

Polimorfismo *CTLA4+49* en la enfermedad celíaca: ¿una asociación en heterocigosis?*

D. Bernardo¹, E. Gómez-González¹, A.J. León¹, A. Antelo¹, C. Calvo², E. Arranz¹, J.A. Garrote^{1,3}

Resumen

La participación del HLA en la predisposición genética para la enfermedad celiaca (EC) es fundamental, pero no supone más del 40% de la carga genética de esta patología. Deben existir por tanto otros genes implicados, posiblemente múltiples. El *CTLA4* es un gen que codifica una molécula reguladora de la activación linfocitaria, que se encuentra en una de las regiones candidatas a participar en la predisposición a la EC: *CELLAC3* en 2q33. Estudiamos el polimorfismo funcional en posición +49 (A/G) en el exón 1 del *CTLA4* en dos grupos de pacientes celiacos (*DQ2+*, n=134, y *DQ2-*, n=42), en un grupo de control poblacional (n=229) y en 153 familiares de primer grado correspondientes a 68 familias de pacientes *DQ2+*. Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, y análisis de diferenciación poblacional entre grupos. Se estudió la transmisión familiar mediante el test sib-TDT. Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron similares entre grupos; no hubo diferencias en sus distribuciones, aunque se encontró un desequilibrio en los dos grupos de celiacos debido a un exceso de heterocigotos. En el análisis familiar sólo 35 familias resultaron informativas y no se obtuvieron diferencias significativas en la transmisión alélica para dicho polimorfismo. No parece haber asociación de la EC con ningún alelo del polimorfismo +49 del *CTLA4*, sin embargo, el desequilibrio de la distribución genotípica en los pacientes celiacos con un exceso de heterocigotos, parece indicar una asociación con el haplotipo derivado de la condición heterocigota, en el que participarían los loci del *CD28* e *ICOS*.

Palabras clave. Enfermedad Celíaca. Genética. *CTLA4*.

Summary. *CTLA4+49* polymorphism in coeliac disease: An association in heterozygosis?

HLA is the cornerstone in genetic predisposition to Coeliac Disease (CD); however, it accounts for no more than 40% of the genetic budget of this disease. Other genes with a minor effect should be implicated. *CTLA4* gene codifies a regulatory molecule of lymphocyte activation, and it is included in one of the putative regions of CD predisposition, *CELLAC3* in 2q33. We studied the functional polymorphism in position +49 (A/G) in the exon 1 of *CTLA4* gene, in 2 CD patient groups (*DQ2+*, n=134, and *DQ2-*, n=42), in a population control group (n=229) and in 153 first degree relatives of *DQ2+* CD patients. Genotypic and allele frequencies, deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and between-group differences related to population differentiation were calculated. Familial transmission of alleles was also studied by sib-TDT test. Allelic and genotypic frequencies were similar amongst groups; no difference was found in their distribution, although some deviation from the equilibrium was found in CD patients, due to excess of heterozygosity. Only 35/68 families resulted informative, and no significant differences were found in the allelic transmission for the mentioned polymorphism. No association of coeliac disease with *CTLA4+49* alleles was found. However, imbalance in genotype distribution in CD patients, with an excess of heterozygous genotypes seems to point towards an association with the heterozygosis-related haplotype, including *CTLA4*, *CD28* and *ICOS* genes.

Key words. Coeliac Disease. Genetics. *CTLA4*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) tiene un origen poligénico y multifactorial, donde el heterodímero HLA-DQ2 (*DQB1*02-DQA1*0501*) [OMIM #212750] permite explicar el 40% de la carga genética de la patología. Dicho heterodímero (o el DQ8 de similares características) tiene un papel fundamental en la restricción de la presentación antigénica y es necesaria su presencia para

el desarrollo de la EC. Sin embargo, dicho heterodímero está presente entre el 20 y 30% de la población general, mientras que únicamente el 0,5% (1) desarrollan la EC. Por tanto, parece necesaria la implicación de numerosos loci de efecto menor, como parecen apoyar los cada vez más numerosos trabajos que identifican nuevos loci de susceptibilidad (2-6). Actualmente se discute la posibilidad de que el gen *CTLA4* [OMIM *123890] sea uno de estos genes, ya que codifica un receptor encargado de regular la activación de los linfocitos T conjuntamente con *CD28* [OMIM *186760], enmarcados ambos (junto con el locus *ICOS* [OMIM *604558]) en el cluster *CELLAC3* [OMIM #609755] en el cromosoma 2q33. De hecho, el efecto de esta región ha sido investigado en varias patologías de naturaleza inflamatoria crónica, encontrándose una asociación del polimorfismo SNP del exón 1 *CTLA4+49 A/G* en la diabetes tipo I, enfermedad de Graves, y artritis reumatoide (7-9). Sin embargo, en la EC los resultados son contradictorios, con

¹Grupo de Inmunología de las Mucosas. Áreas de Pediatría e Inmunología-Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM). Universidad de Valladolid

²Gastroenterología Pediátrica. Servicio de Pediatría. Hospital Clínico Universitario de Valladolid

³Unidad de Investigación. Hospital Clínico Universitario de Valladolid

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Valladolid el 19, 20 y 21 de octubre de 2005

trabajos que encuentran asociación de este polimorfismo al desarrollo de la EC (10-15) y otros que no la encuentran (16-19). Por tanto, decidimos analizar este polimorfismo *CTLA4+49 A/G* en nuestra población de EC de Castilla y León, tanto pacientes DQ2+ como DQ2-, para determinar si este polimorfismo tiene un papel, como gen de efecto menor, en el desarrollo de la EC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Individuos y genotipado

Se estudiaron un total de 176 pacientes EC (134DQ2+ y 42DQ2-) y 229 controles no-EC, que fueron genotipados para el polimorfismo *CTLA4+49 A/G*. Adicionalmente se pudo conseguir un total de 153 familiares en primer grado de un total de 68 familias de DQ2+, a los que se les extrajo una muestra de sangre para poder hacer un seguimiento familiar a los portadores del genotipo de riesgo. Las muestras EC fueron obtenidas en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, y los controles procedían de donantes del banco de sangre de Valladolid. Todos los EC tenían síntomas compatibles con la enfermedad, tanto serología positiva (anticuerpos IgA antiendomiso o antitransglutaminasa) y alteraciones en la mucosa duodenal al tiempo de diagnóstico, así como recuperación tras la introducción de la dieta sin gluten, tanto serológica como histológica. Todos los EC habían sido previamente genotipados para el HLA-DQ2 y agrupados como EC DQ2+ y DQ2-. Los EC DQ2+ se definieron como portadores de ambos alelos de riesgo de la EC: *HLA-DQB1*02* y *HLADQA1*0501*.

El ADN fue extraído a partir de muestras de sangre periférica (Ultra Clean™ DNA blood isolation kit, Mobio laboratorios, Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El genotipado del polimorfismo *CTLA4+49 A/G* se llevó a cabo por PCR atendiendo a la diferente curva de fusión (*melting*) generada por cada alelo (*CTLA4+49*A* = 56,7°C, *CTLA4+49*G* = 64,3°C) en un termociclador a tiempo real Light Cycler II (ROCHE) usando sondas Hybprobe (figura 1).

Análisis estadístico

El *software* GENEPOP (20) se usó para determinar tanto las frecuencias alélicas como genotípicas de los pacientes celíacos DQ2+ y DQ2-, y controles. También se comprobó el ajuste de las frecuencias genotípicas observadas a las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de Guo y Thompson (1992) (21) aplicando el método de las cadenas de Markov, así como el índice de fijación *F_{is}* para cada *locus* con el fin de medir la magnitud de las desviaciones entre las heterocigosidades observadas y esperadas. De igual forma, se realizaron también análisis de diferenciación poblacional entre los tres grupos, calculando la existencia de diferencias génicas y genotípicas entre los pares de muestras genotipadas. Siempre que se realizaron comparaciones múltiples, se aplicó la corrección de Bonferroni para minimizar el error tipo I (22).

Una variante de las pruebas de desequilibrio de transmisión (TDT) (23), el *sib-TDT* (24), se usó para estudiar la transmisión del polimorfismo *CTLA4* en las familias disponibles de celíacos DQ2+. Dicha prueba es una implementación de los análisis TDT-trío clásicos que usa también el genotipo de los hermanos no afectados, permitiendo combinar los datos de las familias tríos clásicas (padres con un hijo afecto) con los obtenidos en familias con padres no disponibles o no informativos aunque con más hijos

no celíacos. Se obtiene de esta forma un *Z-score* que ofrece resultados muy fiables y que aumenta el número de familias informativas analizadas sin tener que recurrir a permutaciones computacionales para inferir los genotipos parentales perdidos (25, 26).

RESULTADOS

Las frecuencias alélicas observadas son bastante parecidas en los tres grupos analizados, (tabla I) lo que determina que no existan diferencias significativas en su distribución (tabla II a). El mayor parecido genético entre las tres poblaciones se encontró al comparar los dos grupos de EC (ECDQ2+ vs ECDQ2-) entre sí ($\chi^2 = 0,231$, $P = 0,891$), estando éstos menos diferenciados génicamente entre sí que respecto a la población control.

La diferenciación genotípica entre pares de muestras (tabla IIb) tampoco resultó ser significativa en ningún caso y, de nuevo, la menor diferenciación entre las muestras se encontró al comparar ambos grupos de EC entre sí ($\chi^2 = 0$ $P = 1$).

Las tres muestras analizadas se encontraban en el equilibrio de Hardy-Weinberg (tabla III), ya que aunque en los ECDQ2- ($P = 0,0651$) se roza el umbral de significación estadística, y se sobrepasa en los ECDQ2+ ($P = 0,041$), debido en ambos casos a un exceso de heterocigotos, la significación desaparece una vez aplicada la corrección de Bonferroni. Sin embargo, valores de probabilidad tan ajustados sugieren que ambas muestras de EC podrían estar sujetas a alguna fuerza genética que las estuviese apartando del equilibrio, ya que en el caso de los controles el valor de la probabilidad del ajuste es de uno (tabla III).

Por último, del total de 68 familias analizadas con 135 parientes en primer grado de celíacos DQ2+, únicamente 35 resultaron ser

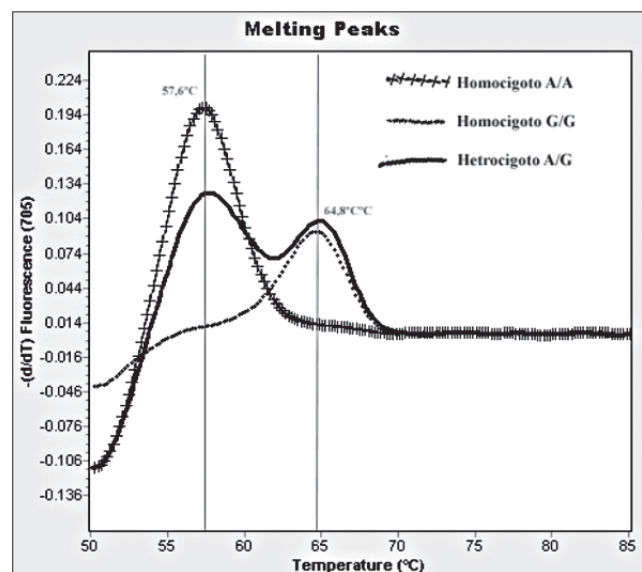


Figura 1. Curvas de fusión (*melting*) para cada uno de los genotipos del polimorfismo *CTLA4+49*: PCR: Cebadores: (F) 5'-ggtttgctctactctcg-3', (R) 5'-aacacctctccatctt-3' (40 ciclos 95°C, 53°C y 72°C). Sonda Hybprobe: (Anclaje) 5'-aggagagtgcagggccagg-Flu-3' y (señal) 5'-Cy5.5-ctggcagccagggtcagc-Pho-3' (50°C). Rampa hasta 95°C a 0,1°/seg. Medición constante de fluorescencia en el canal de 705 nm. La sonda y los cebadores fueron diseñados con el *software* "LightCycler Probe Design 1.0", y sintetizados por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

informativas, y el *Z-score* obtenido del programa sib-TDT ($Z'=0,442$, $P>0,05$) no encontró asociación entre el polimorfismo y el desarrollo de la EC.

Tabla I. Frecuencias (Frec) génicas y genotípicas del polimorfismo *CTLA4+49* en los tres grupos analizados: Controles, Celíacos DQ2+ (ECDQ2+) y Celíacos DQ2- (ECDQ2-)

	AA	AG	GG	Alelo A	Alelo G
Controles					
<i>n</i>	117	94	18	328	130
Frec	0,5109	0,4105	0,0786	0,7162	0,2838
ECDQ2+					
<i>n</i>	60	67	7	187	81
Frec	0,4478	0,5	0,0522	0,6978	0,3022
ECDQ2-					
<i>n</i>	17	24	1	58	26
Frec	0,4048	0,5714	0,0238	0,6908	0,3095

Tabla II. Diferenciación entre los pares de muestras analizados: Controles, Celíacos DQ2+ (ECDQ2+) y Celíacos DQ2- (ECDQ2-)

a) diferenciación génica		
χ^2 (P)	ECDQ2-	Controles
ECDQ2+	0,231 (0,891)	1,023 (0,599)
ECDQ2-		0,735 (0,692)
b) diferenciación genotípica		
χ^2 (P)	ECDQ2-	Controles
ECDQ2+	0(1)	1,031 (0,597)
ECDQ2-		0,765 (0,682)

χ^2 = diferenciación
P = probabilidad

Tabla III. Ajuste de las frecuencias genotípicas observadas a las esperadas bajo el supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg en las tres muestras: controles, celíacos DQ2+ (ECDQ2+) y celíacos DQ2- (ECDQ2-)

	F_{is} (P)
ECDQ2+	-0,0182 (0,041)
ECDQ2-	-0,326 (0,0651)
Controles	-0,007 (1)

F_{is} = $1 - H_{obs}/H_{esp}$
P = probabilidad

DISCUSIÓN

Como era de esperar, las frecuencias génicas y genotípicas observadas de nuestras poblaciones se ajustan a las encontradas previamente en otros trabajos (7, 17). También es lógico pensar que no haya diferencias significativas entre las distribuciones de las frecuencias génicas ni genotípicas en las tres muestras analizadas debido a que nos encontramos ante un posible gen de efecto menor. Sin embargo, llama la atención el hecho de que al comparar las muestras dos a dos, la menor diferenciación se encuentra entre los dos grupos de EC, tanto DQ2+ como DQ2-, siendo especialmente

patente en el caso de la distribución de las frecuencias genotípicas ($P=1$, tabla IIb). Este hecho parece indicar que, aunque no es estadísticamente significativo, las dos muestras de EC son más parecidas entre sí que frente a la población control, probablemente relacionado con el papel menor de dicho *locus* en el desarrollo de la patología.

Por otro lado, y aunque no significativos, los desequilibrios de Hardy-Weinberg encontrados en los dos grupos de pacientes (pero no controles), sugieren un probable papel del polimorfismo del *CTLA4+49* en el desarrollo de la EC, ya que sus valores de probabilidad se alejan mucho de los encontrados en la población control (tabla III). Por tanto, si se asume que las dos muestras EC están en desequilibrio de Hardy-Weinberg, existen varias causas para explicar este desequilibrio, como los errores de genotipado, la ausencia de panmixia, la endogamia, la deriva génica y la migración, que afectarían por igual a los casos como a los controles, por lo que quedan descartadas. Por la misma razón deberemos eliminar la probabilidad de que este polimorfismo sea un punto preferente (*hot-spot*) mutacional.

Así pues, la única fuerza genética que podría estar actuando en la población EC, tanto DQ2+ como DQ2-, sería la selección, bien directa sobre el propio *locus*, o bien indirecta sobre un *locus* ligado a él. Como consecuencia de esto decidimos realizar un análisis sib-TDT sobre un total de 68 familias disponibles de los 80 pacientes celíacos DQ2+ analizados. Sin embargo, únicamente 35 de las familias resultaron significativas, y el *z-score* obtenido no encontró asociación entre la transmisión de los alelos y el desarrollo de la EC. Aun así, hay que hacer dos puntualizaciones: la primera es el escaso número de familias informativas analizadas, que se encuentra muy lejana del mínimo de 50 recomendadas para tener resultados consistentes.

Y la segunda es que los análisis basados en los TDT tratan de encontrar una asociación entre el desarrollo de un fenotipo y la heredabilidad de un alelo. Sin embargo, los desequilibrios de Hardy-Weinberg encontrados en los dos grupos de EC eran consecuencia de un exceso de heterocigotos. Por tanto, y si asumimos que dichos desajustes son consecuencia de una selección, ésta no tendría por qué hacerse patente en estos análisis TDT por cuanto que el fenotipo EC no estaría asociado a un alelo sino a la configuración heterocigota del polimorfismo, o más probablemente al haplotipo derivado de dicha heterocigosidad (en *trans*), ya que no debemos olvidar que el *locus* *CTLA4* se encuentra integrado dentro del cluster de susceptibilidad *CELLIAC3*, junto a los *loci* *CD28* e *iCOS*.

Esta posibilidad de la influencia del haplotipo, que se manifestaría en el exceso de heterocigotos, permitiría explicar estos resultados contradictorios observados al analizar este mismo *locus*, que presenta una asociación tanto con el alelo *A (27) como con el alelo *G (28). De hecho, esta misma posibilidad de la asociación haplotípica también viene secundada por trabajos recientes (29-31) lo que parece lógico dado que en dicho cluster *CELLIAC3* se engloban otros dos genes implicados en la regulación de la actividad de los linfocitos T.

En cualquier caso, la acción que ejercería este polimorfismo en heterocigosis a través presumiblemente del haplotipo derivado del cluster *CELLIAC3* sería de efecto menor, lo mismo parece indicar el hecho de que los desequilibrios de Hardy-Weinberg encontrados

aquí no se mostraran significativos en sentido estricto. Además, permitiría explicar por qué en algunos estudios se llega a la conclusión de una falta de asociación entre el *locus* y el desarrollo de la patología (16-19, 32).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI020895, 02/3068), la Junta de Castilla y León (VA057/04 y SAN1052-VA02/05), las becas de la Junta de Castilla y León (FPI.O.C.14/11/03-O.R.26/01/0) y del Ministerio de Educación (FPU AP2002-1696 Resol.: 2003-06-27), y Phadia (Sweden Diagnostics).

BIBLIOGRAFÍA

- Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* 2003; 61: 105-17.
- Garrote JA, Arranz E, Gomez-Gonzalez E, Leon AJ, Farre C, Calvo C, et al. IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in coeliac disease: differences between DQ2 positive and negative patients. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2005; 33: 245-9.
- Garrote JA, Arranz E, Telleria JJ, Castro J, Calvo C, Blanco-Quiros A. TNF alpha and LT alpha gene polymorphisms as additional markers of coeliac disease susceptibility in a DQ2-positive population. *Immunogenetics* 2002; 54: 551-5.
- López-Vázquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernandez S, et al. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut* 2002; 50: 336-40.
- Rueda B, Martínez A, López-Nevot MA, Mas-Fontao A, Paco L, Ortega E, et al. A functional variant of IFN γ gene is associated with coeliac disease. *Genes Immun* 2004; 5: 517-9.
- Sollid LM, McAdam SN, Molberg O, Quarsten H, Arentz-Hansen H, Louka AS, et al. Genes and environment in coeliac disease. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 183-6.
- González-Escribano MF, Rodríguez R, Valenzuela A, García A, García-Lozano JR, Nunez-Roldan A. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1999; 53: 296-300.
- Knight JC. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *J Mol Med* 2005; 83: 97-109.
- Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 143-6.
- Haimila K, Smedberg T, Mustalahti K, Maki M, Partanen J, Holopainen P. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes Immun* 2004; 5: 85-92.
- Holopainen P, Arvas M, Sistonen P, Mustalahti K, Collin P, Maki M, et al. CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to coeliac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens* 1999; 53: 470-5.
- Holopainen PM, Partanen JA. Technical note: linkage disequilibrium and disease-associated CTLA4 gene polymorphisms. *J Immunol* 2001; 167: 2457-8.
- Popat S, Hearle N, Bevan S, Hogberg L, Stenhammar L, Houlston RS. Mutational analysis of CD28 in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 536-9.
- Popat S, Hearle N, Hogberg L, Braegger CP, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, et al. Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 2002; 66(Pt 2): 125-37.
- Rioux JD, Karinen H, Kocher K, McMahon SG, Karkkainen P, Janatuinen E, et al. Genomewide search and association studies in a Finnish coeliac disease population: Identification of a novel locus and replication of the HLA and CTLA4 loci. *Am J Med Genet A* 2004; 130: 345-50.
- King AL, Moodie SJ, Fraser JS, Curtis D, Reid E, Dearlove AM, et al. Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA4 gene region. *Eur J Immunogenet* 2003; 30: 427-32.
- Martin-Pagola A, Perez de Nanclares G, Vitoria JC, Bilbao JR, Ortiz L, Zubillaga P, et al. No association of CTLA4 gene with coeliac disease in the Basque population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 142-5.
- Neuhausen SL, Feolo M, Farnham J, Book L, Zone JJ. Linkage analysis of HLA and candidate genes for coeliac disease in a North American family-based study. *BMC Med Genet* 2001; 2: 12.
- Zhernakova A, Eerligh P, Barrera P, Weseloy JZ, Huizinga TW, Roep BO, et al. CTLA4 is differentially associated with autoimmune diseases in the Dutch population. *Hum Genet* 2005; 118: 58-66.
- Raymond M, Rousset F. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. In v1.2 ed: J Heredity 1995; 58: 249.
- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361-72.
- Rice WR, Gaines SD. One-way analysis of variance with unequal variances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8183-4.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-16.
- Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 450-8.
- Gordon D, Haynes C, Johnnidis C, Patel SB, Bowcock AM, Ott J. A transmission disequilibrium test for general pedigrees that is robust to the presence of random genotyping errors and any number of untyped parents. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 752-61.
- Knapp M. The transmission/disequilibrium test and parental-genotype reconstruction: the reconstruction-combined transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 861-70.
- Naluai AT, Nilsson S, Samuelsson L, Gudjonsdottir AH, Ascher H, Ek J, et al. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to coeliac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens* 2000; 56: 350-5.
- van Belzen MJ, Mulder CJ, Zhernakova A, Pearson PL, Houwen RH, Wijmenga C. CTLA4 +49 A/G and CT60 polymorphisms in Dutch coeliac disease patients. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 782-5.
- Amundsen SS, Naluai AT, Ascher H, Ek J, Gudjonsdottir AH, Wahlstrom J, et al. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens* 2004; 64: 593-9.
- Brophy K, Ryan AW, Thornton JM, Abuzakouk M, Fitzgerald AP, McLoughlin RM, et al. Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. *Genes Immun* 2006; 7: 19-26.
- Hunt KA, McGovern DP, Kumar PJ, Ghosh S, Travis SP, Walters JR, et al. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 440-4.
- Rueda B, Zhernakova A, Lopez-Nevot MA, Gomez-Garcia M, Ortega E, Pintero A, et al. CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* 2005; 66: 321-5.

Correspondencia

José A. Garrote
 Unidad de Investigación
 Hospital Clínico Universitario
 C/Ramón y Cajal 3
 47011 Valladolid
 jgarrote@hcvu.sacyl.es