

Desarrollos metodológicos para el análisis de polimorfismos de los genes del sistema HLA y otros genes, no HLA, predisponentes a enfermedades autoinmunes

Doctorat en Immunologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

ÍNDICE

ÍNDICE.....	0
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	7
<i>¿Qué son las enfermedades autoinmunes?.....</i>	7
Introducción a la Enfermedad Celiaca.....	7
Introducción a la Enfermedad de Graves	8
BIOMARCADORES	10
<i>¿Qué es un biomarcador?.....</i>	10
Definición.....	10
Tipos de biomarcadores.....	10
<i>Biomarcadores serológicos.....</i>	11
Enfermedad Celiaca	12
Enfermedad de Graves.....	13
<i>Biomarcadores genéticos</i>	13
Sistema HLA	14
• Regiones HLA y características genéticas	14
• Moléculas HLA, diversidad y función.....	17
• Nomenclatura.....	19
• Técnicas de tipificación del sistema HLA	20
• Sistema HLA como biomarcador de enfermedades autoinmunes	24
- Posible combinación de alelos HLA y alelos de otros genes como biomarcadores.....	27
- Alelos HLA en la Enfermedad Celiaca.....	27
- Alelos HLA en la Enfermedad de Graves	28
• Sistema HLA como biomarcador de reacciones de hipersensibilidad.....	28
Otros factores genéticos en la Enfermedad de Graves	29
• CTLA4	29
• PTPN22.....	29
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	32
CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES HLA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES	32
<i>Objetivo 1_Biomarcadores HLA en la Enfermedad Celiaca.....</i>	32
<i>Objetivo 2_Biomarcadores en la Enfermedad de Graves</i>	32
<i>Objetivo 3_Desarrollo de la tipificación del locus A del sistema HLA por PCR a tiempo real.....</i>	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
MUESTRAS GENERALES	33
MÉTODOS GENERALES.....	33
<i>Extracción de DNA.....</i>	33
<i>Reacciones de PCR a tiempo real.....</i>	33
Diseño de <i>primers</i>	34
Diseño de sondas.....	34
Parámetros a tener en cuenta en cada reacción	35
BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA	36
<i>Muestras</i>	36
<i>Métodos.....</i>	36
<i>Primers</i> y sondas utilizados	36
Condiciones óptimas de reacción	37
Determinación de Ac asociados a la Enfermedad Celiaca	41
Realización de biopsia intestinal.....	41
BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES.....	43
<i>Muestras</i>	43

Métodos	43
Primers y sondas utilizados	43
Condiciones óptimas de reacción	44
DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO REAL	48
Muestras	48
Métodos	48
Primers y sondas utilizados	48
Condiciones óptimas de reacción	49
Análisis de las confusiones	51
RESULTADOS	52
RESULTADO 1_BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA	52
Determinación del genotipo HLA asociado a Celiacía mediante PCR a tiempo real	52
Tipificación HLA-DQ2/DQ8	52
Dosis génica HLA-DQB1*02	52
Informatividad de los marcadores HLA en el estudio de sospecha de la Enfermedad Celiaca	53
HLA-DQ2/DQ8	53
HLA-DQB1*02.....	54
Correlación de los biomarcadores HLA con otros biomarcadores de la Enfermedad Celiaca	56
Dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 y anticuerpos anti-Tg2.....	56
Dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 y datos de biopsia	56
Anticuerpos anti-Tg2 y datos de biopsia	57
RESULTADO 2_BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES	59
Determinación de biomarcadores genéticos asociados a Enfermedad de Graves mediante PCR a tiempo real	59
Alelos HLA de clase I	59
Polimorfismos de <i>PTPN22</i> y <i>CTLA4</i>	59
Informatividad de los biomarcadores genéticos asociados a Enfermedad de Graves	59
Alelos HLA de clase I	60
Polimorfismos de <i>PTPN22</i> y <i>CTLA4</i>	62
Alelos HLA de clase I y polimorfismos en genes no HLA.....	63
RESULTADO 3_DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR RT-PCR	66
Reacciones e información proporcionada por éstas	66
Resolución obtenida	68
DISCUSIÓN	69
BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA	69
Tipificación HLA asociado a Celiacía mediante PCR a tiempo real	70
Informatividad de los marcadores HLA en el estudio de sospecha de la Enfermedad Celiaca	70
Otros biomarcadores genéticos en la Enfermedad Celiaca	71
BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES	71
Alelos HLA asociados con la Enfermedad de Graves	72
Polimorfismos en <i>PTPN22</i> y <i>CTLA4</i> asociados con la Enfermedad de Graves	72
DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO REAL	73
Reacciones desarrolladas por PCR a tiempo real para el tipaje del HLA-A	74
CONCLUSIONES	76
ESTUDIOS HLA Y ENFERMEDAD	76
TIPAJE DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO REAL	76
ANEXOS	77
ANEXO 1_BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA	77
Reacciones para la determinación de HLA-DQ2/DQ8	77
Reacciones para la determinación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02	77
Resultados obtenidos	79
ANEXO 2_BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES	84
Alelos HLA de clase I	84
Interpretación de los resultados obtenidos.....	87

<i>Polimorfismos de PTPN22 y CTLA4</i>	88
<i>Resultados obtenidos</i>	89
ANEXO 3_DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO	94
<i>Reacciones utilizadas en la tipificación del locus A del sistema HLA por RT-PCR</i>	94
Interpretación de los resultados obtenidos.....	95
<i>Resolución obtenida por esta metodología</i>	104
BIBLIOGRAFÍA	106

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADR	Reacciones adversas a fármacos
AID	Enfermedades autoinmunes
AITD	Enfermedades autoinmunes tiroideas
Ag	Antígeno
APC	Células presentadoras de antígenos
CD	Enfermedad Celiaca
DGP	Formas deaminadas de la gliadina
DHS	Síndrome de hipersensibilidad frente a fármacos
DRESS	Reacciones frente al fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos
dsDNA	DNA de doble cadena
EFI	European Federation of Immunogenetics
ELISA	Enzimoimmunoensayo
EMA	Endomisio
ESPGHAN	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GD	Enfermedad de Graves
GFD	Dieta libre de gluten
GWAS	Estudios de asociación genómica
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> Antígeno de histocompatibilidad leucocitario
HRM	<i>High resolution melting</i>
HT	Tiroiditis de Hashimoto
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
kDa	kilodalton
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
LTreg	Células T reguladoras
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> Complejo principal de histocompatibilidad
MIC	<i>MHC class I chain related</i>
mM	milimolar
NGS	Secuenciación de nueva generación
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-SBT	PCR-tipaje basado en la secuenciación
PCR-SSO	PCR-sondas específicas de secuencia
PCR-SSP	PCR-cebadores específicos de secuencia

RA	Artritis reumatoide
RE	Retículo endoplasmático
REG 1A	Reg I alpha
RR	Riesgo relativo
RT-PCR	PCR a tiempo real
SLE	Lupus eritematoso sistémico
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
ssDNA	DNA de cadena sencilla
Tg	Tiroglobulina
Tg2	Transglutaminasa tipo 2
TH	Tiroiditis de Hashimoto
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
TPO	Peroxidasa tiroidal
TSHR	Receptor de la hormona estimulante del tiroides
T1D	Diabetes tipo 1
T3	Triyodotironina libre
T4	Tiroxina
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
μM	Micromolar

RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes son enfermedades multifactoriales donde la genética, el sistema inmune y factores ambientales se encuentran relacionados. En muchas de ellas el Sistema Principal de Histocompatibilidad o HLA juega un papel importante. El HLA es un sistema molecular constituido por un conjunto de proteínas de membrana que son extraordinariamente polimórficas y que, debido a que se encuentran en una misma localización cromosómica con alto desequilibrio de ligamiento, se heredan en haplotipos. Su función principal es la presentación de péptidos a los linfocitos T, definiendo por ello el rechazo en el trasplante alogénico.

Como consecuencia de estas características la determinación del polimorfismo HLA (tipificación HLA) es útil en diferentes campos biomédicos.

Hay diferentes técnicas que permiten la definición de estos antígenos HLA a diferentes niveles de resolución. Por un lado se encuentran las técnicas de baja-media resolución como son las técnicas serológicas (microlinfocitotoxicidad) u otras basadas en la amplificación de DNA (PCR-SSP, PCR-SSO) y por otro las de alta resolución cuyo *gold standard* es la secuenciación (PCR-SBT). Esta aproximación junto con las nuevas metodologías de secuenciación (deep sequencing) ha hecho posible resolver los problemas de ambigüedades en la alta resolución. No obstante, en algunas ocasiones no es necesaria una tipificación HLA de alta resolución y por ello no está justificado el uso de una metodología tan costosa, sin embargo las técnicas de baja-media resolución, ampliamente utilizadas en los laboratorios de HLA, también presentan ciertas limitaciones.

Este trabajo pretende abordar la complejidad del sistema HLA desde dos puntos de vista; primero explorando la asociación HLA (y otros genes no HLA) y enfermedad, concretamente en el caso de la celiaquía y de la enfermedad de Graves-Basedow y segundo definiendo una metodología de tipificación de baja resolución del locus A del sistema HLA mediante PCR a tiempo real. Para ello, se han puesto a punto técnicas de tipificación de familias de alelos HLA concretos como son HLA-DQ2/DQ8 para el estudio de la celiaquía y HLA-B*08/44 y HLA-C*03/07/16 en el caso de la enfermedad de Graves-Basedow, y en este último además se han estudiado polimorfismos en otros genes no HLA como son *CTLA4* (una molécula de coestimulación inhibitora) y *PTPN22* (una fosfatasa con funciones también inhibitoras). Con esto se ha pretendido desarrollar un conjunto de pruebas que nos permitan predecir mejor la susceptibilidad a padecer estas enfermedades y ver la correlación con otros parámetros clínicos post-diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDADES AUTOINMUNES

¿Qué son las enfermedades autoinmunes?

Las enfermedades autoinmunes (AID) (OMIM 109100) constituyen un amplio grupo de enfermedades crónicas cuya patogénesis está mediada por la pérdida de tolerancia inmunológica frente a antígenos (Ag) propios. Tolerancia es el proceso por el cual se eliminan o neutralizan células auto-reactivas y un fallo, a nivel central o periférico, en el funcionamiento de este sistema desencadena una respuesta inmune anormal frente a Ag propios, lo que se conoce como autoinmunidad [1, 2]. Estas enfermedades, que afectan aproximadamente a un 5% de la población mundial, representan un grupo heterogéneo de desórdenes que pueden afectar a órganos o tejidos específicos como en el caso de la diabetes tipo 1 (T1D) (OMIM 222100) o las enfermedades autoinmunes tiroideas (AITD) o a múltiples sistemas, como el lupus eritematoso sistémico (SLE) (OMIM 152700) o la artritis reumatoide (RA) (OMIM 180300) [3, 4].

Introducción a la Enfermedad Celiaca

La Enfermedad Celiaca (CD) (OMIM 212750) es un desorden inflamatorio sistémico con un componente autoinmune que es desencadenado por la ingesta de gluten y prolamina relacionadas, en individuos genéticamente susceptibles [5]. Aunque los síntomas y signos de la enfermedad se conocen desde hace más de 100 años, fue en 1940 cuando un pediatra holandés, Dicke, estableció la asociación entre la exposición al gluten y la CD [6].

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de una combinación variable de manifestaciones clínicas, dependientes de la ingesta de gluten, que incluyen manifestaciones gastro-intestinales, como son diarrea, distensión o dolor abdominal y retraso en el crecimiento, pero además alrededor de un 50% de pacientes presentan también manifestaciones extra-intestinales, como dermatitis herpetiforme, anemia, síntomas neurológicos u osteoporosis [7, 8]. La enfermedad puede comenzar a cualquier edad, sin embargo la presentación clínica puede variar entre niños y adultos, siendo el dolor abdominal muy frecuente en niños, mientras que la anemia, osteoporosis e hipertransaminasemia es un modo de presentación más frecuente en adultos [9].

La prevalencia de la CD en Europa y EEUU es de un 1-3% [10]. Sin embargo esta prevalencia se encuentra incrementada en familiares de primer grado de pacientes con CD (10-15%), en pacientes con otras AID, como T1D (3-12%), AITD (5%) y enfermedad hepática autoinmune, en pacientes con desórdenes causados por aberraciones cromosómicas, como el síndrome de Turner (3%) o el síndrome de Down (5%), y en pacientes con déficit selectivo de Inmunoglobulina A (IgA) (9%) [11, 12].

La ingesta de gluten produce una respuesta inflamatoria crónica, mediada por los linfocitos T (LT) CD4+ de la lámina propia intestinal, que puede llegar a producir atrofia intestinal, siendo ésta la lesión extrema de un espectro de lesiones. Según la clasificación de Marsh (1992) la

lesión preinfiltrativa (Marsh 0) corresponde a individuos genéticamente susceptibles con biopsia intestinal normal y a partir de aquí podemos encontrar desde un infiltrado linfocitario de la mucosa, sin cambios estructurales (Marsh 1) o con hiperplasia de las criptas (Marsh 2) hasta una atrofia parcial, subtotal o total de las vellosidades intestinales (Marsh 3A, 3B o 3C respectivamente) [13]. Estos cambios se evalúan mediante una biopsia intestinal, no obstante, existen biomarcadores serológicos para el diagnóstico de esta enfermedad, que se explicarán más adelante.

La asociación de los genes HLA (Human Leukocyte Antigen), responsables de la presentación antigénica como se comentará posteriormente, con las AID es bien conocida. En concreto, los genes HLA de clase II son responsables de aproximadamente un 40% del riesgo genético para la CD, el otro 60% de la susceptibilidad genética a esta enfermedad viene dado por un número desconocido de genes no HLA (se han identificado en torno a 40), muchos de los cuales codifican proteínas con funciones en el sistema inmune y son comunes a varias AID (CTLA4, IL-2, IL-21, CCR3, IL-12A, IL-18RAP, RGS1, etc [14]. Tabla 1). A pesar de ello, su contribución al riesgo de desarrollar la CD es menor que la de los genes HLA [15, 16].

Introducción a la Enfermedad de Graves

Dentro de las AID, las más comunes son aquellas en las que la respuesta inmune, humoral y celular, va dirigida contra la glándula tiroides y dentro de las cuales se incluyen la Tiroiditis de Hashimoto (HT) (OMIM 140300) y la enfermedad de Graves-Basedow (GD) (OMIM 275000) [17]. Ambas se caracterizan por la presencia de un infiltrado linfocitario en el órgano diana que en el caso de la HT desencadena en apoptosis de las células tiroideas e hipotiroidismo y en el caso de la GD provoca la formación de anticuerpos (Ac) anti-Receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR) que estimulan este receptor, induciendo la secreción de un exceso de hormona y causando hipertiroidismo [18]. La presencia de auto Ac contra Ag tiroideos, como la tiroglobulina (Tg), la peroxidasa tiroidal (TPO) y TSHR se utiliza como biomarcador en estas enfermedades, ya que reflejan actividad y progresión de la enfermedad [19].

La GD se describió por primera vez en 1825 por Caleb Parry, aunque debe su nombre a Robert Graves debido a la publicación de 4 casos en 1835. Basedow fue el primero en poner de manifiesto la asociación de esta enfermedad con la exoftalmia en 1840. Es la causa más frecuente de hipertiroidismo, representa entre un 60-80% de los casos y la prevalencia de esta enfermedad se encuentra en torno al 1% en mujeres con una edad comprendida entre 35-60 años mientras que la frecuencia en hombres es entre 5-10 veces menor [20].

El cuadro clínico se caracteriza por hipertiroidismo, bocio difuso y oftalmopatía. A esta tríada diagnóstica cabría añadir un cuarto elemento, de aparición poco frecuente, que es la dermatopatía infiltrativa. No obstante, la enfermedad se presenta a menudo con una forma clínica incompleta.

Como hemos comentado anteriormente, el principal mecanismo efector de la GD es la producción de Ac circulantes dirigidos contra el TSHR produciendo la activación de éste, ya que son capaces de simular el efecto del ligando natural, la TSH. No obstante, los niveles de estos Ac

no correlacionan con el nivel de hormonas tiroideas o con la severidad de la enfermedad, debido a otros factores que pueden ocurrir de manera simultánea como son por ejemplo la respuesta frente a otros auto Ag o la producción de Ac bloqueantes que actúan reduciendo los efectos de los Ac estimulantes.

La GD es una enfermedad compleja cuya etiología incluye la interacción de componentes genéticos y factores ambientales [21]. Han sido identificados diferentes genes de susceptibilidad a la GD (Tabla 1), dentro de los cuales se encuentran genes específicos de tejido (Tg y TSHR) o genes inmuno-reguladores (HLA-DR, CTLA4, PTPN22 y CD40) [21-23].

Locus	Gen	Probable función inmune	OR - CD	OR - AITD
6p21	HLA	Presentación antigénica	6-20	2.0-4.0
2q23	CTLA4	Receptor para CD80 y CD86 Regulador negativo de la activación de linfocitos T	X	1.5-2.2
4q27	IL2, IL21	IL2: factor de crecimiento para linfocitos T IL21: promueve la función de células T, B y NK	1.41	-
1q31	RGS1	Expresada por linfocitos intraepiteliales	1.41	-
2q12	IL1R1, IL18R1, IL18RAP	IL1R1: activación de NF- κ B dependiente de IL1 IL18R1 y IL18RAP codifican para el receptor de la IL18 IL18 promueve la producción de IFN- γ	1.27	-
3p21	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	Receptores de quimiocinas	1.21	-
3q25	IL12A	Favorece la diferenciación de linfocitos Th1	1.21	-
3q28	LPP	<i>LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma</i> . Función no bien conocida	1.21	-
6q25	TAGAP	Se expresa en linfocitos T, modula cambios a nivel del citoesqueleto	1.21	-
12q23	SH2B3	Involucrado en la señalización en linfocitos	1.19	-
18p11	PTPN2	Tirosin fosfatasa de linfocitos T; regulador negativo de la inflamación	X	-
6q23	TNFAIP3	Proteína dedos de zinc que inhibe la actividad de NF- κ B; procesos de apoptosis mediada por TNF	1.25	-
2p13	REL	Componente del complejo NF- κ B	X	-
20q11	CD40	Molécula coestimuladora, participa en la activación de los linfocitos B	-	1.3-1.8
10p15	IL2RA (CD25)	Componente del receptor de la IL2	-	1.1-1.4
1q23	FCRL3	Fc Receptor-like protein 3	-	1.1-1.3
8q24	Tg	Tiroglobulina	-	1.3-1.6
14q31	TSHR	Receptor de la hormona estimulante del tiroides	-	1.4-2.6
1p13	PTPN22	Regulador de la activación de linfocitos T	X	1.4-1.9

Tabla 1: loci de susceptibilidad para la CD y para las AITD (aquellos marcados con una X no hay datos de OR a pesar de que se ha visto cierta asociación)

BIOMARCADORES

El diagnóstico, monitorización y tratamiento de pacientes con AID continúa siendo hoy en día un reto para los clínicos que siguen estos pacientes, por ello la búsqueda de mejores biomarcadores capaces de caracterizar mejor este tipo de enfermedades sigue siendo necesaria [24, 25].

¿Qué es un biomarcador?

Definición

Es una característica biológica que puede ser medida de forma objetiva y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, de un proceso patológico o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica [26]. En la práctica los biomarcadores incluyen las herramientas y tecnologías que ayudan a entender la causa, progresión, predicción, respuesta al tratamiento, etc, de una enfermedad.

Tipos de biomarcadores

Se pueden clasificar en dos principales tipos: biomarcadores de exposición, los cuales se usan para predecir el riesgo de padecer una determinada enfermedad o biomarcadores de enfermedad usados en el diagnóstico y monitorización de una enfermedad [27].

- **Biomarcadores de exposición:** modifican (incrementan o disminuyen) el riesgo de padecer una determinada enfermedad.

Dentro de estos se encuentra, por ejemplo, la susceptibilidad genética. Variantes genéticas que son necesarias aunque no suficientes para padecer una enfermedad, como ocurre con algunos polimorfismos de genes HLA de clase I y II y ciertas AID [3].

- **Biomarcadores de enfermedad:** son indicadores de un factor biológico que representa una manifestación subclínica o no de la enfermedad.

Se utilizan para identificar individuos que se encuentran en estadios pre-clínicos, para reducir la variabilidad dentro de la enfermedad en estudios clínicos o epidemiológicos o como reflejo de la historia natural de la enfermedad (fases de inducción, latencia, ...) [27].

Evaluar la validez de un biomarcador en el diagnóstico, evaluación y pronóstico del paciente es un proceso complejo, se deben tener en cuenta diferentes aspectos, como son el grado en el que el biomarcador refleja el fenómeno biológico estudiado o manifestaciones de la enfermedad, así como la correlación del biomarcador con una enfermedad de forma específica [28]. Esto último se puede evaluar mediante el uso de unos indicadores como son la sensibilidad y especificidad y los valores predictivos, positivo (VPP) y negativo (VPN):

- Sensibilidad y especificidad describen las propiedades de un biomarcador para discriminar entre sujetos enfermos y sanos.
 - Sensibilidad: probabilidad de que un sujeto enfermo tenga el biomarcador en cuestión positivo. Aquellos biomarcadores que se utilizan para el cribaje de una enfermedad, es necesario que tengan una buena sensibilidad.
 - Especificidad: probabilidad de que un sujeto sano tenga el biomarcador en cuestión negativo. Aquellos biomarcadores que se utilizan para confirmar un diagnóstico, es necesario que tengan una buena especificidad.
- Los valores predictivos dan idea de la probabilidad de tener o no la enfermedad teniendo un resultado positivo (VPP) o negativo (VPN) para el biomarcador en cuestión. Estos valores predictivos responden a la cuestión que los clínicos se plantean delante de un paciente con un biomarcador positivo o negativo ¿cuál es la probabilidad de estar enfermo o no?

La utilidad de los valores predictivos se ve limitada por la dependencia que estos tienen según la prevalencia de la enfermedad en cuestión en la población en estudio [29, 30].

Estos indicadores se calculan utilizando tablas de contingencia 2x2 teniendo en cuenta la presencia o no del biomarcador en individuos enfermos y en sujetos sanos (Tabla 2):

SENSIBILIDAD ESPECIFICIDAD		Enfermedad		VPP y VPN		Enfermedad	
		+(g)	-(h)			+(g)	-(h)
Biomarcador	+(e)	(a)	(b)	Biomarcador	+(e)	(a)	(b)
	-(f)	(c)	(d)		-(f)	(c)	(d)
Sensibilidad = a/g Especificidad = d/h				VPP = a/e VPN = d/f			

Tabla 2: cálculo de indicadores para el análisis de un biomarcador; sensibilidad, especificidad, VPP y VPN

Debido su utilidad en la práctica clínica, la búsqueda y descubrimiento de nuevos biomarcadores es un área importante de trabajo en la investigación traslacional.

Biomarcadores serológicos

En el caso de las AID, una de las consecuencias de la respuesta inmune que tiene lugar con la activación de LT y LB es la producción de Ac dirigidos contra Ag propios. Estos Ac pueden ser detectados en el suero del paciente y usados como guía en el diagnóstico y/o seguimiento de éste. Hay Ac que pueden ser usados como marcadores de actividad o severidad de la enfermedad, otros que sirven para clasificar estas enfermedades o que se utilizan como predictores [19].

Por ello, ahora revisaremos los diferentes Ac que se utilizan como biomarcadores en la CD y en la GD.

Enfermedad Celiaca

A pesar de que la confirmación histológica sigue siendo el método *gold standard* para confirmar el diagnóstico de CD, la presencia de Ac específicos de esta enfermedad sirve para apoyar este diagnóstico y permite a los clínicos valorar la necesidad de realizar una biopsia [31, 32] (Figura 1).

En la actualidad, existen 3 biomarcadores serológicos: los Ac anti-transglutaminasa 2 (Tg2), Ac anti-endomisio (EMA) y Ac anti-formas deaminadas de la gliadina (DGP) [33]. Los Ac relacionados con la CD son de tipo IgA, sin embargo, en individuos con bajos niveles séricos de IgA (<20 mg/dl), lo cual es más frecuente en pacientes con CD que en la población general, los biomarcadores utilizados son de tipo IgG, con el objetivo de evitar resultados falsos negativos. La determinación de Ac anti-Tg2 y anti-DGP se realiza mediante ensayo de inmunoenzimología (ELISA) mientras que la determinación de Ac anti-EMA se realiza por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre esófago de mono. A pesar de que la evaluación de los Ac anti-EMA, mediante microscopía, requiere de personal especializado y puede haber cierta variación inter-observador, sigue siendo el método de referencia para la determinación de Ac específicos de esta enfermedad.

Valores elevados de Ac anti-Tg2 y Ac anti-EMA tienen una elevada sensibilidad y especificidad (>90%) mayor que la de los Ac anti-DGP. Los VPP y VPN de los Ac anti-Tg2 y anti-EMA también son realmente elevados (>90%) [8]. En niños y adolescentes con síntomas sugestivos de CD y niveles de Ac anti-Tg2 superiores a 10 veces el límite de normalidad, la probabilidad de presentar una atrofia de las vellosidades intestinales de grado Marsh 3 es elevada, por ello, en estos casos se evalúa la posibilidad de hacer el diagnóstico sin realizar biopsia al paciente [11]. Los niveles de Ac anti-Tg2 también se utilizan en el seguimiento y monitorización de la enfermedad, ya que se ha visto que disminuyen tras 6-24 meses con una dieta libre de gluten (GFD), el único tratamiento efectivo conocido hasta el momento.

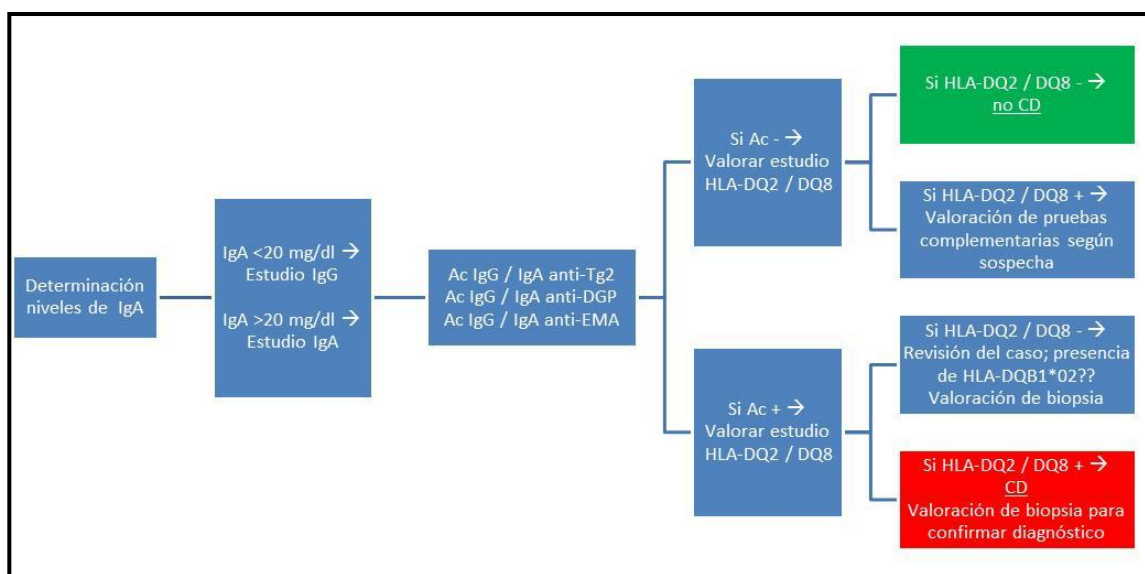


Figura 1: algoritmo diagnóstico utilizado para el diagnóstico de la CD

Otros biomarcadores

En esta búsqueda de nuevos biomarcadores, miembros de nuestro laboratorio han estudiado el papel de la proteína REG 1A como auto Ag y biomarcador en la T1D [34, 35] y la CD. REG 1A pertenece a una familia de genes, REG, que a su vez forma parte de una superfamilia de genes con un dominio lectina dependiente de calcio (C-type lectin). Estos genes codifican un grupo de proteínas secretoras involucradas en fenómenos de regeneración tisular. Es una familia de proteínas con características estructurales y funcionales comunes [36] que actúan como reactantes de fase aguda, factores anti-apoptóticos, factores de crecimiento para células beta-pancreáticas, células epiteliales del sistema digestivo, etc.

Recientemente, se ha descrito un incremento significativo de los niveles de REG 1A en el suero de pacientes celíacos en el momento del diagnóstico de la enfermedad disminuyendo tras 6 meses con una GFD, al igual que ocurre con los Ac anti-Tg2. Por eso, se ha postulado que los niveles de REG 1A pueden ser usados como biomarcador para el diagnóstico y monitorización de la CD [37, 38].

Enfermedad de Graves

En el estudio de la GD se utiliza la determinación de los niveles de TSH, y si estos son bajos se miden también los niveles de tiroxina (T4) y triyodotironina libre (T3), estos últimos normalmente se encuentran elevados.

No obstante, también hay Ac que pueden ser detectados por ELISA y utilizados como biomarcadores de esta enfermedad. Los más específicos son los Ac anti-TSHR que pueden ser detectados en más del 95% de los pacientes con GD y confirman este diagnóstico. Además resultan especialmente útiles en el diagnóstico diferencial con otras formas de hipertiroidismo, como criterio de remisión de la enfermedad, en el diagnóstico de la oftalmopatía de Graves o a la hora de evaluar el riesgo de GD neonatal en mujeres embarazadas con GD.

Estos pacientes además pueden presentar niveles elevados de Ac dirigidos contra la Tg y TPO aunque estos no son específicos de la GD, ya que pueden aparecer también en pacientes con HT, T1D, y con una frecuencia entre el 5-25% en la población general [39]. Como ya ha sido descrito también en otras enfermedades, estos Ac pueden aparecer años antes del debut clínico de la enfermedad y como era de esperar los Ac anti-TPO y Tg aparecen más tempranamente que los Ac anti-TSHR [40].

Biomarcadores genéticos

Dentro de los biomarcadores genéticos de susceptibilidad a las AID, ya hemos comentado que el sistema HLA juega un papel muy relevante. Polimorfismos en los genes HLA de clase I y II constituyen los factores genéticos de susceptibilidad a estas enfermedades más fuertes de todo el genoma [3]. Por ello, este sistema merece una mención especial.

Sistema HLA

El análisis del sistema HLA se inició, por parte de Peter Medawar, con experimentos sobre los procesos inmunológicos responsables del rechazo de trasplantes, donde mostraba que la estructura antigénica reconocida por el receptor como extraña no sólo se encontraba en tejido trasplantado, sino también en otras células como los leucocitos. Observaciones posteriores en el hombre, llevaron a que en 1952 Jean Dausset descubriera que después de recibir diversas transfusiones sanguíneas se desarrollaban Ac contra leucocitos, los cuales reaccionaban selectivamente contra las células de los individuos donadores. Posteriormente de estos estudios surgió la descripción de la primera especificidad antigénica del sistema HLA, identificada como MAC que ahora se conoce con el nombre de HLA-A2. Debido a estos descubrimientos Medawar y Dausset fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1960 y 1980, respectivamente [41, 42].

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es un complejo genético que contiene loci altamente polimórficos que codifican para unas glicoproteínas de membrana cuya función es la de presentar péptidos antigénicos a los LT con el fin de iniciar la respuesta inmune. En humanos dichas proteínas también se conocen con el nombre de moléculas HLA. La agrupación de los loci HLA en un complejo genético es una característica que comparten todos los vertebrados gnatostomados [43].

- **Regiones HLA y características genéticas**

El sistema HLA está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y comprende unos 3.6 Mpb que contienen genes que codifican para más de 160 proteínas. Está dividido en 3 grandes regiones génicas: clase I, clase II y clase III (Figura 2).

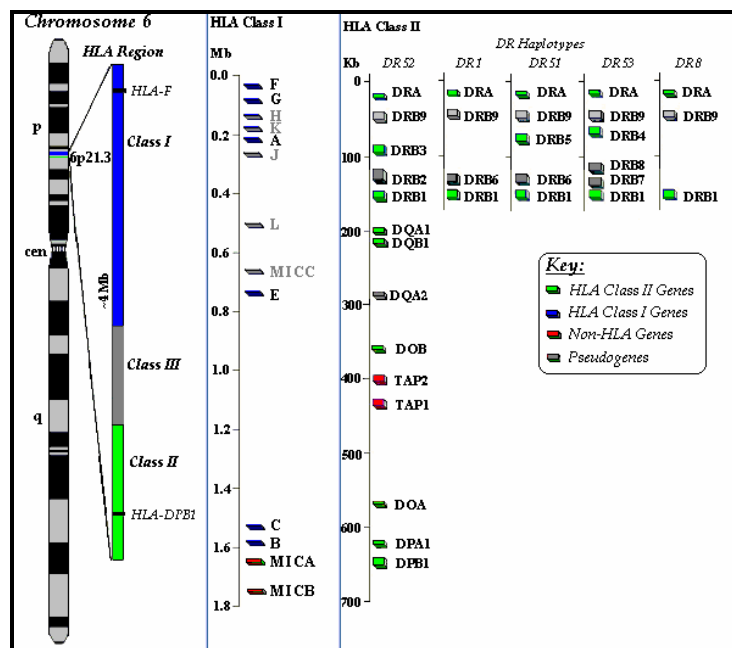


Figura 2: situación de la región HLA en el cromosoma 6; dbMHC Home (Graphic View)

La región de clase I es la más telomérica y contiene los loci codificantes para las moléculas HLA de clase I, la de clase II, la más cercana al centrómero, contiene los loci codificantes para las moléculas HLA de clase II (Figura 3). Además dentro de la región de clase II también encontramos los loci de un grupo de genes que codifican proteínas necesarias para la presentación de Ag, algunos de la vía de clase I (TAP-1, TAP-2, LMP-2 y LMP-7) y otros de la vía de clase II (DOA, DOB, DMA y DMB), que se explicará más adelante [44].

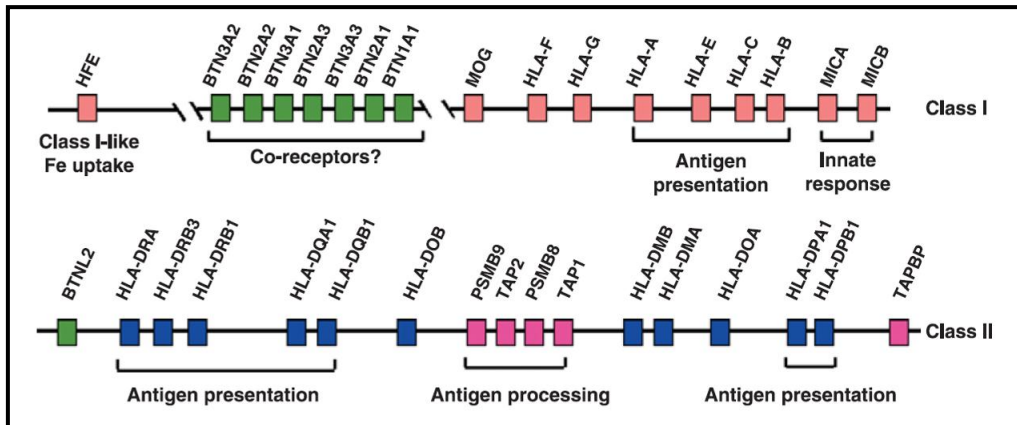


Figura 3: regiones HLA de clase I y clase II [45]

La región de clase III (Figura 4) se encuentra situada entre la región de clase I y la región de clase II y a pesar de que los genes contenidos en esta región no codifican para moléculas presentadoras de Ag, su localización genómica hace que sea necesario al menos citar su existencia. En dicha región se encuentran genes que codifican moléculas con funciones muy diversas, algunas de ellas relacionadas con el sistema inmune. Se encuentran desde diversos componentes del sistema del complemento (C2, C4 y factor Bf) hasta genes como los que codifican para diversas citocinas que tienen un papel en vías inflamatorias, como el TNF (Tumor Necrosis Factor) y las linfoquinas α y β [46].

AID como por ejemplo el SLE o la GD se han visto asociadas a polimorfismos o variación en el número de copias de los genes contenidos en esta región [47].

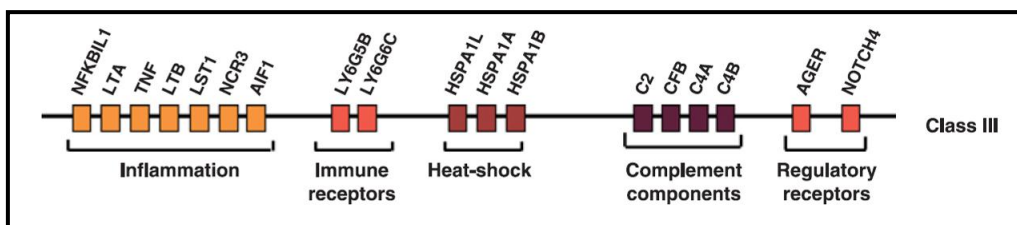


Figura 4: región HLA de clase III [45]

El sistema HLA tiene unas características génicas que lo diferencian del resto del genoma y son fundamentales para garantizar la función de las moléculas que codifica [48, 49]. Se trata de un sistema poligénico, donde cada uno de los genes es a su vez polimórfico y sus alelos son codominantes.

- **Polimorfismo:** el sistema HLA es un sistema altamente polimórfico (son los genes más polimórficos de todo el genoma humano) [50] como se puede comprobar por el gran número de alelos que se ha descrito y se encuentran clasificados en la base de datos IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>; Figura 5). A principios de 2013 el número de alelos HLA estaba situado en torno a 8.800 (6.920 HLA de clase I y 1.880 HLA de clase II).

En cada locus, el polimorfismo de los loci HLA se ha generado por fenómenos de conversión génica, mutación puntual, inserción, delección y recombinación. Esto hace que alelos de un mismo locus a pesar de pertenecer a especificidades serológicas diferentes tengan gran parte de su secuencia similar, pero además estas semejanzas también ocurren entre distintos loci, por ejemplo entre HLA-A, HLA-B y HLA-C.

- **Desequilibrio de ligamiento:** es la asociación alélica que se observa en una determinada región génica y que hace que las frecuencias de los alelos en la población no sean las esperadas si los alelos estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg [51].

En el caso de los loci HLA se observó que en determinadas poblaciones algunos alelos HLA (tanto de clase I como de clase II) eran más frecuentes que otros y que en poblaciones diferentes no eran los mismos los alelos predominantes.

Este hecho se explica por la presencia de desequilibrio de ligamiento entre los loci HLA. Así, la mayor parte de los alelos que se presentan habitualmente junto a otros en concreto son determinados por una herencia en haplotipos [52], esto es, la combinación de alelos de cada locus HLA en un cromosoma, este término se utilizó por primera vez en 1967. Cada individuo hereda un haplotipo paterno y otro materno [53].

- Además los genes de ambos cromosomas se expresan de manera simultánea: lo que se conoce con el nombre de **codominancia** [51].

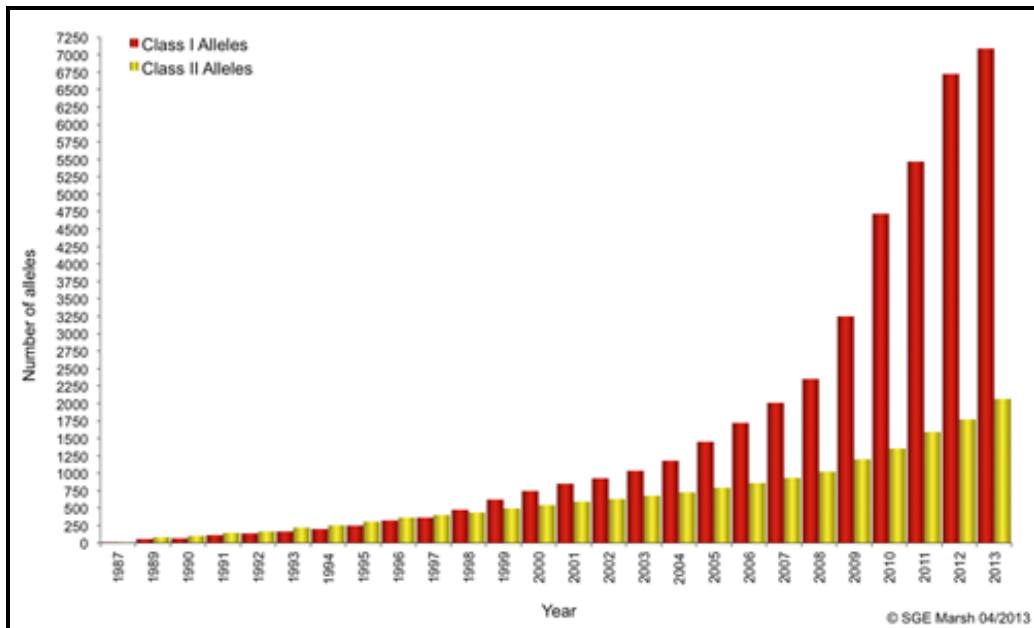


Figura 5: número de alelos HLA de clase I y clase II nombrados desde 1968 (fecha de creación de HLA Nomenclature Committee) hasta Marzo del 2013. IMGT/HLA Database

- **Moléculas HLA, diversidad y función**

Las principales moléculas codificadas en el MHC son las glicoproteínas HLA, están implicadas en la definición de lo propio y permiten al sistema inmune discriminar entre lo que pertenece al individuo y lo extraño a él. Por ello juegan un papel muy importante en los trasplantes, de hecho se descubrieron debido a que son las moléculas responsables de los fenómenos de rechazo que ocurrían en estos, tal y como he comentado anteriormente.

Moléculas HLA de clase I

Los principales representantes de estas moléculas son HLA-A, HLA-B y HLA-C y vienen codificados por los loci de clase I A, B y C correspondientes. Estas moléculas están presentes en la superficie de todas las células (excepto eritrocitos) y son las responsables de presentar Ag, provenientes de patógenos intracelulares, a los LT CD8+ [54].

Estructuralmente están formadas por una cadena α (polimórfica) de unos 45 kDa, anclada a membrana (codificada en el cromosoma 6) y unida de forma no covalente a una cadena β microglobulina (invariante) de 12 kDa (que está codificada en el cromosoma 15 fuera de la región MHC). La cadena α contiene aproximadamente 340 aminoácidos organizados en 3 regiones; una extracelular dividida en 3 dominios globulares: α 1, α 2 y α 3 cada uno de los cuales contiene aproximadamente 90 aminoácidos, otra transmembrana y otra intracelular. El polimorfismo de la cadena α está localizado principalmente en los dominios α 1 y α 2, que forman parte de la zona de unión al péptido (Figura 6); a nivel génico, estos dominios vienen codificados en los exones 2 y 3. El dominio α 3 es el que define la interacción con la molécula CD8 de los LT citotóxicos (los que reconocen los Ag presentados por estas moléculas HLA de clase I).

Existen otras moléculas de HLA I denominadas “no clásicas”, como son: HLA-E, HLA-F y HLA-G. Son moléculas menos polimórficas y tienen una expresión más restringida de tejido [55]. Además también existen otras moléculas relacionadas con clase I (*MHC class I chain related = MIC*) como son MICA y MICB y un gran número de pseudogenes y genes truncados (HLA-X, MICC,...) similares a los genes de clase I.

Moléculas HLA de clase II

Las principales moléculas de clase II son: DP, DQ y DR. Estas moléculas están presentes de forma constitutiva en la superficie de las células presentadoras de Ag (APC): linfocitos B (LB), macrófagos y células dendríticas. También pueden encontrarse en LT activados y otras células (endoteliales o epiteliales, especialmente activadas). Son las responsables de presentar Ag, provenientes de patógenos extracelulares, a los LT CD4+ [56].

Están formadas por dos cadenas, una cadena α de 34 kDa y una cadena β de 29 kDa, unidas a membrana y asociadas entre sí de manera no covalente. En este caso, es la cadena β la más polimórfica. Cada cadena está compuesta de 230 aminoácidos que están organizados en región extracelular (que comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y $\beta 1$ y $\beta 2$, cada uno de los cuales tiene aproximadamente 90 aminoácidos), transmembrana e intracelular. El polimorfismo de las moléculas HLA de clase II está localizado principalmente en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ (en DQ, DP y DR), que forman parte de la zona de unión al péptido (Figura 6); a nivel génico, estos dominios vienen codificados en los exones 2 de cada locus.

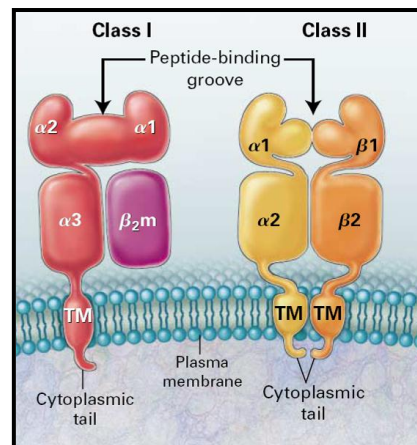


Figura 6: estructura de las moléculas HLA de clase I y II [57, 58]

Conviene recordar aquí que para realizar la función de presentación antigénica, además de las moléculas HLA muchas otras moléculas son también fundamentales y algunas, como se ha citado anteriormente, están también codificadas por locus génicos situados en la región de clase II. Así:

- **Vía de clase I:** moléculas TAP-1 y TAP-2, son transportadores de membrana que forman un complejo encargado de translocar péptidos del citoplasma hacia el lumen del retículo endoplasmático (RE), para que puedan ser presentados vía clase I. Moléculas LMP-2 y

LMP-7, forman parte del proteasoma, un complejo implicado en la digestión proteolítica de un elevado número de proteínas citoplasmáticas.

Deficiencias en la expresión de estas moléculas tienen como consecuencia una ineficiente presentación antigénica y en algunos casos de neoplasias puede suponer un mecanismo de escape del sistema inmune [59]. También se han descrito mutaciones en TAP1 y TAP2 causantes de una rara enfermedad conocida como déficit de HLA de clase I o Síndrome del linfocito desnudo tipo I (*Bare lymphocyte syndrome type I*; OMIM 604571) [60, 61].

- **Vía de clase II:** se encuentran los loci DOA, DOB, DMA y DMB, que codifican las moléculas HLA-DO y HLA-DM respectivamente, moléculas no clásicas de clase II, relacionadas con el tránsito intracelular y la carga de péptidos a las moléculas de clase II.

Existe una interesante unión entre las 2 vías llamada “cross-presentación” donde Ag exógenos pueden ser presentados por moléculas HLA de clase I y Ag endógenos por moléculas HLA de clase II. Es una propiedad atípica pero sin embargo esencial en el inicio de la respuesta inmune frente a virus que no infectan APC [62].

- **Nomenclatura**

Debido al gran número de alelos existentes, en 1968 se creó el comité para la nomenclatura de los diferentes alelos HLA “WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System”.

Según las directrices de este comité, cada alelo HLA se denomina por el nombre del locus seguido de un asterisco (para indicar que se trata de información alélica) y después seguido de una cifra numérica que puede contener de 1 a 4 campos de dígitos. Todos los alelos tienen un nombre de como mínimo 2 campos de dígitos y los nombres de 3 y 4 campos son sólo asignados cuando es necesario diferenciar [63] (Tabla 3).

NOMENCLATURA	INDICA
HLA	Prefijo
HLA-A	Un locus particular del sistema HLA
HLA-A*01	Familia alélica a la que pertenece el alelo. Baja resolución [64]
HLA-A*01:01	Variante alélica dentro de la misma familia. Alta resolución
HLA-A*02:01:01	Este alelo presenta diversas variantes nucleotídicas que no provocan cambios de aminoácidos en la proteína
HLA-A*02:01:01:01	Se han descrito polimorfismos en zonas no codificantes del alelo en cuestión
HLA-A*24:09N	Alelo nulo, que no presenta expresión
HLA-A*24:02:01:02L	Alelo que codifica una proteína con expresión de superficie reducida
HLA-B*44:02:01:02S	Alelo que codifica una proteína que sólo presenta forma soluble

Tabla 3: estructura de la nomenclatura de alelos HLA

Cuando se habla de especificidades serológicas el nombre de los loci no va seguido de un asterisco y sólo continúa con los dígitos indicativos de la familia alélica a la que pertenece.

Para alelos HLA de clase I, la descripción del locus indica el gen que codifica para la cadena α mientras que en el caso de los alelos HLA de clase II ambos genes (el que codifica para la cadena α y el que lo hace para la β) deben informarse, por ejemplo DQA y DQB.

Todos los alelos descritos por laboratorios de diferentes partes del mundo se encuentran recogidos en la base de datos IMGT/HLA [65].

- **Técnicas de tipificación del sistema HLA**

La tolerancia del injerto por el receptor en los trasplantes depende en gran medida de que ambos compartan el mayor número posible de alelos HLA en sus genes. La necesidad de determinar la identidad HLA de donante y receptor para optimizar la eficacia de los trasplantes y evitar, en la medida de lo posible, el rechazo del órgano trasplantado ha conllevado el desarrollo de diversas generaciones de técnicas de tipificación [66]. Los métodos para la identificación de los alelos HLA han cambiado significativamente desde que este grupo de proteínas altamente polimórficas fueron caracterizadas por primera vez mediante métodos serológicos en los años 60 y 70 [67].

Clásicamente se habla de una tipificación de baja resolución para referirnos a familia alélica y cuando decimos alta resolución hacemos referencia a variante alélica dentro de una misma familia [64, 68].

Aunque tradicionalmente se utilizaban tanto técnicas serológicas como moleculares, hoy en día la mayor parte de los laboratorios realizan estas determinaciones a nivel molecular y, debido a la gran complejidad polimórfica que tiene el sistema HLA, la técnica de referencia es la secuenciación. No obstante, las técnicas serológicas pueden ser interesantes a la hora de investigar la expresión de las moléculas HLA [67].

Técnicas de tipificación serológicas

- **Linfocitotoxicidad**

Tradicionalmente, los Ag HLA fueron definidos usando técnicas serológicas [69, 70]. La implementación del complemento junto a la optimización de pequeños volúmenes permitió definir el estándar de serotipificación a través de lo que conocemos como microlinfocitotoxicidad [71, 72].

Esta técnica parte de la obtención de preparaciones viables de linfocitos de la persona a tipificar y enfrenta estas células a diferentes sueros que contengan Ac específicos contra un HLA concreto. El problema de la utilización de estos sueros es que pueden tener más de una especificidad y por ello se ha de utilizar un amplio panel bien caracterizado. La reactividad se evalúa mirando la citotoxicidad que se produce al añadir el complemento. Las fuentes

principales de Ac utilizadas en la microlinfocitotoxicidad proceden de sueros descomplementados de personas sensibilizadas (mujeres multíparas, pacientes transfundidos y trasplantados), aunque también existen Ac monoclonales que permiten evitar la limitación de disponibilidad de los sueros. Por su parte el complemento a utilizar suele provenir de suero de conejo. Con esta metodología los alelos nulos (alelos que no se expresan) quedan enmascarados.

Técnicas de tipificación moleculares

Con el tiempo, han sido las técnicas de tipificación basadas en el análisis del DNA las que han substituido a las técnicas serológicas en la mayoría de laboratorios HLA, ya que desde los inicios de su utilización se vio que los métodos basados en la PCR presentaban una serie de ventajas respecto a la serología [73-75]. Las más destacadas son las que permiten obtener una resolución más elevada, evitan las reacciones cruzadas de los Ac y tienen un alto nivel de precisión y reproducibilidad. Además la obtención de los reactivos a utilizar es más sencilla y se pueden actualizar más fácilmente en función de los nuevos alelos que se van descubriendo. Por todo ello, los métodos de tipificación basados en la PCR han experimentado un importante crecimiento.

Actualmente en los laboratorios HLA la tipificación se realiza mediante una combinación de técnicas siendo común, en general, partir de una amplificación (PCR) y consiguiendo la especificidad de la tipificación ya sea gracias a la especificidad de los cebadores o *primers* (PCR-SSP) o por los oligonucleótidos con los que se hibridan los fragmentos de DNA amplificados (PCR-SSO). En todo caso, en muchas ocasiones estas técnicas necesitan continuarse mediante secuenciación (PCR-SBT), *gold standard*, para resolver ambigüedades que no pueden definirse sólo con técnicas precedentes [76].

- PCR-SSO

Fue el primer método molecular de tipificación que se desarrolló inicialmente para detectar alelos HLA de clase II. Se basa en la hibridación de DNA, amplificado previamente de forma genérica por PCR, con sondas oligonucleotídicas específicas de una región polimórfica, sobre una membrana de hibridación.

Cada sonda específica utilizada tiene una secuencia que puede ser compartida por diferentes alelos. Es necesario tener en cuenta este hecho a la hora de dar una tipificación, así, se analizan patrones de sondas unidas que corresponden a patrones de secuencias polimórficas que definen cada alelo [77].

Hoy en día existe una variante de esta técnica que se denomina Luminex y se basa en la citometría de flujo y en la utilización de sondas oligonucleotídicas inmovilizadas en microesferas, en lugar de la membrana de la descripción original. Se mide la fluorescencia intrínseca de las microesferas y la luz emitida por los fluorocromos unidos a los productos de PCR hibridados con las sondas. El equipo permite el análisis simultáneo de distintas muestras en un único test [78, 79].

- PCR-SSP

Se basa en el uso de *primers* específicos de secuencia. Una amplificación con *primers* totalmente complementarios a la secuencia escogida y que a su vez contengan polimorfismos en su región 3' con los otros alelos consigue únicamente la amplificación de las variantes totalmente complementarias. Es un método de tipificación ideal para realizarlo en muestras individuales y también se utiliza como método confirmatorio o de resolución de ambigüedades, ya que permite la detección de alelos concretos. También es útil para la tipificación de alelos HLA asociados a enfermedad. Sin embargo, requiere procesamiento post-PCR y es un método muy costoso para dar una tipificación completa [67].

- PCR-SBT

Se basa en la utilización de *primers* específicos de un locus situados generalmente en los intrones o bien en una zona exónica común a todos los alelos a amplificar y posteriormente se realiza la reacción de secuenciación nucleotídica mediante el método de Sanger. Los productos generados se someten a electroforesis capilar para obtener los electroferogramas, de los cuales se deduce la secuencia de nucleótidos. Para la tipificación de los loci de clase I es imprescindible la amplificación y secuenciación de los exones 2 y 3 y para los loci de clase II el exón 2 [80]. Es recomendable, para la correcta tipificación, realizar 2 reacciones para cada exón (sentido o *forward* y antisentido o *reverse*).

Dentro de las técnicas basadas en la secuenciación, actualmente se habla de una secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing* o NGS). Desde que en el año 2001 se completó la secuenciación del genoma humano [81] se han desarrollado una serie de nuevas tecnologías de secuenciación. Algunas de ellas ya están comercialmente disponibles mientras que otras se encuentran en fase de desarrollo. El objetivo de estas técnicas es una secuenciación clonal o de una única molécula de DNA y para ello el proceso consta de diferentes pasos como son la fragmentación al azar del DNA genómico, posteriormente, la inmovilización de los fragmentos individuales de DNA generados en el paso anterior y su amplificación clonal mediante PCR, para después secuenciarlos usando fluorescencia o quimioluminiscencia [67, 82, 83]. Actualmente se está desarrollando la aplicación de esta tecnología en la tipificación HLA [82, 83].

- PCR en tiempo real

Principio:

La PCR en tiempo real (RT-PCR; técnica cinética) permite medir la cantidad de molde inicial, cosa que no se puede hacer con las técnicas a punto final. La medición se consigue mediante el análisis del punto de inicio de la curva de reacción mientras que en la PCR convencional se mide el producto final de la reacción [84]. Para realizar una medición continua de la reacción es necesario introducir un componente trazable (fluorocromo). Entre las distintas opciones de detección destacamos aquí la hibridación con una sonda fluorescente, un proceso adicional y

simultáneo a la PCR, que se produce con la amplificación (y/o al final) y que puede informar además de aspectos de la secuencia que reconoce. La RT-PCR combina la amplificación y detección en un único tubo evitando por ello las manipulaciones post-PCR que pueden introducir errores especialmente por contaminación cruzada de muestras [85].

Hay una alta correlación entre la señal y la cantidad de producto presente inicialmente. Durante los primeros ciclos de la reacción hay pequeños cambios en la señal de fluorescencia pero a medida que la reacción progresa la señal de fluorescencia comienza a aumentar con cada ciclo de manera exponencial, lo que ha permitido utilizar esta técnica para la amplificación cuantitativa de cDNA.

Como se ha apuntado, el uso de sondas de hibridación permite también obtener información de las secuencias que hibridan. A menudo se realiza en un paso adicional que permite determinar lo que se conoce como curva de fusión (o *melting*) de una sonda. Una curva de fusión es el cambio de fluorescencia observado cuando el DNA de doble cadena (dsDNA) se disocia en DNA de cadena simple (ssDNA) al aumentar la temperatura de la reacción [86].

Sistemas de detección usados en RT-PCR:

Intercalante SYBR® Green I

SYBR® Green es un colorante que sólo presenta fluorescencia detectable cuando está unido a dsDNA. La intensidad de la señal depende de la cantidad de dsDNA que está presente en el producto de PCR. De este modo la señal de detección es proporcional a la concentración de DNA. Este método no es tan específico como el uso de sondas ya que el colorante se une indiscriminadamente a todo el dsDNA formado durante la PCR detectando también DNA artefactual como, por ejemplo, los dímeros de *primers*. No obstante, se han desarrollado sistemas de tipificación de HLA-DR basados en RT-PCR en combinación con SYBR® Green I [87]. También hay otros sistemas como el *High Resolution Melting* (HRM) que utilizan una nueva generación de intercalantes LCGreen® y LCGreen Plus® (Idaho Technology), que pueden unirse de manera saturante al DNA y permiten ver cambios de una base [88, 89].

Detección mediante sondas de hibridación

Taqman®: este sistema utiliza una sonda oligonucleotídica de 18-22 pb que tiene dos marcadores conjugados, uno en el extremo 5' (*reportador-reporter*) y otro en el extremo 3' (*apagador-quencher*), que hibridará con el fragmento de PCR amplificado. Mientras la sonda está intacta, la molécula *quencher* absorbe la fluorescencia emitida por el fluorocromo *reporter*. Durante la amplificación, la actividad 5' exonucleasa de la Taq DNA polimerasa degrada la sonda hibridada, liberando el *reporter* correspondiente. Cuando esto ocurre, se registra un aumento en la emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto amplificado.

Sondas Light Cycler FRET: Consiste en dos sondas oligonucleotídicas, separadas entre sí de 1-5 bases, marcadas fluorescentemente, cada una de ellas con un solo fluorocromo

(sondas *anchor / sensor*). Una de ellas tiene en posición 3' un fluorocromo donador de fluorescencia y la otra en posición 5' con un fluorocromo aceptor. A medida que la amplificación de la PCR ocurre, las sondas se unen al producto de PCR, con lo que los dos fluorocromos quedan situados de forma cercana, produciéndose entonces el fenómeno de transferencia de energía entre ambos: FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), que se traduce en una señal fluorescente.

Previamente, en nuestro laboratorio se han desarrollado una serie de reacciones basadas en RT-PCR en combinación con sondas FRET para la determinación del polimorfismo de los loci HLA-DR y HLA-B [90, 91].

- **Sistema HLA como biomarcador de enfermedades autoinmunes**

Como consecuencia de las características del sistema HLA, la determinación de su polimorfismo o tipificación HLA es útil en diferentes campos biomédicos. Ya hemos mencionado la importancia a nivel del trasplante, pero además la tipificación HLA es también útil en el diagnóstico de enfermedades, especialmente de AID.

Es ampliamente conocido que las enfermedades de base inmunitaria, y especialmente las AID, tienen una base genética que predispone a los individuos a sufrirlas. A diferencia de las enfermedades monogénicas, este tipo de enfermedades se producen debido a interacciones entre diferentes factores genéticos, cada uno de los cuales puede influir de manera modesta, y factores ambientales, tales como la dieta, toxinas ambientales y/o infecciones. En muchos casos, los genes que contribuyen en mayor grado a la predisposición genética a ciertas AID son los genes HLA (desde un 15% en la Esclerosis Múltiple hasta un 42% en la T1D).

Hay diferentes hipótesis que relacionan la asociación entre los genes HLA y las AID como son:

- La influencia de las moléculas HLA en la selección positiva y negativa de los LT en el timo. Por ejemplo, algunas moléculas HLA asociadas a ciertas enfermedades pueden unir débilmente epítomos críticos de potenciales auto Ag, causando un déficit en la tolerancia a lo propio. Otra posibilidad es que moléculas HLA con efecto protector respecto a ciertas AID, puedan promover la selección tímica de células T reguladoras (LTreg).
- La presentación preferente de péptidos modificados post-translacionalmente por moléculas HLA concretas, hecho que explicaría la pérdida de tolerancia a Ag propios, como ocurre en el caso de la CD.
- La semejanza molecular entre péptidos de un agente infeccioso y de un auto Ag que se une preferentemente a un HLA concreto [92, 93].

Por todo ello, en algunas AID el sistema HLA se utiliza como biomarcador genético. El grado de asociación de un biomarcador genético con una enfermedad determinada se calcula mediante el riesgo relativo (RR) que es un índice de asociación que mide la probabilidad de tener una

determinada patología por parte de una persona que posee la variante del gen en cuestión que confiere riesgo, respecto al riesgo propio de padecer esta enfermedad por parte de las personas que no tienen esta variante genética. Cuanto más alto sea el valor del RR, más fuerte es la asociación entre el biomarcador genético y la enfermedad en cuestión y más útil es su determinación. No obstante, la presencia de un determinado alelo HLA asociado a una enfermedad no es diagnóstico de ella, sin embargo, su ausencia puede ayudar a descartar una enfermedad concreta. Otro índice utilizado para valorar esta asociación es la razón de probabilidad u *odds ratio* (OR), que mide el RR en estudios comparativos entre pacientes y controles, en este contexto la OR se define como el cociente entre el riesgo de tener el alelo o genotipo asociado a una enfermedad y estar realmente enfermo y el riesgo de tener el alelo o genotipo asociado a una enfermedad pero estar sano [51].

Un RR o una OR igual a 1 significan que existe el mismo riesgo de presentar la enfermedad tanto si se tiene el factor como si no. Si el RR o la OR son inferiores a 1 el factor a estudio presenta un efecto protector y si el RR o la OR son superiores a 1, el hecho de presentar el factor confiere un mayor riesgo a padecer la enfermedad.

Ambos se calculan utilizando tablas de contingencia 2x2 teniendo en cuenta la presencia o ausencia del factor de riesgo en cuestión en individuos enfermos y en sujetos sanos (Tabla 4):

RIESGO RELATIVO ODDS RATIO		Enfermedad	
		+	-
alelo HLA	+(e)	(a)	(b)
	-(f)	(c)	(d)
$RR = (a/e)/(c/f)$ $OR = (a/b)/(c/d)$			

Tabla 4: cálculo del RR y OR

En 1973 se describió por primera vez que la espondilitis anquilopoyética está fuertemente relacionada con el HLA-B*27 [94]. Desde entonces se han encontrado que algunos genes HLA de clase I y de clase II predisponen a padecer ciertas AID [57].

A continuación se detallan las asociaciones más importantes, así como el grado de asociación (RR) (Tabla 5):

HLA y Enfermedad				
ENFERMEDAD		HLA	RR	Ref
ENFERMEDADES REUMATOLÓGICAS	ESPONDILITIS ANQUILOPOYÉTICA	B27	87,4	[94]
	ARTROPATÍAS REACTIVAS, incluido el SDR. REITER	B27	37	[57]
	ARTRITIS REUMATOIDE	DR4	4,2	
ENFERMEDADES SISTÉMICAS	LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO	DR3	5,8	
	SDR. SJÖGREN	DQA1*05:01		[95]
		DR3	9,7	[57]

ENFERMEDADES ENDOCRINAS	DIABETES MELLITUS TIPO I	B*39	1,4	[96]
		DR3	3,3	[57]
		DQB1*02:01	2,4	
		DR4	6,4	
		DQB1*03:02	9,5	
		DR2	0,19	
		DRB1*15:01	0,03-0,2	
		DQB1*06:02	0,15	
	ENF. DE ADDISON IDIOPÁTICA	DR3	6,3	[57]
	ENF. DE GRAVES	DR3	3,7	[97]
C3, C7				
B8				
TIROIDITIS DE HASHIMOTO	DR11	3,2	[57]	
TIROIDITIS POST-PARTO	DR4	5,3		
ENFERMEDADES DIGESTIVAS	ENF. CELIACA	DR3	10,8	[98]
		DQB1*02:01		
		DQA1*05:01		
		DR7, 11	6,0-10,0	
ENFERMEDADES RENALES	GLOMERULONEFRITIS MEMBRANOSA IDIOPÁTICA	DR3	12	[57]
	SDR. GOODPASTURE	DR2	15,9	
ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS	ESCLEROSIS MÚLTIPLE	DR2	4,1	[99]
		DRB1*15:01		
		DRB5*01:01		
		DQB1*06:02		
	MIASTENIA GRAVIS	DR3	2,5	[57]
		B8	3,4	
NARCOLEPSIA	DQB1*06:02		[100, 101]	
ENFERMEDADES OCULARES	RETINOPATÍA DE BIRDSHOT	A29	109	[57]
	UVEITIS	B27		[102]
ENFERMEDADES DERMATOLÓGICAS	ENF. DE BEHÇET	B51	3,8	[57]
	PÉNFIGO VULGAR (judíos Ashkenazi)	DRB1*04:02	14,4	
	PÉNFIGO VULGAR	DRB1*04, 08, 14	4,0-6,0	[103]
		DRB1*03, 07, 15	0,3	
	PSORIASIS VULGARIS	Cw6	13,3	[57]
DERMATITIS HERPETIFORME	DR3	15,9		

Tabla 5: asociación entre la presencia de alelos HLA (de clase I y II) y AID (en azul están aquellos que presentan un efecto protector; RR<1)

En los últimos años los estudios de asociación genómica (*Genome-Wide Association Studies*; GWAS) han adquirido una gran importancia a la hora de identificar factores genéticos, diferentes al sistema HLA, que confieren riesgo para enfermedades complejas [3, 51].

Estos estudios han podido corroborar factores genéticos ya identificados y encontrar nuevos no descritos previamente. Además han contribuido en gran medida en el conocimiento

fisiopatológico de estas enfermedades aunque no han podido explicar la mayor parte del componente genético causal que se observa. En estos estudios se asume que este tipo de enfermedades están asociadas a variantes génicas frecuentes en la población pero podría darse el caso que parte de la predisposición genética viniera dada por la interacción de múltiples variantes genéticas infrecuentes a nivel poblacional y por tanto no detectables en estos estudios, hecho que explicaría porque la base genética de estas AID está todavía incompleta.

- Posible combinación de alelos HLA y alelos de otros genes como biomarcadores

Tal y como acabamos de comentar, muchos de los genes identificados como biomarcadores en las AID tienen efectos menores (bajo RR u OR), pero a veces, es la interacción entre diferentes genes lo que predispone a padecer una determinada enfermedad, como ocurre en el caso del gen de la Tg y HLA-DRB1-Arg74.

Se han detectado 3 variantes aminoacídicas del gen de la Tg (A734S, V1027M y W1999R) asociadas con AID, estas diferentes variantes alteran la degradación de la Tg lo que resulta en un repertorio de péptidos patogénico. Por otro lado, se ha identificado que una arginina en la posición 74 de la cadena beta del HLA-DR (HLA-DRB1-Arg74) confiere susceptibilidad a la GD (que se explicará más adelante), ya que puede unir preferentemente unos péptidos determinados, mientras que una glutamina en esta misma posición tiene efecto protector [104]. Pero además, si un mismo paciente presenta la variante W1999R y el HLA-DRB1-Arg74, la susceptibilidad a la GD es mayor [18].

- Alelos HLA en la Enfermedad Celiaca

La participación del sistema HLA en la fisiopatología de la CD está perfectamente definida y explica la asociación genética. Se describió por primera vez en los años 70 [105, 106]. Dentro de los pacientes con CD alrededor del 90% expresan el HLA-DQ2, heterodímero formado por los alelos HLA-DQA1*05 y DQB1*02 en relación al 20% de individuos que lo expresan en la población general. Del resto de pacientes celíacos, un 5% presentan el HLA-DQ8 (HLA-DQA1*0301 y DQB1*0302) y el 5% restante tienen uno de los 2 genes que forma el HLA-DQ2 pero no presentan el heterodímero completo [107].

Se ha visto que en función del genotipo hay un rango de riesgo diferencial de asociación con la CD, siendo de mayor a menor riesgo aquellos individuos DQ2/DQ2, DQ2/otro, DQ8/otro y por último los que presentan sólo uno de los 2 alelos que forman el HLA-DQ2 [108]. Individuos HLA-DQ2 homocigotos tienen hasta 5 veces mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que individuos HLA-DQ2 heterocigotos [11]. La presencia de los genes HLA relacionados es necesaria para causar la enfermedad [11], no obstante sólo un 3% de los individuos HLA-DQ2/DQ8 positivos la desarrollarán tras la exposición al gluten [108]. Por ello el VPP de este biomarcador no es demasiado elevado. Al contrario, la probabilidad de que un individuo con HLA-DQ2/DQ8 negativo tenga CD es verdaderamente pequeña, es decir el VPN de este biomarcador es realmente importante. Esto implica que el estudio genético es útil para delimitar población de riesgo susceptible de evaluación y seguimiento.

La base molecular de esta asociación ha sido ampliamente estudiada, parece ser que hay una unión preferente por parte de los HLA-DQ2 y HLA-DQ8 a péptidos derivados del gluten resistentes a la proteólisis, que presentan residuos de glutamato cargados negativamente y que han sido introducidos por la enzima Tg2 [14].

- Alelos HLA en la Enfermedad de Graves

En relación a los genes del sistema HLA, aunque inicialmente, fueron los Ag HLA de clase II los primeros en asociarse con la GD, en concreto el HLA-DRB1*03 [109], recientemente también se ha demostrado una regulación positiva de moléculas HLA de clase I en células tiroideas en respuesta a la infiltración linfocitaria de la glándula y se postula que estas moléculas puedan tener un papel relevante en la patogénesis de esta enfermedad [97]. Así el HLA-C*07 y HLA-B*08 son factores predisponentes (OR=1.63 y 1.62 respectivamente), mientras que los alelos HLA-C*03, HLA-C*16 y HLA-B*44 tienen efectos protectores (OR=0.54, 0.36 y 0.64 respectivamente) [97].

- **Sistema HLA como biomarcador de reacciones de hipersensibilidad**

A pesar de que el conocimiento en el campo farmacológico está en continuo crecimiento, las reacciones adversas a fármacos (ADR) ocurren con frecuencia y constituyen una causa de morbilidad y mortalidad importante a nivel mundial. La organización mundial de la salud define estas ADR como una respuesta al fármaco que es nociva y no intencionada y que ocurre a las dosis que normalmente se utilizan como profilaxis, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o para la modificación de una función fisiológica.

Hay dos principales categorías de ADR, aquella predecible, asociada con la actividad farmacológica del fármaco en cuestión y aquella idiosincrática, causada por una reacción inmune frente al fármaco. Variantes de esta última son por ejemplo el síndrome de hipersensibilidad frente a fármacos (DHS) o reacciones frente al fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos (DRESS) [110, 111].

En este contexto, el sistema HLA constituye un importante factor genético en el DHS. Desde hace años es conocida la relación entre el alelo HLA-B*57:01 y las DHS al abacavir, un inhibidor de la transcriptasa inversa utilizado en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) [112]. La determinación de la presencia de este alelo, en individuos susceptibles de ser tratados con este fármaco, es recomendada desde la FDA (*US Food and Drug Administration*) y en concreto en el laboratorio de HLA (LIRAD) también se realiza mediante un método basado en la RT-PCR.

De la misma manera, recientemente se ha asociado la presencia del alelo HLA-A*31:01 con las reacciones de hipersensibilidad inducidas por carbamazepina (un fármaco antiepiléptico) en individuos de origen europeo. La presencia de este alelo incrementa el riesgo de sufrir estas reacciones de un 5 a un 26% mientras que su ausencia lo disminuye de un 5 a un 3.8% [111, 113].

Otros factores genéticos en la Enfermedad de Graves

En relación a genes no HLA de susceptibilidad a AITD, aquellos que afectan a la activación de LT como son *CTLA4* (cromosoma 2q33.2) y *PTPN22* (cromosoma 1p13.2) han sido ampliamente estudiados.

- **CTLA4**

CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated factor*; CD152) es un miembro de la superfamilia de las Igs, proteína inmuno-reguladora que se expresa en los LT activados y constituye un regulador negativo para los LT. El CTLA4 presintetizado se almacena en vesículas intracelulares y como consecuencia de la activación de los LT, aumentan los niveles de calcio intracelular, lo que provoca la liberación de esta molécula a la superficie celular [114]. Actúa uniéndose a B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en las APC, igual que lo hace CD28 pero con entre 500 - 2500 veces más afinidad y efecto opuesto. Es decir, CTLA4 y CD28 compiten por su unión a CD80 y CD86, pero mientras que CD28 tiene un efecto estimulador, CTLA4 lo tiene inhibidor [115].

Esta proteína juega un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia a nivel periférico además de en la terminación de las respuestas mediadas por los LT. Una subpoblación de LT que tienen un papel crucial en la tolerancia periférica es la subpoblación de LTreg y estos expresan de forma constitutiva CTLA4 en su superficie [114]. Se ha postulado que polimorfismos en este gen que reduzcan su expresión y/o función pueden predisponer a sufrir autoinmunidad, ya que sería de esperar que aumentara la activación de LT [104].

Se han encontrado diferentes variantes y las 3 que presentan una asociación más consistente son una repetición AT en la región 3'UTR: (AT)_n, una transición A/G en la posición 49 (exón 1; péptido señal; rs231775) que resulta en una sustitución de una alanina por una treonina (A/G49) y otro cambio A/G fuera de la región 3'UTR (CT60) [104, 116]. También hay estudios que hablan de un posible papel sinérgico entre polimorfismos en este gen y determinados alelos HLA en relación a la GD [117].

- **PTPN22**

PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase-22*) codifica para una proteína intracelular LYP (*lymphoid tyrosine phosphatase*) que tiene un papel central en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y por lo tanto en la prevención de las AID [118]. Al igual que CTLA4, juega un papel negativo en la señalización de LT [119]. Esta proteína LYP tiene 807 aminoácidos y contiene un dominio catalítico y 4 sitios de unión a SH3 [120]. Polimorfismos en este gen, y en *CTLA4*, muestran diferencias en cuanto a sus frecuencias en diferentes poblaciones étnicas, tal y como se puede ver en la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). El principal SNP (*single nucleotide polymorphism*) asociado a enfermedad es debido a un cambio missense en la posición 1858 (C>T) que tiene como consecuencia una substitución de una arginina (Arg; R) por un triptófano (Trp; W) en el codón 620 (R620W; rs2476601). Este SNP se ha visto asociado con AITD además de con otras AID [104] como son T1D, donde fue inicialmente descrita, RA, SLE, sin

embargo esta asociación no se ha observado en pacientes con esclerosis sistémica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o esclerosis múltiple [120]. Este polimorfismo, localizado en la región N terminal de uno de los dominios de unión a SH3, disminuye su eficacia de unión a estos dominios de determinadas proteínas, como por ejemplo Csk y recientemente se ha visto que este cambio resulta en una variante con ganancia de función con aumento de la capacidad catalítica. Sin embargo, todavía no está del todo claro como este potencial incremento en la inhibición de la activación del TCR puede acabar desencadenando procesos autoinmunes [118, 121].

HIPÓTESIS

La determinación del polimorfismo del sistema HLA (tipificación HLA) es útil en diferentes campos biomédicos, como son la histocompatibilidad a nivel de trasplante o en relación con el diagnóstico de enfermedades, especialmente AID. Para ello, los laboratorios de HLA hoy en día utilizan una combinación de diferentes técnicas moleculares, que incluyen la PCR-SSP, PCR-SSO o PCR-SBT.

No obstante, la metodología de la RT-PCR en combinación con sondas de hibridación tiene una serie de ventajas como pueden ser el menor tiempo de procesado o menor riesgo de contaminación post-PCR, que pueden resultar útiles en la práctica diagnóstica a la hora de determinar tanto el polimorfismo del sistema HLA como polimorfismos en otros genes que se utilizan como biomarcadores en ciertas AID.

OBJETIVOS

CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES HLA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

El objetivo de este trabajo es el diseño de reacciones de RT-PCR para la caracterización y evaluación de biomarcadores genéticos, principalmente pertenecientes al sistema HLA, para el estudio de AID como son la CD y la GD. El análisis de los biomarcadores del sistema HLA, juntamente con polimorfismos en otros genes cuya función está relacionada con el sistema inmune, como por ejemplo *PTPN22* y *CTLA4*, puede permitirnos predecir mejor la susceptibilidad a padecer estas enfermedades.

Objetivo 1_Biomarcadores HLA en la Enfermedad Celíaca

- Diseñar, poner a punto mediante RT-PCR y validar las reacciones necesarias para implementar la técnica de tipificación HLA-DQ2/DQ8 asociado a CD. Detectar la presencia del alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o en heterocigosis y su relación con la CD.
- Estudiar la presencia del alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o heterocigosis en pacientes con CD y correlacionar la presencia de este alelo con otros biomarcadores de la enfermedad y su gravedad.

Objetivo 2_Biomarcadores en la Enfermedad de Graves

- Diseñar, poner a punto mediante RT-PCR y validar las reacciones necesarias para la detección de los alelos HLA de clase I (HLA-B*08/B*44 y HLA-C*03/C*07/C*16) y para la determinación de los polimorfismos de los genes *PTPN22* y *CTLA4* (rs2476601 y rs231775 respectivamente), que han sido descritos como loci de susceptibilidad para la GD en otras poblaciones.
- Analizar las frecuencias de los alelos HLA de clase I y de los polimorfismos rs2476601 y rs231775 y confirmar que estos loci realmente constituyen loci de susceptibilidad para la GD en una cohorte de pacientes de nuestra región geográfica.

Objetivo 3_Desarrollo de la tipificación del locus A del sistema HLA por PCR a tiempo real

- Diseñar, poner a punto mediante RT-PCR y validar un sistema de tipificación para el locus A del sistema HLA que complemente a otras reacciones ya desarrolladas en el laboratorio por esta misma metodología (HLA-B y DR) [90, 91]. Obtener una tipificación de baja resolución que pueda ser utilizada con diferentes aplicaciones como por ejemplo, el estudio de variantes HLA-A asociadas a enfermedad o susceptibilidad a ciertos medicamentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS GENERALES

Para la puesta a punto de las reacciones utilizadas en este trabajo para el tipaje del sistema HLA (tanto en el caso del locus A así como de los diferentes alelos HLA asociados a AID (HLA-DQ2/DQ8 en el caso de la CD y HLA-B*08/44 y HLA-C*03/07/16 en el caso de la GD)), se han utilizado aproximadamente 200 muestras de DNA genómico del laboratorio de HLA del LIRAD (Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques).

Estas muestras habían sido previamente analizadas mediante tecnologías convencionales (por baja, PCR-SSP o PCR-SSO, o alta resolución, PCR-SBT) para los loci HLA de clase I y/o clase II y han sido escogidas según su tipificación de manera que hubiera la máxima variedad de tipificaciones posibles, tanto de muestras homocigotas como heterocigotas.

MÉTODOS GENERALES

Extracción de DNA

A todas las muestras se les realizó extracción de DNA por uno de los siguientes métodos:

- QIAmp DNA Blood mini Kit QIAGEN (Qiagen GMBH, Hilden, Germany):
El DNA, liberado por lisis celular, es adsorbido en la membrana de la columna. Los lavados posteriores de la misma eliminan los posibles contaminantes. El DNA purificado se eluye de forma concentrada.
- Kit de purificación de DNA Maxwell (Promega®, Madison, USA):
El DNA, liberado por lisis celular, se une a bolas magnéticas y mediante lavados posteriores de la muestra se eliminan los posibles contaminantes. Finalmente obtenemos el DNA purificado de alta calidad.
- Kit QIASymphony DSP AXpH DNA (Qiagen GMBH, Hilden, Germany):
Igual que en el método anterior, el DNA, liberado por lisis celular, se une a bolas magnéticas y mediante lavados posteriores de la muestra se eliminan los posibles contaminantes, obteniendo así el DNA purificado.

Reacciones de PCR a tiempo real

Las reacciones de RT-PCR se han realizado en un LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Germany) combinando la amplificación con *primers* locus-específicos (amplifican de manera general todos los alelos de un mismo locus) o alelo-específicos (amplifican alelos o grupos de alelos concretos) con la detección mediante sondas específicas marcadas con fluorocromos. Las sondas utilizadas para el tipaje del locus A del sistema HLA así como para la determinación de los alelos HLA o polimorfismos en otros genes asociados a GD (*PTPN22*) han sido sondas FRET, sin embargo para estudiar la presencia del alelo HLA-DQB1*02 (asociado a CD) en homocigosis o heterocigosis y el

polimorfismo en *CTLA4* relacionado con GD se han utilizado sondas Taqman®. El volumen final de las reacciones ha sido 10 µl.

Diseño de primers

Se obtuvieron las secuencias de los diferentes alelos HLA-A, B, C y DQB1 a partir de la base de datos <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> [122], se alinearon con el fin de localizar las zonas comunes donde colocar los *primers* que amplificaran la región a estudio y no amplificaran secuencias no interesadas de otros loci, con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas, debido a su similitud.

Para valorar la tendencia que tienen los *primers* a formar dímeros entre sí se utilizó el programa OligoTM de Medprobe y para calcular la temperatura teórica de fusión se utilizó la aplicación meltcalc99free.xlm® [123].

Diseño de sondas

A partir de la alineación de las secuencias de los diferentes alelos, se han valorado las zonas de mayor variabilidad definiendo para cada grupo de alelos aquellas secuencias más específicas, donde colocar las sondas que nos permitan discriminar unos alelos de otros.

Para el diseño de sondas FRET se han tenido en cuenta los siguientes factores:

- La familia alélica o alelo que queremos discriminar con la sonda. Para ello deberemos diseñar la sonda en cuestión de tal manera que se una a una zona que sea diferente en esa familia al resto de familias alélicas.
- La longitud de las sondas (*anchor* y *sensor*) debe ser en torno a 18-20 bases.
- La separación entre ambas sondas en la secuencia molde no debe superar las 5 bases, ya que el proceso de transferencia de energía es dependiente de la distancia a la que estén situadas ambas.
- La sonda *anchor* debe tener un mínimo de 3-5 °C de temperatura de fusión más que la sonda *sensor*.
- Las no-complementariedades que presenta esa familia alélica respecto al resto de familias deben quedar lo más centradas posible.
- Debemos evitar que entre ambas sondas queden nucleótidos de guanosina, sobre todo en la cadena donde hibridará la fluoresceína ya que disminuyen la señal.
- Debemos tener en cuenta la tendencia que tienen las sondas de formar dímeros con ellas mismas, con la otra sonda o con los *primers* utilizados en la amplificación.
- Se deben bloquear los extremos 3', si no llevan marcaje, con un grupo fosfato, para evitar amplificaciones inespecíficas.

Para valorar la tendencia que tienen las sondas para generar artefactos entre sí, al igual que pasa con los *primers*, se utilizó el programa OligoTM de Medprobe y se utilizó la aplicación meltcalc99free.xlm® para calcular la temperatura de *melting* (Tm) de cada una de las sondas, así

como para calcular la temperatura teórica de fusión obtenida de todas las hibridaciones incompatibles diferentes.

Las sondas fueron compradas a TIB MOLBIOL (Berlín, Germany), OPERON Biotechnologies (Cologne, Germany) y SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA).

Parámetros a tener en cuenta en cada reacción

Para establecer las condiciones óptimas de reacción de cada una de las sondas se ha realizado, con cada una de ellas, una primera RT-PCR en la que se ha probado distintas concentraciones asimétricas [124] de *primers* teniendo en cuenta la orientación (sentido o *sense* o antisentido o *antisense*) de la sonda a estudio y diferentes concentraciones de MgCl₂. Por ejemplo, si la sonda tiene orientación *sense* será necesario poner más concentración del primer *antisense* y viceversa.

En aquellos casos en los cuales sea posible combinar sondas diferentes (multiplicidad de sondas) una vez optimizadas éstas de manera aislada, se ensaya la validez del uso simultáneo (en un mismo tubo) de aquellas con condiciones de PCR similares, [125] para ello se ha tenido en cuenta:

- Que estén situadas en el mismo exón y así solo será necesario una amplificación.
- Que tengan la misma orientación (*sense* o *antisense*), ya que de ello dependerá la concentración de los *primers* a utilizar.
- Que estén lo más separadas posible en su localización dentro del exón, para que no haya problemas en la unión de las sondas al DNA.
- Que estén marcadas con fluorocromos distintos, para que seamos capaces de visualizarlas en canales diferentes.

Una vez optimizado este paso, se han añadido los *primers* y sondas necesarios para detectar el gen de la beta-globina (control de amplificación). A veces al realizar estas reacciones múltiples ha sido necesario realizar pequeños ajustes en las concentraciones de los *primers*, sondas o el MgCl₂.

BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA

Muestras

Se han utilizado muestras de pacientes (n=143) procedentes de los servicios de Pediatría o Digestivo del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTIP), a los cuales se les ha solicitado la determinación de HLA-DQ2/DQ8 asociado a CD. Aquellos pacientes que han presentado un estudio serológico compatible con CD forman parte del grupo de enfermos (n=57; 39.9%; Tabla 6) y aquellos que no han presentado un estudio serológico compatible componen el grupo control (n=86; 60.1%).

	Pacientes CD (n=57)	
	n	%
Sexo		
Hombre	20	35.09
Mujer	37	64.91
Edad al diagnóstico		
Menor de 2 años	4	7.02
2-6 años	20	35.09
6-18 años	26	45.61
Mayor de 18 años	7	12.28

Tabla 6: características del grupo de pacientes con CD

Métodos

Primers y sondas utilizados

Los *primers* y sondas utilizados en la reacción del gen control (beta-globina) así como aquellos utilizados en la genotipificación HLA-DQ2/DQ8 y en la evaluación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 se muestran a continuación (Tablas 7, 8 y 9):

Reacción de la beta-globina				
Primers	Secuencia 5'-3'			Long
PCO3	ACACAACTGTGTTCACTAGC			20
PCO4	CAACTTCATCCAGTTCACC			20
Sondas	Secuencia 5'-3'	Marcaje 5'	Marcaje 3'	Long
CT-Cy5	AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA	Cy5	Phosphat	29
CT-FL	CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA		FAM	35

Tabla 7: beta-globina; secuencias de los *primers* y sondas

HLA-DQ2/DQ8			
Sondas	Secuencia 5'-3'	Marcaje 5'	Marcaje 3'
DQA5s	TCATAACTCTCCTCAGCAGAA	FAM	Phosphat
DQA5a	CCCCAGTGCTCCACCTTGC		LC-Red 640
R1a-640	CCACGTCGCTGTCGAAGC	LC-Red 640	Phosphat
R1s	TCACCGCCCGATACACC		FAM
Primers	Secuencia 5'-3'		
DQB1*02-03_F	GACRGAGCGCGTGCCTCT		
DQB1*02-03_R	GCAAGGTCGTGCGGAGCT		
DQA1*05_F	TTCTTCAAGATCGTTACCTCACCC		
DQA1*05_R	CCCAGTGTTCAGAAGAGGCTT		
D354	CTGTTCCAGTACTCGGCGG		

Tabla 8: HLA-DQ2/DQ8; secuencias de los *primers* (*forward* (F) y *reverse* (R)) y sondas (*sensor* (s) y *anchor* (a))

Evaluación dosis génica alelo HLA-DQB1*02				
Nombre	Secuencia 5'-3'	Modificaciones		Longitud
		5'	3'	
Reacción de la beta-globina				
PCO3	ACACAAGTGTCTACTAGC			20
PCO4	CAACTTCATCCACGTTACCC			20
Sonda bg	CAAACAGACACCATGGTGACCTGACTCCTGAGGA	Hex	TAMRA	35
Reacción HLA-DQB1*02				
DQB1*02_ex1_F	CAATTATGTCTTGGAAAAAGG			21
DQB1*02_ex1_R	GAGCCTGTCCAGAGTA			18
Sonda_ex1	ACTGTGACCTTGATGCTGTCGAT	Fam	TAMRA	23
Reacción HLA no DQB1*02				
Sense_no DQB1*02	GGCNGGCGGGAAGTGG			17
Antisense_3_no DQB1*02	TCGGTTATAGATGTRCTGG			20
Sonda_no DQB1*02	TGTGCTACTTCACCAACGGGAC	Fam	TAMRA	22
Sonda_0601	TGTGCTACTTCACCAATGGGAC	Fam	TAMRA	22

Tabla 9: HLA-DQB1*02; secuencias de los *primers* (*forward* (F) o *sense* y *reverse* (R) o *antisense*) y sondas

La localización de los diferentes *primers* y sondas sobre la secuencia de los alelos HLA se muestra en el anexo 1.

Condiciones óptimas de reacción

- Protocolo de amplificación

Para el estudio del HLA-DQ2/DQ8 se ha definido un protocolo de amplificación que es el mismo que se utiliza en la amplificación de las otras metodologías de tipificación HLA basadas en la RT-

PCR en combinación con sondas FRET que se han desarrollado en el laboratorio. El protocolo de amplificación establecido para todas las reacciones fue el siguiente (Tabla 10):

10 min de desnaturalización inicial y activación del enzima Taq (FastStart Taq DNA Polymerase; Roche) a 95 °C seguidos de 55 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación está compuesto por 10 seg de desnaturalización a 95 °C, 10 seg de hibridación a 62 °C y 20 seg de extensión a 72 °C. Las curvas de fusión (o *Melting*) se generaron a 95 °C para 0 seg, 75 °C para 15 seg, 42 °C 4 min y 80 °C 0 seg seguidas de un paso de enfriamiento de 20 seg a 40 °C.

PROTOCOLO LIGHTCYCLER® 480	
DESNATURALIZACIÓN y ACTIVACIÓN Taq	
95 °C	10 min
CICLOS AMPLIFICACIÓN 55	
95 °C	10 seg
62 °C	10 seg
72 °C	20 seg
GENERACIÓN de CURVAS <i>MELTING</i>	
95 °C	0 seg
75 °C	15 seg
42 °C	4 min
ENFRIAMIENTO	
40 °C	20 seg

Tabla 10: HLA-DQ2/DQ8; protocolo de reacción

Para el estudio de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 se ha definido un protocolo de amplificación que consta de los siguientes pasos (Tabla 11):

10 min de desnaturalización inicial y activación del enzima Taq (FastStart Taq DNA Polymerase; Roche) a 95 °C seguidos de 55 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación está compuesto por 10 seg de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación-extensión a 62 °C. Finalmente, un paso de enfriamiento de 30 seg a 40 °C.

PROTOCOLO LIGHTCYCLER® 480	
DESNATURALIZACIÓN y ACTIVACIÓN Taq	
95 °C	10 min
CICLOS AMPLIFICACIÓN 55	
95 °C	10 seg
62 °C	1 min
ENFRIAMIENTO	
40 °C	30 seg

Tabla 11: HLA-DQB1*02; protocolo de reacción

- Concentraciones óptimas de reactivos

Se determinaron las concentraciones óptimas de cada reactivo utilizado en las reacciones diseñadas, con muestras previamente tipadas con otros métodos. Las concentraciones de uso así como el volumen (μ) necesario de cada reactivo se muestran a continuación (Tablas 12 y 13):

Reactivos	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3
PCO3 (10 μ M)	0.2	0.2	0.4
PCO4 (10 μ M)	0.3	1.6	0.4
Sonda bg anchor (10 μ M)	0.2	0.2	0.2
Sonda bg sensor (10 μ M)	0.2	0.2	0.2
DQB1*02-03_F (10 μ M)	0.5	.	1.6
DQB1*02-03_R (10 μ M)	0.1	.	.
DQA1*05_F (10 μ M)	-	0.4	.
DQA1*05_R (10 μ M)	-	0.1	.
D354 (10 μ M)	-	-	0.3
DQA5s (10 μ M)	-	0.2	-
DQA5a (10 μ M)	-	0.2	-
R1a-640 (10 μ M)	0.2	-	0.2
R1s (10 μ M)	0.2	-	0.2
Buffer (10x)	1	1	1
MgCl ₂ (25 mM)	0.8	0.6	0.6
dNTPs (10 μ M)	0.2	0.2	0.2
Taq FastStart (5 U/ μ l)	0.1	0.1	0.1
Betaine (10x)	-	-	0.5
Agua	5.0	4.0	3.1
DNA a estudio	1.0	1.0	1.0

Tabla 12: HLA-DQ2/DQ8; concentraciones óptimas de los reactivos

Reacción HLA-DQB1*02		Reacción HLA no DQB1*02	
Reactivos (concentración)	μl	Reactivos (concentración)	μl
PCO3 (10 μM)	0.5	PCO3 (10 μM)	0.15
PCO4 (10 μM)	0.5	PCO4 (10 μM)	0.15
Sonda bg (10 μM)	0.2	Sonda bg (10 μM)	0.2
DQB1*02_ex1_F (10 μM)	0.5	Sense_no DQB1*02 (10 μM)	0.75
DQB1*02_ex1_R (10 μM)	0.5	Antisense_3_no DQB1*02 (10 μM)	0.75
Sonda_ex1 (10 μM)	0.3	Sonda_no DQB1*02 (10 μM)	0.15
Buffer (10x)	1	Sonda_0601 (10 μM)	0.15
MgCl ₂ (25 mM)	0.8	Buffer (10x)	1
dNTPs (10 μM)	0.2	MgCl ₂ (25 mM)	1.2
Taq FastStart (5 U/μl)	0.2	dNTPs (10 μM)	0.2
Agua	3.3	Taq FastStart (5 U/μl)	0.2
DNA a estudio	1.0	GC_Rich Sol (5x)	2
		Agua	1.1
		DNA a estudio	1.0

Tabla 13: HLA-DQB1*02; concentraciones óptimas de los reactivos

A continuación se muestran ejemplos de estas reacciones (Figuras 7 y 8):

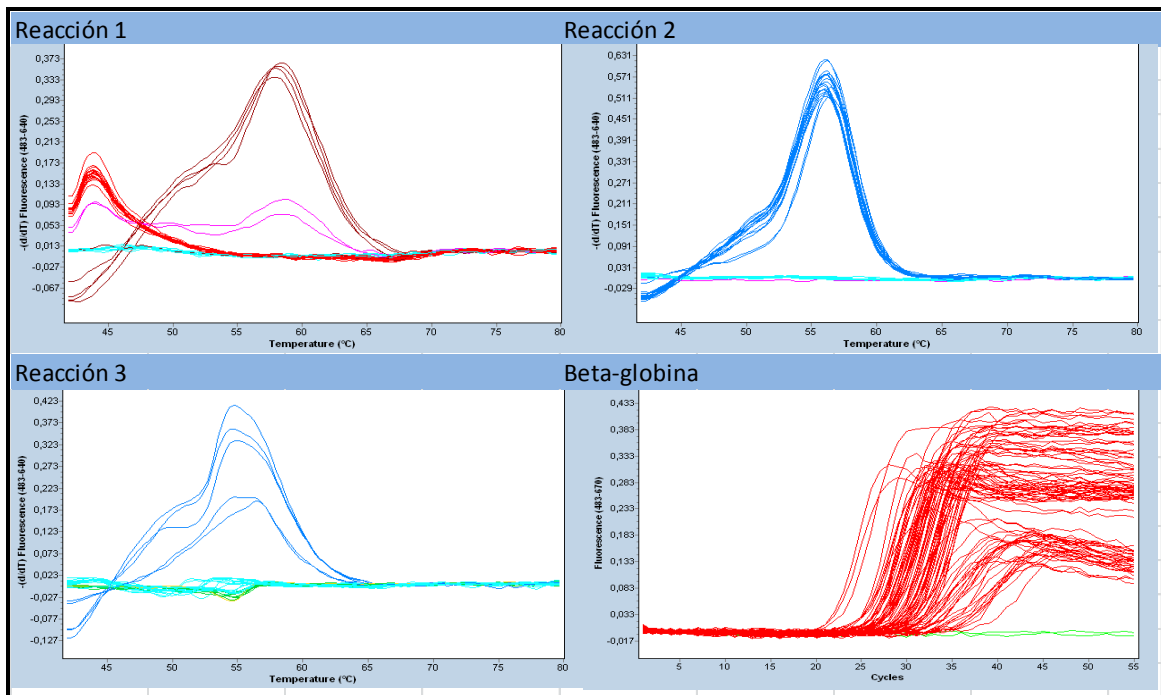


Figura 7: ejemplo de las reacciones para la genotipificación HLA-DQ2/DQ8 asociado a CD (reacciones 1, 2, 3 y beta-globina)

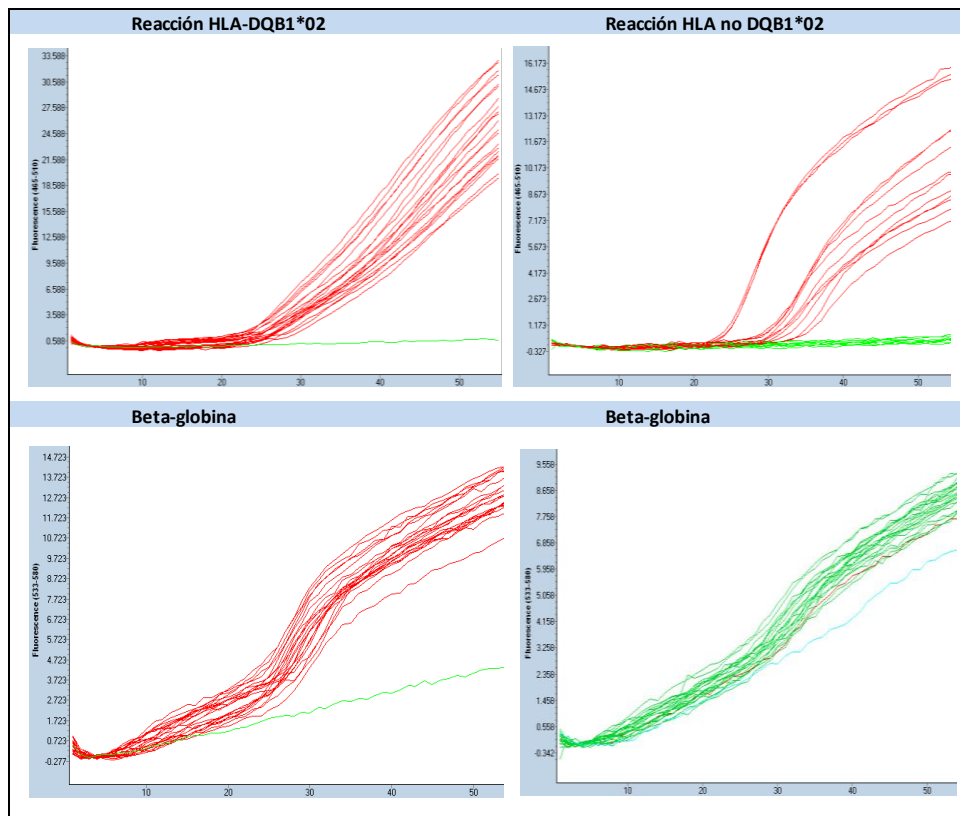


Figura 8: ejemplo de las reacciones para la determinación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02, así como la reacción de la beta-globina

Determinación de Ac asociados a la Enfermedad Celíaca

La determinación de Ac relacionados con CD se realizó siguiendo el algoritmo de la Figura 1.

En primer lugar se determinó si el paciente presentaba niveles de IgA >20 mg/dl por nefelometría (Siemens, Munich, Germany) y según esto se realizó el estudio correspondiente de Ac IgA (si IgA >20 mg/dl) o IgG (si IgA <20 mg/dl). La determinación de Ac anti-Tg y anti-DGP se realizó por ELISA (Orgentec, Mainz, Germany) considerándose un resultado positivo cuando los valores de estos fueron >10 U/mL y >12 U/mL respectivamente. Por otro lado, la determinación de Ac anti-EMA ha sido realizada mediante IFI sobre esófago de mono (Movaco, Barcelona, España) y en este caso el resultado se ha informado como positivo o negativo.

Realización de biopsia intestinal

En 37 de los 57 pacientes (64.9%) se dispone de datos correspondientes a la biopsia intestinal. Para el estudio de estas biopsias de intestino delgado se ha realizado una tinción hematoxilina/eosina para ver si hay atrofia de las vellosidades intestinales así como una tinción inmunohistoquímica con Ac monoclonal anti-CD3 para ver la presencia del infiltrado linfocitario. La evaluación histológica de estos pacientes se muestra a continuación (Tabla 14) según la clasificación de Marsh:

Datos biopsia intestinal	
	Nº pacientes (%)
Pacientes sin datos	20 (35.1%)
Pacientes con datos	37 (64.9%)
Marsh 0	1 (1.8%)
Marsh 1	4 (7.0%)
Marsh 2	0 (0%)
Marsh 3	32 (56.1%)
3 sin especificar	4 (7.0%)
3A	1 (1.8%)
3B	11 (19.3%)
3C	16 (28.0%)

Tabla 14: datos obtenidos en la biopsia intestinal [13]

BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES

Muestras

Se han utilizado muestras de pacientes con GD (n=175) y como grupo control se han utilizado muestras del banco de cordón (n=152) seleccionadas al azar. Las muestras de pacientes con GD provienen de los servicios de Endocrinología del HUGTiP y del Hospital Josep Trueta (de Girona).

Métodos

Primers y sondas utilizados

Las secuencias de los *primers* y sondas utilizados en la reacción del gen de la beta-globina (control interno) son los mismos que los utilizados para el tipaje de HLA-DQ2/DQ8 asociado con CD (Tabla 7), sin embargo aquellos utilizados en las reacciones para el tipaje de alelos HLA de clase I y de los polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4* relacionados con GD se muestran a continuación (Tablas 15 y 16):

Reacciones de alelos HLA asociados con enfermedad de Graves							
Alelo	Nombre	Secuencia 5'-3'	Modificaciones		Pos	Long	Producto
			5'	3'			
HLA-B*08	F_B08	CCACTCCATGAGGTATTTTCG	-	-	490	20	179
	R_B08	CGGTCAGTCTGTGTGTTGGT	-	-	689	20	
	P18s	CGAGTCCGAGAGAGGAGCC	Fam	PH	606	19	-
	P1a	TGAGGTTGACAGCGACGCC	-	LC Red 640	585	20	-
HLA-B*44	p127	GGAGCCCCGCTTCATCA	-	-	539	17	235
	A25_44as	TACGTGGGGGATGGGGA	-	-	591	17	
	P18s	CGAGTCCGAGAGAGGAGCC	Fam	PH	607	19	-
	P1a	TGAGGTTGACAGCGACGCC	-	LC Red 640	586	20	-
	p127	GGAGCCCCGCTTCATCA	-	-	539	17	235
	A25_44as	TACGTGGGGGATGGGGA	-	-	591	17	
	P20s	GGAACCTGCGCGGCTACTACAACCA	-	Fam	721	25	-
P20a	AGCGAGGCCGTGAGTGACCCCGG	LC Red 640	PH	747	24	-	
HLA-C*03	F_C03	ATCGCCCTGAACGAGGAT	-	-	1100	18	129
	R_C03	GCGTCTCCTCCATTCTT	-	-	1247	19	
	S_C03s	CTGGAGGGCCTGTGCGTG	LC Red 640	PH	1208	18	-
	S_C03a	GGCGGAGCAGCTGAGAGCCTA	-	Fam	1186	21	-
HLA-C*07	F_C07	GCGGGGCTCGGGGGACT	-	-	962	17	193
	R_C07	CGCACGGGCCGCTCCA	-	-	1172	17	
	S_C7/16s	CGGACACCGCGGCTCAGAT	LC Red 640	PH	1139	19	-
	S_C7/16a	GACCTGCGCTCTGGACCGCC	-	Fam	1117	21	-
HLA-C*16	F_C16	GTCTCACACCTCCAGT	-	-	1004	17	177
	R_C16	CTCCAGGTAGGCTCTCT	-	-	1198	17	
	S_C7/16s	CGGACACCGCGGCTCAGAT	LC Red 640	PH	1138	19	-
	S_C7/16a	GACCTGCGCTCTGGACCGCC	-	Fam	1116	21	-

Tabla 15: secuencias y posición de los *primers* (*forward* (F) y *reverse* (R)) y sondas (S) (*sensor* (s) y *anchor* (a)) utilizados en las reacciones de los diferentes alelos HLA de clase I asociados a GD

La localización de los diferentes *primers* y sondas en la secuencia de los alelos HLA-B y HLA-C se muestra en el anexo 2.

Primers	Secuencia 5'-3'		
2476601_F	CCTCAAACCTCAAGGCTC		
2476601_R	CCTTTGGATTGTTCTAATTAAC		
231775_F	GGTTTTGCTCTACTTCCTG		
231775_R	AGTCTCACTCACCTTTGCA		
Sondas	Secuencia 5'-3' (orientación antisense)	Modificaciones	
		5'	3'
2476601_a	AATCATTATTATTGGTTGAGGAAGCT	Cy-5	Ph
2476601_s	ACTTCCTGTACGGACACCT		FAM
231775_wt	tccTggTagCcaGgttc	FAM	BHQ1
231775_mut	tccTggCagCcaGgttc	HEX	BHQ1

Tabla 16: secuencias de los *primers* (*forward* (F) y *reverse* (R)) y sondas FRET (*sensor* (s) y *anchor* (a)) o Taqman® (con secuencia complementaria al alelo normal (wt) y secuencia complementaria al alelo mutado (mut)) utilizados en las reacciones de los polimorfismos rs2476601 y rs231775 asociados a GD

Condiciones óptimas de reacción

- Protocolo de amplificación

El protocolo de amplificación utilizado para el tipaje de alelos HLA asociados con GD es el mismo que el utilizado para el tipaje HLA-DQ2/DQ8 asociado a CD (Tabla 9). Para la determinación del polimorfismo rs2476601 el protocolo es ligeramente diferente, siendo en este caso la temperatura de hibridación a 58°C (Tabla 17):

PROTOCOLO LIGHTCYCLER® 480	
DESNATURALIZACIÓN y ACTIVACIÓN Taq	
95 °C	10 min
CICLOS AMPLIFICACIÓN 55	
95 °C	10 seg
58 °C	10 seg
72 °C	20 seg
GENERACIÓN de CURVAS MELTING	
95 °C	0 seg
75 °C	15 seg
42 °C	4 min
ENFRIAMIENTO	
40 °C	20 seg

Tabla 17: polimorfismo rs2476601; protocolo de reacción

En el caso del polimorfismo rs231775, la reacción utiliza el mismo protocolo que el empleado para la reacción del HLA-DQB1*02 (Tabla 11).

- Concentraciones óptimas de reactivos

Previamente al tipaje de muestras de pacientes con GD, se determinaron las concentraciones óptimas de cada reactivo utilizado en las reacciones diseñadas, con muestras previamente tipadas con otros métodos. Las concentraciones de uso así como el volumen (μl) necesario de cada reactivo se muestran a continuación:

	B*08		B*44_1		B*44_2			C*03		C*07		C*16	
	[] final	Vol	[] final	Vol	[] final	Vol		[] final	Vol	[] final	Vol	[] final	Vol
Beta-globina							Beta-globina						
PCO3 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.5 μM	0.5 μl	0.4 μM	0.4 μl	PCO3 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl
PCO4 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.5 μM	0.5 μl	0.4 μM	0.4 μl	PCO4 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl
CT-Fluos (10 μM)	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl	CT-Fluos (10 μM)	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl
CT-LC (10 μM)	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl	CT-LC (10 μM)	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl	0.1 μM	0.1 μl
<i>Primers</i>							<i>Primers</i>						
F_08 / p127 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	F_03 / 07 / 16 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl
R_08 / A25_44as (10 μM)	2.4 μM	2.4 μl	2.0 μM	2.0 μl	2.0 μM	2.0 μl	R_03 / 07 / 16 (10 μM)	1.0 μM	1.0 μl	1.2 μM	1.2 μl	1.0 μM	1.0 μl
<i>Sondas</i>							<i>Sondas</i>						
P1a / P20a (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	S_03 / 07 / 16 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl
P18s / P20s (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	A_03 / 07 / 16 (10 μM)	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl	0.2 μM	0.2 μl
<i>Master Mix</i>							<i>Master Mix</i>						
Buffer (10x)	1x	1.0 μl	1x	1.0 μl	1x	1.0 μl	Buffer (10x)	1x	1.0 μl	1x	1.0 μl	1x	1.0 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	0.8 μl	2 mM	0.8 μl	3 mM	1.2 μl	MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	0.8 μl	2 mM	0.8 μl	2 mM	0.8 μl
dNTPs (10 μM)	2 μM	0.2 μl	2 μM	0.2 μl	2 μM	0.2 μl	dNTPs (10 μM)	2 μM	0.2 μl	2 μM	0.2 μl	2 μM	0.2 μl
Taq (5 U/ μl)	1 U/ μl	0.2 μl	1 U/ μl	0.2 μl	1 U/ μl	0.2 μl	Taq (5 U/ μl)	1 U/ μl	0.2 μl	1 U/ μl	0.2 μl	1 U/ μl	0.2 μl
DMSO (100%)	3%	0.3 μl	-	-	2%	0.2 μl	Agua	-	4.4 μl	-	4.4 μl	-	4.6 μl
GC Rich (5x)	-	-	1x	2.0 μl	-	-	DNA a estudio	-	1.0 μl	-	1.0 μl	-	1.0 μl
Agua	-	2.9 μl	-	1.0 μl	-	2.6 μl							
DNA a estudio	-	1.0 μl	-	1.0 μl	-	1.0 μl							

Tabla 18: concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en cada reacción para el tipaje de alelos HLA de clase I

Reacción rs2476601		Reacción rs231775	
Reactivos (concentración)	μl	Reactivos (concentración)	μl
2476601_F (10 μM)	1.0	231775_F (10 μM)	0.5
2476601_R (10 μM)	0.1	231775_R (10 μM)	0.5
2476601_a (10 μM)	0.2	231775_wt (10 μM)	0.2
2476601_s (10 μM)	0.2	231775_mut (10 μM)	0.2
Buffer + MgCl ₂ (10x)	1.0	Buffer + MgCl ₂ (10x)	1.0
dNTPs (10 μM)	0.2	dNTPs (10 μM)	0.2
Taq FastStart (5 U/ μl)	0.1	Taq FastStart (5 U/ μl)	0.2
Agua	6.2	Agua	6.2
DNA a estudio	1.0	DNA a estudio	1.0

Tabla 19: polimorfismos de PTPN22 y CTLA4: concentraciones óptimas de los reactivos

A continuación se muestran ejemplos de estas reacciones:

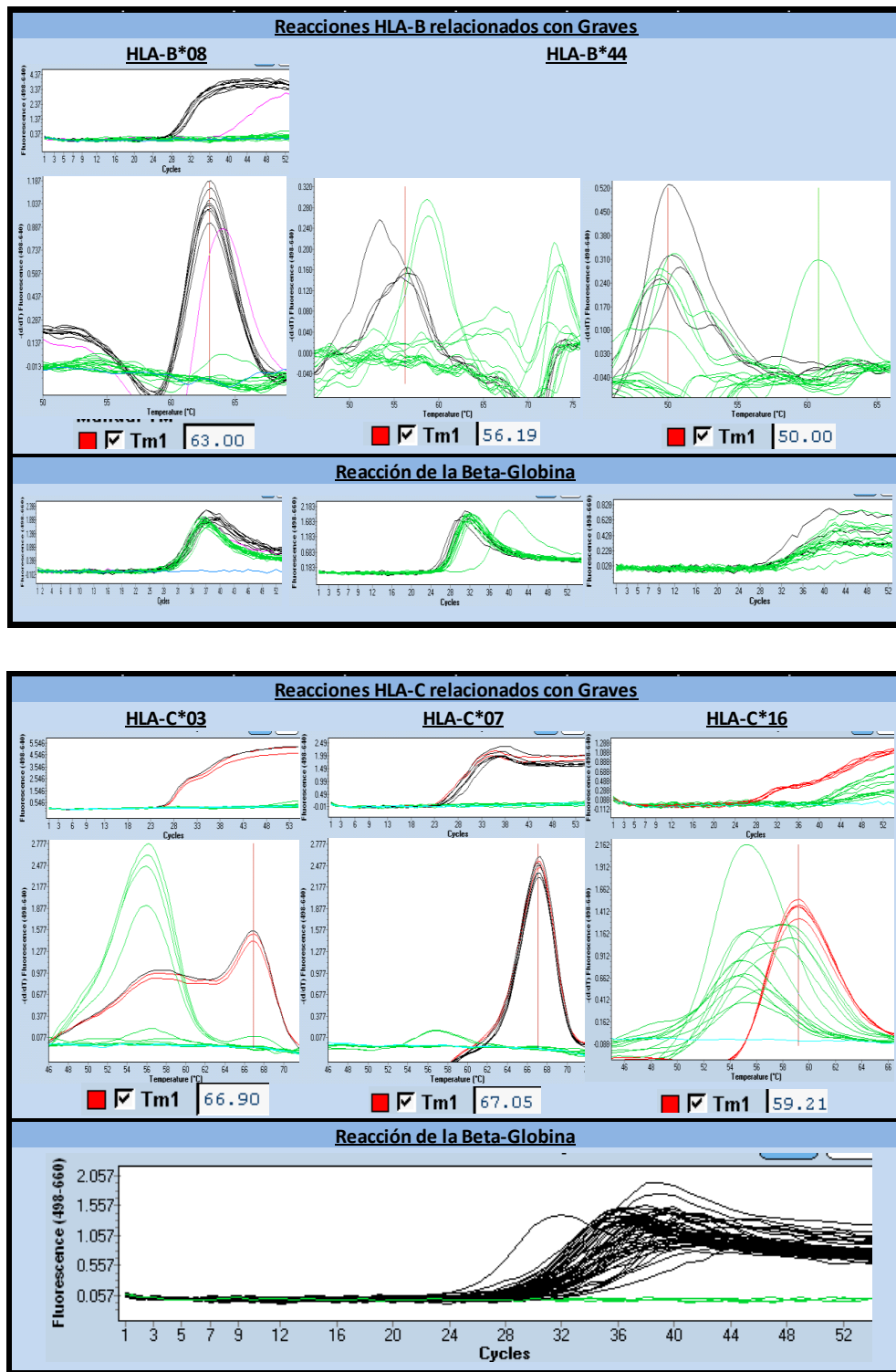


Figura 14: ejemplo de las reacciones para el tipaje de los alelos HLA de clase I relacionados con la GD. La interpretación de los resultados obtenidos según la Tm en cada una de las reacciones se muestra en el anexo 2

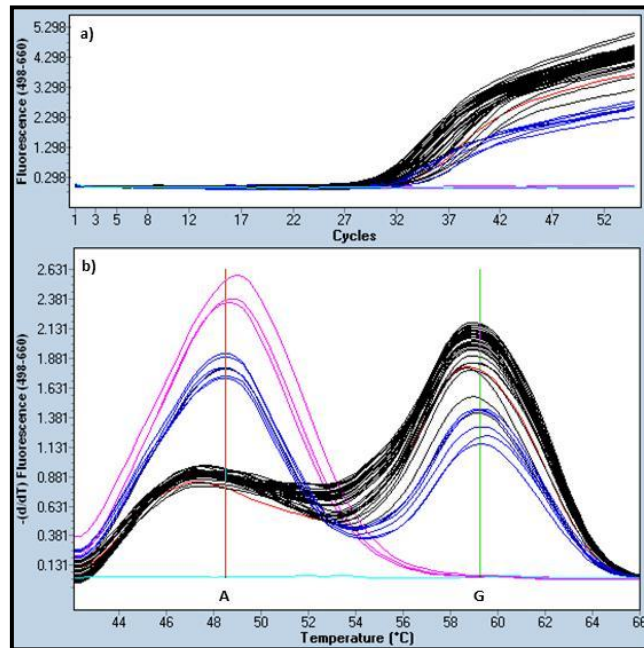


Figura 15: ejemplo de las reacciones para la determinación del polimorfismo rs2476601 (*PTPN22*); a) corresponde a la amplificación y b) a las curvas de *melting* ($T_m=59^\circ\text{C}$ para el alelo G y $T_m=49^\circ\text{C}$ para el alelo A). En rosa están aquellas muestras homocigotas para el alelo A, en negro aquellas homocigotas para el alelo G y en azul las heterocigotas AG

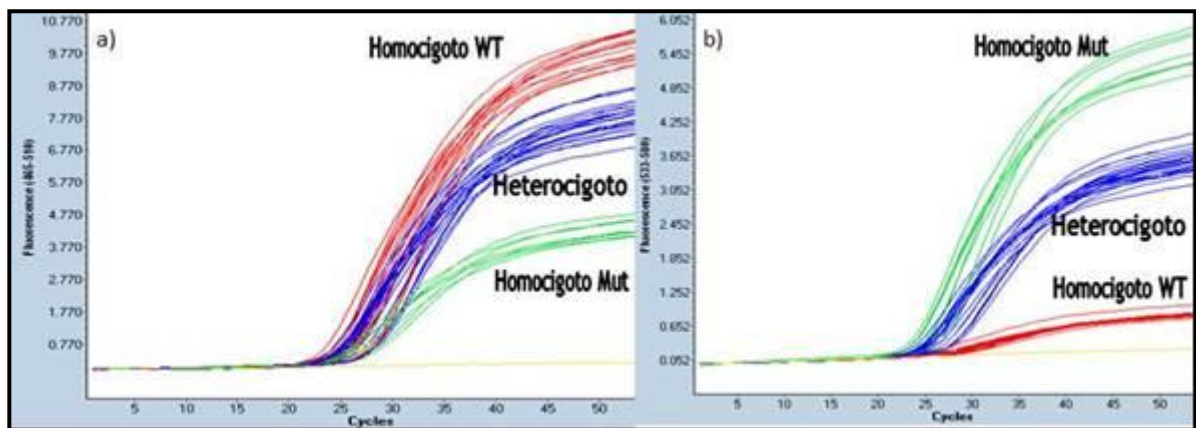


Figura 16: ejemplo de las reacciones para la determinación del polimorfismo rs231775 (*CTLA4*); a) corresponde a la sonda complementaria a la secuencia WT (wt) y b) corresponde a la sonda complementaria a la secuencia con el cambio (mut). En rojo están aquellas muestras homocigotas para el alelo A, en verde aquellas homocigotas para el alelo G y en azul las heterocigotas AG

DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO REAL

Muestras

Para la validación de este método de tipificación del locus A del sistema HLA se han empleado 45 muestras previamente tipadas por alta resolución (PCR-SBT) seleccionadas al azar.

MétodosPrimers y sondas utilizados

Hemos diseñado 2 parejas diferentes de *primers* (Tabla 20), unos para lograr la amplificación del exón 2 (Sv2 y As-gral) y otros para amplificar el exón 3 (Intrón 2_forward e Intrón 3_reverse) del locus A del sistema HLA. Cada pareja amplifica específicamente dichos exones de todos los alelos HLA-A.

Los *primers* diseñados se pueden utilizar de forma conjunta con los *primers* que amplifican el gen de la beta-globina, que es el gen que se ha utilizado como control interno de la reacción de PCR (Tabla 7). Como consecuencia, en cada reacción tienen lugar 2 amplificaciones diferentes.

PRIMERS	SECUENCIA	LONGITUD	ORIENTACIÓN	EXÓN
Sv2	5' CSGCCTCTGYGGGGAGA 3'	17	SENTIDO	2
As-gral	5' TCTCGGACCCGGAGACTGT 3'	19	ANTISENTIDO	2
Intrón 2_forward	5' CGAGACCCTTGHCCCGG 3'	17	SENTIDO	3
Intrón 3_reverse	5' CCTCTCCCTCAGGACCAG 3'	18	ANTISENTIDO	3

Tabla 20: secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación general de los exones 2 y 3 del HLA-A

En dos de las reacciones se han utilizado dos *primers antisense* específicos de secuencia que se han combinado con el *primer forward* del exón 3. Las secuencias de estos *primers* específicos se muestran a continuación (Tabla 21):

PRIMERS	SECUENCIA	LONGITUD	ORIENTACIÓN	EXÓN
SSP_66_CG	GAGCCCGTCCACGCACCG	18	ANTISENTIDO	3
SSP_66_AC	GAGCCACTCCACGCACCG	18	ANTISENTIDO	3

Tabla 21: secuencias de los *primers* específicos de secuencia

Para el diseño de las sondas, primero se localizaron dentro de cada exón aquellas regiones que eran más polimórficas y en base a estas regiones se determinaron aquellas que permitían diferenciar unas familias alélicas de otras.

En estas “regiones propias de familia alélica” se diseñaron 10 pares de sondas FRET (Tabla 22), 4 parejas situadas en el exón 2 y 6 parejas en el exón 3 del locus A del sistema HLA.

SONDA	SECUENCIA	LONGITUD	MARCAJE	ORIENTACIÓN	EXÓN	POSICIÓN*
S2a	5' GCAGGAGGGGCCGGAGTA 3'- M	18	Fluoresceína	SENTIDO	2	361-378
S2s	M -5' TGGGACCGGAACACACGGA 3'- P	19	LC-Red 640	SENTIDO	2	380-398
S3a	M -5' ACAACCAGAGCGAGGCCGGTG 3'- P	21	Fluoresceína	SENTIDO	2	456-476
S3s	5' GGATCCGCGCTCCGCTAC 3'- M	17	LC-Red 640	SENTIDO	2	438-454
S240a	5' GCGCCGTGGATAGAGCAGG 3'- M	19	LC-Red 610	SENTIDO	2	347-365
S240s	M -5' GAGGCCTGAGTATTGGGAC 3'- P	19	Fluoresceína	SENTIDO	2	367-385
S9a	M -5' CGGCGTCGCTGTGCAACC 3'- P	18	LC-Red 610	ANTISENTIDO	2	306-323
S9s	5' GCTCCATCTTCTGGCTG 3'- M	17	Fluoresceína	ANTISENTIDO	2	325-341
S350_a	5' GACCCACGTGCGAGCCATACAT 3'- M	23	Fluoresceína	ANTISENTIDO	3	735-757
S350_s	M -5' TCTGGACGGTGTGAGAACC 3'- P	19	LC-Red 610	ANTISENTIDO	3	714-732
S5a	5' TTCAGGGCGATGTAATCCTTGCCGT 3'- M	25	Fluoresceína	ANTISENTIDO	3	799-823
S5s	M -5' GTAGGCGTACTGGTGGTACCCG 3'- P	22	LC-Red 640	ANTISENTIDO	3	776-797
S5a	5' TTCAGGGCGATGTAATCCTTGCCGT 3'- M	25	Fluoresceína	ANTISENTIDO	3	799-823
S5_30s	M -5' GTAGGCGTGTGTTTCATACCC 3'- P	21	LC-Red 640	ANTISENTIDO	3	777-797
S14a	5' TTGGACCGCGGCGGACATGGC 3'- M	21	Fluoresceína	SENTIDO	3	839-859
S14s	M -5' CTCAGATCACCCAGCGCAAG 3'- P	20	LC-Red 610	SENTIDO	3	862-880
S570a	M -5' CAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA 3'- P	24	Fluoresceína	SENTIDO	3	950-973
S570s	5' GTGCGTGGAGTGGCTCC 3'- M	17	LC-Red-640	SENTIDO	3	932-948
S540a	M -5' CGGAGCAGCAGAGAGCCTA 3'- P	19	LC-Red 610	SENTIDO	3	901-919
S540s	5' GCGCAAGTGAAGAGGCGGCCATG 3'- M	23	Fluoresceína	SENTIDO	3	875-897

Tabla 22: secuencias de las sondas utilizadas para el tipaje de los alelos HLA-A

La localización de los diferentes *primers* y sondas sobre la secuencia de los alelos HLA-A se muestra en el anexo 3.

Condiciones óptimas de reacción

- Protocolo de amplificación

El protocolo de amplificación es el mismo que el utilizado para el tipaje de otros alelos HLA (Tabla 9).

- Concentraciones óptimas de reactivos

Se determinaron las concentraciones óptimas de cada reactivo utilizado en las reacciones diseñadas, con muestras previamente tipadas con otros métodos. Las concentraciones de uso así como el volumen (μ l) utilizado de cada reactivo para cada una de las reacciones se muestran a continuación (Tabla 23):

Reactivos	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO 6	TUBO 7	TUBO 8	TUBO 9
PCO3 (10 µM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
PCO4 (10 µM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
CT-Cy5 (10 µM)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
CT-FL (10 µM)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Sv2 (10 µM)	0.1	0.1	1.0	-	-	-	-	-	-
As-gral (10 µM)	1.4	1.0	0.1	-	-	-	-	-	-
Intrón 2_forward (10 µM)	-	-	-	1.0	0.2	0.2	0.1	0.8	1.5
Intrón 3_reverse (10 µM)	-	-	-	0.1	-	-	1.0	0.2	0.5
SSP_66_CG (10 µM)	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-
SSP_66_AC (10 µM)	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-
S2a (10 µM)	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
S2s (10 µM)	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
S3a (10 µM)	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
S3s (10 µM)	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
S240a (10 µM)	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
S240s (10 µM)	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
S9a (10 µM)	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-
S9s (10 µM)	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-
S350_a (10 µM)	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
S350_s (10 µM)	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
S5a (10 µM)	-	-	-	0.2	-	-	-	0.2	-
S5s (10 µM)	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-
S5_30s (10 µM)	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
S14a (10 µM)	-	-	-	-	0.2	0.2	-	-	-
S14s (10 µM)	-	-	-	-	0.2	0.2	-	-	-
S570a (10 µM)	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
S570s (10 µM)	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
S540a (10 µM)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
S540s (10 µM)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
Buffer (5x)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
MgCl2 (25 mM)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
dNTPs (10 µM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Taq (5U/µl)	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
Agua	3.4	3.3	3.7	3.7	3.9	3.6	3.7	3.4	2.8
DNA a estudio	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tabla 23: concentraciones óptimas de los reactivos utilizados en cada reacción

A continuación se muestran ejemplos de estas reacciones:

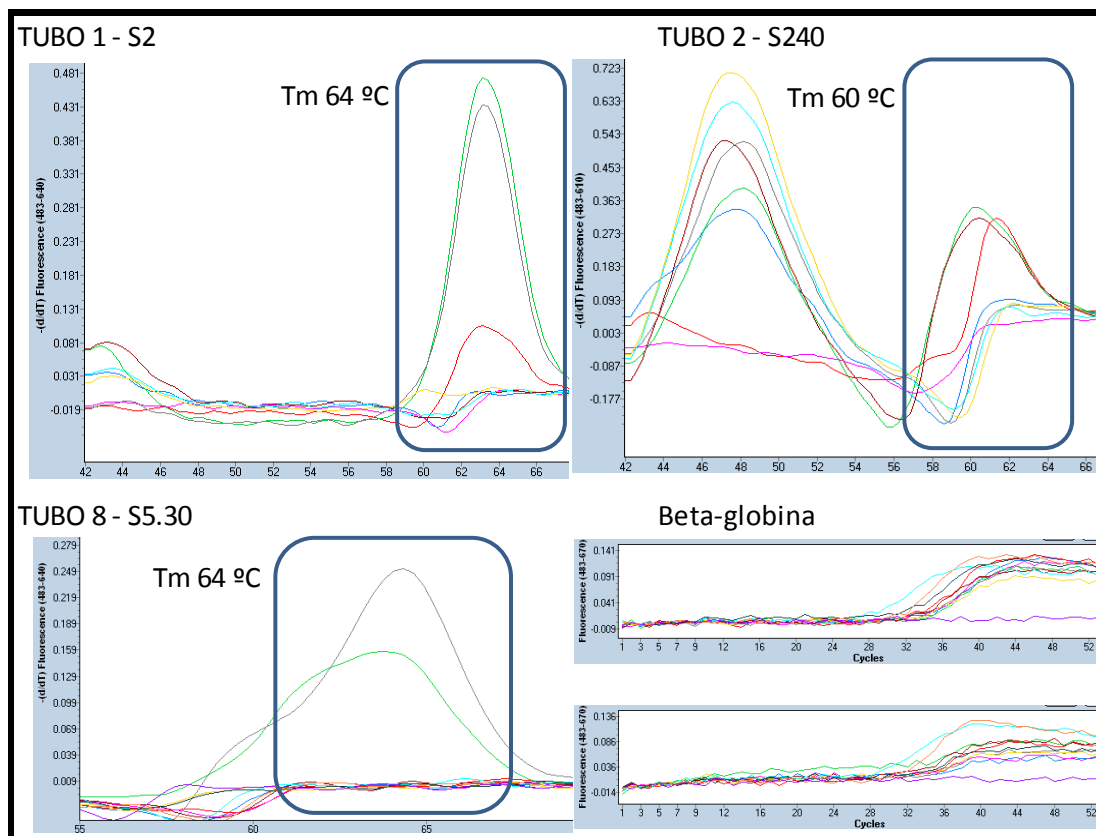


Figura 16: ejemplo de algunas de las reacciones para el tipaje del locus A del sistema HLA, remarcando aquellas temperaturas de *melting* que son informativas

Análisis de las confusiones

Con el objetivo de predecir los resultados de tipificación ambiguos obtenidos, en muestras heterocigotas para alelos HLA-A, con nuestro método de tipificación, se ha utilizado el software Polygene 2.0, desarrollado previamente por miembros del grupo, que permite el análisis de las diferentes T_m de cada sonda. Para ello se codificaron los diferentes resultados de T_m de cada una de las sondas y para cada uno de los alelos en una tabla teórica en código binario, donde 1 significaba positivo y 0 negativo. El número codificado obtenido para cada alelo se analizó mediante dicho software, que compara todos los posibles pares de resultados de tipificación predichos para los alelos conocidos de HLA-A. Además se incluye en este análisis la frecuencia de cada alelo (calculada como media de todos los datos conocidos sobre este alelo en la población caucasoide; <http://www.allelefreqencies.net>). Y finalmente se determina qué combinaciones de alelos generarán resultados ambiguos (cuando coexisten en una muestra heterocigota) así como la frecuencia de cada combinación alélica.

RESULTADOS

RESULTADO 1_BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA

Determinación del genotipo HLA asociado a Celiaquía mediante PCR a tiempo real

Se han diseñado, puesto a punto y validado las reacciones necesarias para poder determinar por un lado la tipificación HLA-DQ2/DQ8 y por otro la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 (presencia de éste en homocigosis o heterocigosis) en muestras de DNA genómico. Esta metodología se ha implementado como técnica de uso rutinario en la tipificación de alelos HLA asociados con CD, en nuestro laboratorio.

Tipificación HLA-DQ2/DQ8

Para la genotipificación de HLA-DQ2/DQ8 por RT-PCR con sondas de hibridación FRET, se han diseñado, optimizado y validado 3 reacciones que permiten determinar la presencia de los alelos HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*02 (DQ2) y HLA-DQB1*03:02 (DQ8). En el apartado de métodos se ha descrito el protocolo optimizado, que ha sido validado en 90 muestras que fueron tipificadas en paralelo mediante PCR-SSP, obteniendo un 100% de concordancia en los resultados. Desde su implementación en el laboratorio de HLA LIRAD, en el año 2008, este protocolo se ha utilizado en la genotipificación de más de 5.000 muestras. De esta manera, con este protocolo de 3 reacciones, tendremos la siguiente interpretación de resultados:

Resultado	Reacción 1		Reacción 2	Reacción 3
	DQB1*02	DQB1*03	DQA1*05	DQB1*03:02
HLA-DQ2 +	+	+/-	+	-
HLA-DQ8 +	+/-	+	-	+
HLA-DQ2/DQ8 +	+	+	+	+
HLA-DQB1*02	+	+/-	-	-
HLA-DQ2/DQ8 -	-	+/-	+	-
	-	+/-	-	-

Tabla 24: interpretación de las reacciones para la genotipificación HLA-DQ2/DQ8. En la reacción 1 existen 2 Tm diferentes (Tm1 para aquellas muestras que sean DQB1*02 o Tm2 para muestras DQB1*03)

Dosis génica HLA-DQB1*02

Para evaluar la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 se han diseñado 2 reacciones de RT-PCR en combinación con sondas de hibridación Taqman® (Tabla 25). La primera reacción se utiliza para ver si hay o no presencia del alelo HLA-DQB1*02 y la segunda para ver si hay presencia de otro alelo HLA-DQB1 (distinto del HLA-DQB1*02). Los *primers* y sondas utilizados así como el protocolo de amplificación han sido descritos en el apartado de la metodología. De esta manera, con estas 2 reacciones, tenemos lo siguiente:

Resultado	Reacciones	
	(1) HLA-DQB1*02	(2) HLA no DQB1*02
HLA-DQB1*02 homocigosis	+	-
HLA DQB1*02 heterocigosis	+	+

Tabla 25: interpretación de las reacciones para el estudio de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02. Aquellas muestras positivas para las reacciones (1) y (2) serán heterocigotas para el alelo HLA-DQB1*02, mientras que aquellas que solo den señal en la reacción (1), serán homocigotas para el mismo

En todas estas reacciones la amplificación de los diferentes alelos HLA asociados con CD ocurre de forma conjunta a la amplificación del gen de la beta-globina (control interno). Como consecuencia, en cada reacción tienen lugar 2 amplificaciones diferentes.

Informatividad de los marcadores HLA en el estudio de sospecha de la Enfermedad Celiaca

En el periodo de tiempo comprendido entre junio de 2008 y diciembre de 2011 fueron solicitados desde el HUGTiP un total de 143 estudios de HLA asociado a CD (HLA-DQ2/DQ8). Todos los estudios correspondían a individuos con sospecha de CD pero en los cuales se desconocía el diagnóstico definitivo. Todos ellos han sido analizados mediante la metodología de tipificación aquí descrita.

HLA-DQ2/DQ8

En relación al estudio de genotipificación HLA-DQ2/DQ8, los resultados obtenidos para estos 143 pacientes fueron los siguientes: 76 (53.2%) pacientes HLA-DQ2 positivo, 18 (12.6%) HLA-DQ8 positivo, 4 (2.8%) HLA-DQ2/DQ8 positivo y 45 (31.4%) HLA-DQ2/DQ8 negativo, 17 de estos últimos presentaron el alelo HLA-DQB1*02 (Tabla 26).

HLA como biomarcador en CD									
HLA-DQA1*05	+	-	+	-	+	-	-	+	
HLA-DQB1*02	+	+	-	-	+	+	-	-	
HLA-DQB1*0302	-	+	+	+	+	-	-	-	
Resultado final	DQ2 +		DQ8+		DQ2/DQ8 +		DQB1*02		DQ2/DQ8 -
Pacientes	76 (53.1%)		18 (12.6%)		4 (2.8%)		17 (11.9%)		28 (19.6%)

Tabla 26: resultados de HLA-DQ2/DQ8 obtenidos en nuestro grupo de pacientes con sospecha de CD

De estos 143 estudios, 57 (39.9%) pacientes presentaron un estudio serológico (tal y como se ha descrito en el apartado de material y métodos) compatible con CD. Finalmente desde el punto de vista clínico 44 de ellos fueron diagnosticados de CD, 4 con un resultado de Ac anti-Tg2 <40 U/ml y biopsia normal o con grado Marsh 1 fueron considerados dudosos, 2 pacientes a los que se les realizó el estudio por debut diabético no dispusieron de datos de biopsia y de 7 no se dispuso de datos clínicos.

Los resultados de HLA-DQ2/DQ8 obtenidos para estos 57 pacientes fueron:

47 HLA-DQ2 positivos, 6 HLA-DQ8 positivos, 3 HLA-DQ2/DQ8 positivos, sólo hubo un caso de un paciente diagnosticado de CD (estudio serológico claramente positivo y biopsia con atrofia vellositaria severa → Marsh 3) que presentó un estudio HLA-DQ2/DQ8 negativo. No obstante, tenía presencia del alelo HLA-DQB1*02.

Con todos estos datos se ha calculado la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos para la determinación de HLA-DQ2/DQ8 (Figura 18) en nuestra población. En concordancia a lo descrito en la literatura, en nuestro grupo de pacientes también se cumple que el VPN de este biomarcador para el estudio de la CD es altamente informativo.

		Celiaquía		
		SI	NO	
DQ2/DQ8	SI	56	42	98
DQ2/DQ8	NO	1	44	45
		57	86	
Sensibilidad	98,25%			
Especificidad	51,16%			
VPP	57,14%			
VPN	97,78%			

Figura 18: tabla de contingencia 2x2 para el estudio HLA-DQ2/DQ8 en relación con la CD

HLA-DQB1*02

En relación al estudio de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02, a todos los individuos incluidos en el estudio (con estudio serológico compatible o no) que presentaron este alelo HLA (n=100; 54 con estudio serológico compatible y 46 con estudio serológico no compatible) se les realizaron las reacciones de RT-PCR para ver si lo presentaban en homocigosis o en heterocigosis.

Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se encuentran en el anexo 1. Se compararon los resultados obtenidos de los pacientes con estudio serológico compatible o no con CD con un grupo control.

La frecuencia del alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o heterocigosis para cada uno de los grupos se muestra a continuación:

Frecuencia HLA-DQB1*02			
HLA-DQB1*02	Pacientes CD n=57 (%)	Pacientes no CD n=86 (%)	Controles n=518 (%)
Homocigosis	22 (38.5)	6 (6.9)	38 (7.3)
Heterocigosis	32 (56.1)	40 (46.5)	193 (37.2)

Tabla 27: frecuencia del alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o heterocigosis

Se representaron los resultados obtenidos en tablas de contingencia (Figura 19):

a)					
		Celiaquía			
		SI	NO		
HLA-DQB1*02	Homocigosis	22	6	28	
	Heterocigosis	32	40	72	
	Negativo	3	40	43	
		57	86	143	
b)					
		Celiaquía			
		SI	NO		
HLA-DQB1*02	Homocigosis	22	6	28	OR 4,58
	Heterocigosis	32	40	72	RR 1,77
		54	46	100	Sensibilidad 40,74%
					Especificidad 86,96%
					VPP 78,57%
					VPN 55,56%
c)					
		Celiaquía			
		SI	NO		
HLA-DQB1*02	Presente	54	46	100	OR 15,65
	Ausente	3	40	43	RR 7,74
		57	86	143	Sensibilidad 94,74%
					Especificidad 46,51%
					VPP 54,00%
					VPN 93,02%

Figura 19: tablas de contingencia 2x2 para el alelo HLA-DQB1*02 en relación con la CD: a) según las 3 opciones posibles, presencia en homocigosis o heterocigosis y ausencia; b) valorando solo el caso de aquellos individuos que lo presentan; c) teniendo en cuenta solo presencia o ausencia, sin importar la dosis génica

Se calcularon los índices de sensibilidad, especificidad así como el VPP y VPN, tanto para la presencia del alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o heterocigosis (Figura 19 b) como para la presencia o ausencia de este alelo, sin tener en cuenta si estaba en dosis única o en doble dosis (Figura 19 c). Dentro del grupo de individuos que presentan el alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis un 78.6% tienen un estudio serológico compatible con CD, sin embargo de aquellos con este alelo en heterocigosis sólo un 44.4% tienen un estudio serológico compatible (Figura 20).

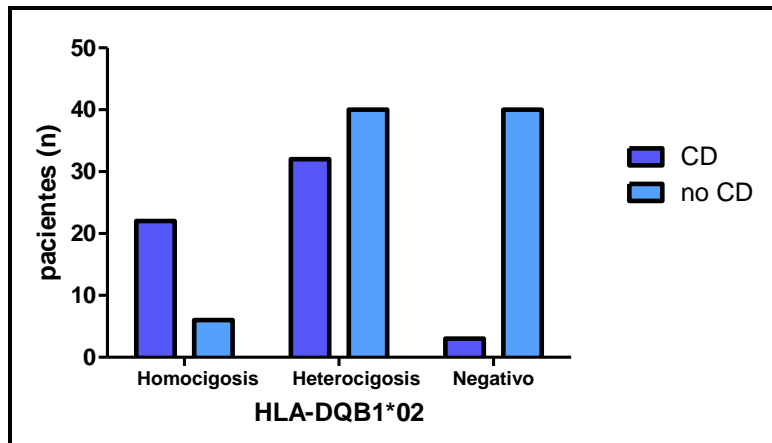


Figura 20: número de pacientes con estudio compatible o no de CD que presentan el alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o heterocigosis

Correlación de los biomarcadores HLA con otros biomarcadores de la Enfermedad Celiaca

Dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 y anticuerpos anti-Tg2

En el grupo de pacientes con un estudio serológico compatible con CD se compararon los niveles de Ac anti-Tg2 (normalidad 0-10 UI/ml) de estos según tuvieran el alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis (Media \pm SD; 72.62 \pm 34.62) o heterocigosis (71.83 \pm 33.03). Como se puede ver en la Figura 21 no se observaron diferencias significativas ($p=0.47$; ns).

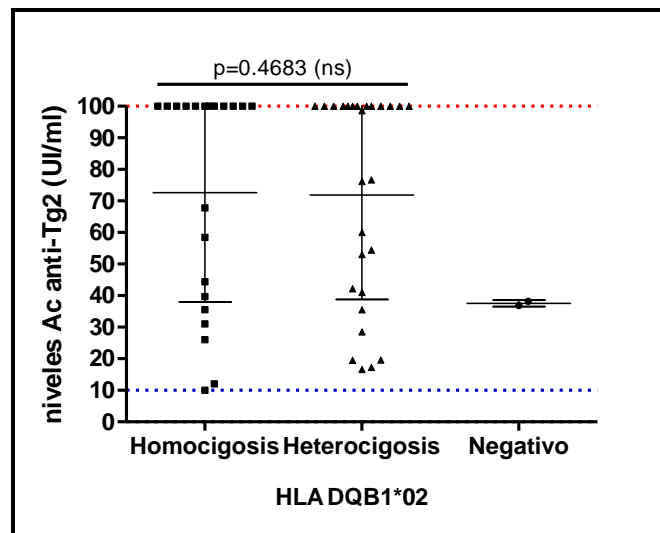


Figura 21: niveles de Ac anti-Tg2 según la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02. La línea azul marca el límite superior de normalidad y la línea roja el límite máximo de detección de la técnica utilizada para la cuantificación de Ac anti-Tg2

Dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 y datos de biopsia

De los 57 pacientes con un estudio serológico compatible con CD, en 37 de ellos dispusimos de datos obtenidos de la biopsia intestinal (según la clasificación de Marsh; Tabla 14) y según esto

se analizó el porcentaje de pacientes que teniendo el alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o heterocigosis, tenían una biopsia con más o menos alteraciones (Figura 22). Tampoco se observaron diferencias en los datos obtenidos de la biopsia intestinal en pacientes con el alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis en relación a aquellos que presentaron este alelo en heterocigosis.

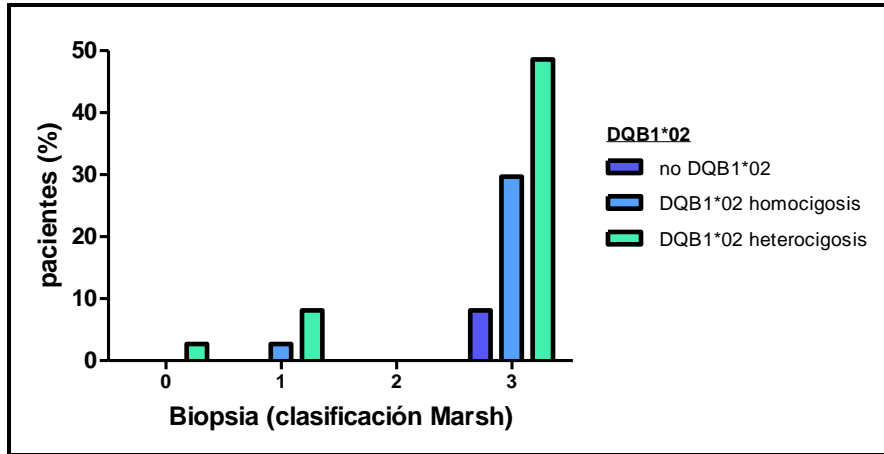


Figura 22: presencia del alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis o heterocigosis en relación a los datos obtenidos de la biopsia intestinal

Anticuerpos anti-Tg2 y datos de biopsia

De acuerdo a lo descrito en la literatura [11, 126], también en nuestro grupo de pacientes con estudio serológico compatible con CD los niveles de Ac anti-Tg2 (normalidad 0-10 UI/ml) guardan relación con los datos obtenidos en la biopsia intestinal, tal y como se puede ver a continuación (Figura 23):

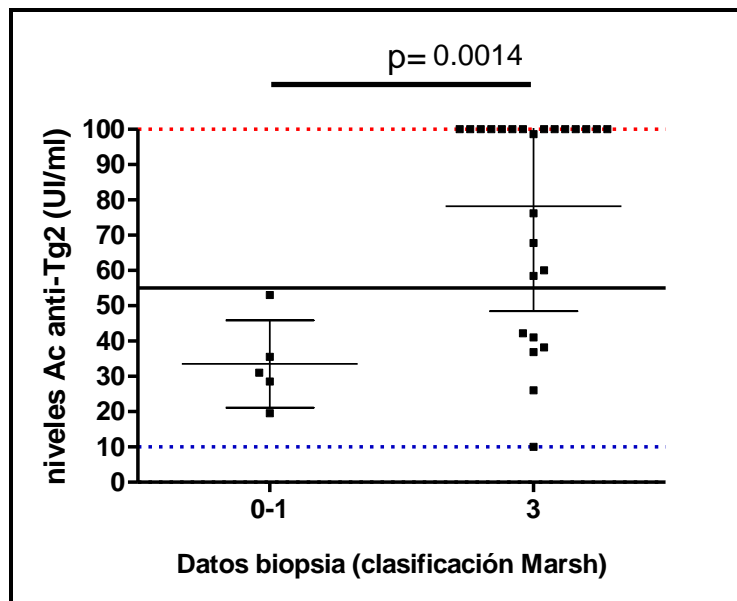


Figura 23: niveles de Ac anti-Tg2 según el resultado obtenido en la biopsia intestinal

En aquellos pacientes con una biopsia intestinal grado 0 o 1 los niveles de Ac anti-Tg2 fueron menores que en aquellos pacientes con una biopsia intestinal de grado 3 (Media \pm SD; 33.54 \pm 12.37 vs 78.22 \pm 29.76; p=0.0014, **). En nuestro grupo de pacientes no hay ninguno con biopsia de grado 2. Valores de Ac anti-Tg2 superiores a 60 U/ml solo se observan en pacientes con biopsia intestinal de grado 3.

RESULTADO 2_BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES

Determinación de biomarcadores genéticos asociados a Enfermedad de Graves mediante PCR a tiempo real

Se han diseñado, puesto a punto mediante RT-PCR y validado las reacciones necesarias para la detección de los alelos HLA de clase I: HLA-B*08 y HLA-B*44 y HLA-C*03, HLA-C*07 y HLA-C*16 y para la determinación de los polimorfismos de los genes *PTPN22* y *CTLA4* (rs2476601 y rs231775 respectivamente), que han sido descritos como loci de susceptibilidad para la GD en otras poblaciones.

Alelos HLA de clase I

Para la tipificación de los alelos HLA de clase I asociados con GD se han utilizado 6 reacciones de RT-PCR en combinación con sondas de hibridación FRET. Estas reacciones se han utilizado de forma conjunta con la reacción para la amplificación del gen de la beta-globina (control interno de la PCR). Como consecuencia, en cada reacción tienen lugar 2 amplificaciones diferentes. Los *primers* y sondas utilizados, así como el protocolo de amplificación han sido descritos en el apartado de material y métodos.

Polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4*

En relación a la determinación del polimorfismo rs2476601 (*PTPN22*) se ha utilizado una reacción de RT-PCR en combinación con sondas de hibridación FRET.

Respecto a la determinación del polimorfismo rs231775 (*CTLA4*) se ha utilizado una reacción de RT-PCR en combinación con sondas de hibridación Taqman®.

Los *primers* y sondas utilizados en ambos casos, así como el protocolo de amplificación han sido descritos en el apartado de material y métodos.

Informatividad de los biomarcadores genéticos asociados a Enfermedad de Graves

Una vez optimizadas y validadas estas reacciones se procedió al tipaje de muestras de controles y pacientes con GD y posterior análisis de estos alelos HLA de clase I, así como de los polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4*, como biomarcadores de susceptibilidad para la GD en nuestra cohorte de pacientes.

Se ha realizado el tipaje de 175 pacientes con GD y 152 controles. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se encuentran en el anexo 2.

Alelos HLA de clase I

En relación al estudio de alelos HLA de clase I asociados con GD, los resultados quedan resumidos a continuación (Tabla 20):

Datos controles				Datos pacientes			
	SI	NO		SI	NO		
B*08	16	136	152	B*08	43	132	175
B*44	42	110	152	B*44	31	144	175
C*03	17	135	152	C*03	29	146	175
C*07	69	83	152	C*07	90	85	175
C*16	25	127	152	C*16	18	157	175

Tabla 20: tipajes de alelos HLA de clase I obtenidos en las muestras de controles y pacientes con GD

Las frecuencias para cada uno de los tipajes obtenidas en nuestro grupo de pacientes y en nuestro grupo control, en relación a lo descrito en la literatura [97], se muestran a continuación (Tabla 21):

HLA	Frecuencia grupo HUGTiP		Frecuencia literatura	
	Pacientes GD n=175 (%)	Controles n=152 (%)	Pacientes GD n=1356 (%)	Controles n=986 (%)
C*03	29 (16.6)	17 (11.2)	103 (7.7)	156 (15.9)
C*07	90 (51.4)	69 (45.4)	685 (50.9)	328 (33.3)
C*16	18 (10.3)	25 (16.5)	26 (1.9)	59 (6.0)
B*08	43 (24.6)	16 (10.5)	341 (25.2)	154 (15.6)
B*44	31 (17.7)	42 (27.6)	152 (11.2)	176 (17.9)

Tabla 21: frecuencia para cada uno de los alelos HLA estudiados, nuestro grupo de controles y pacientes con GD (residentes en Cataluña; a la izquierda) en relación a lo descrito en la literatura [97] (Reino Unido; a la derecha)

Se representaron los resultados obtenidos en tablas de contingencia 2x2, donde se ve la presencia o no del alelo correspondiente en el grupo de pacientes con GD o en el grupo control.

En nuestro grupo de pacientes con GD, las asociaciones se han encontrado con los alelos HLA-B*08 y HLA-B*44, aunque con efectos contrarios, no encontrándose asociaciones con los alelos HLA-C estudiados (Figura 16).

C*03	GRAVES		46	281	X ²	1.95
	SI	NO				
	SI	29	17			
	NO	146	135			
		175	152	327	p	0.16 (ns)
C*07	GRAVES		159	168	X ²	1.19
	SI	NO				
	SI	90	69			
	NO	85	83			
		175	152	327	p	0.28 (ns)
C*16	GRAVES		43	284	X ²	2.70
	SI	NO				
	SI	18	25			
	NO	157	127			
		175	152	327	p	0.1 (ns)
B*08	GRAVES		59	268	OR	2.77
	SI	NO				
	SI	43	16			
	NO	132	136			
		175	152	327	RR	1.48
					X ²	10.85
					p	0.001 (***)
B*44	GRAVES		73	254	OR	0.56
	SI	NO				
	SI	31	42			
	NO	144	110			
		175	152	327	RR	0.75
					X ²	4.61
					p	0.032 (*)

Figura 16: tablas de contingencia 2x2 para los diferentes tipajes HLA relacionados con GD. Los cuadros marcados en rojo corresponden a aquellos alelos con una OR >1 (efecto predisponente), por el contrario los marcados en verde tienen un OR <1 (efecto protector)

Respecto a los alelos HLA-B, el alelo HLA-B*08 parece tener un efecto predisponente para padecer la GD (OR=2.77; 95% CI=1.49-5.16) mientras que el alelo HLA-B*44 muestra un efecto protector para esta misma enfermedad (OR=0.56; 95% CI=0.33-0.95).

Respecto a los alelos HLA-C, a pesar de que los resultados no son estadísticamente significativos, se observa una tendencia. En el caso de los alelos HLA-C observamos diferencias en las frecuencias de estos alelos en la población control descrita en la literatura (Reino Unido) respecto a nuestro grupo control (residentes en Cataluña) (Tabla 21). Parece que los alelos HLA-C*03 y 07 tienen un efecto predisponente mientras que el alelo HLA-C*16 muestra un efecto protector.

HLA-B*08 y HLA-C*07 mantienen un fuerte desequilibrio de ligamiento y frecuentemente se heredan en haplotipo. Así, si tenemos en cuenta la presencia de 2 de estos alelos el efecto observado es mayor (OR=4.86; 95% CI=2.28-10.39), tal y como se puede observar en la Figura 17. En este caso la probabilidad de tener la GD cuando un individuo presenta estos 2 alelos es de un 82%. Siendo la frecuencia de estos 2 alelos en nuestro grupo control de un 18% similar a lo descrito en población europea; 12.8%, según los datos de NMDP (*National Marrow Donor Program*).

		GRAVES			
B*08-C*07	SI	NO		OR	4.86
SI	41	9	50	RR	1.70
NO	134	143	277	X ²	19.25
	175	152	327	p	<0.0001 (***)
Sensibilidad	23.43%				
Especificidad	94.08%				
VPP	82.00%				
VPN	51.62%				

Figura 17: tabla de contingencia 2x2 para valorar la presencia conjunta de los alelos HLA-B*08-C*07

Polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4*

En relación al estudio de los polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4* asociados con GD, los resultados quedan resumidos a continuación (Tablas 22 y 23):

<i>PTPN22</i> (rs2476601)					
Población	Alelos; n (frecuencia)		Genotipos; n (frecuencia)		
	A	G	A A	A G	G G
Todas*	92 (0.042)	2092 (0.958)	2 (0.002)	88 (0.081)	1002 (0.918)
Europea*	75 (0.099)	683 (0.901)	2 (0.005)	71 (0.187)	306 (0.807)
Grupo HUGTiP control	15 (0.049)	289 (0.951)	0 (0.000)	15 (0.099)	137 (0.901)
Grupo HUGTiP GD	38 (0.109)	312 (0.891)	1 (0.006)	36 (0.206)	138 (0.788)

Tabla 22: frecuencias del SNP rs2476601 en poblaciones control y en nuestra cohorte de pacientes con GD. *Corresponden a datos obtenidos de la base de datos Ensembl (www.ensembl.org)

<i>CTLA4</i> (rs231775)					
Población	Alelos; n (frecuencia)		Genotipos; n (frecuencia)		
	G	A	G G	A G	A A
Todas*	987 (0.452)	1197 (0.548)	229 (0.210)	529 (0.484)	334 (0.306)
Europea*	276 (0.364)	482 (0.636)	45 (0.119)	186 (0.491)	148 (0.391)
Grupo HUGTiP control	103 (0.339)	201 (0.661)	16 (0.105)	71 (0.467)	65 (0.428)
Grupo HUGTiP GD	138 (0.394)	212 (0.606)	29 (0.166)	80 (0.457)	66 (0.377)

Tabla 23: frecuencias del SNP rs231775 en poblaciones control y en nuestra cohorte de pacientes con GD. *Corresponden a datos obtenidos de la base de datos Ensembl (www.ensembl.org)

Se representaron los resultados obtenidos en tablas de contingencia 2x2, donde se ve la presencia del alelo normal (G en el caso de *PTPN22* y A en el caso de *CTLA4*) o mutado (A en el caso de *PTPN22* y G en el caso de *CTLA4*) en el grupo de pacientes con GD o en el grupo control:

		GRAVES									
PTPN22	SI	NO		OR	2.35	CTLA4	SI	NO			
A	38	15	53	RR	1.38	G	138	103	241	X ²	2.15
G	312	289	601	X ²	7.66	A	212	201	413		
	175	152	654	p	0.0056 (**)		175	152	654	p	0.1425 (ns)

Sensibilidad	10.86%
Especificidad	95.07%
VPP	71.70%
VPN	48.09%

Figura 18: tablas de contingencia 2x2 para los polimorfismos rs2476601 y rs231775

En el caso del polimorfismo rs2476601 del gen *PTPN22*, a pesar de que los datos de sensibilidad, así como de los valores predictivos no son buenos, la presencia del alelo G tiene un efecto predisponente para la GD (OR=2.35; 95% CI=1.26-4.36). Sin embargo el efecto del polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* no es tan claro en nuestro grupo de pacientes con GD.

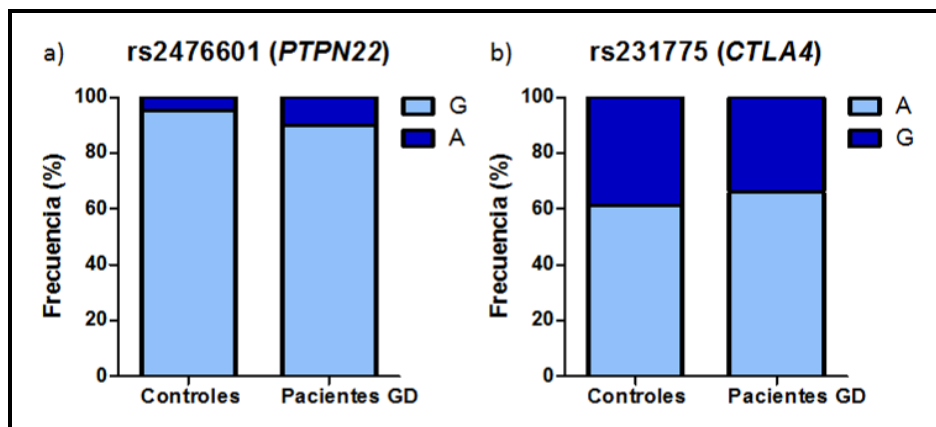


Figura 19: frecuencia de los alelos normal (en azul claro) y mutado (en azul oscuro) para los polimorfismos rs2476601 (a) y rs231775 (b) en nuestro grupo control y en el de pacientes con GD

Alelos HLA de clase I y polimorfismos en genes no HLA

Si valoramos de forma conjunta el efecto del sistema HLA con el de los polimorfismos rs2476601 y rs231775, tenemos los siguientes resultados:

a)

HLA-B	HLA-B*08 / PTPN22		GRAVES		11 316 175 152 327	HLA-B*44 / PTPN22		GRAVES		12 315 175 152 327
	SI	9	2	SI		8	4			
	NO	166	150	NO		167	148			
	χ^2 3.67		χ^2 0.87							
	p 0.0556 (ns)		p 0.3521 (ns)							

HLA-C	HLA-C*03 / PTPN22		GRAVES		7 320 175 152 327	HLA-C*07 / PTPN22		GRAVES		28 299 175 152 327	HLA-C*16 / PTPN22		GRAVES		8 319 175 152 327
	SI	6	1	SI		18	10	SI	6		2				
	NO	169	151	NO		157	142	NO	169		150				
	χ^2 2.98		χ^2 1.43			χ^2 1.52									
	p 0.0843 (ns)		p 0.2322 (ns)			p 0.2174 (ns)									

HLA-B y HLA-C	HLA-B*08 / C*07 / PTPN22		GRAVES		11 316 175 152 327	χ^2 3.67	
	SI	9	2	p 0.0556 (ns)			
	NO	166	150				

b)

HLA-B	HLA-B*08 / CTLA4		GRAVES		38 289 175 152 327	HLA-B*44 / CTLA4		GRAVES		45 282 175 152 327
	SI	24	14	SI		20	25			
	NO	151	138	NO		155	127			
	χ^2 1.607		χ^2 1.727							
	p 0.2050 (ns)		p 0.1889 (ns)							

HLA-C	HLA-C*03 / CTLA4		GRAVES		30 297 175 152 327	HLA-C*07 / CTLA4		GRAVES		92 235 175 152 327	HLA-C*16 / CTLA4		GRAVES		25 302 175 152 327
	SI	22	8	SI		54	38	SI	11		14				
	NO	153	144	NO		121	114	NO	164		138				
	χ^2 5.214		χ^2 1.380			χ^2 0.9855									
	p 0.0224 (*)		p 0.2401 (ns)			p 0.3208 (ns)									
RR 1.424		OR 2.588													

HLA-B y HLA-C	HLA-B*08 / C*07 / CTLA4		GRAVES		35 292 175 152 327	χ^2 2.344	
	SI	23	12	p 0.1258 (ns)			
	NO	152	140				

Figura 20: tablas de contingencia 2x2 para valorar de forma conjunta la presencia de los alelos HLA de clase I y los polimorfismos rs2476601 (a)) y rs231775 (b)) en relación con la GD

Respecto al análisis combinado de los diferentes alelos HLA de clase I con el polimorfismo rs2476601, no se observa un efecto mayor que al analizarlos de forma individual, de hecho se pierden las asociaciones observadas por ejemplo para el alelo HLA-B*08 o para el polimorfismo rs2476601 cuando los estudiamos de forma individual.

Sin embargo, en el caso del análisis combinado de los alelos HLA de clase I con el polimorfismo rs231775, existe una predisposición a padecer GD cuando un individuo presenta a la vez el alelo HLA-C*03 y este polimorfismo en *CTLA4* (OR=2.59; 95% CI=1.12-6.00).

RESULTADO 3_DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR RT-PCR

La posibilidad de realizar la tipificación HLA de los 3 loci HLA principales, mediante un método basado en RT-PCR, puede permitir el uso de esta tecnología en diferentes aplicaciones incluido el estudio del sistema HLA y su asociación a enfermedad.

Por ello, se ha diseñado, puesto a punto mediante RT-PCR en combinación con sondas de hibridación FRET y validado un sistema de tipificación para el locus A del sistema HLA, simplificado en cuanto al número de reacciones y resolución, que complementa a otras reacciones ya desarrolladas en el laboratorio por esta misma metodología (HLA-B y DR).

Reacciones e información proporcionada por éstas

Esta estrategia se basa en el uso de 9 reacciones simultáneas (con 10 parejas de sondas FRET diferentes) que amplifican los exones 2 (T1-T3) y 3 (T4-T9) de los alelos HLA-A a la vez que amplifican el gen de la beta-globina (control interno). Los *primers* y sondas utilizados, así como el protocolo de amplificación han sido descritos en el apartado de material y métodos. Este protocolo ha sido validado con 45 muestras previamente tipadas por PCR-SBT (alta resolución), obteniendo un 100% de concordancia en los resultados.

Cada alelo HLA-A tiene asociado para cada una de las sondas utilizadas una T_m característica. Esta T_m depende de lo complementaria que sea la secuencia de ese alelo concreto en relación a la secuencia de la sonda en cuestión. Las T_m más elevadas corresponden a aquellos tipajes con una secuencia totalmente complementaria a la sonda en cuestión y a medida que aumentan las diferencias (*mismatch*) entre la secuencia del alelo HLA-A y la secuencia de la sonda, tenemos T_m más bajas.

Dependiendo de lo informativa que sea o no la sonda, en una única reacción podemos tener 1, 2 o hasta 3 T_m , y cada una de ellas será positiva (1) o negativa (0) para cada uno de los alelos del locus A del sistema HLA.

La relación de T_m obtenidas para cada sonda y para cada uno de los alelos HLA-A se muestra en el anexo 3. No obstante, a continuación se muestra un resumen de las T_m para cada una de las sondas de los principales tipajes (Tabla 23):

TUBO	T1	T2		T3		T4		T5			T6			T7	T8			T9		
MARCAJE	640	640	610	610		640		610			610			640	640	610		610		
SONDA	S2	S3	S240	S9		S5		CG+ S14			AC+ S14			S570	5.30	S350		S540		
Tm	64	54	62	50	57	61	67	45	55	65	45	55	65	65	64	50	65	46	52	62
SECUENCIA	C25	TGCTC	AT C31	G	C01	A	ACT	CG-CA	CG-	CG-C	AC-CA	AC-	AC-C	GT	C30	A	C69	.	TC / TTC	C11...AC
A*010101	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
A*02010101	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A*03010101	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
A*110101	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
A*230101	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
A*24020101	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A*250101	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A*260101	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A*29010101	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
A*300101	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
A*310102	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
A*320101	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
A*330101	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
A*340101	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
A*3601	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
A*4301	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6601	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*680101	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6901	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A*7401	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
A*8001	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Tabla 23: resultado obtenido para cada una de las sondas con los principales tipajes HLA-A. Marcado con un **1** están aquellos tipajes que dan señal a la Tm correspondiente de la sonda en cuestión y con un **0** aquellos que no dan señal

Dentro de este set de 9 reacciones obtenido para la tipificación del locus A del sistema HLA, las características de unas reacciones y otras son diferentes:

Según el número de sondas por reacción:

- 1 sonda HLA-A por reacción: T1, T3, T4, T5, T6, T7 y T9.
- 2 sondas HLA-A por reacción: en este caso, cada una de las sondas va marcada de manera diferente y el análisis de cada una de ellas se hará en el canal de fluorescencia correspondiente; T2 y T8.

Según la información que proporcionan, podemos distinguir 3 tipos de reacciones diferentes:

- **Altamente informativas:** aquellas reacciones que dan mucha información a nivel general ya que es posible tener diferentes Tm, dependiendo de la secuencia de cada alelo, en una única reacción; como son por ejemplo las reacciones T5, T6 y T9. Cada una de ellas tiene 3 posibles Tm.

Además, las reacciones T5 y T6 son reacciones complementarias, utilizan la misma sonda (S14) y por ello las 3 Tm observadas son las mismas, pero en este caso los *primers* utilizados son diferentes, de manera que en cada reacción se amplifican unos alelos concretos y contrarios (los que se amplifican en T5 no se amplifican en T6 y viceversa).

- **Altamente específicas:** aquellas que únicamente dan señal con uno o dos alelos concretos, por lo que podemos decir que estas reacciones son específicas de estos alelos en cuestión; como por ejemplo la sonda 5.30 de la reacción T8, que únicamente da señal para los alelos HLA-A*30 o la sonda 240 de la reacción T2, que solamente da señal para los alelos HLA-A*30 y HLA-A*31.

Estas reacciones específicas de alelos son útiles si queremos confirmar la presencia o ausencia de estos y su empleo puede resultar provechoso en diferentes aplicaciones biomédicas.

- **Intermedias:** el resto de reacciones o sondas tienen características intermedias entre los dos tipos descritos anteriormente.

Resolución obtenida

A pesar de que analizando los perfiles de Tm obtenidos con este set de 9 reacciones somos capaces de diferenciar unos alelos HLA-A de otros, la combinación de alelos (en muestras heterocigotas) genera una serie de indeterminaciones o tipajes que, con esta metodología basada en la RT-PCR en combinación con sondas de hibridación FRET, no somos capaces de resolver.

El análisis de estos resultados de tipificación ambiguos obtenidos como consecuencia del tipaje de muestras heterocigotas, se ha realizado siguiendo las instrucciones descritas en el apartado de material y métodos. En este análisis se ha tenido en cuenta la frecuencia de cada uno de los alelos en nuestra población, eliminando aquellos cuya combinación se encuentra a una frecuencia inferior a 0.00001. A continuación se puede ver un ejemplo de una de las indeterminaciones que quedan sin resolver (Tabla 24):

Allele_1	Freq_1	Allele_2	Freq_2	Freq_1_2
A*680301	0,00393	A*6602	0,00411	0,00002
A*8001	0,00254	A*680101	0,01831	0,00005
A*680101	0,01831	A*680101	0,01831	0,00034

Tabla 24: ejemplo de una de las indeterminaciones que quedan sin resolver con esta aproximación para el tipaje del HLA-A. Cada una de las filas corresponde a un posible individuo, con 2 alelos diferentes, la frecuencia de estos y la frecuencia de la combinación, y en este caso la indeterminación afecta a 3 posibles combinaciones de alelos HLA-A

En este caso, un individuo que fuera HLA-A*68:03:01 / 66:02 (la frecuencia para esta combinación de alelos es de 0.00002; es decir aparecerá en 2 individuos de cada 100.000 individuos que estudiemos) no se distinguiría de individuos que fueran HLA-A*68:01:01 / 80:01 (con una frecuencia de 0.00005) o HLA-A*68:01:01 homocigotos (con una frecuencia de 0.00034). Con esta aproximación no somos capaces de detectar estas diferencias. El resumen de todas las indeterminaciones que no quedan resueltas con esta aproximación metodológica se encuentra en el anexo 3.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha abordado la complejidad del sistema HLA desde dos puntos de vista:

- Por un lado, explorando la asociación del sistema HLA y enfermedad, concretamente en dos AID como son la CD y la GD. Además, en el caso de la GD, se han estudiado polimorfismos en otros genes no HLA (*PTPN22* y *CTLA4*) pero cuya función también está relacionada con el sistema inmune. Asimismo, se ha evaluado el efecto combinado de estos polimorfismos en genes no HLA con las variantes HLA.
- Por otro lado, se ha definido una metodología de tipificación de baja resolución para el locus A del sistema HLA.

Para ambos estudios, se han puesto en marcha diferentes técnicas de RT-PCR en combinación con sondas de hibridación, que nos han permitido resolver el polimorfismo de los diferentes loci HLA así como de los otros genes estudiados (*PTPN22* y *CTLA4*). Y con todo ello se han desarrollado un conjunto de pruebas, aplicables en un laboratorio de tipaje HLA, para poder predecir mejor la susceptibilidad de un individuo a padecer estas AID.

Dadas las ventajas que tiene la RT-PCR en comparación con otros métodos utilizados en la genotipificación del sistema HLA, como son la rapidez, la ausencia de procesamiento post-PCR, el número de muestras que somos capaces de procesar al mismo tiempo, el menor coste según el objetivo del estudio concreto (en aquellos casos donde sólo queramos determinar por ejemplo un alelo) hace que sea un método fácil de implementar y con una gran aplicabilidad en el trabajo asistencial de los laboratorios de tipaje.

BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA

La CD es una enfermedad multifactorial donde los alelos HLA representan el mayor componente de predisposición genética. Por ello, a pesar de que el tipaje HLA no representa en este caso un valor diagnóstico absoluto, permite asesorar respecto al riesgo de padecer o no esta enfermedad. Tanto es así que el tipaje HLA de los alelos asociados (HLA-DQ2/DQ8) está considerado dentro del algoritmo diagnóstico de las guías de la ESPGHAN (*European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) [11] para el diagnóstico de esta enfermedad. En la práctica clínica diaria, el tipaje de estos alelos HLA asociados a CD es una determinación solicitada con frecuencia al laboratorio de inmunología, por parte de los clínicos que se encargan del diagnóstico y seguimiento de estos pacientes. De hecho, la determinación de los alelos HLA-DQ2/DQ8, mediante esta tecnología aquí presentada, ha sido solicitada en más de 5.000 estudios, desde su implementación en la rutina diagnóstica del laboratorio de HLA del LIRAD en el año 2008.

Hay diferentes tecnologías para el tipaje de los alelos HLA y en los últimos años se han desarrollado diferentes métodos comerciales para el tipaje de los alelos HLA asociados específicamente con la CD [127], no obstante en el trabajo aquí presentado se propone un

método basado en la RT-PCR en combinación con sondas de hibridación, que ha servido de base para la elaboración de un kit comercial.

Tipificación HLA asociado a Celiaquía mediante PCR a tiempo real

En la aproximación descrita en este trabajo, se ha conseguido la tipificación HLA-DQ2/DQ8 mediante RT-PCR, utilizando 3 reacciones de amplificación en combinación con dos parejas de sondas de hibridación FRET. Este método de tipificación permite una genotipificación de estos alelos, asociados con la CD, altamente informativa, de manera automatizada, con un tiempo de procesamiento corto y sin fase de manipulación después de la amplificación (post-PCR) lo que disminuye enormemente el riesgo de contaminación.

Además, en aquellos pacientes que sean HLA-DQB1*02 positivos, la ampliación de este método con 2 reacciones adicionales basadas en esta misma tecnología, con el objetivo de ver si este alelo está en homocigosis o heterocigosis, supone una mejora adicional a la técnica para la determinación de los alelos HLA asociados a CD. En este caso, se trata de una reacción para confirmar la presencia del alelo HLA-DQB1*02 y otra para ver si se encuentra en dosis única o en doble dosis.

Todas estas características hacen que la técnica aquí descrita sea útil en el cribado de la población susceptible de padecer CD y fácilmente aplicable en un laboratorio de tipaje HLA que reciba un volumen importante de muestras.

Informatividad de los marcadores HLA en el estudio de sospecha de la Enfermedad Celiaca

De acuerdo a lo descrito en la literatura [128], también en nuestro grupo de pacientes a estudio se confirma la predisposición genética para la CD asociada a los alelos HLA-DQ2/DQ8. La relevancia clínica del tipaje de alelos HLA asociados a la CD en el estudio de sospecha de esta enfermedad viene dado por el alto VPN de esta prueba, que es altamente informativo. En nuestro estudio, igual que en otros trabajos previos [129], el VPN de esta prueba está cercano al 98%. Por el contrario, a pesar de la elevada sensibilidad de la misma (>98%), su VPP es bajo, cercano al 60%, dato que disminuye la probabilidad de un individuo de tener la enfermedad solo por el hecho de ser positivo para este biomarcador en cuestión.

Además, se ha comprobado que el hecho de tener el alelo HLA-DQB1*02 en homocigosis confiere un mayor riesgo para desarrollar la CD, ya que mientras solamente un 44.4% de individuos con este alelo en heterocigosis presentaba un estudio compatible con CD, un 78.6% de los individuos con el mismo en homocigosis tenía el estudio serológico compatible. Además, la determinación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 aumenta la especificidad de la metodología previa (determinación HLA-DQ2/DQ8). Cuando se realiza exclusivamente esta última determinación la especificidad es de un 51.16%, sin embargo cuando ampliamos el estudio a la evaluación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02, ésta aumenta hasta un 86.96%.

Por otro lado, no hemos observado un efecto entre la dosis de este alelo (heterocigosis vs homocigosis) en relación a los niveles de autoAc o de acuerdo a la severidad de la lesión histopatológica (grado de Marsh, en la biopsia intestinal).

- Respecto a los niveles de autoAc, este dato difiere de otros estudios presentes en la literatura [98] donde se han encontrado niveles significativamente más elevados de Ac anti-Tg2 en aquellos pacientes con doble dosis del alelo HLA-DQB1*02, en relación a aquellos pacientes con dosis única o negativos para el mismo. Esto podría ser debido a que el número de pacientes incluidos en nuestro estudio es mayor o a las diferencias en cuanto a la severidad de la enfermedad en estos. Además, en nuestro caso, la técnica utilizada para la cuantificación de los Ac anti-Tg2 tiene un límite máximo de detección de 100 UI/ml, por ello en aquellos pacientes con un resultado >100 UI/ml el valor que hemos empleado para el análisis ha sido de 100 UI/ml (por no tener relevancia a nivel clínico), hecho que puede hacer que estemos infravalorando algunos pacientes en cada grupo.
- En relación a la lesión histopatológica y al contrario que en este mismo estudio [98], dentro del grupo de pacientes con una biopsia de grado Marsh 3, observamos una proporción más elevada de individuos con el alelo HLA-DQB1*02 en heterocigosis que en homocigosis (56.25% vs 34.38%). Además, un 9.37% de estos pacientes no lo presentan.

Otros biomarcadores genéticos en la Enfermedad Celiaca

A pesar de que la asociación entre los genes HLA de clase II y la CD se conoce desde hace más de 40 años, todavía a día de hoy, se desconoce un gran porcentaje de la heredabilidad de esta enfermedad. En este sentido, el papel de loci genéticos no-HLA en la susceptibilidad a desarrollar la CD es importante y algunos de ellos se ha visto que están implicados además en otras AID. Los primeros estudios GWAS se realizaron en el año 2007, donde se identificaron regiones que contenían genes implicados en el control de la respuesta inmune, como por ejemplo IL2 o IL21, desde entonces el número de genes implicados ha ido aumentando, sin embargo el RR o la OR observada, para estos factores genéticos, en ningún caso es tan elevada como en el caso de los genes HLA (Tabla 1) [16, 130, 131]. Respecto a los polimorfismos rs2476601 y rs231775 que en este trabajo han sido estudiados en relación con la GD, en el caso de la CD, a pesar de que hay algún estudio que sugiere por ejemplo que la presencia del polimorfismo de *PTPN22* confiere un riesgo genético incrementado a padecer CD [132], su papel no ha sido claramente confirmado. Por ello, en el presente trabajo estos polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4* no han sido estudiados en relación con la CD.

BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES

Las AITD al igual que otras AID han sido consideradas enfermedades multifactoriales, donde se incluyen distintos factores genéticos y/o ambientales [133]. Dentro de los factores genéticos, el sistema HLA tiene un papel relevante en estas AID, como ya se ha comentado.

Alelos HLA asociados con la Enfermedad de Graves

En el trabajo aquí presentado se han optimizado 6 reacciones, por RT-PCR, necesarias para el tipaje de los diferentes alelos HLA de clase I que han sido descritos como loci de susceptibilidad para la GD [97]. Y de esta manera se ha evaluado la presencia de estos alelos HLA de clase I en nuestra cohorte de pacientes como posibles biomarcadores de la GD.

En nuestro grupo de pacientes y controles, se ha confirmado la asociación de los alelos HLA-B con la GD [97]. Hemos observado que el alelo HLA-B*08 confiere un mayor riesgo a desarrollar la GD (OR=2.77) mientras que el HLA-B*44 tiene un efecto protector (OR=0.56) siendo los resultados estadísticamente significativos. La asociación observada con el alelo HLA-B*08 en nuestro grupo a estudio es mayor en relación a la previamente descrita en población del Reino Unido (OR=2.77 vs OR=1.62).

Respecto a los alelos HLA-C, no se ha confirmado la asociación con GD, que se había descrito como más fuerte que la de los alelos HLA-B. En nuestra población a estudio, los resultados obtenidos respecto a los alelos HLA-C no son estadísticamente significativos, a pesar de que se observa una tendencia de los alelos HLA-C*03 y 07 con efecto predisponente y del alelo HLA-C*16 con efecto protector. Es destacable el hecho de que la tendencia observada en relación al HLA-C*03 es contraria a la asociación descrita previamente [97]. Un hecho a considerar es que la frecuencia para los alelos HLA-C en nuestro grupo control varía sustancialmente con lo descrito en la literatura (población del Reino Unido), sin embargo, nuestros datos están en concordancia con los datos de frecuencias de estos alelos HLA en población española.

Los alelos HLA-B*08 y HLA-C*07 están con frecuencia codificados en un haplotipo común, por ello, cuando estudiamos su presencia de forma simultánea en nuestro grupo de pacientes y controles, el efecto predisponente observado es mayor (OR=4.86) aumentando el VPP de la prueba de un 72.88% o un 56.60% para los alelos HLA-B*08 y HLA-C*07 respectivamente hasta un 82.00% si tenemos en cuenta el haplotipo HLA-B*08-C*07. En la literatura no se había observado este efecto conjunto, de hecho se había descrito que la asociación de los alelos HLA-B y HLA-C con la GD era independiente y que dicho haplotipo no confería una susceptibilidad adicional a desarrollar la enfermedad.

En este estudio, hemos demostrado que hay importantes diferencias poblacionales en la asociación entre los alelos HLA-B y HLA-C y la GD.

Polimorfismos en *PTPN22* y *CTLA4* asociados con la Enfermedad de Graves

Se han desarrollado 2 reacciones de RT-PCR en combinación con sondas de hibridación para la determinación de los polimorfismos rs2476601 y rs231775 correspondientes a los genes *PTPN22* y *CTLA4*, respectivamente. De esta manera, se ha evaluado el papel de estos polimorfismos en la GD estudiando su presencia o ausencia en nuestro grupo de controles y pacientes con esta enfermedad.

Respecto al polimorfismo rs2476601, se ha encontrado un efecto predisponente para padecer la GD (OR=2.35), sin embargo este efecto no se observa cuando valoramos de forma conjunta la presencia de este polimorfismo y los diferentes alelos HLA-B y HLA-C relacionados con GD.

Respecto al polimorfismo rs231775, no se ha encontrado asociación en relación a la GD, sin embargo al analizar de forma conjunta la presencia de este polimorfismo y los diferentes alelos HLA-B y HLA-C relacionados con GD, se ha visto que el hecho de presentar el alelo HLA-C*03 y este polimorfismo confiere una mayor susceptibilidad a padecer esta enfermedad (OR=2.59).

En nuestro grupo de pacientes se han confirmado las asociaciones de ciertos alelos HLA de clase I (siendo el factor más importante el haplotipo HLA-B*08-C*07) así como el polimorfismo rs2476601 o la combinación del alelo HLA-C*03 con el polimorfismo rs231775, como factores genéticos de susceptibilidad a la GD. A pesar de ello, los valores de OR observados para cada uno de ellos son modestos o no explican el total de pacientes con GD. Estos datos confirman el hecho de que esta enfermedad, al igual que otras AID, es una enfermedad compleja en la que múltiples factores genéticos deben jugar un papel o interactuar proporcionando así un nivel de susceptibilidad a desarrollarla. No obstante, los factores genéticos evaluados en este trabajo son también contribuyentes a este riesgo genético.

DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO REAL

La necesidad de la tipificación HLA viene dada por el papel que juega el sistema HLA en diferentes campos biomédicos, como son por ejemplo la compatibilidad en el trasplante de órganos para lograr un menor rechazo del órgano implantado o en la patogénesis de algunas AID, definiendo así la relación HLA y enfermedad. Por ello y debido a que los genes HLA son los más polimórficos de todo el genoma humano, en este campo se están experimentando continuamente una serie de mejoras metodológicas con el fin de llegar a la identificación de todas las especificidades del sistema HLA.

Desde los inicios de la tipificación HLA con métodos serológicos, hasta las técnicas actuales basadas en la tecnología de amplificación de DNA, se ha ido aumentando el nivel de resolución obtenido. No obstante, el uso de las diferentes técnicas de biología molecular para la resolución del elevado grado de polimorfismo del sistema HLA (tipaje HLA) depende en gran medida de las necesidades de cada laboratorio [80]. La elección de una técnica u otra puede estar influenciada por diferentes parámetros como son la resolución requerida (alta o baja) según el objetivo del estudio, el número de muestras a procesar y estudiar, el tiempo de respuesta definido por la urgencia clínica, el número de personal o los equipamientos con los que cuenta el laboratorio, etc. Y de acuerdo a esto, normalmente los laboratorios clínicos utilizan una combinación de las técnicas disponibles en el mercado, buscando así la máxima eficiencia.

Teniendo en cuenta estas premisas, en el laboratorio de HLA del LIRAD se puso en marcha un abordaje del sistema HLA utilizando la metodología de la RT-PCR, con el objetivo de generar un sistema rápido y robotizable de tipificación HLA que pudiera ser de utilidad para el trasplante y el diagnóstico de ciertas AID. De esta manera, se obtuvieron protocolos para la tipificación de HLA-B27, HLA-B y HLA-DR por PCR con diferentes modalidades de sondas de hibridación [85, 90,

91]. La facilidad, solidez, reproducibilidad y eficiencia de la técnica para la detección del HLA-B27 hizo que en este laboratorio esta técnica se incorporase entre sus métodos habituales de diagnóstico, habiendo sido una de las técnicas que se ha auditado y acreditado por la EFI (*European Federation of Immunogenetics*).

Reacciones desarrolladas por PCR a tiempo real para el tipaje del HLA-A

Hoy en día existen técnicas nuevas y atractivas que pueden ser aplicadas en la tipificación HLA, como es el caso de la secuenciación masiva [82]. Estas técnicas a pesar de ser más laboriosas y costosas resultan adecuadas para la obtención de una tipificación de alta resolución. En el presente trabajo se ha abordado la tipificación del locus A del sistema HLA para obtener una baja-media resolución mediante una metodología rápida y económica basada en la RT-PCR. Con sólo 9 reacciones no se ha logrado obtener una alta resolución del locus HLA-A y dada la existencia de las nuevas tecnologías de alta resolución citadas previamente, no se ha planteado aumentar la resolución mediante este procedimiento.

No obstante, este sistema desarrollado en este trabajo puede tener interés en las siguientes situaciones:

- Complementa las reacciones ya puestas en marcha en el laboratorio, para poder disponer de un conjunto de reactivos útiles para la tipificación de baja-media resolución de los principales loci HLA con relevancia clínica.
- En aquellos casos donde no es necesaria una alta resolución, por ejemplo en los estudios de cribado de familiares compatibles.
- En el caso de procesar un elevado número de muestras para una determinación HLA-A concreta, ya que la facilidad técnica, la eliminación de los pasos post-PCR (que evita posibles errores debido a la contaminación) y la existencia en el mercado de robots capaces de preparar la mezcla de reacción, hacen posible una total automatización del proceso.
- En las situaciones de comprobación y resolución de ambigüedades de tipificación generadas por aquellas técnicas de alta resolución que analizan la secuencia de ambos alelos a la vez, como por ejemplo la PCR-SBT convencional.
- En estudios HLA y enfermedad. Tradicionalmente no han sido descritas asociaciones entre alelos HLA-A y diferentes enfermedades (con excepción del alelo HLA-A*29 y la retinopatía de Birdshot) [57]. Pero, recientemente, se ha descrito la asociación del alelo HLA-A*24 con la T1D, confirmando este alelo un efecto predisponente para esta enfermedad con una $OR \approx 1.5$. Además parece ser que este alelo muestra una asociación significativa con una edad más temprana de debut de la enfermedad [134, 135]. Por ejemplo, para estudios donde se quisiera poner de manifiesto la presencia o ausencia del alelo HLA-A*24, se podría utilizar la combinación de reacciones siguiente: T2 + T6

Presencia o ausencia de HLA-A*24:

T2: con la sonda 3 darían positivo los tipajes siguientes:

HLA-A*23 / 24 / 25 / 32

T6: 3 posibles Tm diferentes

HLA-A*24 daría señal a 55°C

HLA-A*23 / 32 darían señal a 65°C

HLA-A*25 no daría señal

- En estudios HLA y predisposición a ADR. Por ejemplo, para estudios donde se quisiera poner de manifiesto la presencia o ausencia del alelo HLA-A*31 en relación a la hipersensibilidad por carbamazepina [113], se podría utilizar la combinación de reacciones siguiente: T2 + T8

Presencia o ausencia de HLA-A*31:

T2: con la sonda 240 darían positivo los tipajes siguientes:

HLA-A*30 / 31

T8: con la sonda 5.30 solo darían positivo aquellos alelos HLA-A*30

CONCLUSIONES

A partir del trabajo aquí presentado se puede concluir lo siguiente:

ESTUDIOS HLA Y ENFERMEDAD

Se ha demostrado la utilidad de la RT-PCR para la resolución del polimorfismo HLA en relación a AID. Gracias a la facilidad técnica, rapidez, así como a la posibilidad de automatización, la RT-PCR constituye un método aplicable a la rutina diagnóstica de un laboratorio de tipaje HLA. De esta manera, se ha logrado la implementación de unas pruebas capaces de predecir la susceptibilidad de un individuo a padecer estas AID (CD y GD).

- Enfermedad celiaca: la tipificación HLA-DQ2/DQ8 presenta un elevado VPN y la ampliación del estudio a la evaluación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 supone una mejora adicional a la técnica ya que aumenta el VPP de esta prueba. A pesar de esto, no se han observado diferencias en la lesión histopatológica (clasificación de Marsh) o en los valores de Ac anti-Tg2 en relación a dicho genotipo.
- Enfermedad de Graves:
 - Alelos HLA de clase I: se ha observado asociación en el caso de los alelos HLA-B. El alelo HLA-B*08 confiere susceptibilidad a GD, mientras que el alelo HLA-B*44 confiere resistencia. Respecto a los diferentes alelos HLA-C estudiados, no se ha observado asociación con la GD. Al analizar de forma combinada estos alelos HLA de clase I, el haplotipo HLA-B*08-C*07 es el que confiere una mayor susceptibilidad a padecer esta enfermedad.
 - Polimorfismos en genes no HLA: el polimorfismo rs2476601 predispone a GD, mientras que no se ha observado asociación entre el polimorfismo rs231775 y la GD. No obstante, al analizar de forma conjunta el efecto de los alelos HLA de clase I y de estos polimorfismos en genes no HLA se ha encontrado asociación entre el alelo HLA-C*03 y el polimorfismo rs231775 con la GD.

TIPAJE DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO REAL

- La metodología descrita, basada en la RT-PCR en combinación con sondas de hibridación FRET, es capaz de resolver el polimorfismo del locus A del sistema HLA a nivel de media-baja resolución, mediante la utilización de 9 reacciones.
- A pesar de que en algunos casos esta metodología resulta insuficiente debido al número de indeterminaciones que quedan sin resolver, algunas de estas reacciones pueden ser utilizadas con otra finalidad, como son por ejemplo los estudios de asociación HLA y enfermedad, estudios familiares, reacciones para la resolución de ambigüedades generadas por otras tecnologías, etc.

ANEXOS

Anexo 1_BIOMARCADORES HLA EN LA ENFERMEDAD CELIACA

Reacciones para la determinación de HLA-DQ2/DQ8

En la siguiente figura se muestra la localización de los diferentes *primers* y sondas, utilizados en las reacciones para la determinación de los alelos HLA asociados a CD (Figura 21):

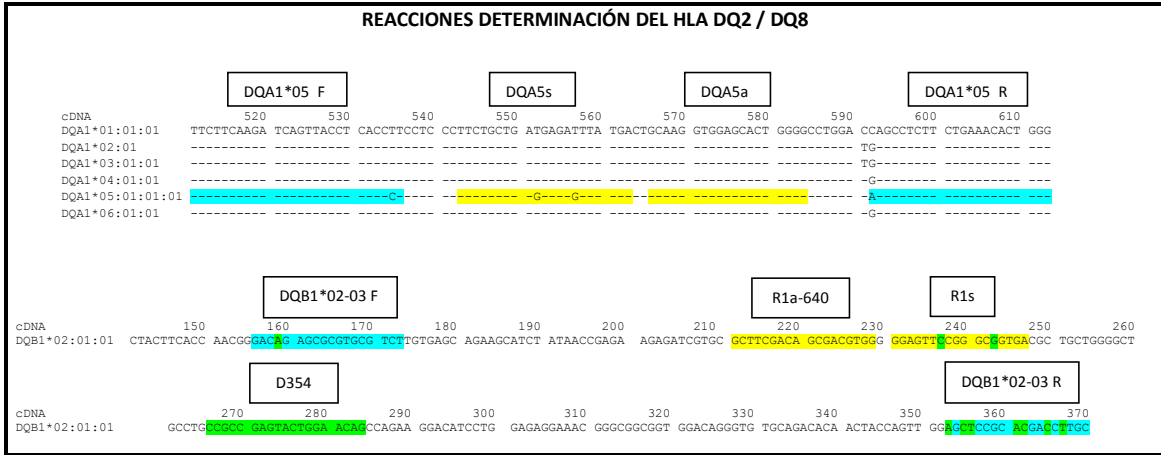


Figura 21: localización de los *primers* (en azul y verde) y sondas (en amarillo) utilizados en las reacciones para la determinación del HLA-DQ2/DQ8 asociado a CD

Reacciones para la determinación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02

En las siguientes figuras se muestra la localización de los diferentes *primers* y sondas, utilizados en las reacciones para la determinación de la dosis génica del alelo HLA-DQB1*02 (Figuras 22 y 23).

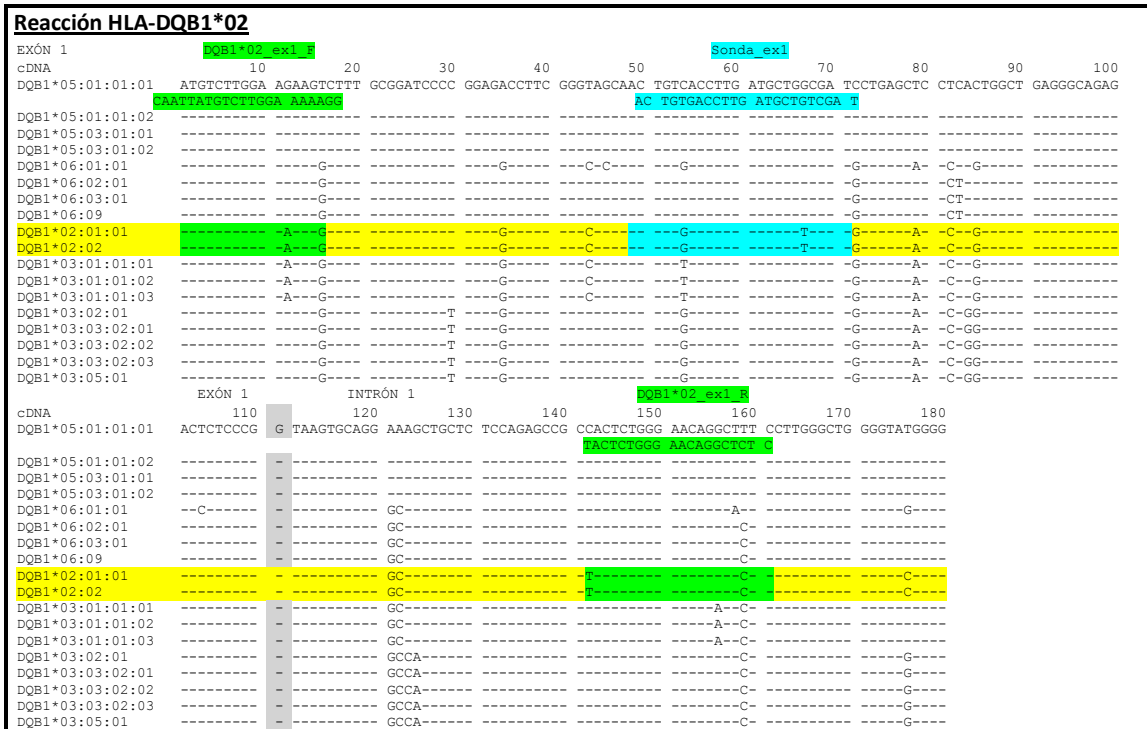


Figura 22: localización de los primers (en verde) y sonda (en azul) utilizados en la reacción para la confirmación del HLA-DQB1*02

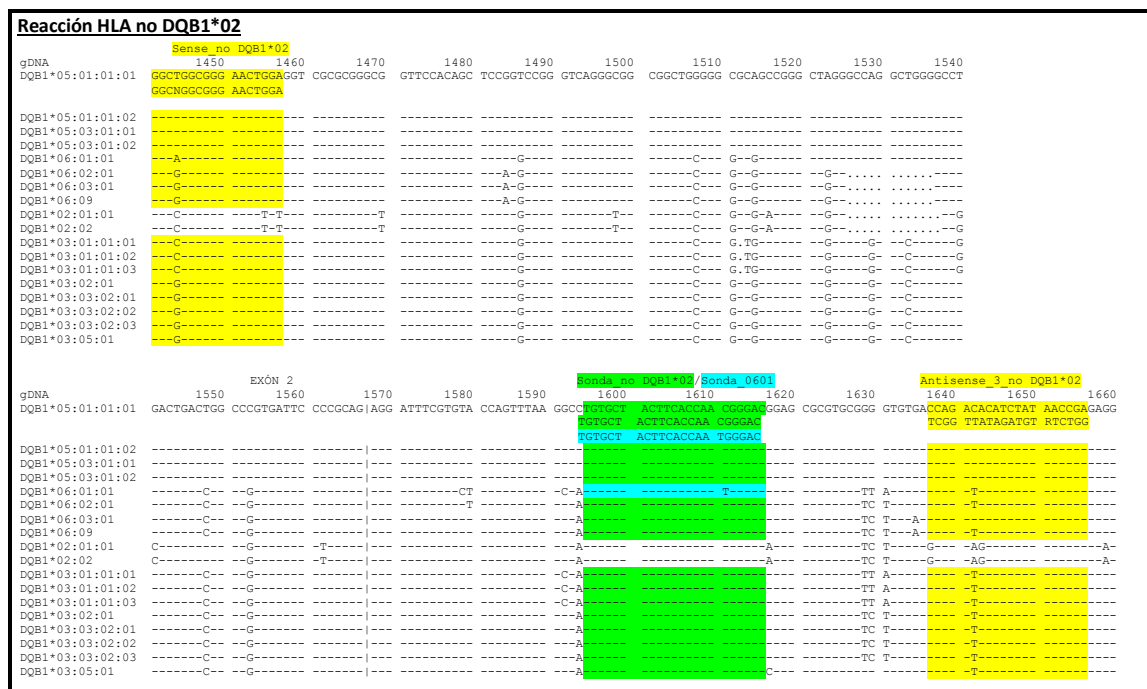


Figura 23: localización de los primers (en amarillo) y sondas (en verde y azul) utilizados en la reacción para la detección de alelos no HLA-DQB1*02

Resultados obtenidos

En las siguientes tablas, correspondientes al grupo de pacientes con estudio serológico compatible o no con CD, se muestran los datos demográficos (número de historia clínica (NHC), sexo (S; H: hombres y M: mujeres) y edad (E)) así como los resultados de los estudios realizados (aquellos valores marcados en rojo, ya sean estudios serológicos o genéticos, corresponden a resultados positivos):

- Estudios serológicos:
Se han realizado según el algoritmo diagnóstico de la Figura 1.
- Biopsia intestinal:
En el caso de pacientes con estudio serológico compatible con CD se muestran las observaciones correspondientes a la biopsia intestinal.
- Estudios de HLA:
Se ha realizado la determinación del HLA-DQ2/DQ8 y en el caso de individuos HLA-DQB1*02 positivo se ha completado el estudio con las 2 reacciones adicionales desarrolladas previamente para ver si este alelo se encuentra en homocigosis (marcados en azul oscuro) o heterocigosis (marcados en azul claro). En aquellos individuos que no presentaban el alelo HLA-DQB1*02 (marcados en lila) no se ha completado el estudio con estas 2 reacciones adicionales.

Grupo de pacientes con estudio serológico compatible con CD (Tabla 25):

Nº	S	E	DQA1*			DQB1*		HLA		IgA (mg/dl)	Ac anti-			Dx	Biopsia		DQB1*
			O5	O2	O302	DQ2	DQ8	Tg2	DGP		EMA	Descripción	Marsh		O2		
1	H	6	P	P	N	P	N	138	98,63	17,49	P	CD	Mucosa jejunal con atrofia moderada, hiperplasia críptica marcada, presencia de algunos agregados linfoides	Marsh 3b	HETERO-		
2	H	7	P	P	N	P	N	94	>100	41,17	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HOMO-		
3	H	5	P	P	N	P	N	100	58,42	13,16	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HOMO-		
4	M	6	P	P	N	P	N	30,8	>100	40,65	P	CD??			HOMO-		
5	M	2	P	P	N	P	N	122	>100	35,33	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HETERO-		
6	M	65	P	P	N	P	N	303	35,55	191,13	P	CD??			HOMO-		
7	H	5	P	P	N	P	N	82	>100	>100	P	CD	Atrofia vellositaria moderada, hiperplasia de criptas	Marsh 3b	HOMO-		
8	H	15	P	P	N	P	N	318	28,5	9,33	P	CD??	Cambios inespecíficos	Marsh 1	HETERO-		
9	H	2	P	P	N	P	N	62	>100	>100	P	CD		Marsh 3b	HOMO-		
10	M	26	P	P	N	P	N	241	19,64			CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HETERO-		
11	M	2	P	P	N	P	N	116	>100	>100	P	CD		Marsh 3b	HETERO-		
12	M	2	N	P	P	N	P	119	53,06	12,1	P	CD	Biopsia poco alterada pero buena respuesta a dieta sin gluten	Marsh 1	HETERO-		

13	M	3	P	P	N	P	N	179	>100	228,11	P	CD	Atrofia vellositaria	Marsh 3c	HETERO-
14	H	15	P	P	N	P	N		76,7	16,55	P	CD			HETERO-
15	M	2	P	P	N	P	N	81	35,57	13,23	P	CD??	En 3-4 años se hará prueba de provocación con gluten	Marsh 1	HETERO-
16	M	14	P	P	N	P	N	51	-	36	P	CD	Atrofia vellositaria	Marsh 3	HOMO-
17	M	54	P	P	N	P	N	190	39,74	29,01	P	CD??			HOMO-
18	H	3	P	P	N	P	N	75	>100	14,02	P	CD	Atrofia vellositaria duodenal	Marsh 3b	HETERO-
19	M	8	P	P	N	P	N	146	>100	28,62	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HOMO-
20	H	2	P	P	N	P	N	48	76,22	15,53	P	CD	Infiltrado linfocitario intraepitelial	Marsh 3c	HETERO-
21	M	8	P	P	N	P	N	68	>100	>100	P	CD			HOMO-
22	H	9	N	N	P	N	P	130	-	>100	P	CD	Atrofia vellositaria	Marsh 3	
23	M	1	P	P	N	P	N	106	26	242,96	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HOMO-
24	M	3	P	P	N	P	N	68	54,47	49,95	P	CD			HETERO-
25	M	12	P	P	N	P	N	63	42,23			CD	Atrofia vellositaria	Marsh 3c	HETERO-
26	H	14	P	P	N	P	N	93	-	N	P T1280	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HETERO-
27	M	10	P	P	N	P	N	96	-	>100	P	CD	Atrofia vellositaria moderada-severa	Marsh 3b	HETERO-
28	H	66	P	P	P	P	P	262	17,3	19	N	CD??			HETERO-
29	H	6	P	N	P	N	P	169	36,84	8,43	P	CD	Atrofia vellositaria moderada	Marsh 3b	
30	M	10	P	P	N	P	N	138	>100	58,2	P	CD	Compatible	Marsh 3	HOMO-
31	H	7	P	P	N	P	N	58,7	>100	>100	P	CD			HOMO-
32	M	4	P	P	N	P	N	151	16,6	3,17	P	CD??	Debut diabético		HETERO-
33	M	8	P	P	N	P	N	92	41,05	64,92	P	CD	Atrofia vellositaria moderada, aumento de linfocitos intraepiteliales	Marsh 3b	HETERO-
34	M	3	P	P	N	P	N	115	>100	>100	P	CD	Atrofia vellositaria severa, marcada linfocitosis intraepitelial	Marsh 3c	HETERO-
35	M	2	P	P	N	P	N	45	10,07	>100	P	CD	Atrofia vellositaria leve. Linfocitosis intraepitelial	Marsh 3a	HOMO-
36	M	0	P	P	N	P	N	222	67,81	>100	P	CD	Atrofia moderada-severa de las vellosidades, linfocitosis intraepitelial	Marsh 3b	HOMO-
37	M	2	P	P	N	P	N	57	60	107,08		CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HETERO-
38	M	12	P	P	N	P	N	64	>100	18,17		CD	Atrofia vellositaria moderada-severa, hiperplasia de criptas	Marsh 3b	HETERO-
39	H	4	P	P	P	P	P	88	>100	8,24	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HETERO-
40	M	17	P	P	N	P	N	143	-	>100	P	CD			HETERO-
41	M	2	N	P	P	N	P	118	>100	PSL	P	CD	Atrofia vellositaria marcada, infiltrado intraepitelial	Marsh 3b	HETERO-
42	M	0	P	P	N	P	N	177	>100	PSL	P	CD	Pendiente????		HOMO-
43	M	44	P	P	N	P	N	210	19,56	3,26	P	CD??	Biopsia normal, control anual anti-tg	Marsh 0	HETERO-
44	M	12	P	N	P	N	P	103	38,23	22,58	P	CD	Atrofia vellositaria severa, moderado infiltrado linfoplasmocitario y exocitosis	Marsh 3c	
45	H	13	P	P	N	P	N	146	>100	>100	P	CD??	No biopsia! No clínica digestiva, debut diabético		HOMO-
46	H	1	P	P	N	P	N	154	>100	PSL	P	CD	No biopsia!! Buena respuesta a dieta sin gluten		HETERO-
47	M	73	P	P	N	P	N	374	44,4	26,49	N	CD??			HOMO-

48	M	2	P	P	N	P	N	40,4	>100	102	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HOMO-
49	M	4	N	P	N	N	N	162	>100	>100	P	CD	Atrofia vellositaria severa	Marsh 3c	HETERO-
50	H	14	P	P	P	P	P	149	>100	>100	P	CD??			HETERO-
51	H	8	P	P	N	P	N	73	-	>100	P	CD			HETERO-
52	M	14	P	P	N	P	N	183	-	27	P	CD			HETERO-
53	H	7	N	P	P	N	P	73	>100	33,03	P	CD	Atrofia vellositaria	Marsh 3	HETERO-
54	M	8	P	P	N	P	N	102	>100	220,76	P	CD			HETERO-
55	M	3	P	P	N	P	N	92	>100		P	CD	No biopsia!		HOMO-
56	M	34	P	P	N	P	N	230	31	20	P	CD??	Biopsia sin alteraciones en vellosidades	Marsh 1	HOMO-
57	M	7	P	P	N	P	N	130	12	6	P	CD??	Biopsia pendiente		HOMO-

Tabla 25: características de los pacientes con estudio serológico compatible con CD

Grupo de individuos estudio serológico no compatible con CD (Tabla 26):

Nº	S	E	DQA1*			DQB1*		HLA		IgA (mg/dl)	Ac anti-			DQB1*
			O5	O2	O302	DQ2	DQ8	Tg2	DGP		Tg2 (IgG)			
1	H	20	N	P	N	N	N	163	0.85				HETERO	
2	H	2	P	P	N	P	N	68	6.73	6.23			HETERO	
3	M	2	P	P	N	P	N	72	0.65	3.23			HETERO	
4	M	2	P	N	N	N	N	30	0.27	1.45				
5	H	8	N	N	P	N	P	118	0.82					
6	M	49	P	P	N	P	N	39	0.39				HETERO	
7	H	32	P	P	N	P	N	247	0.88				HOMO	
8	H	55	N	N	P	N	P	225	0.82					
9	H	43	P	N	P	N	P		0.49					
10	M	76	P	N	N	N	N	104	0.83					
11	M	35	P	N	N	N	N	186	1.26					
12	H	9	N	N	N	N	N	266	0.81					
13	H	0	P	N	N	N	N	28	0.31	14.53				
14	H	38	N	N	N	N	N	262	1.13					
15	H	41	P	P	N	P	N	169	1.27				HOMO	
16	M	27	P	N	N	N	N	159	1.62					
17	M	11	N	N	P	N	P	1.06	0.03			NEG		
18	M	33	P	P	N	P	N	154	1.35				HETERO	
19	M	14	N	N	N	N	N	132	0.6					
20	M	6	P	P	N	P	N	131	0.8				HETERO	
21	H	3	N	P	N	N	N	0.26	0.04	0.25		NEG	HETERO	
22	M	1	N	N	N	N	N	53	0.42	32.81				
23	H	24	P	P	N	P	N	170	0.58				HETERO	
24	M	1	P	P	N	P	N	50	0.37	1.75			HETERO	
25	H	37	N	P	N	N	N	288	2.18				HETERO	
26	H	1	N	N	N	N	N	46	<10	1.9				
27	M	34	N	N	N	N	N	369	0.94					

28	M	46	P	P	N	P	N						HETERO
29	H	5	N	P	N	N	N	63	0.22				HETERO
30	M	8	P	P	N	P	N	68	1.36				HOMO
31	H	2	N	P	N	N	N	4.98	0.74		NEG		HETERO
32	M	29	P	P	N	P	N	224	0.64				HETERO
33	H	41	P	P	N	P	N	253	1.57				HETERO
34	M	24	N	N	N	N	N	199	0.31				
35	M	69	N	P	N	N	N	164	1.36				HETERO
36	M	31	P	N	N	N	N	219	<10				
37	H	1	N	N	N	N	N	103	0.42	0.7			
38	M	38	N	N	N	N	N	142	0.69				
39	M	81	N	N	N	N	N						
40	H	29	N	P	N	N	N						HETERO
41	M	4	P	P	N	P	N	13.4					HETERO
42	H	54	N	P	N	N	N	161	1.05				HETERO
43	M	32	P	P	N	P	N	284	1.18				HETERO
44	M	24	N	N	N	N	N	221	0.81				
45	M	12	P	P	N	P	N	116	0.31				HETERO
46	H	51	P	N	N	N	N	222	0.65				
47	M	29	N	N	N	N	N	270	0.43				
48	H	36	N	P	N	N	N	314	1.94				HETERO
49	M	2	P	N	N	N	N	111	0.28	1.48			
50	H	2	N	N	N	N	N	65	0.98	2.45			
51	M	38	N	N	N	N	N						
52	H	7	N	N	P	N	P	29	0.88	3.8			
53	H	1	P	P	P	P	P	30	5.58	3.8			HETERO
54	H	34	N	P	N	N	N	185	0.91				HETERO
55	H	11	P	P	N	P	N	190	1.41				HETERO
56	H	56	N	N	N	N	N	537	1.14				
57	H	74	P	N	N	N	N	149	<10				
58	M	43	P	P	N	P	N	259	1.17				HETERO
59	H	54	N	N	P	N	P	440	2.31				
60	M	53	N	N	P	N	P	300	0.99				
61	M	43	P	N	N	N	N	229	2.68				
62	M	52	P	N	N	N	N	342	0.9				
63	M	5	N	N	N	N	N	71	0.33				
64	H	26	P	P	N	P	N	304	1.67				HETERO
65	M	3	P	P	N	P	N	32	0.28				HETERO
66	M	9	N	P	N	N	N	136	1.09				HETERO
67	M	7	P	P	N	P	N	43	1.27				HETERO
68	H	48	N	P	N	N	N	361	1.54				HETERO
69	M	69	N	P	N	N	N	329	1.32				HETERO
70	M	33	N	N	N	N	N	161	0.91				
71	H	9	P	P	N	P	N	128	0.89				HOMO
72	M	5	N	N	N	N	N	3.98	0.09		NEG		

73	H	3	P	P	N	P	N	45	6.55			HETERO
74	H	2	P	P	N	P	N	28	0.13	0.76		HETERO
75	M	0	N	P	N	N	N	31	0.44	1.83		HETERO
76	M	45	N	N	P	N	P	459	1.41			
77	M	44	N	N	P	N	P	176	0.91			
78	M	52	P	P	N	P	N	239	1.52			HETERO
79	M	68	N	P	P	N	P	130	0.69			HETERO
80	H	51	P	N	P	N	P	239	1.37	4.2		
81	M	5	P	P	N	P	N	86	0.49			HETERO
82	M	1	N	P	N	N	N	34	0.3	0.6		HOMO
83	H	38	N	P	N	N	N	113	0.43			HOMO
84	H	2	P	P	N	P	N		1			HETERO
85	H	3	P	P	N	P	N		1			HETERO
86	M	42	N	N	P	N	P	150	1			

Tabla 26: características de los pacientes con estudio serológico no compatible con CD

Anexo 2_BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES

Alelos HLA de clase I

A continuación se muestra la localización de los *primers* y sondas utilizados en las reacciones diseñadas para el tipaje de los alelos HLA-B (Figura 24) y HLA-C (Figura 25) relacionados con la GD:

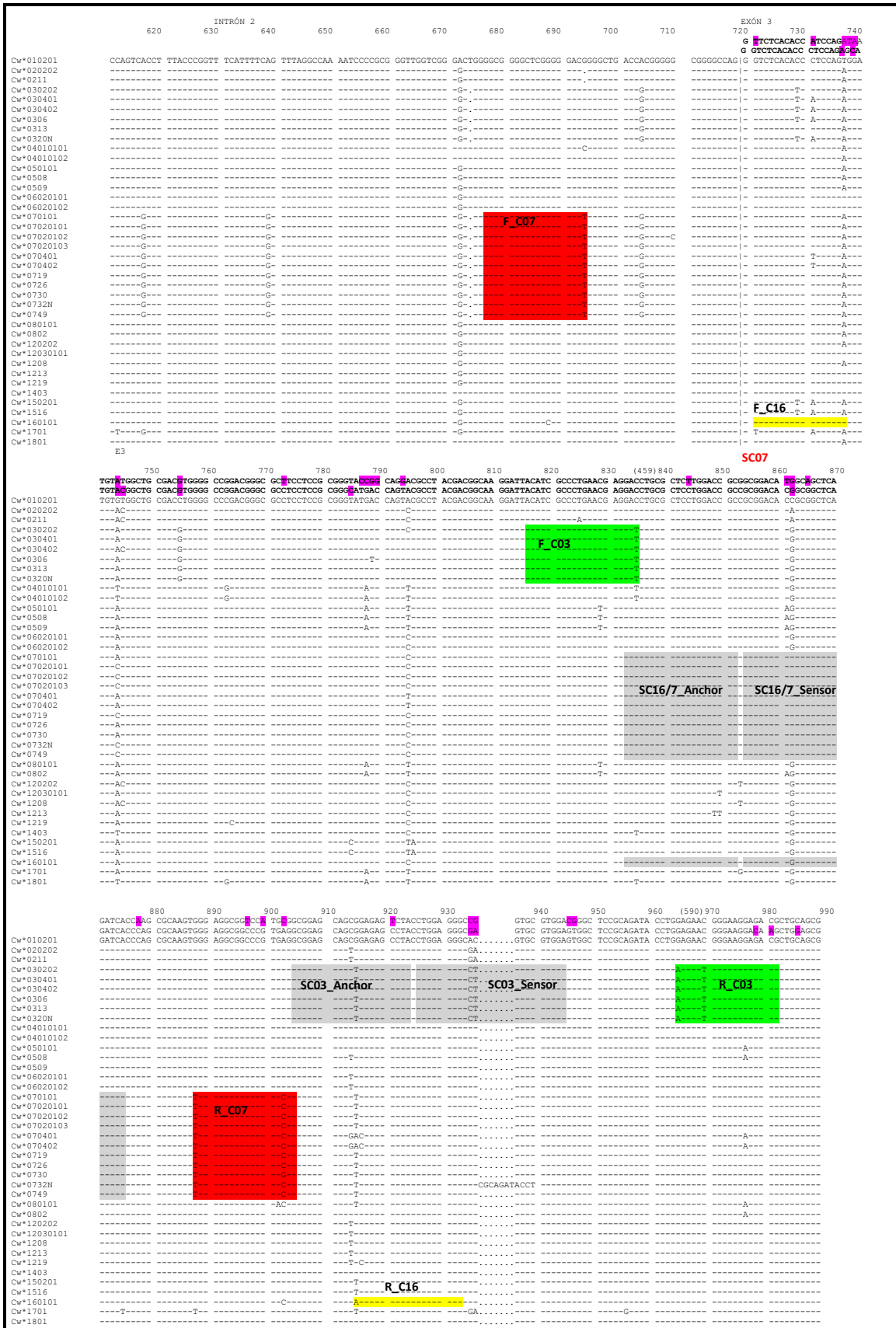


Figura 25: primers (en verde los del alelo HLA-C*03, en rojo los del HLA-C*07 y en amarillo los del HLA-C*16) y sondas (en gris) utilizados en las reacciones de los alelos HLA-C asociados con GD

73	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-C											
01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
03	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 27: resumen de las Tm obtenidas en las reacciones para el tipaje de los alelos HLA-B y HLA-C asociados con GD

Polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4*

A continuación se muestra la localización de los *primers* y sondas utilizados en las reacciones diseñadas para el tipaje de los polimorfismos rs2476601 (Figura 26) y rs231775 (Figura 27) relacionados con la GD. Los polimorfismos rs2476601 y rs231775 se encuentran localizados en los exones 14 y 1 de los genes *PTPN22* y *CTLA4*, respectivamente.

```

ATGAACTCCTCAAACCTCAAGGCTCACACATCAGCTTCCCAAAGTGCTGGAATTAAGGCATGAGCCACCATG
CCCATCCCACTTTATTTTATACTTACTGAACTGTACTIONCAGCTTCCTCAACCACAATAAATGATTCAGGT
GTCCGTACAGGAAGTGGAGGGGGGATTTATCATCTATCCTTGGAGCAGTTGCTATCCAAAATGTCAAAA
TATTGTAACAATTGTTAATTAGAACAATCCAAAGGAAATTCTT

```

Figura 26: *primers* (en verde) y sondas (en azul; donde el SNP corresponde al nucleótido marcado en rojo) utilizados en las reacciones para la determinación del polimorfismo rs2476601 asociado con GD

```

.....cacggcttcctttctcgtaaaaccaaacaacaaaaggctttctattcaagtEXÓN1GCCTTCTGTGT
GTGCACATGTGTAATACATATCTGGGATCAAAGCTATCTATATAAAGTCCTTGATTCT
GTGTGGGTTCAAACACATTTCAAAGCTTCAGGATCCTGAAAGGTTTTGCTCTACTTCC
TGAAGACCTGAACACCGTCCCATAAAGCCATGGCTTGCCTTGGATTTAGCGGCACA
AGGCTCAGCTGAACCTGGCTACCAGGACCTGGCCCTGCACTCTCCTGTTTTTTCTTCT
CTTCATCCCTGTCTTCTTGCAAAGEXÓN1gtgagtgagactttggagcatgaa.....gttccc
tttgctttccatgctagEXÓN2CAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGC
    
```

Figura 27: primers (en verde) y sondas (en azul; donde el SNP corresponde al nucleótido marcado en rojo) utilizados en las reacciones para la determinación del polimorfismo rs231775 asociado con GD

Resultados obtenidos

A continuación se muestran los resultados obtenidos, tanto para el tipaje de los alelos HLA de clase I estudiados como los referentes a los polimorfismos de *PTPN22* y *CTLA4* en el grupo de pacientes (Tabla 28) y controles (Tabla 29):

	HLA-B*		HLA-C*			PTPN22	CTLA4		HLA-B*		HLA-C*			PTPN22	CTLA4	
	08	44	03	07	16	rs2476601	rs231775		08	44	03	07	16	rs2476601	rs231775	
1	293	N	N	N	P	G/A	A/A	89	237	N	N	P	N	N	G/A	A/G
2	305	N	N	N	P	N	G/G	90	452	P	N	N	P	N	G/G	A/G
3	308	N	P	N	N	P	G/A	91	453	N	N	P	N	N	G/G	A/G
4	310	N	N	N	P	N	G/A	92	455	N	N	N	N	N	G/G	A/G
5	314	N	N	N	P	N	G/G	93	459	P	N	N	P	N	G/G	A/G
6	334	N	N	N	N	N	G/G	94	464	P	N	N	P	N	G/G	A/A
7	378	N	P	N	N	N	G/G	95	471	P	N	N	P	N	G/G	A/G
8	38	N	N	P	N	N	G/G	96	472	N	P	P	N	N	G/G	A/G
9	381	N	N	N	N	N	G/G	97	474	N	P	N	P	N	G/G	A/G
10	389	N	P	N	N	P	G/A	98	476	N	P	N	N	N	G/G	A/G
11	390	N	N	N	N	N	G/G	99	477	P	N	N	P	N	G/G	A/A
12	391	N	N	N	P	N	G/G	100	478	N	N	N	N	N	G/G	G/G
13	393	N	N	P	N	N	G/G	101	479	N	N	N	P	P	G/A	A/G
14	394	N	N	N	P	N	G/A	102	480	N	N	N	P	N	G/G	A/A
15	40	N	P	N	N	P	G/G	103	481	N	N	N	N	N	G/G	G/G
16	403	P	N	P	N	N	G/G	104	482	P	N	N	P	N	G/G	A/A
17	265	N	N	N	N	N	G/G	105	483	N	N	N	N	P	G/G	A/G
18	270	N	N	N	N	N	G/A	106	484	N	P	N	N	P	G/G	A/G
19	278	N	N	N	N	N	G/G	107	485	P	N	N	P	N	G/G	A/G
20	286	N	P	N	N	P	G/G	108	488	N	N	N	P	N	G/G	A/A
21	277	P	N	N	P	N	G/G	109	490	N	N	P	N	N	G/G	A/G
22	287	P	N	N	P	N	G/G	110	491	P	P	N	P	P	G/G	A/A
23	336	P	N	N	P	N	G/G	111	492	P	N	N	P	N	G/G	A/A
24	208	P	N	N	P	N	G/G	112	493	N	N	N	N	N	G/G	A/A
25	124	P	P	N	P	N	G/G	113	494	N	P	N	P	P	G/G	G/G
26	200	N	N	N	N	N	G/G	114	495	N	N	N	N	N	G/G	A/G

27	204	N	N	P	N	N	G/G	A/G	115	500	N	N	P	N	N	G/G	A/G
28	26	N	N	N	N	N	G/A	G/G	116	501	N	N	N	P	N	G/G	G/G
29	212	N	P	N	N	P	G/G	A/G	117	502	P	N	N	P	N	G/G	A/G
30	220	N	N	N	N	N	G/G	G/G	118	PGB5	N	N	N	N	N	G/A	G/G
31	242	N	N	N	P	N	G/G	A/G	119	PGB7	P	N	N	P	N	G/G	A/G
32	255	N	P	N	P	N	G/G	G/G	120	PGB12	N	P	N	N	N	G/G	G/G
33	373	N	N	N	P	N	G/G	A/G	121	PGB13	P	N	P	P	N	G/A	A/G
34	164	N	N	N	N	N	G/G	G/G	122	PGB14	N	N	N	P	N	G/G	A/G
35	10	P	N	N	P	N	G/G	A/A	123	PGB20	N	N	P	N	N	G/G	A/A
36	102	N	N	N	P	N	G/G	A/A	124	PGB31	P	N	N	P	N	G/G	A/G
37	107	N	N	N	P	N	G/G	A/G	125	85	N	N	N	P	N	G/G	A/G
38	108	N	N	N	N	N	G/A	A/G	126	172	N	N	N	P	N	G/A	G/G
39	119	N	N	P	N	N	G/G	A/A	127	259	P	N	N	P	N	G/G	A/G
40	134	P	N	N	P	N	G/G	A/A	128	459	N	N	N	N	N	G/G	A/G
41	35	N	N	P	N	N	G/G	G/G	129	550	N	N	P	N	N	A/A	A/G
42	186	N	N	N	N	N	G/G	A/A	130	551	N	N	N	P	N	G/G	A/G
43	140	N	N	N	N	N	G/G	A/G	131	553	N	N	N	N	N	G/G	A/A
44	141	N	N	P	N	N	G/G	A/G	132	524	N	N	N	P	N	G/G	A/A
45	143	N	N	N	P	N	G/G	A/G	133	561	P	N	N	P	N	G/G	A/A
46	172	N	N	P	N	N	G/G	G/G	134	574	N	P	N	N	N	G/A	A/G
47	412	N	N	N	N	N	G/A	G/G	135	635	P	N	N	P	N	G/G	A/A
48	413	N	N	N	N	P	G/G	A/A	136	636	P	N	N	P	N	G/G	A/A
49	416	N	N	P	N	N	G/G	A/A	137	646	N	N	P	N	N	G/G	A/G
50	417	P	N	N	P	N	G/G	A/A	138	648	P	N	N	P	N	G/G	A/G
51	421	P	N	N	P	N	G/G	A/G	139	653	N	N	N	N	N	G/G	A/G
52	423	N	N	N	P	N	G/G	A/A	140	655	P	N	N	P	N	G/G	A/G
53	424	N	N	N	N	N	G/G	A/G	141	658	N	N	N	N	N	G/A	G/G
54	425	N	N	P	N	N	G/A	A/G	142	659	N	N	N	N	N	G/A	A/G
55	426	N	N	N	P	N	G/G	A/G	143	665	N	N	N	P	N	G/G	A/A
56	429	N	N	N	N	N	G/G	A/A	144	671	N	P	N	P	N	G/A	A/G
57	430	N	N	P	N	N	G/G	G/G	145	673	N	P	N	P	N	G/G	A/A
58	442	P	N	N	P	N	G/G	G/G	146	674	N	N	P	P	N	G/G	A/G
59	443	N	N	N	P	N	G/G	G/G	147	676	N	P	P	N	N	G/G	A/G
60	445	P	N	N	P	N	G/G	A/G	148	678	N	P	N	P	N	G/G	A/A
61	446	N	P	N	N	N	G/G	A/A	149	681	N	N	N	P	N	G/G	A/G
62	161	P	N	N	P	N	G/G	A/A	150	687	N	N	N	P	N	G/A	A/A
63	196	N	N	N	N	N	G/G	A/A	151	688	P	N	N	P	N	G/A	A/G
64	179	N	N	N	N	N	G/G	A/G	152	689	P	N	N	N	N	G/G	A/G
65	180	P	N	N	P	N	G/A	G/G	153	690	N	P	N	N	N	G/A	A/A
66	183	N	N	N	N	N	G/G	A/G	154	691	N	N	N	P	N	G/G	A/A
67	2	P	N	N	P	N	G/G	A/G	155	692	P	N	N	P	P	G/G	A/G
68	193	N	N	N	P	N	G/G	A/A	156	698	N	N	N	P	N	G/G	A/A
69	176	N	N	N	P	N	G/G	A/A	157	699	P	N	N	P	N	G/A	A/A
70	257	P	N	N	P	N	G/A	A/A	158	700	P	N	P	P	N	G/A	A/G
71	145	N	P	N	N	N	G/G	A/A	159	701	N	N	N	P	N	G/G	A/G

72	139	P	N	N	P	N	G/A	A/G	160	702	N	N	N	P	N	G/G	A/A
73	157	N	P	N	N	P	G/G	A/A	161	703	N	N	N	P	N	G/G	A/G
74	146	N	N	P	N	N	G/G	G/G	162	704	N	N	N	P	N	G/A	A/G
75	450	N	N	P	P	N	G/G	A/A	163	705	N	N	N	N	N	G/G	A/A
76	45	N	N	N	N	N	G/G	A/G	164	706	N	N	N	P	N	G/G	A/A
77	46	N	N	N	P	N	G/G	A/G	165	707	P	N	N	P	N	G/A	A/A
78	53	N	N	N	N	P	G/A	A/A	166	708	N	P	N	N	P	G/G	A/A
79	57	N	N	N	P	N	G/A	G/G	167	709	N	N	N	N	N	G/G	A/A
80	73	N	P	P	N	N	G/A	A/A	168	710	N	N	P	N	N	G/G	G/G
81	81	N	N	N	P	N	G/G	A/G	169	712	N	N	P	N	N	G/G	A/A
82	92	N	N	N	P	N	G/G	G/G	170	714	P	N	N	P	N	G/A	A/A
83	98	N	N	N	N	N	G/G	A/A	171	720	N	N	N	N	N	G/G	A/A
84	112	N	P	N	P	N	G/G	A/A	172	734	N	P	N	N	N	G/G	A/G
85	158	N	N	N	N	N	G/A	A/A	173	735	N	P	N	P	N	G/A	A/G
86	166	N	N	N	P	N	G/G	A/G	174	736	N	N	N	N	N	G/G	A/A
87	190	N	N	N	N	N	G/G	A/G	175	737	N	P	N	N	P	G/A	A/G
88	213	N	P	P	N	P	G/G	G/G									

Tabla 28: resultados genéticos obtenidos para el grupo de pacientes con GD

Nº	nº Eyra	HLA				PTPN22	CTLA4	Nº	nº Eyra	HLA				PTPN22	CTLA4
1	201205161218142	B*18	B*51	Cw*05	Cw*15	G/G	A/A	77	201206131221198	B*35	B*37	Cw*04	Cw*06	G/G	A/G
2	201205161218143	B*07	B*18	Cw*05	Cw*07	G/G	A/A	78	201206131221216	B*40	B*49	Cw*03	Cw*07	G/A	G/G
3	201205161218173	B*08	B*51	Cw*07	Cw*14	G/G	A/G	79	201206141221338	B*15	B*35	Cw*03	Cw*04	G/G	A/G
4	201205171218287	B*08	B*18	Cw*05	Cw*07	G/G	A/A	80	201206141221339	B*08	B*35	Cw*04	Cw*07	G/G	A/G
5	201205171218288	B*08	BL	Cw*07	BL	G/G	A/G	81	201206141221343	B*08	B*14	Cw*07	Cw*08	G/G	A/G
6	201205171218316	B*14	B*27	Cw*02	Cw*08	G/G	G/G	82	201206141221344	B*15	B*35	Cw*03	Cw*04	G/G	A/A
7	201205181218472	B*13	B*44	Cw*06	Cw*16	G/G	A/G	83	201206141221357	B*07	B*49	Cw*07	BL	G/G	A/A
8	201205191218525	B*18	B*51	Cw*05	Cw*15	G/G	A/A	84	201206151221519	B*40	B*51	Cw*03	Cw*15	G/G	A/A
9	201205191218526	B*07	B*51	Cw*02	Cw*07	G/G	A/A	85	201206151221520	B*49	B*57	Cw*06	Cw*07	G/G	A/A
10	201205201218527	B*18	B*51	Cw*05	Cw*14	G/G	A/A	86	201206151221543	B*08	B*44	Cw*05	Cw*07	G/A	A/G
11	201205201218528	B*44	B*52	Cw*05	Cw*12	G/G	G/G	87	201206151221544	B*18	B*51	Cw*07	Cw*15	G/G	A/G
12	201205211218644	B*15	B*45	Cw*06	Cw*07	G/G	A/A	88	201206161221545	B*07	B*18	Cw*05	Cw*07	G/G	A/G
13	201205211218650	B*44	B*52	Cw*12	Cw*16	G/G	A/G	89	201206161221546	B*07	B*44	Cw*02	Cw*07	G/G	A/A
14	201205211218666	B*08	B*40	Cw*07	Cw*15	G/G	G/G	90	201206171221547	B*14	B*18	Cw*05	Cw*08	G/G	A/A
15	201205211218667	B*27	B*57	Cw*01	Cw*06	G/A	A/G	91	201206191221857	B*35	BL	Cw*03	Cw*04	G/G	A/A
16	201205211218670	B*18	B*51	Cw*01	Cw*05	G/G	A/A	92	201206191221886	B*15	B*57	Cw*03	Cw*06	G/G	A/A
17	201205211218671	B*51	B*58	Cw*07	Cw*12	G/G	A/G	93	201206281222884	B*07	B*45	Cw*06	Cw*07	G/G	A/G
18	201205211218672	B*07	B*18	Cw*07	BL	G/G	A/A	94	201206281222886	B*40	B*51	Cw*03	Cw*14	G/G	A/G
19	201205221218801	B*35	B*57	Cw*04	Cw*07	G/A	A/A	95	201206291222996	B*18	B*44	Cw*05	Cw*16	G/G	A/A
20	201205221218802	B*14	B*18	Cw*05	Cw*08	G/G	A/G	96	201206291222997	B*08	B*51	Cw*07	Cw*15	G/G	G/G
21	201205221218849	B*42	B*44	Cw*04	Cw*17	G/G	A/A	97	201206291222999	B*44	BL	Cw*04	Cw*05	G/G	A/A
22	201205221218850	B*35	B*49	Cw*07	BL	G/G	A/G	98	201207031223285	B*14	B*35	Cw*04	Cw*08	G/G	A/G

23	201205221218851	B*18	B*51	Cw*07	Cw*16	G/A	A/A
24	201205231219049	B*08	B*35	Cw*04	Cw*07	G/A	A/G
25	201205231219050	B*15	B*44	Cw*03	Cw*05	G/A	A/A
26	201205241219143	B*14	B*44	Cw*04	Cw*08	G/G	A/G
27	201205241219144	B*08	B*50	Cw*06	Cw*07	G/G	A/G
28	201205241219191	B*08	BL	Cw*07	BL	G/G	A/G
29	201205241219192	B*27	B*37	Cw*01	Cw*06	G/G	A/G
30	201205241219201	B*08	B*51	Cw*02	Cw*07	G/G	A/G
31	201205241219202	B*14	B*57	Cw*07	Cw*08	G/G	G/G
32	201205251219313	B*14	B*18	Cw*05	Cw*08	G/G	A/G
33	201205251219314	B*14	B*40	Cw*03	Cw*08	G/G	A/G
34	201205291219437	B*08	B*13	Cw*06	Cw*07	G/G	G/G
35	201205291219471	B*35	B*51	Cw*04	Cw*15	G/G	A/G
36	201205301219598	B*07	B*44	Cw*07	Cw*16	G/G	A/G
37	201205301219599	B*35	B*49	Cw*04	Cw*07	G/A	A/G
38	201205301219610	B*07	B*44	Cw*05	Cw*07	G/G	A/G
39	201205301219611	B*15	B*38	Cw*03	Cw*12	G/G	A/A
40	201205301219612	B*44	B*55	Cw*03	Cw*16	G/G	A/G
41	201205301219613	B*50	B*51	Cw*06	Cw*16	G/G	A/G
42	201205311219765	B*42	B*49	Cw*07	Cw*17	G/G	A/G
43	201205311219766	B*44	B*49	Cw*05	Cw*07	G/G	A/G
44	201205311219786	B*27	B*35	Cw*02	Cw*04	G/G	A/G
45	201205311219787	B*35	B*57	Cw*04	Cw*06	G/G	A/A
46	201205311219788	B*35	B*49	Cw*04	Cw*07	G/G	A/A
47	201206011219946	B*39	B*53	Cw*04	Cw*12	G/G	A/G
48	201206011219947	B*44	BL	Cw*16	BL	G/G	A/G
49	201206051220208	B*14	B*15	Cw*07	Cw*08	G/G	A/A
50	201206051220228	B*18	B*35	Cw*04	Cw*07	G/G	A/A
51	201206051220247	B*07	B*51	Cw*07	Cw*14	G/G	A/G
52	201206061220348	B*35	B*51	Cw*04	Cw*15	G/G	A/A
53	201206061220359	B*14	B*35	Cw*04	Cw*08	G/G	A/G
54	201206061220404	B*07	B*27	Cw*02	Cw*07	G/G	A/A
55	201206061220406	B*44	B*49	Cw*05	Cw*07	G/G	A/A
56	201206071220443	B*35	B*39	Cw*01	Cw*07	G/G	G/G
57	201206071220444	B*07	B*52	Cw*07	Cw*12	G/G	A/G
58	201206071220529	B*27	B*38	Cw*02	Cw*12	G/G	A/G
59	201206071220530	B*35	B*51	Cw*04	Cw*15	G/A	A/A
60	201206071220550	B*07	B*27	Cw*01	Cw*07	G/A	A/G
61	201206081220699	B*35	B*57	Cw*04	Cw*08	G/G	A/A
62	201206081220700	B*15	B*51	Cw*07	Cw*16	G/G	A/G
63	201206081220733	B*39	B*51	Cw*01	Cw*07	G/G	A/A
64	201206091220760	B*08	B*15	Cw*07	BL	G/G	A/A
65	201206101220762	B*45	B*49	Cw*07	Cw*16	G/G	A/A

99	201207031223286	B*13	B*38	Cw*06	Cw*12	G/G	A/G
100	201207041223431	B*51	BL	Cw*02	Cw*14	G/G	A/G
101	201207041223432	B*27	B*44	Cw*02	Cw*16	G/G	A/A
102	201207051223433	B*07	BL	Cw*07	BL	G/G	A/A
103	201207051223434	B*14	B*35	Cw*04	Cw*08	G/G	A/G
104	201207051223435	B*27	B*45	Cw*02	Cw*16	G/G	A/G
105	201207051223436	B*07	B*82	Cw*03	Cw*15	G/G	A/A
106	201207051223522	B*07	B*14	Cw*07	Cw*08	G/G	A/A
107	201207051223523	B*15	B*44	Cw*06	Cw*16	G/G	A/A
108	201207051223524	B*39	B*44	Cw*07	BL	G/G	A/G
109	201207051223525	B*35	B*50	Cw*04	Cw*05	G/G	A/G
110	201207061223705	B*07	B*51	Cw*07	Cw*14	G/A	A/G
111	201207061223706	B*18	B*35	Cw*04	Cw*05	G/G	A/A
112	201207071223707	B*18	B*38	Cw*05	Cw*12	G/G	A/G
113	201207071223708	B*07	B*44	Cw*07	Cw*16	G/A	A/G
114	201206251222438	B*27	B*35	Cw*01	Cw*04	G/G	A/G
115	201205021216647	B*14	B*44	Cw*08	Cw*16	G/G	A/A
116	201205021216678	B*08	B*18	Cw*05	Cw*07	G/G	A/A
117	201205021216679	B*13	B*18	Cw*05	Cw*06	G/G	A/G
118	201205021216680	B*08	B*51	Cw*07	Cw*15	G/G	A/G
119	201205021216681	B*39	B*58	Cw*07	Cw*12	G/G	A/A
120	201205021216682	B*27	B*58	Cw*01	Cw*03	G/G	A/A
121	201205021216683	B*40	B*45	Cw*02	Cw*06	G/G	G/G
122	201205031216795	B*39	B*52	Cw*05	Cw*12	G/G	A/A
123	201205031216796	B*44	BL	Cw*05	Cw*07	G/G	A/A
124	201205031216814	B*13	B*44	Cw*06	Cw*16	G/G	A/G
125	201205031216815	B*27	B*51	Cw*02	Cw*14	G/G	A/A
126	201205041216941	B*44	B*50	Cw*06	Cw*16	G/G	A/A
127	201205041216942	B*39	B*44	Cw*04	Cw*12	G/G	A/G
128	201205051216957	B*44	BL	Cw*05	Cw*16	G/G	A/G
129	201205051216958	B*27	B*44	Cw*02	Cw*05	G/A	A/G
130	201205071217102	B*18	B*35	Cw*04	Cw*05	G/A	A/A
131	201205071217103	B*15	B*49	Cw*07	BL	G/G	A/G
132	201205071217104	B*15	B*38	Cw*07	Cw*12	G/A	A/G
133	201205081217129	B*40	B*49	Cw*03	Cw*07	G/G	A/A
134	201205081217240	B*15	B*44	Cw*03	Cw*16	G/G	A/G
135	201205081217262	B*27	B*37	Cw*01	Cw*06	G/G	A/G
136	201205101217610	B*35	BL	Cw*04	BL	G/G	A/G
137	201205101217614	B*07	B*44	Cw*05	Cw*07	G/G	A/A
138	201205101217631	B*15	B*44	Cw*04	Cw*07	G/G	A/G
139	201205101217632	B*35	B*51	Cw*04	Cw*16	G/G	G/G
140	201205101217633	B*07	B*08	Cw*07	BL	G/G	G/G
141	201205111217674	B*14	B*50	Cw*06	Cw*08	G/G	A/A

66	201206101220764	B*07	B*35	Cw*04	Cw*07	G/G	A/A	142	201205111217675	B*07	B*57	Cw*07	BL	G/G	A/A
67	201206111220888	B*44	B*58	Cw*03	Cw*05	G/G	A/G	143	201205121217687	B*15	B*18	Cw*07	BL	G/G	A/A
68	201206111220889	B*44	BL	Cw*16	BL	G/G	A/A	144	201205121217688	B*37	B*44	Cw*06	Cw*16	G/G	A/A
69	201206111220914	B*35	B*49	Cw*04	Cw*07	G/G	A/A	145	201205141217814	B*35	B*40	Cw*12	Cw*15	G/G	A/G
70	201206121221017	B*35	B*44	Cw*04	Cw*05	G/G	G/G	146	201205141217815	B*27	B*49	Cw*02	Cw*07	G/G	A/G
71	201206121221046	B*44	B*49	Cw*05	Cw*07	G/G	A/A	147	201205151217987	B*14	B*40	Cw*03	Cw*08	G/G	G/G
72	201206121221049	B*35	B*44	Cw*04	BL	G/G	A/G	148	201205151218004	B*39	B*44	Cw*07	Cw*16	G/G	A/A
73	201206121221050	B*44	B*50	Cw*06	Cw*16	G/G	A/A	149	201207091223859	B*14	B*44	Cw*05	Cw*08	G/G	G/G
74	201206121221064	B*40	B*44	Cw*02	Cw*05	G/G	A/G	150	201207091223860	B*13	B*44	Cw*04	Cw*06	G/G	G/G
75	201206121221065	B*07	B*44	Cw*05	Cw*07	G/G	A/G	151	201207091223861	B*14	B*44	Cw*08	Cw*16	G/G	G/G
76	201206131221196	B*38	B*51	Cw*12	Cw*14	G/G	A/A	152	201207091223862	B*35	B*53	Cw*04	BL	G/G	A/A

Tabla 29: resultados genéticos obtenidos para el grupo de controles

Anexo 3_DESARROLLO DE LA TIPIFICACIÓN DEL LOCUS A DEL SISTEMA HLA POR PCR A TIEMPO REAL

Reacciones utilizadas en la tipificación del locus A del sistema HLA por RT-PCR

A continuación se muestra la localización de los diferentes *primers* y sondas utilizados en las reacciones diseñadas para el tipaje de los alelos HLA-A (Figura 28):

utilizadas en cada una de las reacciones, según el alelo en cuestión. Estas diferentes Tm se han codificado en la siguiente tabla (Tabla 28) de tal manera que se ha marcado como **1** aquel alelo que da positivo a la Tm correspondiente o como 0 aquel alelo que no da señal a la Tm en cuestión.

A*6603	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6604	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6605	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6606	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6607	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
A*6608	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6609	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A*6610	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
A*6611	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6612	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*680101	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*68020101	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*680301	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6804	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6805	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6806	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
A*6807	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*680801	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A*6809	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
A*6810	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6811N	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6812	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6813	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6814	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6815	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6816	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6817	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6818N	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6819	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6820	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6821	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6822	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6823	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6824	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6825	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6826	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
A*6827	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6828	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6829	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6830	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6831	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6832	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6833	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6834	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6835	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6836	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6837	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6838	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6839	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6840	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6841	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6842	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6843	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6844	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
A*6845	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6846	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6847	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6848	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
A*6901	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
A*7401	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7402	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7403	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7404	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7405	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7406	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7407	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7408	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7409	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7410	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7411	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7412N	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7413	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*7414N	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
A*8001	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Tabla 30: resumen de las Tm obtenidas en las reacciones para el tipaje de los alelos HLA-A

Resolución obtenida por esta metodología

El resumen de las ambigüedades de tipificación relevantes que han sido generadas por el sistema de tipificación establecido en este trabajo queda recogido a continuación (Tabla 29):

Allele_1	Freq_1	Allele_2	Freq_2	Freq_1_2	Allele_1	Freq_1	Allele_2	Freq_2	Freq_1_2	Allele_1	Freq_1	Allele_2	Freq_2	Freq_1_2	Allele_1	Freq_1	Allele_2	Freq_2	Freq_1_2
A*3206	0.00011	020101	0.02605	0.00000	A*7401	0.01733	A*6602	0.00411	0.00007	A*0260	0.00016	A*6602	0.00411	0.00000	A*1104	0.00019	A*2417	0.00134	0.00000
A*310101	0.02147	680101	0.02105	0.00016	A*8004	0.00254	330101	0.02605	0.00011	A*1261	0.00004	A*6602	0.00411	0.00000	A*3102	0.00317	A*2417	0.00134	0.00000
A*250101	0.00827	A*7403	0.00000	0.00000	A*7401	0.01733	A*3402	0.00985	0.00017	A*680301	0.00393	A*6602	0.00411	0.00002	A*3102	0.00055	A*1104	0.00019	0.00000
A*2502	0.00002	330101	0.01330	0.00000	A*330301	0.04265	A*6602	0.00411	0.00018	A*8001	0.00254	680101	0.01831	0.00005	A*03010101	0.08758	A*310102	0.03166	0.00277
A*2502	0.00002	320101	0.02147	0.00000	A*330301	0.04265	A*3402	0.00985	0.00042	A*680101	0.01831	A*680101	0.01831	0.00034	A*300101	0.03327	A*7401	0.01733	0.00058
A*2602	0.02191	A*3206	0.00011	0.00000	A*7401	0.01733	330301	0.04265	0.00074	A*2609	0.00002	A*3601	0.00723	0.00000	A*300101	0.03327	A*310102	0.03166	0.00105
A*230101	0.02147	A*6601	0.02605	0.00013	A*290201	0.02248	A*330301	0.04265	0.00096	A*2401	0.00194	A*3601	0.00723	0.00000	A*03010101	0.08758	A*310102	0.03166	0.00058
A*2609	0.00002	320101	0.02147	0.00000	A*330301	0.04265	A*330301	0.04265	0.00182	A*03010101	0.08758	A*2609	0.00002	0.00000	A*7401	0.01733	310102	0.03166	0.00055
A*3206	0.00011	A*6602	0.00411	0.00000	A*0102	0.00214	020101	0.02605	0.00006	A*1104	0.00019	A*3402	0.00985	0.00006	A*290201	0.02248	A*310102	0.03166	0.00071
A*3206	0.00011	340101	0.00474	0.00000	A*010101	0.08599	68020101	0.02605	0.00224	A*03010101	0.08758	A*3402	0.00985	0.00086	A*310102	0.03166	A*310102	0.03166	0.00100
A*3206	0.00011	330101	0.01330	0.00000	A*1105	0.00015	020101	0.02605	0.00000	A*1104	0.00019	340101	0.00474	0.00000	A*300101	0.03327	A*1104	0.00019	0.00001
A*2410	0.00080	290101	0.00827	0.00001	A*110101	0.07670	68020101	0.02605	0.00000	A*0302	0.00317	340101	0.00474	0.00000	A*30010101	0.08758	A*300101	0.03327	0.00291
A*2410	0.00080	260101	0.02413	0.00002	A*2603	0.00043	A*6801	0.00170	0.00000	A*1104	0.00019	A*6602	0.00411	0.00000	A*1104	0.00019	A*3004	0.00271	0.00000
A*2410	0.00080	680101	0.01831	0.00001	A*6901	0.00170	A*4301	0.00080	0.00000	A*03010101	0.08758	A*6602	0.00411	0.00036	A*0302	0.00254	A*3004	0.00271	0.00001
A*2410	0.00080	020101	0.02605	0.00003	A*02010101	0.14032	A*6601	0.00619	0.00007	A*8001	0.00254	A*3402	0.00985	0.00002	A*300101	0.03327	A*3104	0.00008	0.00000
A*2410	0.00080	A*6901	0.00170	0.00001	A*03010101	0.14032	A*260101	0.02613	0.00339	A*3402	0.00985	A*6602	0.00411	0.00004	A*300101	0.03327	A*8001	0.00254	0.00008
A*0207	0.00363	250101	0.00827	0.00002	A*4301	0.00080	020101	0.02605	0.00007	A*340101	0.00474	A*3402	0.00985	0.00005	A*300101	0.03327	A*290201	0.02248	0.00075
A*021701	0.00161	A*250101	0.00827	0.00001	A*6601	0.00619	020101	0.02605	0.00016	A*290201	0.02248	A*6602	0.00411	0.00009	A*300101	0.03327	A*300101	0.03327	0.00111
A*021701	0.00161	68020101	0.02605	0.00022	A*260101	0.02413	68020101	0.02605	0.00063	A*290201	0.02248	A*3402	0.00985	0.00022	A*8001	0.00254	A*3004	0.00271	0.00011
A*0219	0.00002	250101	0.00827	0.00000	A*0216	0.00023	A*6601	0.00619	0.00000	A*8001	0.00254	340101	0.00474	0.00001	A*3004	0.00271	A*3004	0.00271	0.00001
A*2414	0.00011	260101	0.02413	0.00000	A*0216	0.00023	260101	0.02413	0.00001	A*240101	0.00474	A*240101	0.00474	0.00002	A*8001	0.00254	A*1104	0.00019	0.00000
A*24020101	0.11128	A*250101	0.00827	0.00000	A*0219	0.00002	680101	0.01831	0.00000	A*6602	0.00411	A*6602	0.00411	0.00002	A*7401	0.01733	A*8001	0.00254	0.00004
A*24020101	0.11128	A*260101	0.02413	0.00269	A*0219	0.00002	020101	0.02605	0.00000	A*2405	0.00011	310102	0.03166	0.00000	A*7401	0.01733	A*7401	0.01733	0.00030
A*2405	0.00011	A*6601	0.02605	0.00000	A*03010101	0.08758	A*6901	0.00170	0.00015	A*230101	0.08363	A*310102	0.03166	0.00265	A*7401	0.01733	290201	0.02248	0.00039
A*2405	0.00011	680101	0.01831	0.00000	A*1104	0.00019	A*290101	0.02605	0.00033	A*0219	0.00002	320101	0.02147	0.00000	A*0216	0.00023	110201	0.00358	0.00000
A*2405	0.00011	020101	0.02605	0.00000	A*0302	0.00317	020101	0.02605	0.00008	A*300101	0.03327	A*230101	0.08363	0.00278	A*0216	0.00023	110101	0.00670	0.00002
A*2405	0.00011	A*2405	0.00011	0.00000	A*03010101	0.08758	A*68020101	0.02605	0.00228	A*2410	0.00080	A*7401	0.01733	0.00001	A*02010101	0.14032	A*1104	0.00019	0.00003
A*2414	0.00011	680101	0.01831	0.00000	A*6901	0.00170	A*3403	0.00008	0.00000	A*2410	0.00080	320101	0.02147	0.00002	A*0221	0.00384	010101	0.08758	0.00034
A*2414	0.00011	020101	0.02605	0.00000	A*02010101	0.14032	A*2609	0.00002	0.00000	A*0219	0.00002	A*2405	0.00011	0.00004	A*02010101	0.14032	A*03010101	0.08758	0.00229
A*2414	0.00011	020101	0.02605	0.00000	A*6901	0.00170	A*3405	0.00058	0.00000	A*7401	0.01733	A*2414	0.00011	0.00000	A*020301	0.00960	A*1104	0.00019	0.00000
A*2425	0.00745	020101	0.02605	0.00019	A*6901	0.00170	290201	0.02248	0.00004	A*2414	0.00011	320101	0.02147	0.00000	A*0302	0.00317	020301	0.00960	0.00003
A*24020101	0.11128	A*68020101	0.02605	0.00290	A*02010101	0.14032	A*3402	0.00985	0.00138	A*24020101	0.11128	A*7401	0.01733	0.00193	A*021701	0.00161	A*1104	0.00019	0.00000
A*6901	0.00170	A*2405	0.00011	0.00000	A*2609	0.00002	020301	0.00960	0.00000	A*24020101	0.11128	A*320101	0.02147	0.00029	A*03010101	0.08758	A*020501	0.01323	0.00016
A*6901	0.00170	220101	0.00863	0.00014	A*030101	0.00960	A*2405	0.00011	0.00005	A*7401	0.01733	230101	0.00363	0.00145	A*0216	0.00023	290201	0.02248	0.00001
A*680301	0.00393	A*2405	0.00011	0.00000	A*2609	0.00002	020101	0.02605	0.00000	A*230101	0.08363	A*320101	0.02147	0.00180	A*0302	0.00317	020501	0.01323	0.00004
A*680301	0.00393	020101	0.02605	0.00000	A*3402	0.00985	020101	0.02605	0.00026	A*1104	0.00019	320101	0.02147	0.00000	A*0211	0.00384	010101	0.08611	0.00002
A*230101	0.08363	68020101	0.02605	0.00218	A*290201	0.02248	68020101	0.02605	0.00059	A*7401	0.01733	A*2417	0.00134	0.00003	A*0211	0.00384	A*290201	0.02248	0.00035
A*24020101	0.11128	A*2609	0.00002	0.00000	A*2609	0.00002	020501	0.01323	0.00000	A*2417	0.00134	320101	0.02147	0.00003	A*0219	0.00002	010101	0.08611	0.00010
A*24020101	0.11128	A*340101	0.00474	0.00053	A*02010101	0.14032	A*340101	0.00474	0.00006	A*03010101	0.08758	A*230101	0.02147	0.00188	A*0219	0.00002	290201	0.02248	0.00000
A*2405	0.00011	A*6602	0.00411	0.00000	A*6901	0.00170	A*6602	0.00411	0.00001	A*8001	0.00254	320101	0.02147	0.00005	A*0216	0.00023	010101	0.08611	0.00002
A*2405	0.00011	A*3402	0.00985	0.00000	A*6901	0.00170	680101	0.01831	0.00003	A*7401	0.01733	320101	0.02147	0.00037	A*0216	0.00023	010101	0.08758	0.00002
A*2609	0.00002	230101	0.01330	0.00000	A*6901	0.00170	020101	0.02605	0.00004	A*320101	0.02147	A*320101	0.02147	0.00046	A*0216	0.00023	010101	0.08611	0.00000
A*230101	0.08363	A*6602	0.00411	0.00014	A*0211	0.00384	020101	0.02605	0.00010	A*2417	0.00134	320101	0.02147	0.00003	A*0219	0.00002	010101	0.08611	0.00010
A*230101	0.08363	A*3402	0.00985	0.00002	A*02010101	0.14032	A*6602	0.00411	0.00058	A*2410	0.00080	A*3601	0.00723	0.00001	A*0102	0.00214	010101	0.08758	0.00019
A*2417	0.00134	A*6601	0.02605	0.00001	A*02010101	0.14032	A*68020101	0.02605	0.00366	A*010101	0.08599	A*240301	0.00230	0.00020	A*010101	0.08599	03010101	0.08758	0.00753
A*03010101	0.08758	A*250101	0.00827	0.00072	A*8001	0.00254	020101	0.02605	0.00007	A*0103	0.00004	020101	0.02605	0.00000	A*010101	0.08599	A*1104	0.00019	0.00002
A*250101	0.00827	A*1104	0.00019	0.00000	A*6602	0.00411	020101	0.02605	0.00011	A*010101	0.085								

BIBLIOGRAFÍA

1. Michels, A.W. and G.S. Eisenbarth, *Immunologic endocrine disorders*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S226-37.
2. Cho, J.H. and P.K. Gregersen, *Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(17): p. 1612-23.
3. Rai, E. and E.K. Wakeland, *Genetic predisposition to autoimmunity--what have we learned?* Semin Immunol, 2011. **23**(2): p. 67-83.
4. Amador-Patarroyo, M.J., A. Rodriguez-Rodriguez, and G. Montoya-Ortiz, *How does age at onset influence the outcome of autoimmune diseases?* Autoimmune Dis, 2012. **2012**: p. 251730.
5. Ludvigsson, J.F. and A. Fasano, *Timing of introduction of gluten and celiac disease risk*. Ann Nutr Metab, 2012. **60 Suppl 2**: p. 22-9.
6. Ludvigsson, J.F., et al., *The Oslo definitions for coeliac disease and related terms*. Gut, 2012.
7. Trynka, G., C. Wijmenga, and D.A. van Heel, *A genetic perspective on coeliac disease*. Trends Mol Med, 2010. **16**(11): p. 537-50.
8. Gujral, N., H.J. Freeman, and A.B. Thomson, *Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(42): p. 6036-59.
9. Reilly, N.R. and P.H. Green, *Epidemiology and clinical presentations of celiac disease*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(4): p. 473-8.
10. Tack, G.J., et al., *The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(4): p. 204-13.
11. Husby, S., et al., *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **54**(1): p. 136-60.
12. Fasano, A. and C. Catassi, *Clinical practice. Celiac disease*. N Engl J Med, 2012. **367**(25): p. 2419-26.
13. Barker, J.M. and E. Liu, *Celiac disease: pathophysiology, clinical manifestations, and associated autoimmune conditions*. Adv Pediatr, 2008. **55**: p. 349-65.
14. Jabri, B. and L.M. Sollid, *Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 858-70.
15. Romanos, J., et al., *Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 834-40, 840 e1-3.
16. Kumar, V., C. Wijmenga, and S. Withoff, *From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(4): p. 567-80.
17. Brand, O.J. and S.C. Gough, *Immunogenetic mechanisms leading to thyroid autoimmunity: recent advances in identifying susceptibility genes and regions*. Curr Genomics, 2011. **12**(8): p. 526-41.
18. Tomer, Y., *Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future*. Thyroid, 2010. **20**(7): p. 715-25.
19. Leslie, D., P. Lipsky, and A.L. Notkins, *Autoantibodies as predictors of disease*. J Clin Invest, 2001. **108**(10): p. 1417-22.
20. Vanderpump, M.P., et al., *The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey*. Clin Endocrinol (Oxf), 1995. **43**(1): p. 55-68.
21. Huber, A.K., et al., *Analysis of immune regulatory genes' copy number variants in Graves' disease*. Thyroid, 2011. **21**(1): p. 69-74.
22. Colobran, R., et al., *Association of an SNP with intrathymic transcription of TSHR and Graves' disease: a role for defective thymic tolerance*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(17): p. 3415-23.

23. Davies, T.F., R. Latif, and X. Yin, *New genetic insights from autoimmune thyroid disease*. J Thyroid Res, 2012. **2012**: p. 623852.
24. Tektonidou, M.G. and M.M. Ward, *Validity of clinical associations of biomarkers in translational research studies: the case of systemic autoimmune diseases*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(5): p. R179.
25. Maecker, H.T., et al., *New tools for classification and monitoring of autoimmune diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(6): p. 317-28.
26. Naylor, S., *Biomarkers: current perspectives and future prospects*. Expert Rev Mol Diagn, 2003. **3**(5): p. 525-9.
27. Mayeux, R., *Biomarkers: potential uses and limitations*. NeuroRx, 2004. **1**(2): p. 182-8.
28. Tektonidou, M.G. and M.M. Ward, *Validation of new biomarkers in systemic autoimmune diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(12): p. 708-17.
29. Chu, H., et al., *Meta-analysis of diagnostic accuracy studies accounting for disease prevalence: alternative parameterizations and model selection*. Stat Med, 2009. **28**(18): p. 2384-99.
30. Agoritsas, T., et al., *Does prevalence matter to physicians in estimating post-test probability of disease? A randomized trial*. J Gen Intern Med, 2011. **26**(4): p. 373-8.
31. Vives-Pi, M., et al., *Biomarkers for Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease*. J Clin Gastroenterol, 2013.
32. Bao, F., P.H. Green, and G. Bhagat, *An update on celiac disease histopathology and the road ahead*. Arch Pathol Lab Med, 2012. **136**(7): p. 735-45.
33. Walker, M.M., et al., *Detection of celiac disease and lymphocytic enteropathy by parallel serology and histopathology in a population-based study*. Gastroenterology, 2010. **139**(1): p. 112-9.
34. Planas, R., et al., *Reg (regenerating) gene overexpression in islets from non-obese diabetic mice with accelerated diabetes: role of IFNbeta*. Diabetologia, 2006. **49**(10): p. 2379-87.
35. Planas, R., et al., *Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes*. Clin Exp Immunol, 2010. **159**(1): p. 23-44.
36. Zhang, Y.W., L.S. Ding, and M.D. Lai, *Reg gene family and human diseases*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(12): p. 2635-41.
37. Planas, R., et al., *Regenerating gene lalpha is a biomarker for diagnosis and monitoring of celiac disease: a preliminary study*. Transl Res, 2011. **158**(3): p. 140-5.
38. Ruiz-Ortiz, E., et al., *Urinary levels of regenerating protein lalpha do not differentiate celiac patients and healthy subjects*. Biomarkers, 2013.
39. Girgis, C.M., B.L. Champion, and J.R. Wall, *Current concepts in graves' disease*. Ther Adv Endocrinol Metab, 2011. **2**(3): p. 135-44.
40. Hutfless, S., et al., *Significance of prediagnostic thyroid antibodies in women with autoimmune thyroid disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(9): p. E1466-71.
41. Dausset, J., et al., [*Leuko-agglutinins. IV. Idiopathic chronic pancytopenia with serum leukoagglutinins*]. Rev Hematol, 1953. **8**(3): p. 316-38.
42. Dausset, J., A. Nenna, and H. Brecy, *Leukoagglutinins. V. Leukoagglutinins in chronic idiopathic or symptomatic pancytopenia and in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Blood, 1954. **9**(7): p. 696-720.
43. Danchin, E.G. and P. Pontarotti, *Towards the reconstruction of the bilaterian ancestral pre-MHC region*. Trends Genet, 2004. **20**(12): p. 587-91.
44. Shiina, T., et al., *The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease*. J Hum Genet, 2009. **54**(1): p. 15-39.
45. Traherne, J.A., *Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies*. Int J Immunogenet, 2008. **35**(3): p. 179-92.

46. Vandiedonck, C., et al., *Pervasive haplotypic variation in the spliceo-transcriptome of the human major histocompatibility complex*. *Genome Res*, 2011. **21**(7): p. 1042-54.
47. Liu, Y.H., et al., *Association between copy number variation of complement component C4 and Graves' disease*. *J Biomed Sci*, 2011. **18**: p. 71.
48. Parham, P., et al., *Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles*. *J Immunol*, 1989. **142**(11): p. 3937-50.
49. Parham, P. and T. Ohta, *Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules*. *Science*, 1996. **272**(5258): p. 67-74.
50. Campbell, R.D. and J. Trowsdale, *Map of the human MHC*. *Immunol Today*, 1993. **14**(7): p. 349-52.
51. Xavier, R.J. and J.D. Rioux, *Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(8): p. 631-43.
52. Yunis, E.J., et al., *Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks*. *Tissue Antigens*, 2003. **62**(1): p. 1-20.
53. Vandiedonck, C. and J.C. Knight, *The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2009. **8**(5): p. 379-94.
54. Binkowski, T.A., S.R. Marino, and A. Joachimiak, *Predicting HLA class I non-permissive amino acid residues substitutions*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e41710.
55. Dahl, M. and T.V. Hviid, *Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss*. *Hum Reprod Update*, 2012. **18**(1): p. 92-109.
56. Warren, E.H., *Diversifying the MHC peptide portfolio*. *Blood*, 2012. **120**(16): p. 3165-7.
57. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. Second of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(11): p. 782-6.
58. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(10): p. 702-9.
59. Cresswell, A.C., et al., *Reduced expression of TAP-1 and TAP-2 in posterior uveal melanoma is associated with progression to metastatic disease*. *Melanoma Res*, 2001. **11**(3): p. 275-81.
60. Matamoros, N., et al., *Molecular studies and NK cell function of a new case of TAP2 homozygous human deficiency*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **125**(2): p. 274-82.
61. *Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological Societies*. *Clin Exp Immunol*, 1999. **118** Suppl 1: p. 1-28.
62. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(12): p. 823-36.
63. Marsh, S.G., *Nomenclature for factors of the HLA system, update April 2010*. *Tissue Antigens*, 2010. **76**(6): p. 501-8.
64. Nunes, E., et al., *Definitions of histocompatibility typing terms: Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group*. *Hum Immunol*, 2011. **72**(12): p. 1214-6.
65. Robinson, J., et al., *The IMGT/HLA database*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D1171-6.
66. Middleton, D., *History of DNA typing for the human MHC*. *Rev Immunogenet*, 1999. **1**(2): p. 135-56.
67. Dunn, P.P., *Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal*. *Int J Immunogenet*, 2011. **38**(6): p. 463-73.
68. Nunes, E., et al., *Definitions of histocompatibility typing terms*. *Blood*, 2011. **118**(23): p. e180-3.
69. Terasaki, P.I., et al., *Human Blood Lymphocyte Cytotoxicity Reactions with Allogenic Antisera*. *Ann N Y Acad Sci*, 1964. **120**: p. 322-34.
70. Terasaki, P.I. and J.D. McClelland, *Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins*. *Nature*, 1964. **204**: p. 998-1000.

71. Ferrone, S., et al., *Utilization of cultured human lymphoid cells for detection of humoral sensitization in prospective recipients of kidney transplants*. J Clin Invest, 1975. **55**(2): p. 388-94.
72. Herzig, R.H., et al., *The relationship between donor-recipient lymphocytotoxicity and the transfusion response using HLA-matched platelet concentrates*. Transfusion, 1977. **17**(6): p. 657-61.
73. Bozon, M.V., et al., *Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing*. Tissue Antigens, 1996. **47**(6): p. 512-8.
74. Bozon, M.V., et al., *Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods*. Tissue Antigens, 1997. **50**(4): p. 387-94.
75. Middleton, D., et al., *Discrepancies in serological tissue typing revealed by DNA techniques*. Transpl Int, 1988. **1**(3): p. 161-4.
76. Erlich, H.A., *Principles and applications of the polymerase chain reaction*. Rev Immunogenet, 1999. **1**(2): p. 127-34.
77. Erlich, H., *HLA DNA typing: past, present, and future*. Tissue Antigens, 2012. **80**(1): p. 1-11.
78. Cesbron-Gautier, A., et al., *[Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities]*. Ann Biol Clin (Paris), 2004. **62**(1): p. 93-8.
79. Dalva, K. and M. Beksac, *HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex technology*. Methods Mol Med, 2007. **134**: p. 61-9.
80. Bontadini, A., *HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics*. Methods, 2012. **56**(4): p. 471-6.
81. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
82. De Santis, D., et al., *16(th) IHIW : Review of HLA typing by NGS*. Int J Immunogenet, 2013. **40**(1): p. 72-6.
83. Shiina, T., et al., *Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers*. Tissue Antigens, 2012. **80**(4): p. 305-16.
84. Wittwer, C.T., et al., *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. Biotechniques, 1997. **22**(1): p. 130-1, 134-8.
85. Faner, R., et al., *HLA-B27 genotyping by fluorescent resonance emission transfer (FRET) probes in real-time PCR*. Hum Immunol, 2004. **65**(8): p. 826-38.
86. Pryor, R.J. and C.T. Wittwer, *Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis*. Methods Mol Biol, 2006. **336**: p. 19-32.
87. Liu, Y., Q. Zhu, and N. Zhu, *Rapid HLA-DR fluorotyping based on melting curve analysis*. Immunol Invest, 2007. **36**(4): p. 507-21.
88. Zhou, L., et al., *High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution*. Clin Chem, 2005. **51**(10): p. 1770-7.
89. Erali, M., K.V. Voelkerding, and C.T. Wittwer, *High resolution melting applications for clinical laboratory medicine*. Exp Mol Pathol, 2008. **85**(1): p. 50-8.
90. Casamitjana, N., et al., *Development of a new HLA-DRB real-time PCR typing method*. Hum Immunol, 2005. **66**(1): p. 85-91.
91. Faner, R., et al., *Real-time PCR using fluorescent resonance emission transfer probes for HLA-B typing*. Hum Immunol, 2006. **67**(4-5): p. 374-85.
92. Thorsby, E., *On the future of HLA*. Tissue Antigens, 2011. **78**(4): p. 229-40.
93. Gough, S.C. and M.J. Simmonds, *The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action*. Curr Genomics, 2007. **8**(7): p. 453-65.
94. Schlosstein, L., et al., *High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis*. N Engl J Med, 1973. **288**(14): p. 704-6.

95. Cruz-Tapias, P., et al., *HLA and Sjogren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies*. *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(4): p. 281-7.
96. Howson, J.M., et al., *Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A*. *Diabetes Obes Metab*, 2009. **11 Suppl 1**: p. 31-45.
97. Simmonds, M.J., et al., *A novel and major association of HLA-C in Graves' disease that eclipses the classical HLA-DRB1 effect*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(18): p. 2149-53.
98. Nenna, R., et al., *HLA-DQB1*02 dose effect on RIA anti-tissue transglutaminase autoantibody levels and clinicopathological expressivity of celiac disease*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008. **47**(3): p. 288-92.
99. Katsavos, S. and M. Anagnostouli, *Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview*. *Mult Scler Int*, 2013. **2013**: p. 340508.
100. Miyagawa, T., et al., *Effects of oral L-carnitine administration in narcolepsy patients: a randomized, double-blind, cross-over and placebo-controlled trial*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53707.
101. Caillat-Zucman, S., *Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases*. *Tissue Antigens*, 2009. **73**(1): p. 1-8.
102. Barisani-Asenbauer, T., et al., *Uveitis- a rare disease often associated with systemic diseases and infections- a systematic review of 2619 patients*. *Orphanet J Rare Dis*, 2012. **7**: p. 57.
103. Yan, L., J.M. Wang, and K. Zeng, *Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis*. *Br J Dermatol*, 2012. **167**(4): p. 768-77.
104. Tomer, Y. and A. Huber, *The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment*. *J Autoimmun*, 2009. **32**(3-4): p. 231-9.
105. Falchuk, Z.M. and W. Strober, *HLA antigens and adult coeliac disease*. *Lancet*, 1972. **2**(7790): p. 1310.
106. Stokes, P.L., et al., *Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease*. *Lancet*, 1972. **2**(7769): p. 162-4.
107. Ahn, R., et al., *Association analysis of the extended MHC region in celiac disease implicates multiple independent susceptibility loci*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36926.
108. Gutierrez-Achury, J., R. Coutinho de Almeida, and C. Wijmenga, *Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases*. *J Intern Med*, 2011. **269**(6): p. 591-603.
109. Jacobson, E.M., A. Huber, and Y. Tomer, *The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology*. *J Autoimmun*, 2008. **30**(1-2): p. 58-62.
110. Bharadwaj, M., et al., *Drug hypersensitivity and human leukocyte antigens of the major histocompatibility complex*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012. **52**: p. 401-31.
111. Daly, A.K., *Using genome-wide association studies to identify genes important in serious adverse drug reactions*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012. **52**: p. 21-35.
112. Mallal, S., et al., *Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir*. *Lancet*, 2002. **359**(9308): p. 727-32.
113. McCormack, M., et al., *HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(12): p. 1134-43.
114. Sigal, L.H., *Basic science for the clinician 55: CTLA-4*. *J Clin Rheumatol*, 2012. **18**(3): p. 155-8.
115. Daroszewski, J., et al., *Soluble CTLA-4 receptor an immunological marker of Graves' disease and severity of ophthalmopathy is associated with CTLA-4 Jo31 and CT60 gene polymorphisms*. *Eur J Endocrinol*, 2009. **161**(5): p. 787-93.
116. Bicek, A., et al., *49A/G and CT60 polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 gene associated with autoimmune thyroid disease*. *Hum Immunol*, 2009. **70**(10): p. 820-4.

117. Takahashi, M. and A. Kimura, *HLA and CTLA4 polymorphisms may confer a synergistic risk in the susceptibility to Graves' disease*. *J Hum Genet*, 2010. **55**(5): p. 323-6.
118. Nielsen, C., et al., *Expression of human PTPN22 alleles*. *Genes Immun*, 2007. **8**(2): p. 131-7.
119. Heward, J.M., et al., *Association of PTPN22 haplotypes with Graves' disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(2): p. 685-90.
120. Zheng, J., et al., *Meta-analysis reveals an association of PTPN22 C1858T with autoimmune diseases, which depends on the localization of the affected tissue*. *Genes Immun*, 2012.
121. Arechiga, A.F., et al., *Cutting edge: the PTPN22 allelic variant associated with autoimmunity impairs B cell signaling*. *J Immunol*, 2009. **182**(6): p. 3343-7.
122. Robinson, J., et al., *IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(1): p. 311-4.
123. Schutz, E. and N. von Ahsen, *Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches*. *Biotechniques*, 1999. **27**(6): p. 1218-22, 1224.
124. Barratt, K. and J.F. Mackay, *Improving real-time PCR genotyping assays by asymmetric amplification*. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(4): p. 1571-2.
125. Wittwer, C.T., et al., *Real-time multiplex PCR assays*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 430-42.
126. Mubarak, A., et al., *Tissue transglutaminase levels above 100 U/mL and celiac disease: a prospective study*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(32): p. 4399-403.
127. Megiorni, F. and A. Pizzuti, *HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing*. *J Biomed Sci*, 2012. **19**: p. 88.
128. Meresse, B., G. Malamut, and N. Cerf-Bensussan, *Celiac disease: an immunological jigsaw*. *Immunity*, 2012. **36**(6): p. 907-19.
129. Murray, J.A., et al., *HLA DQ gene dosage and risk and severity of celiac disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. **5**(12): p. 1406-12.
130. Izzo, V., et al., *Improving the estimation of celiac disease sibling risk by non-HLA genes*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e26920.
131. Trynka, G., et al., *Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease*. *Nat Genet*, 2011. **43**(12): p. 1193-201.
132. Santin, I., et al., *The functional R620W variant of the PTPN22 gene is associated with celiac disease*. *Tissue Antigens*, 2008. **71**(3): p. 247-9.
133. Simmonds, M.J. and S.C. Gough, *Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond*. *Clin Exp Immunol*, 2004. **136**(1): p. 1-10.
134. Kronenberg, D., et al., *Circulating preproinsulin signal peptide-specific CD8 T cells restricted by the susceptibility molecule HLA-A24 are expanded at onset of type 1 diabetes and kill beta-cells*. *Diabetes*, 2012. **61**(7): p. 1752-9.
135. Mbunwe, E., et al., *HLA-A*24 Is an Independent Predictor of 5-Year Progression to Diabetes in Autoantibody-Positive First-Degree Relatives of Type 1 Diabetic Patients*. *Diabetes*, 2013. **62**(4): p. 1345-50.