



Malattia celiaca e HLA-G: analisi genomica e proteomica

Nicola Aronico¹, Alessandra Marchese¹, Claudia Vattiato¹, Carla Badulli²,
Miryam Martinetti², Federico Biagi¹, Gino Roberto Corazza¹

¹*Clinica Medica I e* ²*Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale,
Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

Malattia celiaca e HLA-G : analisi genomica e proteomica

Il polimorfismo HLA-G 14bp inserzione/delezione è stato ricercato mediante PCR in 118 pazienti affetti da MC non complicata, in 19 con MC complicata, in 18 con MC potenziale, in 258 controlli sani. I livelli sierici di HLA-G solubile sono stati quantificati mediante kit ELISA in 80 pazienti con MC non complicata non trattati, in 80 con MC non complicata e in dieta aglutinata, in 25 con MC complicata, in 23 con MC potenziale e in 42 controlli sani. I sieri di 33 degli 80 pazienti con MC non complicata sono stati analizzati sia prima che dopo l'inizio della dieta aglutinata. Il genotipo Ins/Ins è risultato essere significativamente più frequente nei celiaci. Raggruppando insieme i diversi gruppi di MC i livelli di HLA-G solubile sono risultati significativamente più elevati rispetto ai controlli. Tuttavia non sono emerse differenze fra i diversi gruppi. Nei pazienti studiati prima e dopo l'inizio della dieta aglutinata la concentrazione dell'HLA-G solubile si è ridotta in maniera significativa. Inoltre nei pazienti che seguivano una rigorosa dieta aglutinata i livelli di HLA-G si sono ridotti significativamente del 39%. L'incremento dei livelli di HLA-G solubile è una caratteristica della malattia celiaca indipendentemente dal suo grado di attivazione. Inoltre la discesa dei livelli di HLA-G una volta iniziata la dieta potrebbe costituire un marker di aderenza alla dieta stessa.

Coeliac disease and HLA-G: genomic and proteomic analysis

HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism was detected by means of PCR in 118 patients with uncomplicated CD, 19 with complicated CD, 18 with potential CD, and 258 healthy controls. sHLA-G was measured with an ELISA assay in 80 patients with uncomplicated CD while on a gluten-containing diet, 80 with uncomplicated CD while on a gluten-free diet, 25 with complicated CD, 23 with potential CD, and 42 healthy controls. Serum samples from 33 patients with uncomplicated CD were studied before and after the start of a gluten-free diet. Frequency of Ins/Ins genotype was significantly increased in CD patients compared to controls. sHLA-G levels were significantly increased in CD patients by considering them as just one group. However there was no difference among the different groups of CD patients. In the patients studied before and after the start of a gluten-free diet, sHLA-G levels were significantly reduced. Interestingly, this reduction (39%) was found only in the patients with a strict gluten-free diet while sHLA-G remained unchanged in patients not on a strict diet. sHLA-G levels are specific for CD and are not due to its activity. Moreover, the reduction of sHLA-G could represent a biological marker of gluten-free diet adherence.

Introduzione

HLA-G è una molecola HLA-Ib non classica con numerose proprietà immunoregolatorie. Essa si caratterizza per un basso numero di polimorfismi allelici, una limitata distribuzione tissutale e la presenza di sette isoforme, quattro di membrana (G1-G4) e tre solubili (G5-G7). Queste varianti proteiche sono codificate da 28 alleli, 23 dei quali corrispondono a sostituzioni nella sequenza codificante. In particolare, il polimorfismo più studiato è rappresentato dall'HLA-G 14bp inserzione/delezione che si trova al 3'UTR dell'esone 8 del locus HLA-G. Questo è descritto come un polimorfismo biallelico determinato dall'inserzione di una sequenza di 14 nucleotidi. Anche i polimorfismi della regione non codificante influiscono significativamente sull'espressione funzionale del gene HLA-G [1-3]. Entrambe le forme, sia quella legata alla membrana sia quella solubile, modulano la risposta immune attraverso svariati meccanismi che agiscono in maniera non esclusiva: proteggono le cellule bersaglio dai linfociti natural killer (NK) e dall'azione citolitica dei linfociti T citotossici, inibiscono la proliferazione dei linfociti T allogenici e modulano l'azione delle cellule che presentano l'antigene, tra le quali anche le cellule dendritiche. Inoltre, HLA-G partecipa anche all'espressione di HLA-E, un'altra molecola HLA-Ib non classica in grado di inibire l'attività dei NK e dei linfociti T attraverso l'interazione con il recettore inibitorio CD94/NKG2A. In aggiunta, è stato dimostrato che HLA-G è in grado di influenzare l'attività immunitaria attraverso la trogocitosi, meccanismo consistente nel trasferimento di multipli domini di proteine di membrana attraverso il contatto cellula-cellula.

Da un punto di vista molecolare HLA-G esplica il suo effetto inibitorio attraverso l'interazione con tre recettori inibitori: immunoglobuline like transcript 2 (ILT2), espresso sui linfociti NK, linfociti T, cellule mieloidi e cellule presentanti l'antigene; ILT4 espresso sulle cellule dendritiche e sui monociti/macrofagi; killer cell immunoglobulin like receptor espresso sui linfociti NK e sui linfociti T CD8⁺ [1-2].

In base a quanto affermato finora, HLA-G ha un effetto benefico in gravidanza, nei trapianti e nelle patologie autoimmuni, condizioni nelle quali una down-regulation del sistema immunitario svolge un effetto protettivo. Tuttavia la down-regulation del sistema immunitario permette anche alle cellule tumorali e alle cellule infettate da virus di evadere la risposta immunitaria. Dunque, HLA-G può avere effetti deleteri in corso di tumori o di infezioni virali [4-5]. HLA-G è stato studiato anche nell'ambito di malattie gastroenterologiche, in particolare nelle malattie infiammatorie croniche intestinali. È stato evidenziato che l'espressione di HLA-G è aumentata nelle biopsie di mucosa del colon in pazienti affetti da rettocolite ulcerosa; in campioni prelevati da pazienti affetti da morbo di Crohn l'espressione di HLA-G è invece completamente assente. Inoltre, una ridotta prevalenza del genotipo -14/-14 è stata riscontrata in pazienti con rettocolite ulcerosa rispetto a pazienti con morbo di Crohn [6-7].

Sono invece pochissimi gli studi che hanno valutato il ruolo dell'HLA-G nella malattia celiaca (MC). Un recente studio italiano ha analizzato il polimorfismo biallelico 14bp delezione/inserzione dell'HLA-G, localizzato nell'esone 8, in un campione di più di 500 pazienti affetti da MC. Grazie a questo studio si è potuto accertare che il genotipo omozigote I/I è più frequente nei pazienti con MC che nei controlli [8]. Per quanto riguarda l'espressione proteomica, un'aumentata espressione dell'HLA-G solubile (sHLA-G) è stata riscontrata, sia a livello sierico che tissutale, in pazienti celiaci con patologie autoimmuni associate e in pazienti celiaci che non seguivano una rigorosa dieta aglutinata [9]. Per quanto questo studio possa essere criticato a causa di importanti difetti metodologici, esso sicuramente mostra che HLA-G può giocare un ruolo importante in questa malattia caratterizzata da patogenesi autoimmune e gravata da complicanze neoplastiche [10]. Infine, è noto che i sintomi che portano alla diagnosi di MC possono insorgere dopo il parto [11]. Questo potrebbe essere correlato con la fisiologica riduzione dei livelli sierici di sHLA-G che si hanno dopo il parto, analogamente a quanto già dimostrato per la sclerosi multipla [5].

Negli ultimi anni, lavorando insieme al Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia ci siamo molto dedicati allo studio della genetica di differenti patologie del tratto gastroenterico [12-16]. Nell'ambito del presente lavoro, il nostro obiettivo è stato quello di studiare sia il polimorfismo genetico sia l'espressione sierica dell'HLA-G in pazienti affetti da diverse forme di MC, quali la MC non complicata, la MC potenziale e la MC complicata [17]. Infine, in un gruppo di pazienti celiaci che hanno iniziato una dieta aglutinata, abbiamo studiato l'espressione sierica dell'sHLA-G sia prima che dopo l'inizio della dieta aglutinata stessa per verificare come questa vari durante la dieta aglutinata e per verificare se questa possa essere utilizzata come marker di aderenza alla dieta stessa.

Scopo del lavoro

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare sia il polimorfismo genetico sia l'espressione dell'HLA-G in pazienti affetti da diverse forme di MC. Inoltre ci siamo proposti di valutare se il dosaggio di sHLA-G possa essere utilizzato come marker di aderenza alla dieta glutinata.

Materiali e metodi

Pazienti e controlli

Lo studio genomico è stato effettuato ricercando il polimorfismo HLA-G 14bp inserzione/delezione nel DNA genomico di 118 pazienti affetti da MC non complicata (89 F, età media 34 anni \pm 13), 19 pazienti con MC complicata (12 F, età media 55 anni \pm 13), 18 pazienti con MC potenziale (12 F, età media 33 anni \pm 15) e 258 controlli sani afferenti al Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale della nostra Fondazione (159 F, età media 30 anni \pm 5).

La MC non complicata è stata diagnosticata sulla base di atrofia dei villi nelle biopsie duodenali e sulla positività degli anticorpi sierici antiendomio e antitransglutaminasi. Una rigorosa dieta priva di glutine ha poi ripristinato il normale assetto morfologico della mucosa duodenale in tutti questi pazienti. I pazienti con MC complicata sono rappresentati da pazienti in cui la MC è andata incontro allo sviluppo di complicanze quali la MC refrattaria, il linfoma intestinale e l'adenocarcinoma del tenue. In particolare, le diagnosi di linfoma e di adenocarcinoma del tenue si basano su criteri istologici; la diagnosi di MC refrattaria si basa sul riscontro di atrofia dei villi che non ha risposto ad almeno 12 mesi di dieta aglutinata [18-20]. Infine, la diagnosi di MC potenziale si basa sulla positività sierologica degli anticorpi antiendomio e su un aumentato numero di linfociti intraepiteliali nel contesto di una mucosa duodenale architettonicamente ancora normale.

Lo studio proteomico è stato effettuato quantificando i livelli sierici di sHLA-G in 80 pazienti con MC non complicata e ancora non trattati (57 F, età media 35 anni \pm 16), in 80 pazienti con MC non complicata e trattati con una dieta aglutinata (58 F, età media 33 anni \pm 10), 25 pazienti con MC complicata e trattati con una dieta aglutinata (17 F, età media 55 anni \pm 12) e 23 pazienti con MC potenziale e ancora non trattati (16 F, 31 anni \pm 15). I sieri di 33 degli 80 pazienti con MC non complicata (22 F, età media 36 anni \pm 14) sono stati analizzati sia prima che dopo l'inizio della dieta aglutinata, la rigidità della quale è stata valutata mediante uno score da noi recentemente sviluppato. Infine, abbiamo studiato l'espressione sierica di sHLA-G in 42 controlli sani (28 F, età media 31 anni \pm 6).

Misurazione quantitativa dell'HLA-G solubile (sHLA-G)

La concentrazione di sHLA-G è stata determinata mediante un kit ELISA (Praga, Repubblica Ceca), un sistema a sandwich per la misurazione quantitativa della forma solubile dell'antigene di istocompatibilità di classe G (sHLA-G). Il kit misura sia HLA-G1 distaccato sia la forma solubile di HLA-G5 nel siero, nel plasma, nel liquido amniotico e nel supernatante ottenuto da cultura cellulare. Nel kit ELISA, calibratori e campioni sono incubati su una piastra pretrattata con un anticorpo monoclonale (MEM/9). Dopo 60 minuti di incubazione e lavaggio un anticorpo monoclonale diretto contro le β 2-microglobuline umane coniugato con horseradish peroxidase viene aggiunto ai pozzetti e incubato per 60 minuti. Dopo un altro lavaggio il restante coniugato viene fatto reagire con la soluzione di TMB. La reazione è bloccata con l'aggiunta di una soluzione acida e, mediante lettore ELISA, si misura l'assorbanza del cromogeno giallo che si ottiene. L'assorbanza è infatti proporzionale alla concentrazione di sHLA-G. Una curva di calibrazione è costruita confrontando i valori di assorbanza dei calibratori contro la loro concentrazione. Usando questa curva di calibrazione si determinano le concentrazioni dei campioni studiati.

Isolamento del DNA dal sangue intero periferico

Il DNA genomico è stato estratto da 10 ml di sangue periferico usando un sistema automatizzato per l'estrazione del DNA fornitoci da AGOWA[®] mag Maxi DNA Isolation Kit PLUS (AGOWA GmbH, Berlin, Germany).

Analisi molecolare del polimorfismo di HLA-G di 14bp inserzione/delezione

Come già detto, il polimorfismo HLA-G 14bp inserzione/delezione si trova al 3'UTR dell'esone 8 del locus HLA-G ed è descritto come un polimorfismo biallelico determinato dall'inserzione di una sequenza di 14 nucleotidi. È associato a differenze nei livelli di HLA-G mRNA, nei livelli proteici e nello splicing alternativo dell'HLA-G mRNA. Viene analizzato tramite PCR. L'amplificazione è ottenuta con Gene Amp PCR System 9700 Thermal Cycler (Perkin Elmer) usando i seguenti primers specifici:

- GE14_{HLA-G}_F: 5'- GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTC - 3';
- RHG4_R: 5'- GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA - 3'.

La PCR è eseguita in un volume di 25 μ l che contengono 100 ng di DNA genomico, tampone per PCR (Roche Molecular Biochemical, Basilea, Svizzera), 200 mM di ogni dNTP, 0.4 mM di ogni primer e 0.75 U di Taq polimerasi (Roche Molecular Biochemical, Basilea, Svizzera). La concentrazione finale di MgCl₂ è 1.5 mM. Le seguenti condizioni sono usate per l'amplificazione: 94°C per 2 minuti, 25 cicli a 94°C per 30 secondi, 64°C per 1 minuto e 72°C per 2 minuti. Il passaggio finale è di 10 minuti a 72°C. I prodotti finali della PCR, 210 e/o 224 bp, sono separati su un gel di agarosio al 3%. Le immagini del tracciato elettroforetico sono raccolte e analizzate con un software specifico. In particolare i prodotti della PCR forniscono i seguenti frammenti a seconda del genotipo del campione analizzato: genotipo HLA-G -14/-14 codifica un frammento di 210 bp; genotipo HLA-G +14/+14 codifica un frammento di 224 bp; genotipo HLA-G -14/+14 codifica sia un frammento di 210 bp che uno di 224bp.

Statistica

I livelli di sHLA-G sono stati analizzati mediante test di Kruskal-Wallis, test di Wilcoxon, e test di Mann-Whitney dove appropriato. Le frequenze dei tre diversi genotipi sono state analizzate mediante test del Chi².

Risultati

Analisi genomica

La tabella 1 mostra la frequenza dei genotipi nei tre gruppi di pazienti celiaci raggruppati insieme rispetto ai controlli. Il test del Chi² mostra che il genotipo Ins/Ins è significativamente più frequenti nei celiaci che nei controlli. Viceversa, il genotipo Ins/Del è significativamente più frequenti nei controlli. La tabella 2 mostra invece che tra i tre gruppi di pazienti affetti da MC non sono emerse differenze statisticamente significative.

Analisi proteomica

L'espressione delle molecole sieriche di sHLA-G nei quattro gruppi di pazienti celiaci raggruppati insieme è risultata essere significativamente aumentata rispetto ai controlli (Figura 1). In particolare il valore mediano di concentrazione è risultato di 12.0 ng/mL (range 0.1-110.0 ng/mL) nei celiaci e di 4.3 ng/mL (range 0.2-115.4 ng/mL) nei controlli (test di Mann-Whitney, $p < 0.0001$).

L'espressione delle molecole sieriche sHLA-G è risultata essere invece assolutamente sovrapponibile nelle quattro diverse forme di MC che abbiamo studiato (Figura 2). In particolare, il valore mediano di concentrazione è risultato di 12.6 ng/mL nei celiaci potenziali (range 1.2-100.7 ng/mL), 11.2 ng/mL (range 0.1-101.6 ng/mL) nei celiaci non complicati e non trattati, 13.0 ng/mL (range 0.1-100.5 ng/mL) nei celiaci non complicati e trattati, e 13.6 ng/mL, (range 0.8-110.0 ng/mL) nei celiaci complicati (test di Kruskal-Wallis, $p = \text{NS}$).

Risultati molto interessanti sono stati invece ottenuti confrontando i livelli di sHLA-G nei 33 pazienti con MC non complicata studiati prima e dopo l'inizio della dieta aglutinata (Figura 3). I livelli di sHLA-G si sono infatti ridotti in maniera significativa una volta iniziata la dieta. In particolare si è passati da una mediana di 13.7 ng/mL (range 1.3-101.7 ng/mL) a una di 8.9 ng/mL (range 0.4-97.2 ng/mL) (test di Wilcoxon per dati appaiati, $p = 0.007$). Inoltre, nei pazienti che seguivano rigorosamente la dieta aglutinata i livelli di sHLA-G si sono ridotti del 39% mentre nei pazienti che non seguivano una rigorosa dieta aglutinata i livelli dell'sHLA-G sono rimasti stabili (+1.5%) (test di Mann-Whitney, $p = 0.038$).

Discussione

HLA-G è una molecola HLA-Ib non classica con numerose proprietà immunoregatorie, il cui ruolo è già stato studiato in alcune malattie gastroenterologiche, tra cui le malattie infiammatorie croniche intestinali e anche la MC [1-3, 6-9].

I risultati del nostro studio genomico dell'HLA-G sicuramente confermano e rafforzano quelli di un altro gruppo italiano [8]. Anche noi abbiamo infatti dimostrato che nei pazienti celiaci la frequenza del genotipo omozigote Ins/Ins è più frequente che nei controlli sani. Inoltre, noi abbiamo dimostrato che la frequenza del genotipo eterozigote Del/Ins è più frequente nei controlli.

Per quanto riguarda lo studio proteomico, abbiamo evidenziato che i pazienti celiaci presentano una concentrazione di sHLA-G sierica maggiore dei controlli. Questa non sembra presentare però delle differenze statisticamente significative nei quattro gruppi di MC che abbiamo studiato. Si potrebbe pertanto pensare che questo incremento dell'sHLA-G sia una caratteristica della MC, indipendente dal suo grado di attivazione. D'altra parte è anche possibile che questo uniformazione dei valori sia dovuta alla grande sovrapposizione dei valori stessi. Noi riteniamo che quest'ultima sia la spiegazione più verosimile. Infatti nei pazienti in cui abbiamo studiato la concentrazione dell'sHLA-G sia prima che

dopo l'inizio della dieta aglutinata abbiamo riscontrato una franca riduzione dei livelli. Inoltre, questa era massima nei pazienti che seguivano una rigorosa dieta aglutinata. I nostri risultati confermano pertanto in maniera speculare quelli di Torres et al che avevano notato un'aumentata concentrazione di sHLA-G nei pazienti che non seguivano una rigorosa dieta aglutinata [9].

Uno degli obiettivi del nostro lavoro era quello di verificare se la riduzione della concentrazione dell'sHLA-G potesse essere utilizzata come marker di aderenza alla dieta aglutinata. Considerata la grande dispersione dei risultati ottenuti, noi riteniamo di poter dire che la concentrazione dell'sHLA-G come tale non possa essere utile in tal senso. Abbiamo però visto che nei pazienti che seguivano una rigorosa dieta aglutinata si è verificata una riduzione media del 39%. Si potrebbe pertanto pensare di eseguire il dosaggio dell'sHLA-G sia prima che dopo l'inizio della dieta aglutinata in maniera tale da verificare un'eventuale discesa della concentrazione. È chiaro però che prima di utilizzare un test di questo tipo in un singolo paziente, un numero molto maggiore di pazienti celiaci dovrà essere studiato per garantire la potenza statistica di uno studio di questo tipo.

Tabelle e figure

Tabella 1. Frequenza dei tre genotipi dell'HLA-G 14bp Del/Ins nei pazienti affetti da malattia celiaca (tutte le forme di malattia celiaca raggruppate insieme) e nei controlli (Abbreviazioni: MC= malattia celiaca; Del= delezione; Ins= inserzione; NS= non significativo).

	Del/Del	Del/Ins	Ins/Ins
MC	44/155 (0.28)	61/155 (0.39)	50/155 (0.32)
Controlli sani	71/258 (0.27)	152/258 (0.58)	35/258 (0.13)
test del Chi2	p=NS	p<0.001	p<0.0001

Tabella 2. Frequenza dei tre genotipi dell'HLA-G 14bp Del/Ins nelle tre forme di malattia celiaca studiate e nei controlli (Abbreviazioni: MC= malattia celiaca; Del= delezione; Ins= inserzione; NS= non significativo).

	Ins/Ins	Del/Ins	Del/Del
MC potenziale	8/18 (0.44)	8/18 (0.44)	2/18 (0.11)
MC	37/118 (0.31)	45/118 (0.38)	36/118 (0.30)
MC complicata	5/19 (0.26)	8/19 (0.42)	6/19 (0.31)
test del Chi2	p=NS	p=NS	P=NS

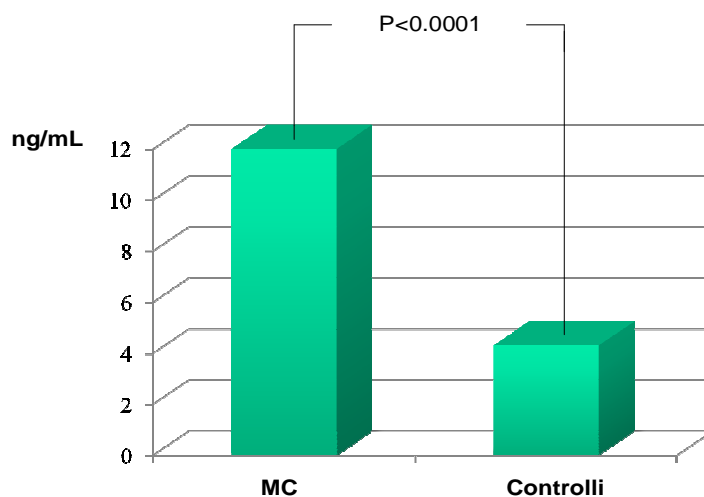


Figura 1. Livelli di sHLA-G nei pazienti celiaci e nei controlli.

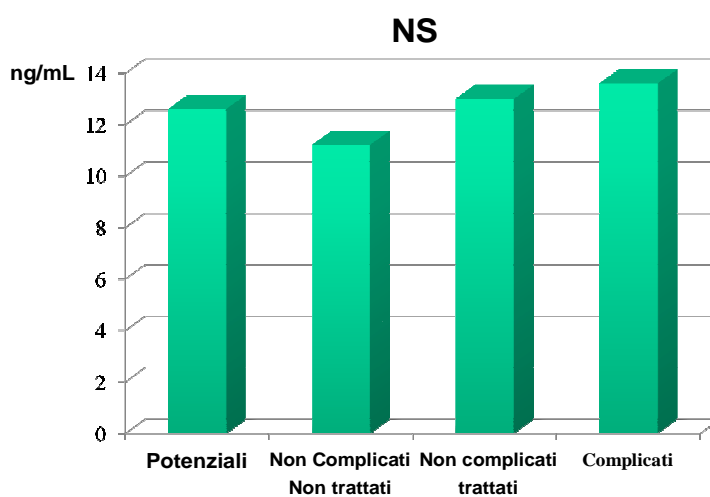


Figura 2. Livelli di sHLA-G nei 4 gruppi di pazienti celiaci studiati.

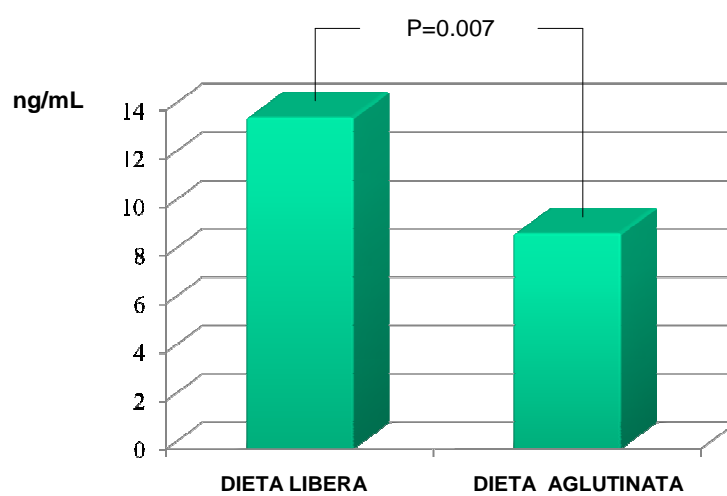


Figura 3. Livelli di sHLA-G in 33 pazienti con malattia celiaca non complicata prima e dopo la dieta aglutinata.

Bibliografia

1. Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 2008;29:313-321.
2. Larsen MH, Hviid TV. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Hum Immunol* 2009;70:1026-1034.
3. Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L et al. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol* 2006;67:53-62.
4. Pistoia V, Morandi F, Wang X et al. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* 2007;17:469-479.
5. Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 2008;29:125-132.
6. Downs-Kelly E, Schade AE, Hansel DE. The role of HLA-G in gastrointestinal inflammatory disease and malignancy. *Semin Cancer Biol* 2007;17:451-458.
7. Baricordi OR, Stignani M, Melchiorri et al. HLA-G and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008;7:67-74.
8. Fabris A, Segat L, Catamo E et al. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2011;106:139-144.
9. Torres MI, López-Casado MA, Luque J et al. New advances in coeliac disease: serum intestinal expression of HLA-G. *Int Immunol* 2006;18:713-718.
10. Biagi F, Corazza GR. Mortality in celiac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;158-162.
11. Stewart K, Willoughby JM. Postnatal presentation of coeliac disease. *BMJ* 1988;297:1245.
12. Greco L, Corazza GR, Babron MC et al. Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:669-675.
13. Biagi F, Bianchi PI, Vattiato C et al. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on Severity in Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46:46-50.
14. Biagi F, Corazza GR. The contribution of molecular genetics to gastroenterology: the case of coeliac disease. *It J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:202-204.
15. Martinetti M, Biagi F, Badulli C et al. The HLA alleles DRB1*13 and DQB1*06 are associated to Whipple's disease. *Gastroenterology* 2009;136:2289-2294.
16. Biagi F, Badulli C, Feurle GE et al. Cytokine genetic profile in Whipple's disease. *Eur J Clin Microbiol* 2013;in press.
17. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai J et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 2013; in press.
18. Malamut G, Afchain P, Verkarre V et al. Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II. *Gastroenterology* 2009;136:81-90.
19. Al-Toma A, Verbeek WH, Hadithi M et al. Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience. *Gut* 2007;56:1373-1378.
20. Daum S, Ipczynski R, Schumann A et al. High rates of complications and substantial mortality in both types of refractory sprue. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:66-70.