, 2002), que son parte del mestizaje sonorense. La población de niños sonorenses de este estudio, tuvo una frecuencia de 0.22 para este alelo (sumado al DQB1\*0303), lo cual queda lejos de las frecuencias de mayos y seris. Incluso, queda debajo de la frecuencia 0.34 para DQB1\*0302/3, en mestizos de Guadalajara. Esto puede deberse a que en la población sonorense, la contribución de genes ancestros europeos es aproximadamente el doble que de los amerindios (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009).

En contraste a la frecuencia de los alelos encontrados en población mestiza mexicana, las poblaciones europeas y una de los EUA con más contribución de genes europeos, presentan frecuencias más altas de los alelos que conforman DQ2, que de los DQ8 (Tabla 5).

**Tabla 5. Frecuencia de alelos en neonatos sonorenses y en otras poblaciones europeas y estadounidense**

Alelo	Neonatos Sonora n=153	Vascos n=112	Españoles n=100	Estadounidenses n=542
DQ2				
α0501	0.22	0.19	0.19	
β0201	0.13		0.12	0.21
DQ8				
α0301	0.24	0.08	0.14	
β0302/3	0.22		0.13	0.16

que el mestizaje de los neonatos sonorenses es mucho más cercano al obtenido del análisis de un grupo de 99 mexicanos mestizos (Vargas-Alarcón *et al.*, 2010).

En general, en las poblaciones amerindias tiene muy alta frecuencia el alelo DQB1\*0302, como se puede ver de los valores de 0.62 y 0.50 para mayos (Arnaiz-Villena *et al.*, 2007) y seris (Alaez *et al.*, 2002), que son parte del mestizaje sonorense. La población de niños sonorenses de este estudio, tuvo una frecuencia de 0.22 para este alelo (sumado al DQB1\*0303), lo cual queda lejos de las frecuencias de mayos y seris. Incluso, queda debajo de la frecuencia 0.34 para DQB1\*0302/3, en mestizos de Guadalajara. Esto puede deberse a que en la población sonorense, la contribución de genes ancestros europeos es aproximadamente el doble que de los amerindios (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009).

En contraste a la frecuencia de los alelos encontrados en población mestiza mexicana, las poblaciones europeas y una de los EUA con más contribución de genes europeos, presentan frecuencias más altas de los alelos que conforman DQ2, que de los DQ8 (Tabla 5).

**Tabla 5. Frecuencia de alelos en neonatos sonorenses y en otras poblaciones europeas y estadounidense**

Alelo	Neonatos Sonora n=153	Vascos n=112	Españoles n=100	Estadounidenses n=542
DQ2				
α0501	0.22	0.19	0.19	
β0201	0.13		0.12	0.21
DQ8				
α0301	0.24	0.08	0.14	
β0302/3	0.22		0.13	0.16

La frecuencia del alelo DQA1\*0501 es solo un poco menor (0.19) en vascos (Pérez-Miranda *et al.*, 2003) y españoles (Vidales *et al.*, 2006) que en la población sonorense (0.22) (Tabla 5). Por su parte, el DQB1\*0201 es mucho más frecuente en poblaciones caucásicas como los eslovenos (Buc *et al.*, 1998) y los estadounidenses (Madeleine *et al.*, 2008), con valor de 0.21, que en los sonorenses estudiados (0.13); que a su vez es comparable a la de los españoles (0.12). En cuanto a la frecuencia de los alelos para DQ8, el 0301, sólo presenta 0.08 en los vascos, mientras que en los españoles es la frecuencia es 0.14, en comparación al 0.24 de este estudio. La frecuencia para 0302 de estadounidenses de raza blanca es de 0.16 (Madeleine *et al.*, 2008), mayor que 0.13 de los españoles, pero menor que el 0.22 de este estudio. Así, se podría inferir que los niños sonorenses de este estudio, se asemejan a una población española actual en cuanto a DQ2 y a un población mestiza mexicana en cuanto a DQ8.

La distribución de los alelos encontrada en este estudio de sonorenses recién nacidos y de los otros estudios citados, en población abierta, difiere bastante de la que presentan las poblaciones típicas de enfermos celíacos (Tabla 6); sin embargo, aunque no proporcional, hay relación entre presencia de alelos que codifican para HLA-DQ2 y DQ8.

**Tabla 6. Frecuencia de alelos de neonatos sonorenses, en comparación con poblaciones de enfermos celíacos**

Alelo	Neonatos Sonora n=153	Chilenos n=62	Españoles n=136	Brasileños n=25
DQ2				
α0501	0.22	0.48	0.59	
β0201	0.13	0.25	0.47	0.42
DQ8				
α0301	0.24	0.33	0.01	
β0302/3	0.22	0.43	0.03	

En una población chilena de enfermos celíacos, la frecuencia de DQA1\*0301 fue de 0.33, para DQB1\*0201 fue de 0.25, para DQB1\*0302 de 0.43, mientras que el alelo DQA1\*0501 tuvo una frecuencia de 0.48 (Tabla 6). Aunque este último valor es alto, se observaron con mayor frecuencia las combinaciones entre DQA1\*0301 y DQB1\*0302. Esto, en concordancia con la composición étnica y los antecedentes de relación con la genética Español-Mapuche. Los Mapuches son el segundo grupo con influencia genética más importante en la sociedad chilena constituyendo el 38% del la composición genética total (Araya *et al.*, 2000).

En contraste a los celíacos chilenos, en pacientes celíacos de España, se encontró una frecuencia para DQA1\*0501 de 0.59, mientras que para DQB1\*0201 fue de 0.47, DQA1\*0301 tuvo una frecuencia de 0.01 y DQB1\*0302/3 de 0.03 (Vidales *et al.*, 2004). El mismo grupo de autores comparó la frecuencia de alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 entre los pacientes españoles con EC y la población general de España estudiada previamente por Marsh (1999), datos que se encuentran en la Tabla 5. Es de hacer notar que aunque la frecuencia de los alelos



que codifican para HLA-DQ2 no es tan diferente de la frecuencia de los alelos que codifican para HLA-DQ8 en población abierta, los enfermos celíacos presentaron casi en su totalidad HLA-DQ2.

Una población de celíacos de raza blanca en Brasil presentó una frecuencia para DQB1\*0201 de 0.42 (Silva *et al.*, 2000). Esto indica que incluso dentro de Latinoamérica, existen diferencias en la distribución y frecuencia de los alelos relacionados a EC, dependiendo del grado de mestizaje.

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

En cuanto a la relación entre haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, es curioso que en este estudio fuera de 50% para cada uno (Figura 7). A nuestro conocimiento, es una relación que no presenta ninguna otra población, aunque prácticamente no hay estudios de este tipo en poblaciones mestizas.

De acuerdo a Margaritte-Jeannin (2004), se considera que del 90 a 95% de los celíacos europeos presentan HLA-DQ2 y el resto DQ8. Sin embargo, el estudio de genética de EC en la población europea (European Genetics Cluster on Celiac Disease), señala que la proporción de pacientes negativos para DQ2 fue más elevada en el sur de Europa (Francia e Italia) que en el norte (Finlandia, Noruega, Suecia y Reino Unido (Karell *et al.*, 2003).

En la Tabla 7 se muestra la prevalencia de haplotipos relacionados a EC en poblaciones de enfermos celíacos de diversos países.

**Tabla 7. Prevalencia de haplotipos relacionados a enfermedad celiaca en diversas poblaciones (%)**

HLA	Italia	Holanda	Libia	EUA	Chile
DQ2	80.7	93.8	84	78	23
DQ8	10.3	6.2	13	16	52
DQ2/DQ8				6	24

En una población de celíacos en Italia se obtuvo una prevalencia de 80.7% para DQ2 y 10.3% para DQ8 (Tabla 7), mostrando claramente que la prevalencia de pacientes positivos para DQ2 es menor que en el norte de Europa (Mengiorni *et al.*, 2009). En una población de celíacos en Holanda se encontró un 93.8% de pacientes positivos para DQ2 y tan sólo el 6.2% lo fueron para DQ8 (Hadithi *et al.*, 2007), corroborando de esta forma los resultados obtenidos por Karell (2003).

En otro continente, el de África, en una población pediátrica de enfermos celíacos en Libia, se encontró un 84% de positivos para DQ2 y 13% para DQ8 (Tabla 7). Estos resultados son más cercanos a los de población del sur que del norte de Europa, como es de esperarse de la cercanía geográfica (Alarida *et al.*, 2010). En América, se estudió un grupo de pacientes celíacos de E.U.A., encontrando que el 78% codificaba para la molécula HLA-DQ2, mientras que el 16% lo hacía para DQ8 y sólo el 6% para ambas moléculas (Fasano *et al.*, 2003). Por el contrario, en una población mestiza como la chilena, el 52% de los enfermos celíacos presenta HLA-DQ8, el 23% tiene DQ2 y el 24% es DQ2/DQ8 (Araya *et al.*, 2000).

Por otra parte, la predisposición genética a la EC en población abierta, es decir, aquéllos que presentan HLA-DQ2 ó DQ8, sin tener la enfermedad, es

aproximadamente de 30% (Björck *et al.*, 2010). En este estudio con recién nacidos sonorenses, el 28.1% presentó los haplotipos de predisposición, valor cercano al 29% obtenido en población italiana (Mengiorni *et al.*, 2009).

Al comparar la prevalencia de haplotipos de riesgo para EC de los neonatos sonorenses con otras poblaciones generales del mundo (Tabla 8), se encuentran diferencias notables.

**Tabla 8. Comparación de haplotipos de riesgo con otras poblaciones (%)**

HLA	Neonatos Sonora	Indios Norteamericanos	EUA	Italia
DQ2	13.7	4.5	13.16	
DQ8	13.7	25.3	9.62	7.2
DQ2/DQ8	0.7			0.2

Una muestra de Indios Norteamericanos (Tabla 8) con componente genético amerindio marcado, presentó una contribución del 25.3% para el haplotipo HLA-DQ8 y sólo el 4.5% para HLA-DQ2 (Alarida *et al.*, 2010). El valor reportado para HLA-DQ8 es muy elevado en comparación con la prevalencia presentada por la muestra de neonatos sonorenses, mientras que en una población de Estados Unidos hay mas similitud en la prevalencia para HLA-DQ2 en relación a la población sonorense estudiada (Klitz *et al.*, 2003).

A diferencia de la muestra de Indios Norteamericanos, una muestra en Italia presentó preponderancia de HLA-DQ2 sobre HLA-DQ8 con 21.6% sobre 7.2%, respectivamente (Mengiorni *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos por los neonatos sonorenses, no se asemejan con el elevado valor para HLA-DQ8 presentado por los

Indios Norteamericanos ni con el alto valor para HLA-DQ2 de la muestra analizada en Italia, sino que se presenta una relación 1:1, lo que podría ser resultado del mestizaje presente en la población sonoreense.

Aunque los niños sonorenses estudiados no tienen enfermedad celiaca y se desconoce en qué proporción la podrían desarrollar. De su composición de haplotipos se podría inferir que se daría como en otras poblaciones mestizas, con fuerte contribución de HLA-DQ8.

## CONCLUSIÓN

El presente estudio, es útil para conocer que la predisposición genética a enfermedad celiaca está presente en los sonorenses recién nacidos. Su predisposición genética es equivalente a la de cualquier otra población del mundo en donde la prevalencia de la enfermedad es del 1%.

También sirve este estudio para reafirmar junto con otros estudios citados en esta tesis, sobre el riesgo a la enfermedad celiaca, en población mestiza mexicana.

Más importante aún, es saber que hay posibilidad de manejar el riesgo, con regímenes de alimentación infantil adecuados. Tales son el amamantamiento hasta los 6 meses y la introducción gradual de alimentos de trigo, entre los 4 y 5 meses, cuando se continúa amamantando.

## REFERENCIAS

- Alaedini, A. y Green, P. (2005). Narrative Review: Celiac Disease: Understanding a Complex Autoimmune Disorder. *Ann Intern Med.* 142:289-298.
- Alaez, C., Infante, E., Pujol, J., Duran, C., Navarro, JL. y Gorodezky, C. (2002). Molecular analysis of HLA-DRB1, DQA1, DQB1, DQ promoter polymorphism and extended class I/class II haplotypes in the Seri indians from northwest Mexico. *Tissue Antigens.* 59:388-396.
- Alarida, K., Harown, J., Di Pierro, M., Drago, S. y Catassi, C. (2010). HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes in celiac and healthy Libyan children. *Dig Liver Dis.* 42(6):425-7.
- Araya, M., Mondragón, A., Pérez-Bravo, F., Roessler, J., Alarcón, T., Ríos, G. y Bergenfreid, C. (2000). Celiac disease in a Chilean population carrying Amerindian traits. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 31(4):381-386.
- Arnaiz-Villena, A., Moscoso, J., Granados, J., Serrano-Vela, JI., de la Peña, A., Reguera, R., Ferri, A., Seclen, E., Izaguirre, R., Perez-Hernandez, N. y Vargas-Alarcon, G. (2007). HLA genes in Mayos population from northeast Mexico. *Current Genomics.* 8:466-475.
- Balladares, S., Alaez, C., Pujol, J., Duran, C., Navarro, JL. y Gorodezky, C. (2002). Distribution of TAP gene polymorphisms and extended MHC haplotypes in Mexican Mestizos and in Seri Indians from northwest Mexico. *Genes and Immunity.* 3:78-85.
- Bardella, M., Fredella, C., Prampolini, L., Molteni, N., Giunta, A. y Bianchi, P. (2000). Body composition and dietary intakes in adult celiac disease patients consuming a strict gluten-free diet. *Am J Clin Nutr.* 72:937-939.
- Barker, J. y Liu, E. (2008). Celiac disease: pathophysiology, clinical manifestations and associated autoimmune conditions. *Adv Pediatr.* 55:349-365.
- Björck, S., Brundin, C., Lörinc, E., Lynch, K. y Agardh, D. (2010). Screening detects a high proportion of celiac disease in young HLA-genotyped children. *Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition.* 50(1):49-53.

- Briani, C., Samaroo, D. y Alaedini, A. (2008). Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 7: 644-650.
- Buc, M., Fazekaz, H., Cechova, E., Hegyi, E., Kolibaz, K. y Ferencik, S. (1998). Occurrence rates of HLA-DRB1, HLA-DQB1, and HLA-DPB1 alleles in patients suffering from vitiligo. *European Journal of Dermatology*. 8(1):13-5.
- Cabrera-Chávez, F. y Calderón de la Barca, AM. (2009). Bovine milk intolerance in celiac disease is related to IgA reactivity to alpha-and beta-caseins. *Nutrition*. 25(6):715-6.
- Cabrera-Chávez, F., Rouzaud-Sandez, O., Sotelo-Cruz, N. y Calderon de la Barca, AM. (2009). Bovine milk caseins and transglutaminase-treated cereal prolamins are differentially recognized by IgA of celiac disease patients according to their age. *J Agric Food Chem*. 57:3754-3759.
- Casellas, F. Enfermedad celiaca. (2006). *Med Clin (Barc)*. 126(4):137-42.
- Castillo, LC. y Rivas, CC. (2008). Cost of a basic food basket for celiac patients in Chile. *Rev Med Chil*. 136(5):613-619.
- Castro, T. La diversidad cultural del noroeste de México (Internet). San Luis Río Colorado: Tonatiuh Castro. 2008 Nov. Disponible en: <http://sonoradiversidad.blogspot.com/2008/11/tonatiuh-castro-silva-introduccion-el.html> (Consultado el 20 de junio de 2010).
- Catassi, C., Fornaroli, F. y Fasano, A. (2002). Celiac disease: From basic immunology to bedside practice. *Clin Applied Immunol Rev*. 3: 61–71.
- Ciclitira, P., Ellis, H. y Lundin, K. (2005). Gluten-free diet-what is toxic?. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 19(3):359–371.
- Collin, P., Wahab, P. y Murray, J. (2005). Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. 19(3):341-350.
- Cortes, LM., Baltazar, LM., Perea, FJ., Gallegos-Arreola, MP., Flores, SE., Sandoval, L., Olivares, N., Lorenz, MG., Xu, H., Barton, SA., Chakraborty, R. y Rivas, F. (2004). HLA-DQB1, -DQA1, -DRB1 linkage disequilibrium and haplotype diversity in a Mestizo population from Guadalajara, Mexico. *Tissue Antigens*. 63:458-465.

- Cranney, A., Zarkadas, M., Graham, I., Butzner, D., Rashid, M., Warren, R., Molloy, M., Case, S., Burrows, V. y Switzer, C. (2007). The Canadian celiac health survey. *Dig Dis Sci.* 52:1087-1095.
- Cruz-Ángeles, L. (2007). *Regímenes de lactancia, alimentación complementaria y conductas maternas relacionadas como condicionantes del sobrepeso y obesidad en preescolares*. Tesis de Maestría, Hermosillo Sonora, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- Di Sabatino, A. y Corazza, G. (2009). Coeliac disease. *Lancet.* 373:1480–93.
- Dubois, P. y van Heel, D. (2008). Translational mini-review series on the immunogenetics of gut disease:immunogenetics of coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 153:162-173.
- Fallang, LE., Bergseng, E., Hotta, K., Berg-Larsen, A., Kim, CY. y Sollid, L. (2009). Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nature Immunology.* 10(10):1096-1102.
- Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, RB., Drago, S., Elitsur, Y., Green, PH., Guandalini, S., Hill, ID., Pietzak, M., Ventura, A., Thorpe, M., Kryszak, D., Fornaroli, F., Wasserman, SS., Murray, JA. y Horvath, K. (2003). Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 163(3):286-92.
- Fernández-Bañares, F., Esteve-Comas, M. y Rosinach, M. (2005). Cribado de la enfermedad celíaca en grupos de riesgo. *Gastroenterol Hepatol.* 28(9):561-6.
- Fernández-Bañares, F., Monzón, H. y Forné, M. (2009). A short review of malabsorption and anemia. *World J Gastroenterol.* 15(37):4644-4652.
- García, M. (2003). La enfermedad celíaca hoy. *Vox Paediatrica.* 11:37-42.
- Gianfrani, C., Auricchio, S. y Troncone, R. (2005). Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Inmunology Letters.* 99:141-145.
- Green, P. y Jabri, B. (2003). Coeliac disease. *Lancet.* 362:383–91.
- Green, P., Alaedini, A., Sanderb, H., Brannagan, T., Latovb, N. y Chinb, R. (2005). Mechanisms underlying celiac disease and its neurologic manifestations. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:791–799.



- Green, P. y Cellier, M. (2007). Celiac disease. *New Eng J Med.* 357:1731-1743.
- Groschwitz, K. y Hogan, S. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 124(1):3-20.
- Hadithi, M., von Blomberg, M., Crusius, B., Bloemena, E., Kostense, P., Meijer, J., Mulder, C., Stehouwer, C. y Peña, A. (2007). Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Annals of Internal Medicine.* 147:294-302.
- Hall, J., Lingenfelter, P., Adams, S., Lasser, D., Hansen, J. y Bean, M. (1995). Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridization. *Blood.* 86(7):2829-2832.
- Hallert, C., Grant, C., Grehn, S., Grännö, C., Hultén, S., Midhagen, G., Ström, M., Svensson, H. y Valdimarsson, T. (2002). Evidence of poor vitamin status in celiac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Aliment Pharmacol Ther.* 16:1333-1339.
- Heap, G. y van Heel, D. (2009). Genetics and pathogenesis of celiac disease. *Seminars in Immunology.* 21:346-354.
- Herrera, M., Theiler, G., Augustovski, F., Chertkoff, L., Fainboim, L., DeRosa, S., Cowan, EP. y Satz, ML. (1994). Molecular characterization of HLA class II genes in celiac disease patients of Latin American Caucasian origin. *Tissue Antigens.* 43(2):83-7.
- Hoffenberg, E., MacKenzie, T., Barriga, K., Eisenbarth, G., Bao, F., Haas, J., Erlich, H., Bugawan, T., Sokol, R., Taki, I., Norris, J. y Rewers, M. (2003). A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr.* 143(3):308-314.
- Hurtado-Valenzuela, J., Sotelo-Cruz, N., López Cervantes, G. y Calderón de la Barca, AM. (2008). Tetany caused by chronic diarrhea in a child with celiac disease: A case report. *Cases J.* 1(1):176.
- INEGI. (2005). Información estadística sobre sociodemografía y población de Sonora. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=est&c=3836&e=26&i=> (Consultado el 20 de junio de 2010).

- Ivarsson, A., Persson, LA. y Hernell, O. (2000). Does breast-feeding affect the risk for coeliac disease? *Adv Exp Med Biol.* 478:139-49.
- Johannsson, G., Kristjansson, G., Cariglia, N. y Thorsteinsson, V. (2009). The prevalence of celiac disease in blood donors in Iceland. *Dig Dis Sci.* 54:348-350.
- Karell, K., Louka, A., Moodie, S., Ascher, H., Clot, F., Greco, L., Ciclitira, P., Sollid, L., Partanen, J. y the Members of the European Genetics Cluster on Celiac Disease. (2003). HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human Immunology.* 64:469-477.
- Kaukinen, K., Partanen, J., Mäki, M. y Collin, P. (2002). HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 97(3):695-699.
- Klitz, W., Maiers, M., Spellman, S., Baxter-Lowe, L., Schemeckpeper, B., Williams, T., Fernandez-Viña, M. (2003). New HLA haplotype frequency reference standards: High-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens.* 62:296-307.
- Koning, F., Gilissen, L. y Wijmenga, C. (2005a). Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease. *Semin Immun.* 27:217-232.
- Koning, F., Schuppan, D., Cerf-Bensussan, N. y Sollid, L. (2005b). Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 19(3):373-387.
- Ludvigsson, JF., Fälth-Magnusson, K. y Ludvigsson, J. (2001). Tissue transglutaminase auto-antibodies in cord blood from children to become celiacs. *Scand J Gastroenterol.* 36:1279-1283.
- Madeleine, M., Johnson, L., Smith, A., Hansen, J., Nisperos, B., Li, S., Zhao, LP., Daling, J., Schwartz, S. y Galloway, D. (2008). Comprehensive analysis of HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 loci and squamous cell cervical cancer risk. *Cancer Res.* 68(9):3532-3539.
- Margaritte-Jeannin, P., Babron, MC., Bourgey, M., Louka, AS., Clot, F., Percopo, S., Coto, I., Hugot, JP., Ascher, H., Sollid, LM., Greco, L. y Clerget-Darpoux, F. (2004). HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a

- study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens*. 63:562-567.
- Mariné, M., Fernández-Bañares, F., Alsina, M., Farré, C., Cortijo, M., Santaolalla, R., Salas, A., Tomàs, M., Abugattas, E., Loras, C., Ordás, I., Viver, JM. y Esteve, M. (2009). Impact of mass screening for gluten-sensitive enteropathy in working population. *World J Gastroenterol*. 15(11):1331-1338.
- Mengiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Nenna, R., Maiella, G., Lulli, P. y Mazzilli, M. (2009). HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Human Immunology* 70:55-59.
- Monsuur, A., de Bakker, P., Zhernakova, A., Pinto, D., Verduijn, W., Romanos, J., Auricchio, R., Lopez, A., van Heel, D., Crusius, B. y Wijmenga, C. (2008). Effective detection of human leukocyte antigen risk alleles in celiac disease using tag single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE*. 3(5):e2270.
- Niewinski, M. (2008). Advances in celiac disease and gluten-free diet. *J Am Diet Assoc*. 108: 661-672.
- Nusier, M., Brodtkorb, H., Rein, S., Odeh, A., Radaideh, A. y Klungland, H. (2010). Serological screening for celiac disease in schoolchildren in Jordan. Is height and weight affected when seropositive? *Italian Journal of Pediatrics*. 36:16.
- Olerup, O., Aldener, A. y Fogdell, A. (1993). HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*. 41:119-134.
- Ollikka, P., Raussi, HM., Laitala, V., Jaakkola, L., Hovinen, J., Hemmilä, I. y Ylikoski, A. (2009). Genotyping of celiac disease-related-risk haplotypes using a closed-tube polymerase chain reaction analysis of dried blood and saliva disk samples. *Analytical Biochemistry*. 386:20-29.
- Olsson, C., Hernell, O., Hörnell, A., Lönnberg, G. y Ivarsson, A. (2008). Difference in celiac disease risk between Swedish birth cohorts suggests an opportunity for primary prevention. *Pediatrics*. 122:528-534.
- Parra, A., García, CT., Pacheco, JE. y Ríos, C. (2009). Historia regional de Sonora. Módulo de aprendizaje. Colegio de Bachilleres del Estado de Sonora.

- Pereira, M., Ortiz-Agostinho, C., Nishitokukado, I., Sato, M., Damião, A., Alencar, M., Abrantes-Lemos, C., Cançado, E., De Brito, T., Oloshii, S., Valarini, S. y Sipahi, A. (2006). Prevalence of celiac disease in an urbana area of Brazil with predominantly European ancestry. *World J Gastroenterol.* 12(40):6546-6550.
- Pérez-Bravo, F., Araya, M., Mondragón, A., Ríos, G., Alarcón, T., Roessler, J. y Santos, J. (1999). Genetic differences in HLA-DQA1\* and DBQ1\* allelic distributions between celiac and control children in Santiago, Chile. *Human Immunology.* 60:262-267.
- Pérez-Miranda, AM., Alfonso-Sánchez, MA., Peña, JA. y Calderón, R. (2003). HLA-DQA1 polymorphism in autochthonous Basques from Navarre (Spain): Genetic position within European and Mediterranean scopes. *Tissue Antigens.* 61:465-474.
- Remes-Troche, JM., Ramírez-Iglesias, MT., Rubio-Tapia, A., Alonso-Ramos, A., Velazquez, A. y Uscanga, LF. (2006). Celiac disease could be a frequent disease in Mexico: Prevalence of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors. *J Clin Gastroenterol.* 40(8):697-700.
- Remes-Troche, JM. (2008). Enfermedad celíaca: ¿quién está fuera? *Rev Gastroenterol Mex.* 73(2):50-53.
- Rojas, E. (2009). *Diseño de una guía dietaria para niños entre 1 y 6 años con enfermedad celíaca.* Tesis de Maestría, Hermosillo Sonora, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R., Adamson, J., Migliaccio, G., Migliaccio, A., Taylor, P. y Stevens, C. (1995). Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:10119-10122.
- Schuppan, D., Junker, Y. y Barisani, D. (2009). Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology.* 137:1912-1933.
- Selimoglu, M. y Karabiber, H. (2010). Celiac Disease: prevention and treatment. *Journal of Clinical Gastroenterology.* 44(1):4-8.

- Silano, M., Agostoni, C. y Guandalini, S. (2010). Effect of the timing of gluten introduction on the development of celiac disease. *World J Gastroenterol.* 16(16):1939-1942.
- Silva, E., Fernandes, M., Galvão, L., Sawamura, R. y Donadi, E. (2000). Human Leukocyte Antigen class II alleles in white Brazilian patients with celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 31:391-394.
- Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J., Fernandez-Lopez, J., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., Balam-Ortiz, E., del Bosque-Plata, L., Velazquez-Fernandez, D., Lara, C., Goya, R., Hernandez-Lemus, E., Davila, C., Barrientos, E., March, S. y Jimenez-Sanchez, G. (2009). Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci.* 106:8611-8616.
- Silvester, J. y Rashid, M. (2007). Long-term follow-up of individuals with celiac disease: An evaluation of current practice guidelines. *Can J Gastroenterol.* 21(9):557-564.
- Sollid, LM. y Thorsby, E. (1993). HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology.* 1105:910–22.
- Sollid, L. (2000). Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol.* 18:53-81.
- SSA. (2005). NOM-043-SSA2-2005. Servicios básicos de salud, promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. Disponible en: <http://bibliotecas.salud.gob.mx/gsdll/collect/nomssa/index/assoc/HASH0138/713924cd.dir/doc.pdf> (Consultado el 23 de junio de 2010).
- Stevens, L. y Rashid, M. (2008). Gluten-free and regular foods: a cost comparison. *Can J Diet Pract Res.* 69(3):147-50.
- Tack, G., Verbeek, W., Schreurs, M. y Mulder, C. (2010). The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 7(4):204-13.
- Torres, MI., López-Casado, MA. y Rios, A. (2007). New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol.* 13:1156-1161.

- Urciuoli, P., Passeri, S., Ceccarelli, F., Luchetti, B., Paolicchi, A., Lapi, S., Nocchi, F., Lamanna, R., Iorio, M., Vanacore, R., Mazzoni, A. y Scatena, F. (2010). Pre-birth selection of umbilical cord blood donors. *Blood Transfus.* 8:36-43.
- Vargas-Alarcón, G., Granados, J., Rodríguez-Pérez, JM., Parga, C., Pérez-Hernández, N., Rey, D., Zuñiga, J. y Arnaiz-Villena, A. (2010). Distribution of HLA class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizo population: comparison with other populations. *Immunol Invest.* 39(3):268-83.
- Vargas, M., Melero, J., Fernández, J., González, C., Fernández, C. y Romero, A. (2005). Marcadores serológicos y genéticos en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca. *An Pediatr (Barc).* 62(5):412-9.
- Vidales, M., Zubillaga, P., Zubillaga, I. y Alfonso-Sánchez, M. (2004). Allele and haplotype frequencies for HLA class II (DQA1 and DQB1) loci in patients with celiac disease from Spain. *Human Immunology.* 65:352-358.
- Visser, J., Rozing, J., Sapone, A., Lammers, K. y Fasano, A. (2009). Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1165:195-205.