



**Programa de Doctorado en Ciencias de la  
Salud**

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA SEROLÓGICA  
A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B EN  
PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA Y  
DIABETES MELLITUS TIPO 1**

**Autor: María José Pérez Rodríguez**

**Directores: Doctora Cristina Camarero Salces  
Doctora Garbiñe Roy Ariño**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directoras de tesis por su apoyo y entusiasmo durante la realización de este trabajo. En especial, quiero agradecerle a Cristina el haber confiado en mí para llevar a cabo este maravilloso estudio. Una gran profesora me inculcó el amor a la pediatría e hizo que comenzara este viaje. Conocer a Cristina supuso un estímulo para intentar mejorar día a día. Desde que te conocí, hace casi 20 años, siempre he pensado "de mayor quiero ser como tú".

A mis padres por estar siempre a mi lado y educarme en la bondad y el trabajo, los dos grandes valores que me han acompañado toda mi vida.

A mis hermanas, permanente fuente de estímulo para mejorar y progresar. En especial a Estrella por sus grandes consejos lingüísticos y su apoyo permanente.

A Enrique, por ser mi amado y mi amante, por confiar en mi capacidad, alentarme a mejorar y acompañarme siempre, en la salud y en la enfermedad.

A mis hermosas hijas que crecen cada día en belleza, bondad y generosidad. Gracias por quererme tanto y por todas esas veces que me decís: "mamá, eres la mejor".

## Dedicado a mis hijas

A Elena: has aprendido que si te esfuerzas puedes alcanzar casi todo aquello que te propongas. Que esto sea una demostración más de que con esfuerzo todo es posible. No lo dudes, puedes llegar tan alto como te lo propongas.

A Ana: desde tu primer segundo de vida luchaste por sobrevivir. Con tus mil gramitos me enseñaste que la fortaleza no está en el tamaño sino el carácter. Sigues peleando cada día y enseñándome a mí a hacerlo.

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

- Anticuerpos antiendomiso: AAE
- Anticuerpos antigliadina : AAG
- Anticuerpos frente a péptidos de gliadina: anti- PDG
- Anticuerpos frente al antígeno de superficie del virus B: anti-HBs
- Antígeno HBs: HBsAg
- Antígeno leucocitario humano: HLA
- Antitransglutamina tisular: tTG
- Células presentadoras de antígenos: CPA
- Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)
- Enfermedad celíaca: EC
- Hemoglobina (HB)
- Inmunoglobulina: IG
- Interferón gamma: INF $\gamma$
- Interleucina: IL
- Linfocitos intraepiteliales: LIE
- Lactancia materna: LM
- Natural killer: NK
- Organización Mundial de la Salud: OMS
- Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición  
Pediátrica (EPSGHAN)
- Transglutaminasa-2: TG2
- Virus de la hepatitis B: VHB

# **ÍNDICE**

<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	1
<b>ÍNDICE</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	8
<b>1. LA ENFERMEDAD CELÍACA</b>	11
<b>1.1. HISTORIA</b>	12
<b>1.2. EPIDEMIOLOGÍA</b>	13
<b>1.3. PATOGÉNESIS</b>	15
<b>1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>	25
<b>1.4.1. Enfermedad celíaca asintomática</b>	28
<b>1.4.2. Enfermedad celíaca subclínica</b>	29
<b>1.4.3. Enfermedad celíaca potencial</b>	30
<b>1.4.4. Enfermedades asociadas</b>	30
<b>1.5. DIAGNÓSTICO</b>	32
<b>1.5.1. Test serológicos</b>	33
<b>1.5.2. Biopsia intestinal</b>	35
<b>1.5.3. Protocolo diagnóstico</b>	44
<b>1.5.4. Diagnóstico diferencial</b>	45
<b>1.6. TRATAMIENTO</b>	46

<b>1.6.1. Nuevos tratamientos</b>	48
<b>1.7. PREVENCIÓN</b>	48
<b>1.7.1. Lactancia materna (LM)</b>	49
<b>1.7.2. Cantidad de gluten y momento de introducción</b>	51
<b>1.7.3. Otras medidas preventivas</b>	52
<b>2. LA DIABETES MELLITUS TIPO 1</b>	53
<b>2.1. PATOGÉNESIS</b>	53
<b>2.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>	54
<b>2.3. COMPLICACIONES</b>	56
<b>2.4. ENFERMEDADES ASOCIADAS</b>	57
<b>2.5. TRATAMIENTO</b>	58
<b>3. LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B</b>	60
<b>3.1. LA PROTECCIÓN FRENTE AL VIRUS B A LARGO PLAZO</b>	62
<b>3.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B EN LA ENFERMEDAD CELÍACA.</b>	62
<b>3.3. RESPUESTA FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 1</b>	67
<b>3.4. RESPUESTA FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B EN OTRAS ENFERMEDADES</b>	70

4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	71
<b>OBJETIVOS</b>	75
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	76
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	77
1. SUJETOS DE ESTUDIO	77
1.1. GRUPO DE PACIENTES	77
1.2. GRUPO DE CONTROLES	78
2. MÉTODOS	80
2.1. GRUPO DE PACIENTES	80
2.2. GRUPO DE CONTROLES	85
2.3. REQUISITOS ÉTICOS DEL ESTUDIO	85
2.4. RECOGIDA DE DATOS	86
2.5. ANALISIS DE DATOS	86
2.6. NOMENCLATURA	87
<b>RESULTADOS</b>	88
1. ESTUDIO DESCRIPTIVO	88
1.1. DISTRIBUCIÓN POR SEXO	88

1.2. DISTRIBUCIÓN POR EDAD	90
1.3. RESPUESTA SEROLÓGICA A LA VACUNA DEL VHB	93
1.4. ESTUDIO GENÉTICO	94
2. ESTUDIO ANALÍTICO	96
2.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA VACUNACIÓN CON LOS TÍTULOS DE ANTI-HBS	96
2.2. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA A LA VACUNA DEL VHB ENTRE LOS GRUPOS DIAGNÓSTICOS	101
2.3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA RESPUESTA A LA VACUNA Y LOS HAPLOTIPOS HLA	109
2.4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL RECUENTO DE IEL, GD Y CD3- EN LAS MUESTRAS DE BIOPSIA INTESTINAL DE LOS PACIENTES CELÍACOS Y LA RESPUESTA A LA VACUNA DEL VHB	115
2.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN EXISTENTE ENTRE EL TIEMPO QUE HA DURADO LA INGESTA DE GLUTEN EN LOS PACIENTES CELÍACOS Y LOS TÍTULOS DE ANTI-HBS	116
2.6. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA A UN "BOOSTER" DE VACUNA	118
3. GRUPO DE PACIENTES CELÍACOS Y DIABÉTICOS	119



<b>DISCUSIÓN</b>	121
1. CONSIDERACIONES GENERALES	121
2. FORTALEZAS Y LIMITACIONES METODOLÓGICAS	123
3. CARACTERÍSTICAS POBLACIONES	127
4. RESPUESTA SEROLÓGICA A LA VACUNA DEL VHB	128
5. IMPLICACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS HLA EN LA CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DEL VHB	148
6. RELACIÓN ENTRE EL INMUNOFENOTIPO DE LOS LIE DE LA MUCOSA INTESTINAL Y LA CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DEL VHB	150
7. IMPLICACIÓN DEL GLUTEN EN LA CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DEL VHB	152
8. ESTRATEGIA VACUNAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA	157
9. IMPLICACIONES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS DEL ESTUDIO	163

10. SUGERENCIAS PARA PRÓXIMOS ESTUDIOS	165
<b>CONCLUSIONES</b>	168
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	169

## **INTRODUCCIÓN**

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) representa un importante problema de salud a nivel mundial, siendo responsable de una alta morbilidad y mortalidad. Afecta a más de 350 millones de personas en el mundo y causa enfermedad aguda y crónica del hígado, cirrosis y carcinoma hepatocelular (1). La introducción de una vacuna altamente efectiva y segura frente al virus es considerada como la principal estrategia para el control de la infección y evitar la transmisión del virus (2), reduciéndose de esta manera sus secuelas a largo plazo a escala global, tanto en términos de coste-efectividad como de coste-beneficio.

La vacuna frente al VHB fue introducida a principios de 1980 para su uso en individuos con alto riesgo de adquirir la infección. Desde 1991 la OMS recomienda la vacunación rutinaria de la población y, de acuerdo con ello, la vacunación universal se ha implantado actualmente en 168 países del mundo, con un destacado historial de seguridad y eficacia (2). La aplicación efectiva de dichos programas de vacunación se ha traducido en una disminución sustancial de la carga de la enfermedad, de la tasa de portadores de hepatitis B, así como de la morbilidad y mortalidad. En nuestro país la vacuna está incluida en el calendario de vacunación infantil y, desde 1996, se administra la primera dosis en los primeros días de vida, con 3 dosis de recuerdo a los 2, 4 y 6 meses de edad.

Calendario vacunal de la Comunidad de Madrid:

Vacunas	0m	2m	4m	6m	12m	18m	4a	6a	12a	14a
Hepatitis B	HB	HB		HB						
Difter. Tét. Tos		DTPa	DTPa	DTPa		DTPa		Tdpa		Tdpa
Polio inyect.		VPI	VPI	VPI		VPI				
Haem. infl. b		Hib	Hib	Hib		Hib				
Meningoc. C		MenC	MenC		MenC				MenC	
Triple vírica					SRP		SRP			
Varicela									Var <sup>1</sup>	
Papilomavirus										VPH

Desde la introducción de esta vacuna se han realizado numerosos estudios epidemiológicos a nivel mundial para evaluar su eficacia, considerándose que niveles de anticuerpos específicos  $\geq 10$  IU/L son protectores frente a la enfermedad (4-6). Aproximadamente entre el 4 y el 10% de los individuos sanos no desarrollan anticuerpos frente al VHB tras recibir la pauta completa de vacunación (7, 8). Los mecanismos exactos de esta falta de respuesta aún no están completamente aclarados. Se sabe que muchos factores no genéticos como la edad, la obesidad, el tabaquismo, la drogadicción, el

alcoholismo, las infecciones, la inmunodepresión y la vía de la vacunación están asociados con la falta de respuesta. El antígeno leucocitario humano (HLA) es considerado el marcador genético más importante de la no respuesta a la vacuna (9-12).

## 1. LA ENFERMEDAD CELÍACA

La enfermedad celíaca (EC) es un trastorno sistémico mediado inmunológicamente, desencadenado por el gluten y prolaminas relacionadas en individuos genéticamente susceptibles, y caracterizado por la presencia de una combinación variable de manifestaciones clínicas gluten-dependientes, anticuerpos específicos, haplotipos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 y enteropatía.

Las prolaminas son la fracción proteica y soluble en alcohol del gluten, un componente importante de algunos de los cereales más comunes en la dieta de occidente: trigo, centeno, avena y cebada. En los pacientes celíacos la ingestión de gluten induce una respuesta inflamatoria crónica en el tracto gastrointestinal, que desencadena la producción de autoanticuerpos específicos. Se trata de una enfermedad sistémica que afecta de manera primaria al tracto gastrointestinal, pero que puede afectar al hígado, la piel, las articulaciones, los órganos reproductivos, el sistema nervioso central y el corazón. Los pacientes desarrollan grados variables de inflamación intestinal, que va desde la simple linfocitosis intraepitelial hasta una masiva infiltración de la lámina propia, que conduce a la atrofia vellositaria y la hiperplasia de las criptas (13).

## 1.1. HISTORIA

El físico griego Arateus describió por primera vez la EC en el siglo 1 después de Cristo. En 1887 es descrita con mayor precisión y nombrada afección celíaca por Samuel Gee, que también fue el primero en reconocer la necesidad de un tratamiento dietético de por vida (14). Durante la segunda guerra mundial se produjo un avance crucial en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, al observarse que los niños celíacos holandeses mejoraron durante la época de escasez de pan y recayeron cuando este alimento volvió a sus dietas. En los años 50, con el inicio de las biopsias intestinales, se describió que la atrofia vellositaria y la hiperplasia de las criptas del intestino delgado eran los hallazgos patológicos fundamentales de la enfermedad. Posteriormente se demostró que la eliminación del gluten de la dieta llevaba a la total recuperación de la mucosa intestinal (15).

Aunque estamos ante una enfermedad típicamente pediátrica, hoy sabemos que puede debutar en cualquier momento de la vida. Los pacientes con síntomas no digestivos pueden pasar años sin ser diagnosticados.

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La EC se distribuye por todo el mundo con las mayores tasas de prevalencia en el Sahara occidental (5,6%), seguido de Escandinavia, Oriente Medio, India y el Norte de África. La prevalencia estimada en Europa y Estados Unidos es del 1% (16). Es la enfermedad crónica gastrointestinal más prevalente en los caucásicos y una de las enfermedades gastrointestinales más comunes en todo el mundo con una estimación de 20-30 millones de personas afectas a nivel mundial. Existen al menos dos estudios que muestran un aumento en la prevalencia de la enfermedad con el paso del tiempo (17, 18). Además, existen muchos pacientes que aún no han sido diagnosticados. La prevalencia de la enfermedad parece aumentar con la edad, ya que un estudio reciente realizado en Finlandia (19) mostró una prevalencia de 1:47 en los mayores de 52 años. Esto convierte a la EC en una de las patologías genéticamente determinadas más prevalentes de la raza humana. La prevalencia entre los familiares de primer grado de los pacientes celíacos es del 10%. La tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos, en comparación con la de los dicigóticos, es del 86% frente al 20% (20).

Está descrita la asociación entre EC y otras enfermedades como el síndrome de Down (4-15%), la diabetes mellitus tipo 1 (3-8%), el síndrome de Turner, síndrome de Williams, el déficit selectivo de IgA (10%), la enfermedad de Addison, la tiroiditis autoinmune, alopecia areata, cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmune (21, 22). Por



otro lado, los pacientes con EC no diagnosticada y no tratada tienen mayor riesgo de desarrollar linfoma intestinal de células T, adenocarcinoma de intestino delgado y otros cánceres del aparato digestivo (16).

Recientemente se ha introducido el concepto de "iceberg celíaco" debido a que, a pesar de la alta prevalencia de la enfermedad, un número aún mayor de pacientes permanecen sin diagnosticar. En los países desarrollados se piensa que por cada paciente diagnosticado existen 5-10 que no han sido diagnosticados con síntomas escasos o atípicos. La punta del iceberg está formada por aquellos pacientes que presentan síntomas y daño de la mucosa intestinal. Justo por debajo se sitúan aquellos pacientes que están asintomáticos, pero en los que existe daño de la mucosa intestinal (los llamados celíacos asintomáticos). El fondo del iceberg está formado por los denominados celíacos potenciales, que son aquellos en los que existen marcadores genéticos y autoinmunes de celiaquía, pero cuya mucosa intestinal es normal (16).

Más del 80% de los sujetos con test de screening positivo para EC tienen formas subclínicas, presentan poca clínica o manifestaciones no digestivas. La EC subclínica y asintomática se asocia con anemia, osteoporosis y una disminución de la calidad de vida; frecuentemente se solapa con la EC atípica, que se caracteriza por clínica extradigestiva como artritis, infertilidad, hipertransaminasemia (23-27). Es más, la sensibilidad al gluten con

normalidad intestinal o la simple presencia de anticuerpos antigliadina se ha asociado a diferentes patologías neurológicas o psiquiátricas como la ataxia cerebelosa, neuropatía periférica, esquizofrenia o autismo (28-31). La clínica que presentan estos pacientes mejora al eliminar el gluten de la dieta.

### **1.3. PATOGÉNESIS**

La EC es una enteropatía inflamatoria crónica, multifactorial, que implica al sistema inmune nativo y adaptativo con tres hechos principales:

- Asociación con los antígenos humanos leucocitarios (HLA) de tipo II DQ2 o DQ8.
- Presencia de anticuerpos específicos frente al enzima transglutaminasa tisular tipo-2 (autoanticuerpos).
- Aumento de linfocitos intraepiteliales (LIE) innatos TcR $\gamma\delta$ .
- Remisión completa del proceso cuando se sigue una dieta estricta sin gluten.

#### **1.3.1. Gluten: el desencadenante ambiental de la enfermedad**

Las propiedades viscoelásticas del gluten son esenciales para la formación de harina, y le dan al pan de trigo su textura y sabor únicos. Por ello, el gluten es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, no sólo en productos relacionados con harinas, sino

también como parte de diferentes salsas, sopas e incluso de medicamentos. La ingesta estimada de gluten en una dieta normal de un país occidental se encuentra entre los 15 y los 20 gramos al día (32).

El gluten es una mezcla heterogénea de gliadinas y gluteinas en el trigo, o de proteínas similares en la cebada y el arroz. Tiene un alto contenido en los aminoácidos glutamina (30%) y prolina (15%). Su alto contenido en glutamina lo hace rico en nitrógeno, un factor esencial para la germinación de las semillas. El alto contenido en prolina lo hace muy resistente a la degradación por las enzimas gastrointestinales, haciendo posible que grandes péptidos inmunogénicos del gluten alcancen la superficie de la mucosa intestinal (33, 34).

### **1.3.2. HLA-DQ: el locus genético asociado con más fuerza a la enfermedad por ahora**

La fuerte influencia genética que presenta la enfermedad es evidente. La mayor influencia genética está determinada por los HLA. Fue señalada por primera vez por varios estudios realizados en los años 70 (35, 36) en los que se describía la predominancia del HLA-B8 y HLA-DR3 en estos pacientes. Estudios posteriores establecieron que la asociación más fuerte tenía lugar con las moléculas de HLA-DQ2 (DQA\*A0501, DQB\*0201, llamados DQ2.5), que son codificadas en asociación con los alelos HLA-B8 y HLA-DR3 (37). La fuerte

asociación entre la enfermedad celíaca y el HLA-DQ2.5 la demuestra el hecho de que los individuos homocigotos para HLA-DQ2.5 tienen un riesgo 5 veces mayor de desarrollar EC que los individuos heterocigotos para el HLA-DQ2.5 (38).

Existen otras variantes HLA-DQ2 que no predisponen a la EC debido a sus propiedades de unión peptídica. El riesgo atribuido al HLA-DQ2 y HLA-DQ8 en el desarrollo de la enfermedad se estima cercano al 35% (39).

No todos los individuos HLA-DQ2.5 y HLA-DQ8 desarrollan la EC, lo que indica que estos genotipos son necesarios, pero no suficientes para el desarrollo de la enfermedad. Estudios recientes a gran escala sobre la asociación genética en la EC han identificado otros muchos *loci* genéticos adicionales con una pequeña contribución en el riesgo de desarrollo de la EC. La mayoría de estos genes codifican proteínas involucradas en la inmunidad, lo que apoya la noción de la EC como enfermedad relacionada con el sistema inmunológico (32).

### **1.3.3. La respuesta inmune adaptativa: gluten, HLA-DQ y células T CD4+ determinan la respuesta inmune específica a nivel de la lámina propia**

En los pacientes celíacos los péptidos derivados del gluten presentados por los alelos HLA-DQ2.5 o HLA-DQ8 inducen una respuesta de células T CD4+. Tanto el HLA-DQ2.5 como el HLA-DQ8

se unen preferentemente a péptidos con aminoácidos de cargas negativas en los puntos de anclaje. Sin embargo, los péptidos del gluten están desprovistos de cargas negativas, uniéndose pobremente a HLA-DQ2.5 y HLA-DQ8. En consecuencia, las células CD4 específicas para los péptidos nativos de gluten son raras. La enzima tisular tansglutaminasa 2 (TG2) puede modificar los péptidos del gluten de manera que puedan reunir criterios para unirse con gran afinidad a HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (40). La TG2 puede transformar la glutamina, no cargada, en ácido glutámico cargado negativamente mediante un proceso llamado deamidación. El alto contenido del gluten en glutamina y prolina lleva a la introducción de cargas negativas en los péptidos de gluten en posiciones favorables para su interacción con las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8; como resultado, el repertorio de células T CD4+ específicas para gluten aumenta sustancialmente, lo que favorece la inflamación y el desarrollo de la enfermedad (41).

La TG2 se encuentra principalmente dentro de la célula en forma inactiva y se activa cuando es liberada por el daño tisular (42,43). Es, por tanto, necesario un desencadenante del daño tisular que inicie la liberación de TG2 y lleve a la modificación de los péptidos de gluten. La presentación de los péptidos de gluten nativos por los HLA-DQ2 y HLA-DQ8 a los linfocitos T CD4+ conduce a la producción de interferón gamma (INF $\gamma$ ), lo que a su vez lleva a una mayor expresión de las moléculas HLA-DQ y, por tanto, a un

aumento en la presentación de los péptidos de gluten. En presencia de gluten esto se convertiría en un círculo de auto-amplificación que podría causar un daño tisular local limitado. A su vez, el daño tisular llevaría a la liberación de TG2, el cual modificaría los péptidos nativos de gluten convirtiéndolos en ligandos de alta afinidad para HLA-DQ2 y HLA-DQ8, y, por tanto, incrementaría la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup> específicas para gluten. El daño tisular se agravaría poniéndose en marcha un segundo círculo de auto-amplificación. De manera alternativa, diferentes procesos infecciosos del tracto gastrointestinal podrían generar un medio pro-inflamatorio, que llevaría a una pérdida de la tolerancia a los péptidos nativos de gluten, generando daño tisular simultáneamente e iniciando el proceso de deamidación mediado por la TG2 (32).

#### **1.3.4. Los linfocitos intraepiteliales activados dañan el epitelio intestinal: respuesta inespecífica frente al gluten**

Los linfocitos intraepiteliales (LIE) se localizan entre las células del epitelio intestinal en el lado basolateral. Se piensa que desempeñan un papel importante en la vigilancia inmunológica del epitelio. La población de LIE del intestino delgado es una mezcla de células T TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> y células linfoides no T con fenotipo natural killer (NK), con predominio mayoritario de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> (44).

En la EC activa el número de LIE  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ ,  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  está significativamente aumentado. Se desconoce si es debido a una respuesta a los cambios que se producen en la homeostasis del epitelio o si es consecuencia del medio pro-inflamatorio creado por la respuesta de las células T  $\text{CD4}^+$  en la lámina propia. En comparación con los de sujetos sanos, los LIE de los pacientes celíacos expresan un repertorio mayor de receptores de células NK activadas (45). En el intestino delgado sano los LIE expresan predominantemente el receptor inhibitor  $\text{CD94/NKG2A}$ . Por el contrario, en la EC los LIE expresan niveles altos de receptores activadores tipo NK como  $\text{CD94/NKG2C}$  y  $\text{NKG2D}$  (46). Simultáneamente, las células epiteliales intestinales en la EC regulan MIC y HLA-E, que son los ligandos para  $\text{NKG2D}$  y  $\text{CD94/NKG2C}$  respectivamente. La interacción de  $\text{NKG2D}$  y  $\text{CD94/NKG2C}$  con sus ligandos mejora la producción de  $\text{INF}\gamma$  e incrementa el potencial de histólisis de estos linfocitos, siendo los efectores del daño celular del epitelio. La interleucina (IL)-15 es un importante factor en la activación de estos linfocitos con receptores tipo NK (47). Además, la IL-15 puede modular la función de los mismos llevando a una citólisis mediada por estos receptores innatos, independiente de la especificidad TCR (46, 47).

En conclusión, mientras las células T  $\text{CD4}^+$  producen una respuesta inflamatoria específica frente al gluten en la lámina propia, los LIE del epitelio adquieren potencial citolítico y de secreción de

citocinas inflamatorias a través de la activación de los receptores del sistema inmune innato, contribuyendo al daño tisular típico de la EC.

### **1.3.5. El modelo para el riesgo de desarrollar EC**

La expansión del repertorio de péptidos de gluten debido a la liberación de TG2 es un paso crítico en la patogénesis de la EC. Existen diferentes líneas de evidencia que apoyan el hecho de que el nivel de presentación de gluten a las células T influye de manera crítica sobre el riesgo de desarrollar la enfermedad.

En primer lugar, los individuos homocigotos para HLA-DQ2.5 tienen un riesgo 5 veces mayor de desarrollar EC que los heterocigotos. Ello es debido a que la cantidad de genes se correlaciona directamente con la magnitud de la respuesta de células T CD4+. Las células presentadoras de antígenos (CPA) de los individuos homocigotos para HLA-DQ2.5 inducen una respuesta proliferativa de células T de gran magnitud, así como la producción de IFN- $\gamma$ , mientras que las CPA de los heterocigotos inducen respuestas mucho más débiles (48). Estos datos indican que el número de moléculas HLA-DQ2.5 capaces de presentar péptidos de gluten en la superficie de las CPA definiría la magnitud de la respuesta de células T CD4+.

En segundo lugar, mientras que el HLA-DQ2.5 se asocia con el desarrollo de la EC, su homólogo HLA-DQ2.2 no lo hace. Aunque estas dos variantes tienen un perfil semejante de unión peptídica, el



HLA-DQ2.2 sólo puede unirse a una parte de los péptidos a los que se une el HLA-DQ2.5, debido a que la prolina en posición 3 impide la unión (49). Por consiguiente, el HLA-DQ2.5 puede presentar un espectro mucho mayor de péptidos de gluten que el HLA-DQ2.2; además el HLA-DQ2.5 tiene mayor capacidad de retener a estos péptidos en sus lugares de unión (50). Como resultado de todo ello, la presentación de los péptidos de gluten por el HLA-DQ2.5 es más prolongada que la realizada por el HLA-DQ2.2, lo que aumenta las posibilidades de estimulación de células T CD4+.

En tercer lugar, la EC se asocia fundamentalmente con el HLA-DQ2.5 y en menor medida con el HLA-DQ8. Aunque se han identificado una gran variedad de péptidos de gluten que pueden estimular a las células T HLA-DQ8, existe un péptido  $\alpha$ -gliadina que parece ser inmunodominante, induciendo de manera invariable una respuesta específica de células T en los pacientes celíacos HLA-DQ8<sup>+</sup> (51). Los péptidos que interaccionan con las moléculas de HLA-DQ8 no derivan de una región rica en prolina y, por tanto, son más susceptibles de degradación en el tracto gastrointestinal. Así, mientras en su interacción con las moléculas de HLA-DQ2 una simple deamidación en los péptidos de gluten es suficiente para desencadenar una respuesta de células T CD4+, para la interacción con las moléculas de HLA-DQ8 es preferible una deamidación en dos posiciones (51), lo que limita la producción de péptidos de gluten con gran poder antigénico, disminuyendo el riesgo de desarrollo de la EC.

El nivel de presentación de gluten es, por tanto, un parámetro crítico para el desarrollo de la enfermedad. Este hecho también se pone de manifiesto desde un ángulo completamente diferente: la mayoría de los pacientes celíacos tolera la avena, aunque se ha comprobado que las moléculas parecidas al gluten que posee la avena pueden inducir respuesta de células T CD4+ en los enfermos celíacos (52); estas moléculas de avena contienen sólo dos secuencias antigénicas, mientras que en la cebada y el centeno se encuentran docenas de ellas. El consumo de avena representa una exposición mucho menor a péptidos antigénicos en comparación con otros cereales y es, aparentemente, bien tolerada, no llevando al desarrollo de la enfermedad en la mayoría de los pacientes.

Todos estos datos parecen indicar la existencia de un umbral para el desarrollo de la EC. Es más fácil que se desencadene cuando existe una mayor exposición de las células T a los antígenos de gluten. Esta exposición está influida por el tipo y la cantidad de moléculas presentadoras HLA-DQ, que son las que, en último término, determinan la eficiencia en la presentación de los péptidos de gluten a las células T CD4+. En los individuos HLA-DQ2.5 el umbral para el desarrollo de la enfermedad es superado con facilidad, mientras que en los HLA-DQ2.2+ y HLA-DQ8+ el umbral es mucho más alto.

### **1.3.6. El desarrollo de EC requiere una conjunción de factores**

Se sabe que individuos sanos pueden tener anticuerpos frente a los péptidos nativos de gluten. Como la respuesta de anticuerpos es controlada por las células T CD4+, estos individuos tienen con mayor probabilidad células T CD4+ específicas para péptidos nativos de gluten, lo que indica que la presencia de estas células T es, en general, insuficiente para superar el umbral de desarrollo de la EC. Esto supone que, en la mayoría de los individuos, los procesos de tolerancia y regulación intestinal mantienen la respuesta celular frente al gluten bajo control.

Este estado de equilibrio puede romperse por episodios repetidos de infecciones por enterovirus que llevan a la secreción de citoquinas inflamatorias y a la diferenciación de las células T helper (Th)1 (53), iniciando la respuesta al gluten. En consecuencia, el efecto combinado de un nivel alto de reactividad frente al gluten y un proceso inflamatorio inducido por patógenos intestinales puede llevar al daño tisular y a la liberación de TG-2. La actividad de la TG-2 generaría un gran repertorio de péptidos de gluten deamidados con alta afinidad por HLA-DQ, incrementando la respuesta de células T específicas para gluten. En este punto se pondrían en marcha los círculos de auto-amplificación: producción de IFN- $\gamma$  con amplificación de la respuesta específica frente al gluten de las células T. La TG-2 liberada por el daño tisular aumenta el repertorio de péptidos de gluten expuesto, incrementando el daño tisular. Debido a la expansión

masiva del pool de células T específicas para gluten, los procesos de regulación son incapaces de contener las respuestas de células T, perpetuando el daño. La eliminación del gluten de la dieta es el único medio de frenar el proceso.

#### **1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La EC tiene un amplio espectro de manifestaciones gastrointestinales y extraintestinales que, en general, varían con la edad (54). Los primeros síntomas suelen aparecer en los meses siguientes a la introducción del gluten en la dieta, habitualmente entre los 12 meses y los 3 años de edad (55), sin olvidar que la enfermedad puede activarse en cualquier momento de la vida a partir de la ingesta de gluten.

- Niños menores de 9 meses: cuando la EC se presenta en lactantes son frecuentes los vómitos, la diarrea es severa con exacerbaciones importantes y el deterioro nutricional rápido. Esta forma de presentación es muy infrecuente en la actualidad.

- Niños menores de 5 años: un elevado número de pacientes debuta en este período de la vida, especialmente alrededor de los 2 años. Son niños que, estando previamente bien, gradualmente tienen cambios en las heces (que se hacen más abundantes, fétidas y frecuentes), presentan distensión abdominal, disminución del apetito y enlentecimiento o aplanamiento de la curva ponderal. Las

alteraciones emocionales son comunes: los niños se hacen irritables, caprichosos y antipáticos, no se separan de la madre y tienden a aislarse de su entorno. La anemia y/o ferropenia son frecuentes. A veces la EC no debuta con diarrea sino con estreñimiento. En ocasiones la enfermedad parece tener un comienzo brusco y no gradual porque una gastroenteritis aguda infecciosa que incide en un intestino ya afectado por la enteropatía no se resuelve y se prolonga, facilitando que la EC se manifieste. Cuando la enfermedad no se trata en sus etapas iniciales, el deterioro progresa hasta una diarrea franca con anorexia marcada y desnutrición.

Estas presentaciones de la enfermedad son descritas con frecuencia como enfermedad celíaca clásica

- Niños mayores de 5 años: cada vez se diagnostican con más frecuencia pacientes que no fueron identificados en los primeros años de vida porque sus síntomas eran leves, y pasaron inadvertidos o no fueron correctamente interpretados. Las manifestaciones clínicas de la EC a estas edades son muy variables y pueden agruparse en digestivas y extradigestivas

Las manifestaciones digestivas más frecuentes son:

- diarrea o despeños diarreicos intermitentes.
- dolor abdominal, flatulencia, distensión abdominal.
- estreñimiento.
- aftas orales, glositis.
- prolapso rectal.

Otros pacientes presentan manifestaciones clínicas extradigestivas:

- La ferropenia es la alteración no digestiva más frecuente en los celíacos. La detección de una anemia y/o ferropenia en el niño, especialmente cuando no se justifica por otras causas y no responde al tratamiento con hierro oral, obliga a investigar la presencia de la EC.
- Está demostrado que la dermatitis herpetiforme es una manifestación cutánea de la EC. Con frecuencia, estos pacientes, aunque portadores de la enteropatía celíaca, no tienen otros síntomas de la enfermedad.
- Existe un incremento de los defectos del esmalte en la dentición definitiva de los pacientes celíacos. Los cambios asociados a la EC se distribuyen en los 4 cuadrantes de la dentición y consisten en coloración amarillenta o cremosa, u opacidades parduscas, surcos lineales y pequeños huecos poco profundos. Las alteraciones más precoces afectan a los incisivos.
- La densidad mineral ósea y la masa ósea total están disminuidas en los celíacos y son recuperables cuando el retraso diagnóstico no es excesivo.
- La talla baja puede ser el síntoma primario de una EC y es una causa más frecuente de retraso estatural que el déficit de la hormona de crecimiento (GH). El patrón endocrinológico generalmente incluye retraso en la edad ósea, normalidad en la

respuesta de la GH a las pruebas de estímulo y niveles bajos de IGF-1.

- La elevación aislada de aminotransferasas, descrita inicialmente en celíacos adultos, también puede estar presente en los pacientes pediátricos y se corrige con una dieta sin gluten. En muchas ocasiones estos pacientes no tienen otros síntomas.
- La anorexia y la pérdida de peso, inexplicables por otras causas, pueden ser secundarias a una EC.
- Aunque se suele pensar que los celíacos tienen deterioro ponderal, algunos asocian obesidad. El exceso de peso en un paciente no descarta una posible EC.

#### **1.4.1. Enfermedad celíaca asintomática**

Se define como la presencia en un paciente de anticuerpos específicos de la EC y enteropatía celíaca, pero sin síntomas y signos suficientes para suscitar la sospecha clínica, a pesar de un interrogatorio dirigido a su búsqueda.

Este patrón de la EC se reconoció en estudios poblacionales de prevalencia de la enfermedad en los que se identificaron celíacos sin manifestaciones clínicas. De manera similar, el despistaje de la enfermedad en los grupos de riesgo también ha demostrado la existencia de pacientes con estas características, que hubieran pasado inadvertidos si no hubieran sido objeto de esa investigación.

### **1.4.2. Enfermedad celíaca subclínica**

En algunos pacientes aparentemente asintomáticos, una historia clínica rigurosa y dirigida a la búsqueda de determinados síntomas pone de manifiesto algunas alteraciones. Las más comunes son cambios en la conducta, como irritabilidad o mal rendimiento escolar, fatiga o astenia crónica, poca resistencia al ejercicio, ferropenia y reducción de la mineralización ósea. Otros pacientes, aparentemente asintomáticos, refieren una notable mejoría en el bienestar psíquico y físico cuando son diagnosticados y se suprime el gluten de la dieta. Estos individuos no pueden ser considerados asintomáticos sino portadores de una enfermedad subclínica.

La EC asintomática y subclínica es muy prevalente. Se estima que, en los países desarrollados, por cada paciente diagnosticado hay cinco sin diagnosticar. En su mayoría son celíacos con enfermedad asintomática, quienes, al no ser diagnosticados, continúan ingiriendo gluten y están expuestos a complicaciones a largo plazo como talla baja, infertilidad, osteoporosis o cáncer.

El conocimiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la EC permite identificar a estos pacientes y evitar el riesgo de que sufran complicaciones a corto y largo plazo (56).



### **1.4.3. Enfermedad celíaca potencial**

Se define por la presencia de anticuerpos específicos de la EC, pero sin atrofia vellosa en la biopsia duodenal. Alguno de ellos tiene cambios en los LIE, especialmente en las subpoblaciones  $\gamma\delta$  e i-NK (57). Estos pacientes pueden o no desarrollar enteropatía celíaca posteriormente.

### **1.4.4. Enfermedades asociadas**

Muchas enfermedades ocurren en asociación con la enfermedad celíaca. La EC se asocia a la diabetes mellitus tipo I, aunque la mayoría de los niños tienen una presentación silente y es necesario un screening anual para su detección en casi todos los casos (58). Los pacientes pediátricos y adultos con EC parecen tener un riesgo aumentado de sepsis, especialmente por neumococo (59). El riesgo de linfoma no Hodgkin es mayor en los pacientes celíacos así como entre individuos con un hermano afecto de EC (60).

La disfunción neurológica puede ser la única manifestación de la sensibilidad al gluten. Los anticuerpos antitransglutaminasa son prevalentes en la ataxia por gluten y pueden servir de marcador de este proceso (61). La prevalencia de depresión es mayor en pacientes que asocian EC y diabetes mellitus (62).

Los pacientes adultos con EC tienen 70 veces más riesgo de presentar colitis microscópica que la población general. Estos sujetos

pueden precisar tratamiento con corticoides e inmunosupresores para controlar la diarrea, y pueden presentar una atrofia vellosa más grave (63).

El aumento del riesgo de enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus, la tiroiditis y la artritis reumatoide no se limita a los pacientes celíacos, sino que también está presente en sus familiares de primer grado (64).

En un estudio realizado por Frost y cols. (65) en pacientes con síndrome de Turner, la prevalencia de la EC fue del 2.8%. Por otro lado, Ford y cols. (66), tras realizar una revisión sistemática y un meta-análisis, demostraron que la prevalencia de la EC en pacientes con el síndrome del intestino irritable fue más de 4 veces superior a la de los controles.

En la siguiente tabla se resumen las enfermedades asociadas a la EC que se detectaron en 1010 niños (55):

ENFERMEDAD	Nº PACIENTES	ENFERMEDAD	Nº PACIENTES
Déficit selectivo de IgA	37	Enfermedad cardíaca	3
Diabetes mellitus	32	Enfermedades tiroideas	
Asma bronquial	6	Fibrosis quística	3
Psoarisis	6	Alveolitis fibrosante	3
Hepatitis crónica activa	6	Acidosis tubular renal	1
Epilepsia	6	Degeneración	
Vitiligo	4	espinocerebelosa	1
Síndrome de Down	3		
		<b>Total</b>	<b>146</b>

### 1.5. DIAGNÓSTICO

Desde la descripción del espectro de afectación de la mucosa intestinal y la disponibilidad de test genéticos y marcadores serológicos, se ha vivido un cambio sustancial en el diagnóstico de la EC (67). Además, no es precisa la presencia de una atrofia absoluta de la mucosa intestinal con ausencia de vellosidades, si están presentes otros datos histológicos compatibles, junto con la positividad de los marcadores serológicos, en un paciente con susceptibilidad genética (68).

### 1.5.1. Test serológicos

Se basan en la detección de anticuerpos de isotipo de inmunoglobulina (Ig) A, que incluye anticuerpos antigliadina, antireticulina, antiendomiso y antitransglutaminasa tisular (tTG). En la mayoría de los pacientes la positividad de estos test apoya el diagnóstico, siendo muy útiles para el screening y seguimiento de los pacientes.

**a) Anticuerpos antigliadina (AAG):** fueron los primeros en desarrollarse, al comienzo de los años 80. Se mide IgA e IgG antigliadina. Los anticuerpos de clase IgA tienen una sensibilidad similar, pero una especificidad mucho mayor a los IgG (69-71): 90% frente a un 80% para los IgG.

El 2% de los pacientes presenta un déficit selectivo de IgA (frente a sólo el 0,2% de la población general), por lo que es recomendable medir el nivel de IgA total a la vez que se realiza el estudio serológico, y recurrir a los anticuerpos IgG en estos pacientes.

**b) Anticuerpos antiendomiso (AAE):** fueron desarrollados a mediados de los años 80. Presentan una alta sensibilidad (95%) y especificidad (99%) (72), pero son más caros y difíciles de estandarizar que los AAG. Su determinación se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de esófago de mono. En los centros con gran experiencia con AAE continúa siendo la técnica de confirmación.

**c) Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (tTG):**

desarrollados al final de los años 90. Presentan una sensibilidad mayor (98%) y una especificidad parecida a los AAE (99%) (70,71). La determinación de IgA anti-tTG se ha convertido en el test de elección para el diagnóstico y la monitorización de la EC en la mayoría de los países. Al igual que sucede con los AAG, en caso de déficit de IgA pueden aparecer falsos negativos, por lo que debe recurrirse a los IgG anti-tTG, que presentan una menor sensibilidad (70%) y especificidad (95%).

**d) Anticuerpos frente a péptidos de gliadina (anti-PDG):**

se basan en la conversión de determinados péptidos de gluten en péptidos deamidados por acción de la tTG intestinal. Dependiendo de la población estudiada, la IgA anti-PDG puede mostrar la misma sensibilidad y especificidad que la IgA anti-tTG (73, 74). Sin embargo, en los casos de déficit de IgA en los que la IgG anti-tTG muestra una baja sensibilidad, la IgG anti-PDG presenta sensibilidades mayores del 80% y una especificidad mayor del 95% (74-76).

En niños menores de 2 años los test serológicos son menos sensibles (72). En estos pacientes se ha sugerido que la determinación de AAG y anti-PDG ofrece la mayor sensibilidad para el diagnóstico (77-79).

La positividad serológica generalmente se relaciona con el grado de daño de la mucosa intestinal, aunque puede encontrarse una mínima lesión histológica, con linfocitosis intraepitelial, con marcadores negativos (68). En paralelo con estos hallazgos, otros estudios (80, 81) han demostrado que títulos altos de anticuerpos anti-tTG (>100 unidades) predicen un alto grado de atrofia vellositaria. En conjunto, todos estos hallazgos indican que un resultado serológico negativo no es suficiente para descartar una EC con una lesión tipo 1 de Marsh.

La determinación de los antígenos HLA sirve para detectar la susceptibilidad de padecer la EC. En el 90-95% de los pacientes se encuentra HLA-DQ2; la mayoría de los restantes se asocia con HLA-DQ8. Como estos alelos HLA se encuentran en casi el 40% de la población general, su presencia no influye directamente en el diagnóstico, pero su ausencia prácticamente excluye la EC.

### **1.5.2. Biopsia intestinal**

De manera semejante a la gran variedad de manifestaciones clínicas, la EC tiene un amplio espectro de anomalías histológicas que dificulta la interpretación de las muestras de biopsia. El daño de la mucosa del intestino delgado clásicamente afecta al duodeno y yeyuno proximal, extendiéndose distalmente, en una longitud variable por el ileon (82). Por otro lado, la normalización de la

mucosa se produce en sentido contrario, de distal a proximal (83); este proceso puede durar entre 6 y 24 meses desde que el paciente inicia el tratamiento (84).

En la literatura existen informes contradictorios en lo que respecta a la distribución de los hallazgos patológicos de la mucosa a lo largo del intestino delgado (85-88). Aunque hace años se había aceptado ampliamente que la atrofia vellositaria rara vez coexistía con mucosa histológicamente normal, en la actualidad muchos investigadores creen que la EC puede presentar una distribución parcheada, lo que significa que puede haber zonas con atrofia vellositaria en la proximidad de otras con histología normal, especialmente en los pacientes pediátricos (87, 88). Este hecho debe llevarnos a valorar la posibilidad de falsos negativos en el diagnóstico, especialmente cuando las muestras son insuficientes. Sin embargo, se desconoce el número óptimo de muestras necesario para confirmar el diagnóstico. La Asociación Americana de Gastroenterología ha recomendado la toma de 6 muestras (89). En la práctica parece razonable tomar al menos 4 muestras del duodeno distal y dos del bulbo, para detectar lesiones parcheadas y sutiles en algunos casos de EC (67).

En general, se acepta que la presencia de al menos 3 o 4 vellosidades consecutivas con una ratio normal entre vellosidad y cripta en una muestra de biopsia es suficiente para considerarla como normal (90). La mucosa normal del intestino delgado tiene

vellosidades largas y finas, en las que esta ratio oscila entre 3:1 y 5:1 en función del lugar de la biopsia; las vellosidades más cortas se encuentran en el duodeno, mientras que la altura de las vellosidades aumenta distalmente desde el yeyuno al ileon. La distribución normal de los LIE a lo largo de las vellosidades muestra un descenso característico desde la base de la vellosidad hacia la punta.

#### 1.5.2.1. El espectro morfológico de la enteropatía por gluten

La evidencia histológica de la enteropatía por gluten radica en la arquitectura de la mucosa (acortamiento de las vellosidades e hiperplasia de las criptas), en el número de LIE o en ambos. En su forma clásica existe un acortamiento y ensanchamiento de las vellosidades o incluso una atrofia total de la mucosa con hiperplasia de las criptas. En general, el grosor de la mucosa permanece relativamente conservado, pero la ratio cripta/vellosidad (en condiciones normales, 3/1 en el duodeno distal y 2/1 en el bulbo) disminuye a medida que se acortan las vellosidades. Estos cambios morfológicos son precedidos por un aumento de los LIE. Estos casos son los que deben ser buscados activamente cuando la enteropatía por gluten forma parte del diagnóstico diferencial con otros procesos (82, 91).

Marsh y cols. (91) revisaron el espectro morfológico de la EC, que varía desde una arquitectura normal de las vellosidades con un aumento de los LIE como única anomalía, hasta el adelgazamiento de



la mucosa con hiperplasia de las criptas, aumento del número de LIE, destrucción epitelial e inflamación en la lámina propia. Con estos datos hicieron una clasificación de la enteropatía.

**LIE:** se postula que los linfocitos intraepiteliales son los responsables del daño epitelial observado en la EC, aunque el mecanismo exacto de acción aún no se conoce. La mayoría de los LIE son linfocitos T, fundamentalmente células T CD8 citotóxicas que expresan el receptor de células T (TCR)  $\alpha\beta$  en su superficie. La segunda subpoblación linfocitaria en importancia numérica son linfocitos CD3<sup>-</sup> tipo NK (i-NK), seguidos de la subpoblación de linfocitos TcR $\gamma\delta$ , que representa en torno al 6% en la mucosa normal (92, 93). En la EC activa se observa un incremento de las poblaciones T (TCR)  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  y un descenso de la subpoblación i-NK.

Con el paso de los años, el valor de corte y, por tanto, el número normal de LIE ha variado mucho, con una reducción significativa en el valor más alto de la normalidad (hasta 20 LIE por cada 100 células epiteliales) (94-97). La causa puede ser atribuida al cambio en el lugar de la realización de la biopsia, pues la mucosa del yeyuno tiene más LIE que la mucosa duodenal. Habitualmente el límite alto en el número de LIE se encuentra en 20 linfocitos por cada 100 enterocitos en las secciones de hematoxilina-eosina, en comparación con 25 LIE por cada 100 enterocitos en las muestras con inmunotinción CD3 (97). Todavía no está determinado si este

descenso en el límite superior de los LIE afecta a la especificidad de la biopsia de intestino delgado en el diagnóstico de la EC, pues puede llevar a un solapamiento con otras causas de LIEosis (67). Aunque existen varios métodos para contar los LIE, la mayoría no son adecuados para la práctica patológica. El método más ampliamente usado ha sido el recuento de LIE por cada 100 enterocitos (95-100). Recientemente se ha propuesto un método de screening en el que, puede utilizarse el recuento de los LIE en la punta de las vellosidades (5 vellosidades bien orientadas con 20 enterocitos en la punta de cada una) para una aproximación rápida. EL rango normal de LIE de acuerdo con este método es de 5 por cada 20 enterocitos, mientras que los recuentos de entre 6 y 12 por cada 20 deben considerarse sugestivos de EC (101, 102). La aplicación rutinaria de la tinción inmunohistoquímica CD3 parece ser un medio mejor para evaluar el número y distribución de los LIE, cuando existe una arquitectura normal de las vellosidades (97, 103).

El estudio de las muestras de biopsia por citometría de flujo ha demostrado que los pacientes celíacos presentan un aumento de TCR  $\gamma\delta$  con disminución de CD3-CD7+ de manera permanente, incluso tras la remisión clínica e histológica (104, 105), lo que permite obtener información diagnóstica de manera rápida y fácil, sin interferir con el estudio histológico. León y cols. (106) analizan por este método la producción de citocinas por los LIE de estos pacientes y encuentran que los pacientes celíacos presentan mayor cantidad de

IFN- $\gamma$ ; la IL-4 fue casi indetectable en todos los casos y la IL-10 parece estar más elevada en los pacientes con EC silente. Estos cambios no son parcheados, sino difusos. Este mismo grupo (107) evalúa, mediante citometría de flujo, los recuentos de LIE en la mucosa intestinal sana de niños y adultos, estableciendo los valores de referencia normales. Así describen que el límite de la normalidad o percentil 97 es del 14% en los niños y del 1% en los adultos. Parece, por tanto, que la citometría de flujo es un método rápido, objetivo y seguro para el análisis de las muestras de biopsia intestinal y es útil en el diagnóstico de algunos pacientes celíacos, como las formas latentes, los pacientes con diagnóstico dudoso y los que presentan déficit de IgA (108). También puede contribuir al diagnóstico diferencial de otras enteropatías en las que existe atrofia vellositaria y aumento de LIE, y proporciona información complementaria cuando los hallazgos de la biopsia ofrecen dudas (107).

En resumen, el hecho fundamental en la enteropatía celíaca es la linfocitosis intraepitelial y hemos definido un inmunofenotipo celíaco caracterizado por aumento de LIE totales, aumento de la subpoblación TCR  $\gamma\delta$  y disminución, hasta casi desaparecer, de la subpoblación i-NK. Estos cambios no son parcheados como ocurre con la lesión histológica. La retirada del gluten de la dieta se acompaña de cierta recuperación, pero sin alcanzar la normalidad.

La citometría de flujo tiene claras ventajas sobre la inmunohistoquímica y, por ello, es preferible.

#### 1.5.2.2. Clasificación de la enteropatía por gluten

Sobre la base de una amplia investigación clínica, incluyendo una secuencia de estudios dinámicos, Marsh (91) introdujo por primera vez el espectro morfológico de la enteropatía por gluten. La clasificación de Marsh describe 4 estadios consecutivos en el daño de la mucosa:

- **Lesión infiltrativa, tipo 1 de Marsh:** aumento del número de LIE en el epitelio de la vellosidad, en una mucosa que por lo demás es normal, con una ratio vellosidad/cripta normal. Esta lesión puede observarse en pacientes con EC que siguen una dieta sin gluten, pero que ingieren pequeñas cantidades de gliadina, o en aquellos sujetos que aún no están en remisión completa de la enfermedad. Pero, lo que es más importante, puede encontrarse en la EC latente, en los familiares de los pacientes con EC y en algunos individuos con dermatitis herpetiforme (91, 95, 109-111). El aumento del número de LIE es la primera y más sensible señal del efecto del gluten en la mucosa y, aunque no es específica, es el hallazgo histológico más característico de la EC (112).

- **Lesión hiperplásica, tipo 2 de Marsh:** existe hiperplasia de las criptas con vellosidades normales pero que muestran un aumento de LIE. La importancia de esta lesión fue descrita por primera vez por Mowat y Ferguson (113) en un modelo de ratón recién nacido con enfermedad del injerto contra el huésped. Representa la respuesta

inmune de la mucosa intestinal mediada por células T. Este tipo de lesión se encuentra sólo en contadas ocasiones, en algunos pacientes con EC bajo condiciones experimentales o en estudios de relación tiempo-dosis de exposición al gluten (114-118). Los resultados de estos estudios demuestran que la hiperplasia de las criptas es el primer cambio morfológico en la evolución de la lesión de la mucosa, iniciado por el aumento de los LIE. La hiperplasia de las criptas o el aumento de longitud de la cripta es un proceso que precede al acortamiento de las vellosidades, lo que contradice la creencia de que es un fenómeno compensatorio en respuesta al aplanamiento vellositario (114). Esta elongación puede ser causada por la interacción de las células del estroma con el epitelio mediante la secreción de distintas citoquinas y por el influjo de la liberación de factores de crecimiento por las células inflamatorias.

En la práctica esta lesión no se encuentra en la forma en que fue originariamente descrita por Marsh. Cuando existe hiperplasia de las criptas, esta siempre se acompaña del aplanamiento de las vellosidades.

- **Lesión destructiva, tipo 3 de Marsh:** atrofia de las vellosidades con hiperplasia de las criptas y aumento de los LIE.

- **Lesión atrófica, tipo 4 de Marsh:** atrofia vellosa casi total o total con hipoplasia de las criptas e inflamación leve. Esta lesión es muy rara, y se caracteriza por un adelgazamiento de la mucosa y por la presencia de pocas criptas y un número normal de LIE.

Generalmente se observa en pacientes con EC refractaria o en los que desarrollan linfoma de células T (91, 112).

La clasificación de Marsh no sólo ha ayudado a comprender la biología de la enfermedad, sino que también ha facilitado el reconocimiento de los casos en los que sólo existe un aumento de los LIE en una mucosa por lo demás normal. Un problema de esta clasificación es que no ha sido establecido el límite para el número de LIE cuando se utiliza la histoquímica. La actualización de esta clasificación cuatro años después (94) ha resuelto este problema estableciendo que 40 LIE por cada 100 enterocitos debe ser el límite de la normalidad en las muestras obtenidas de yeyuno; el límite para las muestras de duodeno, lugar preferido para obtener las muestras de biopsia, se fija en 25 LIE por cada 100 enterocitos. Cuando se utiliza la citometría de flujo, se han establecido los valores normales, ya mencionados (107).

La segunda revisión de esta clasificación, realizada por Overhuber y cols. (94), subdivide la lesión tipo 3 en tres grados de acuerdo con la severidad del acortamiento o atrofia vellositaria:

- Tipo 3A: atrofia vellositaria leve, con un grado leve o moderado de acortamiento vellositario.
- Tipo 3B: atrofia vellositaria marcada. Indica que sólo existen pequeños fragmentos residuales de las vellosidades.
- Tipo 3C: adelgazamiento completo de la mucosa. No pueden reconocerse vellosidades y la superficie está aplanada.

Aunque esta clasificación es usada por muchos patólogos, lleva a un aumento de la subjetividad en la interpretación de los hallazgos; así, la definición de los tipos 3A y 3B no tiene en cuenta la ratio vellosidad/cripta.

### **1.5.3. Protocolo diagnóstico**

En resumen, para el diagnóstico de estos pacientes se hará, en primer lugar, una determinación de IgA anti-tTG mientras siguen una dieta con gluten, para identificar a los pacientes que probablemente son celíacos. En los menores de 18 meses debe realizarse también la de IgA anti-gliadina. El diagnóstico definitivo para confirmar o excluir la enfermedad requiere la toma de biopsias de duodeno a diferentes niveles, que son estudiadas con microscopía óptica para ver las características morfológicas y las alteraciones de los LIE (que hemos denominado inmunofenotipo celíaco) (105-108, 119, 120), caracterizado por el aumento de los LIE totales y de la subpoblación TCR  $\gamma\delta$ , y por la disminución, hasta casi desaparecer, de los i-NK.

Recientemente, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (EPSGHAN) ha publicado una guía clínica para el diagnóstico de la enfermedad, y, por primera vez, admite que, en determinados pacientes, puede no ser necesario realizar la biopsia intestinal (54).

#### **1.5.4. Diagnóstico diferencial**

Abarca una gran variedad de procesos en los que existen anomalías morfológicas y/o LIEosis:

- Duodenitis crónica asociada a *helicobáctér pylori*: puede originar un aumento de los LIE en el bulbo duodenal. Supone un gran problema cuando no se biopsia el duodeno distal. Ayudan al diagnóstico la presencia de infiltración por neutrófilos de la lámina propia y de la superficie epitelial, un menor daño morfológico en las vellosidades y la presencia de metaplasia foveolar (67).

- Alergia alimentaria: la hipersensibilidad a antígenos alimentarios diferentes del gluten, como la leche de vaca, el pescado, el arroz, etc., puede asociarse a un aumento de los LIE y a cambios morfológicos en forma de enfermedad parcheada o difusa en cualquier parte del tracto gastrointestinal. La hiperplasia linfoidea del bulbo es un hallazgo común en la alergia alimentaria junto con la infiltración eosinofílica de la lámina propia y linfocitosis intraepitelial, especialmente en niños, siendo menos frecuente el acortamiento vellositario (82, 121).

- Infecciones: una amplia variedad de agentes infecciosos que incluye virus, parásitos y bacterias pueden afectar a la mucosa del intestino delgado. La mayoría causan sólo alteraciones leves e inespecíficas de la mucosa intestinal, incluyendo LIEosis, inflamación de la lámina propia y, en escasas ocasiones, anomalías morfológicas (por ejemplo en la giardiasis) (67).



- Enteropatía autoinmune: esta enfermedad originada por autoanticuerpos frente a los enterocitos, afecta fundamentalmente a niños. Los hallazgos histológicos (acortamiento vellositario e hiperplasia de las criptas) son similares a los de la EC, pero producen una diarrea secretora que no responde a la eliminación del gluten de la dieta ni a la nutrición parenteral total, y los anticuerpos anti-tTG y anti-endomisio son negativos. Puede haber aumento de LIE, pero los neutrófilos predominan en la superficie epitelial (82, 83, 90).

- Enfermedad de Crohn: aunque la frecuencia exacta de afectación del tracto digestivo superior se desconoce, puede alcanzar el 30-50% de los casos. Los granulomas son raros, pero cuando aparecen pueden ayudar en el diagnóstico diferencial (82, 83, 122).

## 1.6. TRATAMIENTO

El seguimiento de una dieta exenta de gluten durante toda la vida ha sido la base del tratamiento de la EC durante más de medio siglo (123). La dieta estricta sin gluten requiere un gran número de restricciones alimentarias a estos pacientes, que conlleva importantes implicaciones sociales y económicas.

La contaminación de numerosos alimentos con gluten no puede ser eliminada por completo (124). La definición de dieta sin gluten por el Comité de Nutrición y Alimentos para Usos Dietéticos

Especiales dice que los alimentos sin gluten no deben contener más de 20 mg/kg de gluten en total (125).

En un estudio multicéntrico, doble-ciego, controlado y randomizado hecho en adultos con EC que seguían una dieta sin gluten desde hacía al menos dos años, se evaluó el efecto de la ingesta de 0, 10 o 50 mg/día de gluten durante 90 días, mediante parámetros clínicos, serológicos e histológicos (126). El estudio concluyó que la ingestión de gluten debe mantenerse por debajo de 50 mg/día para el tratamiento de la EC. Algunos autores proponen 100 mg/kg como límite seguro para los alimentos sin gluten (127). No debe olvidarse la variación individual de la respuesta al gluten (126, 127).

La falta de negativización de los anticuerpos anti-tTG tras un período de 12 meses desde que se inició la dieta sin gluten sugiere la ingestión continua de gluten o productos relacionados (128, 129). La resolución completa de los síntomas en un niño previamente sintomático es una evidencia de que el paciente realiza bien la dieta (129). La biopsia duodenal es clave para determinar la respuesta a la dieta sin gluten, aunque la biopsia de seguimiento no está indicada en los pacientes que se recuperan clínicamente.

La restricción dietética puede causar ira, tristeza y desesperación, especialmente en adolescentes y adultos. Ludvigsson y cols. (130) encontraron que la EC se asociaba con un aumento en el riesgo de sufrir depresión.

Los efectos de la dieta sin gluten en la ganancia ponderal y en el riesgo cardiovascular han sido objeto de interés (131, 132). Un estudio que evaluó el índice de masa corporal en pacientes con EC, antes y después de seguir una dieta sin gluten durante dos años, encontró una mejoría en el 81% de los pacientes, incluidos los que inicialmente presentaban sobrepeso (133).

### **1.6.1. Nuevos tratamientos**

A pesar de su inocuidad, la naturaleza restrictiva de la dieta sin gluten ha llevado a diferentes investigaciones en busca de nuevas modalidades terapéuticas. Estos tratamientos deberían ser tan seguros y eficientes como la dieta sin gluten y, a la vez, mejorar la calidad de vida del paciente y asegurar un mejor cumplimiento. En el momento actual existen diferentes opciones que están siendo investigadas, como la suplementación enzimática, la corrección del defecto de la barrera intestinal frente a la entrada de gluten, el bloqueo de la presentación de gluten por bloqueantes HLA e inhibidores de la transglutaminasa tisular, citoquinas y anticitoquinas, péptidos modificados de gluten y trasplante de células madre (124).

### **1.7. PREVENCIÓN**

El hecho de que la EC se desarrolle tras el destete, cuando los cereales son introducidos por primera vez en la dieta, ha llevado a

pensar que la dieta del niño tiene un impacto en el riesgo y presentación de la enfermedad.

La incidencia de la EC en Suecia alcanzó su máximo nivel en los ochenta y descendió nuevamente en 1995 (134). Durante ese tiempo la incidencia anual en menores de dos años aumentó 4 veces (de 50-60 casos por 100.000 habitantes hasta 200-240 casos por 100.000 habitantes y año). Esta curva epidémica para una enfermedad de etiología no infecciosa, pero relacionada con la dieta, en una población genéticamente estable es única, lo que enfatiza el papel de los factores ambientales en su etiología. Las diferencias en las prácticas alimentarias entre el período de alta y baja incidencia incluyen un aumento de la lactancia materna (LM) y un descenso del consumo de harinas en 1997 en comparación con 1980. Dos recomendaciones nacionales, la primera en 1982 posponiendo la introducción del gluten del 4º al 6º mes, la segunda en 1996, sugiriendo que el gluten debía introducirse en pequeñas cantidades desde los 4 meses de edad, mientras el niño continuaba tomando LM, crearon grandes diferencias entre los dos períodos.

### **1.7.1. Lactancia materna (LM).**

Desde el año 1959 se ha sugerido que los niños lactados al pecho tenían un debut más tardío de la EC (135). Algunos autores han demostrado que una duración de la LM menor a 90 días (136) y

30 días (137) se asociaba a un aumento del riesgo de EC. De manera paralela, Peters y cols. (138) encontraron que el riesgo de EC disminuía en un 63% en los niños lactados durante más de dos meses en comparación con los que eran lactados durante menos tiempo.

La LM durante la introducción del gluten es otro importante campo de investigación. En 2002 Ivarsson y cols. (139) demostraron que la LM tiene un efecto protector frente a la EC si el niño toma LM en el momento en que se introduce el gluten en la dieta. Unos años después, un meta-análisis demostró que, en los niños que tomaban pecho en el momento de la introducción del gluten, el riesgo de EC disminuía un 52% (140). Una limitación de los estudios incluidos en este meta-análisis es que, como grupo control, se utilizaron pacientes sin clínica de celiaquía y sin biopsia, y, como sabemos, hay un grupo de celíacos que son asintomáticos.

También se ha sugerido que la LM afecta a la presentación de la EC. En un estudio retrospectivo realizado en 141 pacientes con EC, D'Amico y cols. (141) compararon niños que recibieron exclusivamente LM durante al menos 6 meses con otros que no la recibieron. Encontraron que los niños con LM exclusiva desarrollaron síntomas de EC significativamente más tarde que los demás; así mismo, se vio que este grupo de niños tenía porcentajes menores de fallo de medro y de talla baja: 69% frente al 88% y 37% frente al 62%, respectivamente.

El mecanismo por el que la LM protege del desarrollo de EC no se conoce. Puede deberse a la prevención de infecciones gastrointestinales (140) o al hecho de que seguir lactando disminuye la cantidad de gluten que el niño recibe. Juto y cols. (142) sugieren otros dos posibles mecanismos: en primer lugar, la IgA de la leche humana puede disminuir la respuesta inmune frente al gluten por un mecanismo como la aglutinación de antígenos a inmunocomplejos en la superficie de la mucosa y, en segundo lugar, porque el efecto inmunomodulador de la leche puede ser ejercido suprimiendo el efecto de las células T específicas.

### **1.7.2. Cantidad de gluten y momento de introducción**

Al contrario de lo que sucede en Suecia, la incidencia media de la EC en Dinamarca es de 10 por 100.000 nacimientos. Este fenómeno, llamado "paradoja escandinava", se debe en parte a la introducción tardía y gradual del gluten en la dieta de los daneses (143). Un estudio epidemiológico realizado en 627 pacientes y 1254 controles concluyó que los niños con EC consumían mayores cantidades de harina en comparación con los controles (139).

Otro estudio, prospectivo y observacional, realizado en 2005, examinó si el momento de introducción del gluten en la dieta infantil influía en el inicio de la autoinmunidad de la EC. Entre los niños HLA-DR3 se vio que la introducción muy temprana (antes de los 3 meses)

o tardía (después de los 7 meses) del gluten aumentaba el riesgo de desarrollar la EC (144).

### **1.7.3. Otras medidas preventivas**

Las infecciones pueden aumentar la permeabilidad intestinal incrementando la penetración antigénica y desencadenando la respuesta inmune que conduce a la EC. Estudios epidemiológicos recientes sostienen, basándose en el patrón estacional de la EC, la hipótesis de que una infección vírica desencadena la enfermedad (145). El rotavirus parece un buen candidato, ya que infecciones repetidas por este patógeno predicen un mayor riesgo de autoinmunidad (3,76 por  $\geq 2$  infecciones) (146).

En conclusión, las estrategias para prevenir el desarrollo de la EC se basarían en fomentar la LM, introducir pequeñas cantidades de gluten antes de retirar la lactancia, entre los 4 y 6 meses de edad, y prevenir las infecciones gastrointestinales.

## **2. LA DIABETES MELLITUS TIPO 1**

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es la enfermedad endocrino-metabólica más frecuente en la infancia y la adolescencia. Es un trastorno poligénico, habiéndose descrito un aumento en la susceptibilidad a padecerla en los individuos que expresan las moléculas HLA DR3, DR4, DQ2 Y DQ8 (147).

Se caracteriza por una deficiencia absoluta de insulina secundaria a la destrucción progresiva de las células beta pancreáticas, habitualmente causada por un mecanismo autoinmune (148), que conlleva graves alteraciones en el metabolismo de todos los principios inmediatos. Sin embargo, la alteración más evidente es la hiperglucemia crónica que, además de ser el parámetro analítico fundamental para el diagnóstico, es la principal responsable de las complicaciones neurológicas y vasculares que estos pacientes pueden desarrollar a largo plazo (149).

### **2.1. PATOGÉNESIS**

La DM1 se desarrolla lentamente, produciéndose anomalías en la función de las células beta que preceden a lo que parece un debut agudo de la hiperglucemia (147). La elevación de la hemoglobina (Hb) A1C por encima de los valores normales, el deterioro de la tolerancia a la glucosa así como la pérdida de la primera fase de la



secreción de insulina preceden generalmente a la diabetes clínicamente evidente. La cantidad exacta de células beta que quedan en el momento del diagnóstico no está claramente definida (150). En los pacientes con DM1 de larga evolución se ha comprobado actividad residual de las células beta, aunque la masa de estas células generalmente es menor del 1% de lo normal (151).

Existe una fuerte evidencia de que el desarrollo de la DM1 está determinado por una alteración en el equilibrio entre linfocitos T patogénicos y reguladores (152, 153). Una cuestión fundamental es si existe un autoantígeno primario que desencadene la auto-reactividad de las células T con el subsiguiente reconocimiento de multitud de antígenos de los islotes.

El aumento de la incidencia de DM1 sugiere que los factores ambientales tienen un papel importante en su desarrollo. Los factores que han sido implicados con más frecuencia son la dieta (leche de vaca, cereales, déficit de vitamina D) y los virus (enterovirus) (147).

## **2.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La historia natural de la enfermedad se desarrolla en cuatro fases (154):

a) Diabetes preclínica: se refiere a los meses o años que preceden a la presentación clínica. Se pueden detectar anticuerpos contra las células beta del páncreas en suero. La progresiva destrucción de las

células beta da lugar a un déficit casi absoluto en la secreción de insulina.

En esta fase se pueden detectar alteraciones de la glucemia sin que lleguen a cumplir los criterios de DM.

Actualmente no existe ninguna acción preventiva o que retrase la evolución de la enfermedad, por lo que en pocas ocasiones está indicado el estudio del HLA de riesgo, la determinación de autoanticuerpos o una sobrecarga oral de glucosa (155).

b) Presentación clínica: puede variar desde una forma no urgente hasta una deshidratación severa con shock, que supone una urgencia vital. La clínica cardinal secundaria a la hiperosmolaridad plasmática consiste en la presentación progresiva de poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. En otras ocasiones, la forma de presentación puede ser atípica como por ejemplo:

- Enuresis en un niño con control previo de esfínteres.
- Candidiasis vaginal en niñas prepúberes.
- Fallo de medro o pérdida de peso.
- Irritabilidad, astenia, empeoramiento del rendimiento escolar, cambios de humor.
- Infecciones cutáneas recurrentes.

c) Fase de "luna de miel" o remisión parcial: en aproximadamente un 80% de los niños y adolescentes se produce una reducción transitoria de las necesidades de insulina al iniciar la insulinoterapia, con niveles

de glucemia más estables. Esta fase se debe a una reserva pancreática de células beta en mayor o menor cuantía.

Actualmente se define como aquella fase en la que el paciente necesita menos de 0,5 UI de insulina por kg de peso al día y la HbA1c es <7% (156).

Esta fase se presenta a los días o semanas del inicio de la insulinoterapia y puede durar semanas o meses (de media entre 10-12 meses y dos años). Es más rara en niños muy pequeños o si el debut fue en forma de cetoacidosis (155).

d) Fase crónica: es un proceso gradual desde la fase anterior, que culmina con el agotamiento funcional de las células beta y la dependencia de la terapia con insulina. Esta fase se puede ver acelerada por enfermedades intercurrentes.

### 2.3. COMPLICACIONES

Los pacientes con DM1 son susceptibles de sufrir numerosas complicaciones a largo plazo, la mayoría de ellas secundarias a la hiperglucemia crónica. Algunos estudios recientes (157-159) indican que las complicaciones crónicas de la diabetes comienzan a desarrollarse ya en la edad pediátrica.

Estos pacientes también están expuestos a un mayor riesgo para desarrollar otro tipo de enfermedades, entre ellas, psiquiátricas (160) y autoinmunes (161), sin que se haya demostrado que el grado

de control glucémico influya sobre la probabilidad de desarrollarlas o sobre su evolución posterior. Con cierta frecuencia, dichas enfermedades se manifiestan de manera paucisintomática y se diagnostican tardíamente, pese a que pueden ser responsables de alteraciones inexplicables en el control metabólico durante largo tiempo antes de ser descubiertas.

Entre las complicaciones secundarias a la hiperglucemia crónica figuran (162):

- Microangiopatía diabética.
- Retinopatía diabética.
- Microalbuminuria persistente.
- Neuropatía diabética.
- Enfermedad macrovascular.

#### **2.4. ENFERMEDADES ASOCIADAS**

- Enfermedad tiroidea autoinmune: se pueden encontrar anticuerpos antitiroideos hasta en el 25% de los niños y adolescentes diabéticos (163), aunque sólo presenta hipotiroidismo el 3-5% (164). El hipertiroidismo es menos habitual, pero también es más frecuente que en la población no diabética (162).
- Enfermedad celíaca: es 10 veces más frecuente entre los diabéticos que en la población general, pudiendo afectar hasta

al 1-10% de los pacientes (165). Con frecuencia es asintomática, aunque puede producir síntomas digestivos, hipocrecimiento o anemia (166).

- Otras enfermedades autoinmunes se presentan con mayor frecuencia que en la población general:
  - Enfermedad de Addison .
  - Gastropatía autoinmune.
  - Vitíligo.
- Necrobiosis lipoídica diabetorum (167).
- Infecciones bacterianas, especialmente urinarias y cutáneas (168).
- Osteopenia (169-171).
- Trastornos psicológicos y psiquiátricos, especialmente la depresión y el trastorno por ansiedad generalizada (172, 173).

## 2.5. TRATAMIENTO

Se sustenta en tres grandes pilares: la administración de insulina, la dieta y el ejercicio físico. Los tres deben tener el mismo peso para el manejo de la enfermedad (155).

Los pacientes requieren indefectiblemente una terapia con insulina para sobrevivir. Tras el descubrimiento de la insulina en 1921, se comenzaron a utilizar insulinas (porcinas o bovinas) en los pacientes con diabetes tipo 1, pero no fue hasta comienzos de los

años 60 cuando se estableció una relación directa entre la pauta insulínica y el desarrollo de complicaciones. Posteriormente, el estudio del Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) de 1993, puso en evidencia, de forma definitiva, la relación inversa entre el estrecho control metabólico (tratamiento intensivo) y el desarrollo de complicaciones microvasculares. A partir de entonces comienza una nueva era de la terapia insulínica que incluye el desarrollo de insulinas más purificadas y humanas, y la disponibilidad de análogos de insulina tanto de acción rápida como lenta, caracterizados con un perfil de acción más fisiológico. Así mismo, se van optimizando las pautas de insulino terapia tendiéndose a patrones más fisiológicos como la pauta basal/bolos y el desarrollo de los sistemas de infusión subcutánea continua de insulina (ISCI). Más recientemente, el desarrollo tecnológico ha hecho posible el desarrollo de sistemas de monitorización subcutánea continua de glucosa (SMCG) que, junto con ISCI, han permitido el desarrollo del denominado sistema de "asa cerrada o semicerrada", todavía en fase de investigación clínica (174).

### **3. LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B**

El VHB expresa tres tipos de proteínas de superficie: pequeñas medianas y grandes, también denominadas antígenos s, pres2 y pres1, respectivamente. El antígeno s es el predominante y el inmunodominante, lo que implica que es imprescindible para la génesis de la respuesta de anticuerpos protectores humanos (175). La patogénesis de la infección crónica por el virus no se conoce con claridad. La respuesta de células T CD4+ tiene, con probabilidad, un papel clave en la evolución de muchas infecciones virales. Se ha visto que el aclaramiento del VHB se asocia con una respuesta de células T CD4+ vigorosa hacia la proteína de la nucleocápside (176); por el contrario, la respuesta de células T CD4+ hacia las proteínas de superficie está marcadamente disminuida, sin que se conozca la causa (177).

La vacunación de recién nacidos y adultos sanos con antígeno HBs (HBsAg) recombinante induce una respuesta inmune protectora en el 90-99% de los casos (178-180). La administración de dosis sucesivas de vacuna y el uso de vacunas de nueva generación, que contienen las tres formas de los antígenos de superficie, han aumentado la tasa de seroprotección (181-184). Sin embargo, entre

el 4 y el 10% de los individuos sanos continúan sin producir niveles protectores de anticuerpos (185, 186).

La causa de esta falta de respuesta a la vacuna se desconoce pero distintos grupos de trabajo la han atribuido a diferentes mecanismos:

a) Defecto en la presentación antigénica debido a la expresión de determinados alelos HLA. EL complejo HLA es fundamental en la respuesta antigénica dependiente de las células T (187, 188).

La falta de respuesta a la vacuna se ha asociado con determinados tipos de moléculas HLA, en especial con la homocigocia para HLA-DRB1\*0301 (189, 190). La proteína HLA-DR3 se diferencia de otros tipos de moléculas HLA por su escasa capacidad de unir ligandos derivados de la proteína S (191). El HLAB1+0701(190, 192) y el HLA-DQ2 (193) también se han asociado a la falta de respuesta a la vacuna.

b) Se ha demostrado un defecto en el reordenamiento de los receptores T específicos para HBsAg de las células T-citotóxicas (194).

c) La tolerancia inmunológica (195, 196) y un defecto funcional en las células T necesarias para la producción de anticuerpos anti-HBs por las células B (197-199) pueden contribuir a la falta de respuesta al HBsAg.



### **3.1. LA PROTECCIÓN FRENTE AL VIRUS B A LARGO PLAZO**

La respuesta inmune a largo plazo generada por la vacuna de la hepatitis B administrada durante la infancia no ha sido del todo evaluada, existiendo controversias en relación con la necesidad de administrar dosis de vacuna adicionales. Con el paso del tiempo, los títulos de anti-HBs tienden a disminuir como demuestran numerosos trabajos (200-211).

La evolución a lo largo del tiempo de los títulos anti-HBs varía según la endemidad para la infección por VHB existente.

### **3.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B EN LA ENFERMEDAD CELÍACA**

Desde el año 2003 varios estudios describen una menor tasa de respuesta a la vacuna frente al VHB en los pacientes con EC.

Noh y cols. (212) fueron los primeros en describir este hecho. Para ello, investigaron el título de anti-HBs en 19 pacientes adultos con EC vacunados entre 0 y 15 años antes. 13 de los pacientes (68%) tenía títulos < 10 UI/mL.

Posteriormente otros autores han confirmado estos hallazgos. En el estudio realizado por Park y cols. (213) 14 de los 26 celíacos estudiados (>50%) carecían de anticuerpos protectores frente al VHB pese a haber recibido la vacunación completa, en comparación con un 11% en el grupo de los controles. Para el resto de las vacunas

analizadas (rubéola, tétanos y Haemophilus Influenza b) no se encontraron diferencias significativas. En este estudio no se especifica en qué momento recibieron la vacunación los pacientes estudiados, sólo se señala que, como criterio de inclusión, los sujetos debían haber recibido 3 dosis de vacuna al menos 6 meses antes de iniciarse el estudio.

Ahishali y cols. (214) comparan a 25 celíacos adultos con 20 controles, todos sero-negativos frente al VHB. A todos les administran 3 dosis de vacuna (0, 1 y 6 meses) y miden los anticuerpos a las 4 semanas de la última dosis. Sólo el 68% de los pacientes con EC desarrollan títulos protectores frente al VHB en comparación con el 100% de los controles.

Nemes y cols. (215) dan un paso más. Realizan un estudio en 128 niños celíacos y 113 controles, relacionando la tasa de sero-conversión tras la vacuna con la actividad de la EC en el momento de la vacunación. Para ello dividen a los pacientes en 4 grupos. El primero está formado por 22 pacientes celíacos ya diagnosticados y siguiendo tratamiento con dieta sin gluten en el momento en que son vacunados. El segundo grupo lo forman 106 pacientes celíacos vacunados a los 14 años durante una campaña de vacunación escolar; de estos pacientes, 79 estaban ya diagnosticados y siguiendo dieta sin gluten en el momento de la vacunación y 27 no habían sido diagnosticados todavía. El tercer grupo está formado por 113 sujetos sanos que actúan como controles. Por último, establecen un cuarto

grupo formado por 37 de los pacientes celíacos ya vacunados y que no habían desarrollado anticuerpos protectores frente al VHB, y que son revacunados. Los resultados que obtienen respecto a la respuesta a la vacuna son los siguientes:

- Grupo 1: desarrolla protección el 95,5%.
- Grupo 2: desarrolla protección el 50,9% de los pacientes, y de ellos:
  - un 61,4% de los celíacos ya diagnosticados y con dieta sin gluten.
  - un 25,9% de los celíacos no diagnosticados y tomando gluten.
- Grupo 3: el 75,2% tiene anticuerpos protectores frente al VHB.
- Grupo 4: el 97,3% desarrollan protección frente al VHB.

A la vista de estos datos concluyen que la actividad de la enfermedad desempeña un papel primario en el fallo de la respuesta a la vacuna, ya que, cuando la vacuna se administra cuando el paciente sigue una dieta sin gluten, la tasa de respuesta es igual que la de la población general.

Leonardi y cols. (216) comparan a 60 pacientes celíacos diagnosticados después de los 12 meses de edad con 60 controles sanos. Todos los pacientes del estudio habían sido vacunados con 3 dosis de vacuna a los 3, 5 y 11 meses de edad y en el momento del estudio habían transcurrido al menos 6 meses desde la

administración de la vacuna. El 50% de los pacientes celíacos frente al 11,6% de los controles presentaron títulos no protectores de anticuerpos, siendo el porcentaje mayor en el grupo de celíacos diagnosticados más tardíamente.

Ertem y cols. (217) estudian la respuesta a la vacuna en 63 pacientes celíacos y la posible relación de la falta de respuesta con determinados antígenos HLA. El 32,5% de los celíacos tenían títulos de anti-HBs <10 UI/mL entre 5-73 meses después de completar la vacunación frente a un 14,8% de los controles, aunque en este grupo no especifican el tiempo transcurrido desde la vacuna. No encontraron relación entre la falta de respuesta a la vacuna y el portar el HLA-DQ2.

Unos años después, Ertekin y cols. (218) realizan otro estudio comparativo de la respuesta a la vacuna de la hepatitis B entre celíacos y controles, con tasas de no respuesta del 38,5% en los celíacos frente al 10% en los controles. En este trabajo no se especifica a qué edad fueron vacunados los pacientes, sólo que habían pasado al menos 6 meses desde la administración de la vacuna hasta la realización del estudio.

En el año 2010, Zingone y cols. (219) analizan el posible papel del gluten de la dieta en la inducción de una respuesta inmune subóptima en los pacientes celíacos. Estudian a 51 pacientes con EC que seguían una dieta sin gluten y eran negativos para IgA anti-tTG. Once años después de la vacunación la proporción de pacientes con

títulos mayores de 10 UI/mL era significativamente más baja entre los celíacos que entre los controles (68,6% frente al 91,7%). Solo 3 pacientes celíacos estaban tomando dieta sin gluten en el momento de la vacunación. El 87,5% de los celíacos y todos los controles con títulos no protectores recibieron una dosis de recuerdo de la vacuna. Dos semanas después el 28,6% de los celíacos y el 75% de los controles presentaron un ascenso de los títulos de anticuerpos. Tres de los 10 pacientes celíacos que no respondieron a la dosis de recuerdo recibieron una pauta completa de vacunación. Un mes después todos mostraban títulos de anticuerpos entre 10 y 100 mUI/mL. Como conclusión de su trabajo establecen que la ingesta de gluten en el momento de recibir la vacuna puede disminuir su eficacia.

En el trabajo realizado por Urganci y Kalyoncu (220) los títulos de anticuerpos son analizados en todos los pacientes un mes después de completar la vacunación, un mes después de la dosis de recuerdo y una vez al año durante el seguimiento. El 70 % de los celíacos tuvo títulos >10 mUI/mL frente al 90% de los controles. No observaron disminución en los títulos de anticuerpos durante el período de seguimiento.

### 3.3. RESPUESTA FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 1

Como ocurre con la EC, la DM1 es más frecuente en los individuos portadores del HLA DQ2/DQ8. Más del 90% de los pacientes con DM1 son portadores del HLA-DR3-DQ2 o HLA DR4-DQ8, que sólo se encuentra en el 40% de la población general. Además, aproximadamente el 30% de los pacientes tienen ambos haplotipos DR3/DR4, que confieren mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad (221). Los estudios que investigan la respuesta a la vacuna del VHB en estos pacientes son escasos, antiguos y con resultados contradictorios (222-225). Sería deseable conocer el comportamiento de la vacuna en estos pacientes por idénticas razones que en la EC y por algunas observaciones obtenidas en diabéticos adultos. Los datos del período 1999-2010, a partir de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES), una muestra nacional representativa de la población no institucionalizada de EE.UU., indicó una seroprevalencia de anti-HBc (indicador de infección por VHB presente o pasada) un 60% mayor ( $P < 0,001$ ) que en los pacientes sin diabetes (226).

Recientemente, Spradling y cols. (227) han realizado una revisión de la literatura sobre la respuesta a la vacuna del VHB en los pacientes diabéticos. Incluyen 17 trabajos que estudian a pacientes entre 8.4 y 79.5 años. El grado de protección alcanzado tras la vacuna fue mayor en niños que en adultos. El porcentaje de

pacientes pediátricos con títulos protectores osciló entre el 54.2 y el 100% (media de 93%) frente al 100% de los niños sanos. La tasa de protección en los diabéticos adultos fue, de media, de un 73,4% frente a una media del 87% en los adultos sanos.

Otros estudios realizados previamente muestran resultados discordantes. Marseglia y cols. (228) encuentran tasas semejantes de respuesta a la vacuna en 65 pacientes diabéticos con edades comprendidas entre los 4,5 y los 27,5 años en comparación con 201 controles sanos; sólo aquellos pacientes que además de DM asociaban otra enfermedad autoinmune (EC, tiroiditis...) mostraron una respuesta peor.

Wismans y cols. (229) encontraron que los pacientes con DM1 presentan una respuesta a la vacuna del VHB significativamente peor que la del grupo control.

En el año 2002 Halota y cols. (230) hallaron, entre los diabéticos, un porcentaje del 98,7% de respondedores a la vacuna, midiendo los títulos de anti-HBs a los 5-8 meses de administrar la vacuna.

Finalmente, Arslanoglu y cols. (225) no encontraron diferencias significativas frente a la vacuna del VHB al comparar a un grupo de 99 pacientes con DM1 de entre 3,7 y 17,2 años con un grupo control semejante. Entre en el grupo de diabéticos no hubo diferencias en la respuesta a la vacuna en función de la duración de la enfermedad ni del grado de control metabólico del paciente.

El VHB es altamente infeccioso y ambientalmente estable. Puede ser transmitido por el material médico contaminado por sangre que no es visible a simple vista. En las determinaciones de glucemia capilar se pueden producir exposiciones percutáneas al VHB (231), así como en otros procedimientos que implican instrumentos o tratamientos parenterales compartidos entre personas. Los fallos en el control de infecciones durante la monitorización de glucemias que han conducido a la transmisión del VHB incluyen el uso compartido por varios pacientes de dispositivos diseñados para uno solo y la desinfección inadecuada de monitores de glucosa entre los pacientes (232). Se ha estudiado y concluido (233) que los pacientes adultos con DM1 tienen aproximadamente el doble riesgo de padecer enfermedades crónicas del hígado y carcinoma hepatocelular que los individuos no diabéticos. El Grupo de Trabajo de vacunas contra la hepatitis ha desarrollado modelos económicos de coste-efectividad para valorar la vacunación de adultos con DM1, concluyendo que la administración de la vacuna en este grupo de pacientes evitaría 4271 infecciones por VHB, 256 de ellas crónicas, 467 hospitalizaciones, 33 casos de carcinoma hepatocelular, 13 trasplantes de hígado y 130 muertes (226). Apoyándose en estos datos, el Comité de vacunas de EEUU ha recomendado la vacunación de los adultos con DM1 (233).



### **3.4. RESPUESTA FRENTE A LA VACUNA DE LA HEPATITIS B EN OTRAS ENFERMEDADES**

Existen pocos trabajos en la literatura que estudien la respuesta a la vacuna frente al VHB en enfermedades distintas a las previamente descritas.

Se ha estudiado la tasa de seroconversión en los pacientes con artritis reumatoide con hallazgos dispares: 68% (234) en un primer trabajo, frente a un 97,4% (235) en un segundo.

En el lupus eritematoso sistémico la tasa de seroconversión frente a la vacuna estudiada por Kuruma y cols. (236) fue similar a la de la población general (93%)

Nos parece interesante destacar un estudio realizado por Vida y cols. (237) en el año 2009 con pacientes adultos afectados de enfermedad inflamatoria intestinal. En su trabajo un 65,9% de los pacientes no desarrolló protección adecuada a los 2 meses de completar la pauta vacunal. No hay muchos más datos en la literatura médica que corroboren o contradigan este hallazgo.

## 4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Una vez revisados todos los estudios realizados hasta la fecha sobre la respuesta inmune frente a la vacuna del VHB en la población general y en los pacientes con EC y DM1 podemos extraer varias conclusiones:

- Para conocer si un individuo genera una respuesta adecuada a la vacuna del VHB se deben analizar los títulos de anti-HBs entre 2 y 6 meses después de finalizar la pauta vacunal. Con el tiempo los títulos de anticuerpos van disminuyendo sin que ello implique que el sujeto deje de estar protegido frente al virus.
- Entre un 4-10% de la población general no genera una respuesta de anticuerpos adecuada tras recibir la vacuna del VHB.
- En el caso de los pacientes con EC el porcentaje de individuos con respuesta subóptima frente a esta vacuna es mayor.
- El gluten puede tener un papel causal en esta peor respuesta vacunal que presentan los pacientes celíacos.
- Los individuos con DM1 representan un grupo de riesgo de adquirir infección por VHB, pero en ellos no está clara la calidad de la respuesta inmune generada por esta vacuna.

- Los pacientes con EC y DM1 expresan con una elevada frecuencia los genes HLA DQ2, DQ8 Y DR3. La expresión de estos genes se asocia con una peor respuesta a la vacuna del VHB.
- La base patogénica de la enteropatía por gluten es una alteración de la respuesta inmune localizada en la mucosa intestinal.

Parece importante destacar que:

a) Algunas de estas conclusiones tienen muchas limitaciones

- Los estudios sobre la respuesta vacunal en la EC se han realizado, en general, con tamaños muestrales pequeños. La edad a la que los pacientes y controles reciben la vacuna del VHB es variable, como también lo es el tiempo transcurrido desde que son vacunados hasta que se realiza el estudio serológico. En ninguno de estos estudios se tiene en cuenta el descenso que se produce en los títulos de anti-HBs con el paso del tiempo.
- Se implica al gluten como responsable de la peor respuesta a la vacuna sin ningún estudio de causalidad ni de tiempo exposición-títulos. Se basan en que el porcentaje de pacientes respondedores a la vacuna es mayor entre los celíacos vacunados o revacunados cuando no tomaban gluten que entre los que recibieron la vacuna mientras el

gluten estaba presente en su dieta (216, 220). Ninguno de estos autores toma en consideración el tiempo transcurrido desde la administración de la vacuna o de la dosis de recuerdo y la medición de los títulos de anti-HBs.

- Sólo en un estudio se ha investigado la posible relación de los genes HLA con la peor respuesta vacunal de los pacientes con EC, concluyendo que estos genes no desempeñan ningún papel.

b) Quedan sin aclarar algunos otros puntos:

- Al ser los enfermos con DM1 un grupo de riesgo para la infección por VHB es de trascendental importancia aclarar cómo se comporta este grupo patológico frente a la vacuna del VHB, y de esta manera garantizar que quedan protegidos frente a este patógeno.
- La causa de la peor respuesta de los pacientes con EC a esta vacuna queda por esclarecer. Nos parece que la expresión, tanto en celíacos como en diabéticos, de los mismos genes HLA que se han descrito entre los no respondedores sanos puede desempeñar un papel importante que no ha sido estudiado en profundidad. Otro punto que se debe considerar es si la alteración inmunológica localizada en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos puede estar relacionada con la génesis de una respuesta inmune alterada a nivel sistémico frente a la vacuna del VHB.

Planteamos este trabajo con el ánimo de ahondar en el estudio de la respuesta frente a la vacuna del VHB de los pacientes con EC y DM1, intentando, en lo posible, superar las limitaciones que hemos observado en los estudios previos y tratando de encontrar respuesta a las cuestiones aún no resueltas.

## **OBJETIVOS**

Con la realización del presente trabajo pretendemos investigar:

- 1.- Calidad de la respuesta serológica a la vacuna del VHB, administrada en los primeros 6 meses de vida, en niños con enfermedad celíaca y diabetes mellitus tipo I, en comparación con un grupo control.
- 2.- Evolución en el tiempo de los títulos de los anticuerpos anti-HBS.
3. -Existencia de una relación entre la respuesta a la vacuna en los pacientes celíacos con las alteraciones en el inmunofenotipo de los linfocitos intraepiteliales de la mucosa intestinal.
- 4.- Influencia de los antígenos HLA de clase II en la respuesta a la vacuna del virus de la hepatitis B en pacientes celíacos y niños sanos.
- 5.- Efecto del gluten en la respuesta inmune frente a la vacuna: relación entre el tiempo en el que los pacientes celíacos han ingerido gluten antes del diagnóstico y la respuesta a la vacuna.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

- 1.- Los pacientes con EC y DM1 generan una peor respuesta de anticuerpos tras recibir la vacuna del VHB, con respecto a la población general.
- 2.- Con el paso del tiempo los títulos de anti-HBs van disminuyendo de manera progresiva.
- 3.- El gluten no desempeña ningún papel en la génesis de esta respuesta inmune subóptima que presentan los pacientes con EC tras recibir la vacuna del VHB.
- 4.- La expresión de los alelos HLA DQ2, DQ8, DR3 y DR7 se asocia con una peor respuesta vacunal en los individuos celíacos y en la población general.
- 5.- El inmunofenotipo de los LIE expresado en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos se relaciona con la respuesta inmune a esta vacuna.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se trata de un estudio observacional prospectivo de casos- controles realizado entre los años 2010 y 2013 en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

### **1. SUJETOS DE ESTUDIO**

#### **1.1. GRUPO DE PACIENTES**

Pacientes seguidos en las consultas de Gastroenterología Pediátrica y Endocrinología Pediátrica del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

#### **Criterios de inclusión:**

- 1.- Haber sido diagnosticado de EC o DM1 de acuerdo a los protocolos internacionales.
- 2.- Seguir tratamiento para su enfermedad de acuerdo a protocolos internacionales.
- 3.- Haber iniciado la vacunación en el periodo neonatal y haberla completado en el primer año de vida, según la pauta incluida en el calendario vacunal de la Comunidad de Madrid. Por tanto, sólo participarán en el estudio niños nacidos después del año 1996, pues



ese fue el año en que se implantó la vacunación del VHB en el período neonatal.

**Criterios de exclusión:**

- 1.- Pacientes con otras enfermedades autoinmunes o inmunodeficiencias.
- 2.- Pacientes con cáncer pasado o actual.
- 3.- Pacientes que hayan recibido o estén recibiendo tratamiento inmunosupresor.

**1.2. GRUPO DE CONTROLES**

Se investigará la tasa de respuesta a la vacuna del VHB en niños estudiados en el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid que acudan al servicio de extracciones para realizar una analítica solicitada por su médico, y cuyos padres, tras leer un consentimiento informado, accedan a que participen en el estudio.

**Criterios de inclusión:**

- 1.- No padecer ninguna enfermedad autoinmune.
- 2.- No estar recibiendo ni haber recibido tratamiento inmunosupresor.
- 3.- Acceder a participar en el estudio firmando el consentimiento informado.

4.- Haber iniciado la vacunación en el periodo neonatal y haberla completado en el primer año de vida, según la pauta incluida en el calendario vacunal de la Comunidad de Madrid. Por tanto, sólo participaran en el estudio niños nacidos después de 1996.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. GRUPO DE PACIENTES**

#### **2.1.1. Recogida de datos de la historia clínica**

- Pauta de vacunación.
- Edad de diagnóstico de la enfermedad (EC o DM1).
- Edad en el momento de realizar la serología frente al VHB.
- En los celíacos:
  - HLA clase II.
  - estudio inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales.

#### **2.1.2. Estudio serológico**

La tasa de anticuerpos anti-HBs se estudiará mediante el método ELISA automático (Architect I 2000, Abbott Diagnostics).

A los pacientes celíacos con títulos < 10 mUI/mL se les administrará una dosis de recuerdo de la vacuna, midiendo la respuesta 6 meses después.

#### **2.1.3. Diagnóstico de EC**

El diagnóstico de EC se realiza según los protocolos internacionales:

2.1.3.1. Marcadores serológicos de enfermedad celíaca: los anticuerpos antigliadina, antitransglutaminasa tisular y anti-péptido deaminado de la gliadina se realizan por un test de ELISA y los

antiendomisio por IFI.

### 2.1.3.2. Biopsia intestinal con comprobación de la enteropatía:

2.1.3.2.1. Estudio morfológico: Se utilizará la clasificación de Marsh-Oberhubber:

- Tipo 0: no lesión.
- Lesión infiltrativa, tipo 1 de Marsh: aumento del número de linfocitos intraepiteliales (LIE) en el epitelio de la vellosidad en una mucosa que, por lo demás, es normal con una ratio vellosidad/cripta normal.
- Lesión hiperplásica , tipo 2 de Marsh: existe hiperplasia de las criptas con vellosidades normales, pero que muestran un aumento de los LIE.
- Lesión destructiva, tipo 3 de Marsh: atrofia de vellosidades con hiperplasia de criptas y aumento de LIE.
  - Tipo 3a: atrofia vellositaria leve, con un grado leve o moderado de acortamiento vellositario.
  - Tipo 3b : atrofia vellositaria marcada. Indica que sólo existen pequeños fragmentos residuales de las vellosidades.
  - Tipo 3c: adelgazamiento completo de la mucosa. No pueden reconocerse vellosidades y la superficie está aplanada.

### 2.1.3.2.2. Inmunofenotipo de los linfocitos intraepiteliales

Procesamiento de las biopsias intestinales:

#### a) DESEPITELIZACIÓN DEL INTESTINO DELGADO:

Las biopsias fueron incubadas durante 60´ en "medio completo" (MC) con EDTA 1 mM y DTT 1 mM (Sigma, EE.UU.) [Madrigal 1993, Eiras 1998] a temperatura ambiente (TA) y en agitación moderada constante en un rotor. El MC consta de medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% FCS (Gibco, Life Technologies, Alemania), 2mM glutamina (ICN, EE.UU.), 50 g/ml gentamicina (Schering-Plough, España) y 50 g/ml ampicilina (Laboratorios Normón, España).

El procesamiento ha de realizarse antes de que transcurran 2 h. desde la extracción de las muestras, para evitar su desepitelización espontánea [Todd 1999].

El uso de EDTA y DTT (quelante de iones divalentes y agente reductor, respectivamente) provoca la ruptura de las uniones intercelulares y la liberación al medio de los LIE y los enterocitos, lo que permite su marcaje individualizado. Las células así liberadas al medio se recolectan por centrifugación a 1400 r.p.m durante 10 min. Tras ello, se lava la suspensión celular en suero salino para su posterior marcaje con anticuerpos monoclonales.

Típicamente, el rendimiento obtenido de una biopsia control fue de  $100.000 \pm 50.000$  IEL, con una pureza de un 6-12%.

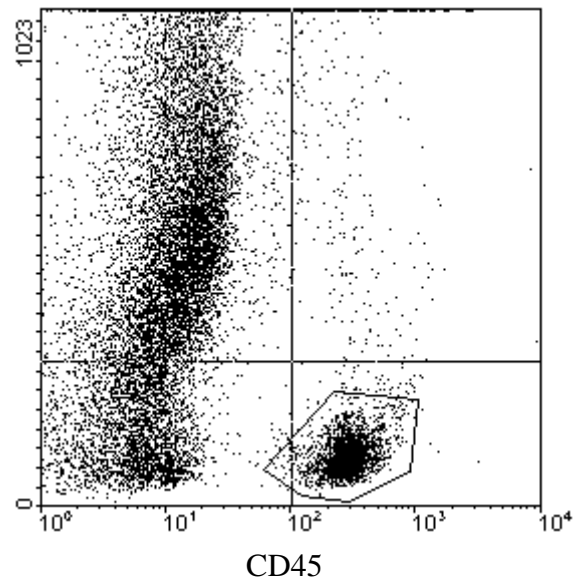
#### b) INMUNOFENOTIPAJE DE LIE.

-MARCAJES DE MEMBRANA.

Las células en suspensión, mezcla de LIE y enterocitos obtenidos de biopsias, fueron marcadas con combinaciones de anticuerpos monoclonales purificados o conjugados con fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína/FITC, ficoeritrina/PE, peridinil clorofila/Per-CP, cianina 5/Cy-5, alofocianina/APC), específicos para los antígenos que se busca detectar CD103, CD3, TcR $\gamma\delta$ , en las concentraciones recomendadas por el fabricante Becton-Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), EE.UU. Los marcajes se realizaron durante 30´ a 4°C en suero salino, siendo las células lavadas antes de su análisis en un citómetro de flujo. Se utilizó un citómetro FACSCanto II, de Becton Dickinson Immunocytometry Systems –BDIS, EE.UU. Se analizaron entre 2000 y 5000 LIE por cada combinación de marcadores. Se utilizaron anticuerpos conjugados de especificidad irrelevante y de los mismos isotipos de los anticuerpos específicos, para establecer los límites de la fluorescencia inespecífica.

El punto de corte citométrico para la recogida de los datos (“threshold”) se basó en la exclusión de los eventos de tamaño inferior a un linfocito, para excluir eritrocitos y debrís celulares, siendo el tamaño equivalente en fluorocitometría al FSC o “Forward scatter”. Los LIE se diferenciaron de las células epiteliales en virtud de su expresión de CD45, marcador exclusivo de las células de estirpe hematopoyética, y a su reducida complejidad interna (“Side

Scatter", SSC). Los datos se analizaron mediante el programa Celikey (BDIS).



Se analiza la ventana de las células CD45+ (APC) para los marcadores CD3 (PerCP), TcR $\gamma\delta$  (PE) y CD103 (FITC), todos ellos de Beckton Dickinson.

#### 2.1.4. Estudio genético

El estudio de los haplotipos HLA se realizará mediante ensayo tipaje por SSO (hibridación de oligonucleótidos), One Lambda (RSSO 2Q\_008\_03).

## **2.2. GRUPO DE CONTROLES**

### **2.2.1. Recogida de datos de la historia clínica**

- Pauta de vacunación.
- Patología por la que está siendo estudiado y medicación que recibe.
- Edad en el momento de realizar la serología frente al VHB.

### **2.2.2. Serología del VHB**

Realizada por el mismo método que en los pacientes celíacos.

A aquellos niños participantes en el estudio en los que se detecten títulos de anticuerpos anti-HBs de 0 mUI/mL se le ofertará recibir de nuevo la pauta completa de vacunación, como recomiendan las guías internacionales.

### **2.2.3. Estudio genético:**

Realizado por el mismo método que en los pacientes celíacos.

## **2.3. REQUISITOS ÉTICOS DEL ESTUDIO**

El proyecto de investigación recibió la aprobación del Comité ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Se elaboró un consentimiento informado que fue firmado por todos los participantes en el estudio.



## 2.4. RECOGIDA DE DATOS

Los datos de los pacientes se recogerán por escrito según un cuestionario de recogida de datos, para su posterior introducción en una base de datos Excell anónima.

## 2.5. ANALISIS DE DATOS

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa STATA 13, con la colaboración del servicio de estadística del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Dado el tamaño muestral, los datos pueden contrastarse con un alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,1, asumiendo la máxima incertidumbre que correspondería a un 50% de seroconversión, con diferencias mayores del 15 %. Así mismo se podría estimar incluso con máxima indeterminación (proporción del 50%) con un epsilon del 8%.

Las variables continuas se describirán mediante media y desviación típica, o media y rango intercuartílico si la distribución es asimétrica. Las variables categóricas se describirán mediante frecuencia absoluta y relativa. La asociación entre la presencia de celiaquía y la seroconversión se contrastará mediante la prueba de chi cuadrado y el test exacto de Fisher. Se plantearán modelos de regresión para contrastar la existencia de confusión y/o interacción.

Todos los contrastes son bilaterales con nivel de significación de 0.05.

## 2.6. NOMENCLATURA

Para estudiar la respuesta a la vacuna del VHB en los 3 grupos diagnósticos de individuos participantes en el estudio y valorar las diferencias existentes entre ellos, los pacientes se dividirán en varios grupos según el título de anti-HBs que presenten:

a) Por un lado se analizarán diferencias entre respondedores y no respondedores:

- No respondedores: individuos con un título no protector de anticuerpos (anti-HBs < 10 mUI/mL).
- Respondedores: individuos con un título protector de anticuerpos (anti-HBs  $\geq$  10 mUI/mL).

b) Estudiaremos también las diferencias entre pacientes con anticuerpos anti-HBs y sin anticuerpos:

- Pacientes sin anticuerpos: son un subgrupo de los no respondedores, en los que el título de anti-HBs es igual a 0.000 mUI/mL.
- Pacientes con anticuerpos: está formado por todos los respondedores y el grupo de no respondedores cuyo título de anti-HBs es > 0.000 mUI/mL.

# **RESULTADOS**

## **1. ESTUDIO DESCRIPTIVO**

En total participaron en el estudio 669 pacientes, de los cuales:

- 198 (29,6%) eran celíacos
- 109 (16,29%) eran diabéticos
- 16 (2,39%) eran celíacos y diabéticos
- 346 (51,72%) eran controles

Para realizar el análisis estadístico de los datos, los 16 pacientes que eran celíacos y diabéticos fueron incluidos dentro del grupo de pacientes celíacos. Al tratarse de un grupo poco numeroso de pacientes podía ser un factor de confusión en el análisis estadístico de datos. Por ello, a partir de ahora no mencionaremos a este grupo y el grupo de celíacos estará formado por un total de 214 pacientes.

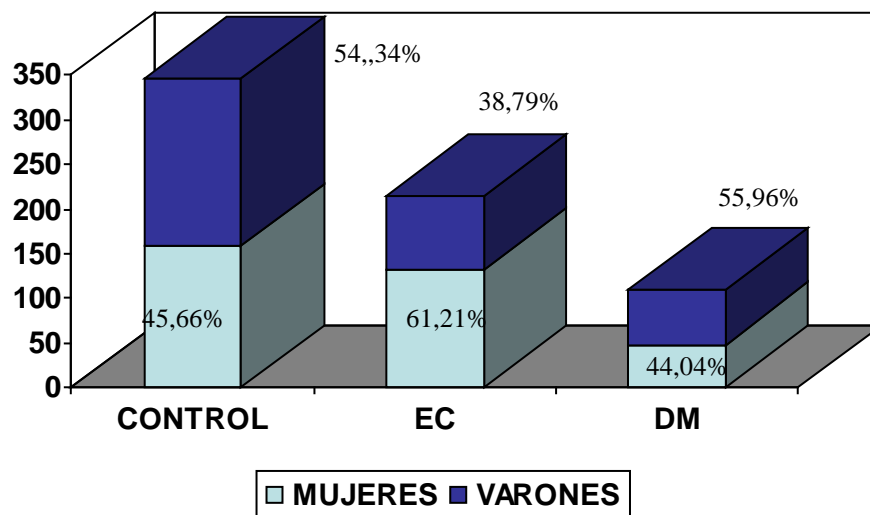
### **1.1. DISTRIBUCIÓN POR SEXO**

Del total de participantes en el estudio 337 (50,34%) eran mujeres y 332 (49,63%) eran varones. La distribución por sexo en los distintos grupos diagnósticos se muestra en la siguiente tabla

Tabla 1: Distribución por sexo.

GRUPO	SEXO		
	MUJERES	HOMBRES	TOTAL
CONTROLES	158 (45,66%)	188 (54,34%)	346
CELÍACOS	131 (61,21%)	83 (38,79)	214
DM	48 (44,04%)	61 (55,96)	109
TOTAL	337 (50,37%)	332 (49,63)	669

Gráfico 1: Distribución por sexo.



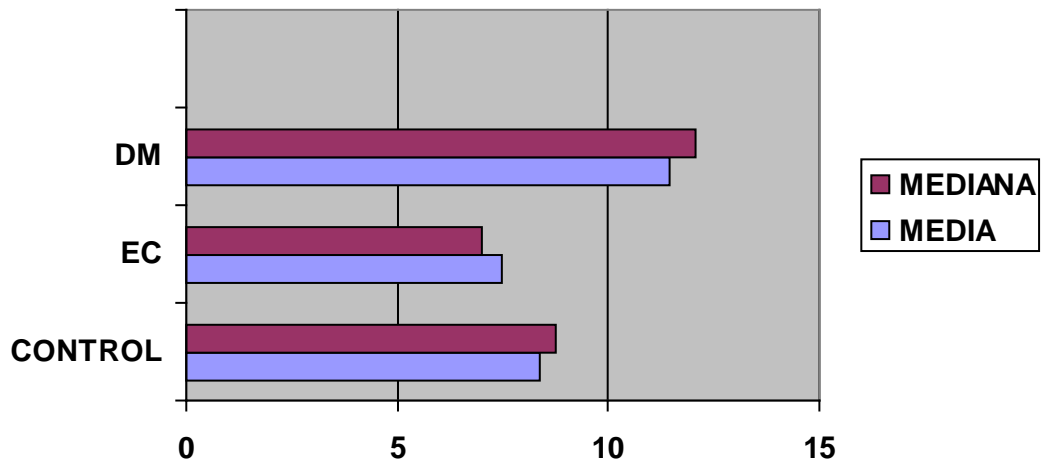
## 1.2.- DISTRIBUCIÓN POR EDAD

La media de edad (medida en años decimales) de los participantes en el estudio en el momento en que se realizó la serología fue de 8,58 años (DS± 4,02), con una mediana de 8,8 años. Los valores de edad en los distintos grupos diagnósticos se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 2: Distribución por edad.

GRUPO	MEDIA	DS	MEDIANA
CONTROLES	8,36	3,90	8,75
CELÍACOS	7,49	3,86	7
DM	11,44	3,81	12,05
TOTAL	8,59	4,02	8,8

Gráfico 2.-Distribución gráfica de la media y mediana de edad en los grupos diagnósticos.



Para estudiar la respuesta serológica a la vacuna de VHB, los pacientes de cada grupo diagnóstico fueron, a su vez, divididos en 3 grupos de edad:

- Menores de 5 años (de 1 a 4,99 años)
- Mayor o igual a 5 años y menor de 10 años (de 5 a 9,99 años)
- Mayor o igual a 10 años (de 10 en adelante)

La distribución por edades de los participantes en el estudio en función de la categoría diagnóstica se resume en la tabla 3. Salvo en el grupo de pacientes con DM, el subgrupo de edad más numeroso fue el de 5 a 9,99 años y el menos numeroso, el de pacientes menores de 5 años.

Gráfico 3.-Distribución gráfica de los subgrupos de edad en cada categoría diagnóstica.

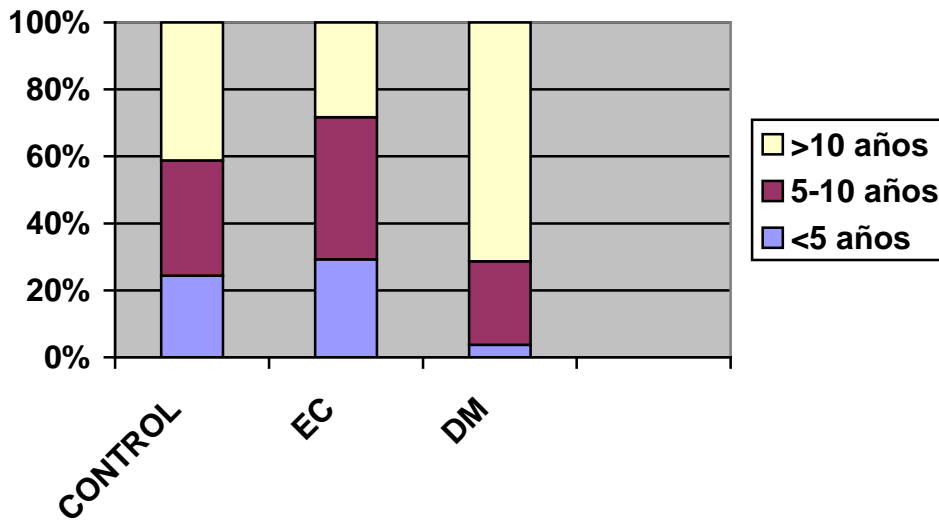


Tabla 3: subgrupos de edad.

Edad	EC	DM	Control
1-4,99 años	62 (29,24%)	4 (3,7%)	83 (24,4%)
5-9,99 años	90 (42,45%)	27 (25%)	117 (58,82%)
10 o más años	60 (28,30%)	77 (71,3%)	140 (41,18%)
Total	212	108	340

### 1.3. RESPUESTA SEROLÓGICA A LA VACUNA DEL VHB

Para estudiar la respuesta a la vacuna del VHB se valoraron dos parámetros:

- Porcentaje de individuos no respondedores en cada grupo diagnóstico.
- Porcentaje de individuos sin anticuerpos en cada grupo diagnóstico.

El análisis se realizó en el total de individuos en cada grupo diagnóstico y en los 3 subgrupos de edad. Los resultados se resumen en la tabla 4.



Tabla 4: Porcentaje de individuos respondedores, no respondedores y sin anticuerpos en cada grupo diagnóstico y en cada subgrupo de edad.

GRUPO DIAGNÓSTICO	SUBGRUPO DE EDAD	Respondedores	No respondedores	Sin anticuerpos
CONTROLES	1-4,99 años	58 (69,9%)	25 (30,1%)	1 (1,2%)
	5-9,99 años	34 (29,1%)	83 (70,9%)	8 (6,8%)
	10 o más años	43 (30,7%)	97 (69,3%)	18 (12,9%)
	Total	136 (39,3%)	210 (60,7%)	29 (8,4%)
EC	1-4,99 años	31 (50%)	31 (50%)	6 (9,69%)
	5-9,99 años	21 (23,33%)	69 (76,67%)	18 (20%)
	10 o más años	16 (26,67%)	44 (73,33%)	6 (10%)
	Total	67 (31,3%)	147 (68,7%)	30 (14%)
DM	1-4,99 años	1 (25%)	3 (75%)	2 (50%)
	5-9,99 años	8 (29,6%)	19 (70,4%)	4 (14,8%)
	10 o más años	21 (27,3%)	56 (72,7%)	10 (13%)
	Total	31 (28,4%)	78 (71,6%)	16 (14,7%)

#### 1.4. ESTUDIO GENÉTICO

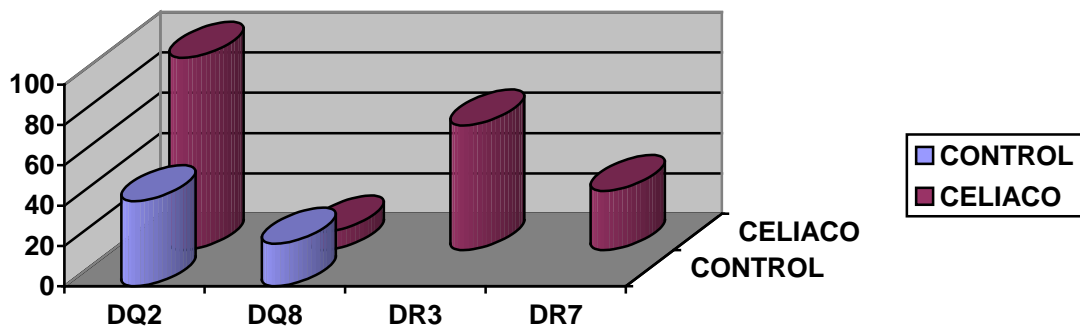
En 393 de los pacientes, 204 controles, 188 celíacos y un diabético se realizó estudio de los alelos HLA de clase II. En los pacientes celíacos se realizó estudio completo, mientras que en los controles sólo se estudiaron los genes DQ.

En nuestro trabajo nos hemos centrado en la presencia de los genes DQ2, DQ8, DR3 y DR7, al ser los que todos los estudios previos asocian con una menor respuesta a la vacuna de VHB.

Tabla 5.- Estudio genético en celíacos y controles.

	DQ2		DQ8		DR3		DR7	
	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Celíacos	179 95,21%	9 4,78%	17 9,04%	171 90,85%	116 61,70%	72 38,29%	55 29,25%	133 70,74%
Controles	86 42,15%	118 57,84%	43 21,07%	161 78,92%				
Total	265	127	60	332				

Gráfico 4.- Distribución gráfica del porcentaje de pacientes que expresan los genes HLA-DQ2, DQ8, DR3 y DR7.



El 95,21% de los pacientes celíacos estudiados portaban el gen DQ2, frente al 42,15% de los controles. Respecto al gen DQ8 se encontró en el 9,04% de los celíacos y en el 21,07% de los controles.

El 61,7% y el 29,25% de los celíacos portaban DR3 y DR7, respectivamente.

## 2. ESTUDIO ANALÍTICO

### 2.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE LA VACUNACIÓN CON LOS TÍTULOS DE ANTI-HBs

#### 2.1.1. Total de pacientes

Se realizó una regresión logística entre el valor del título y la edad en la que se realizó el estudio serológico. En nuestra población de estudio todos los pacientes recibieron la vacuna al nacimiento, finalizando las dosis de recuerdo a los 6 meses, por lo que la edad del estudio refleja, por igual en todos ellos, el tiempo transcurrido desde la última dosis.

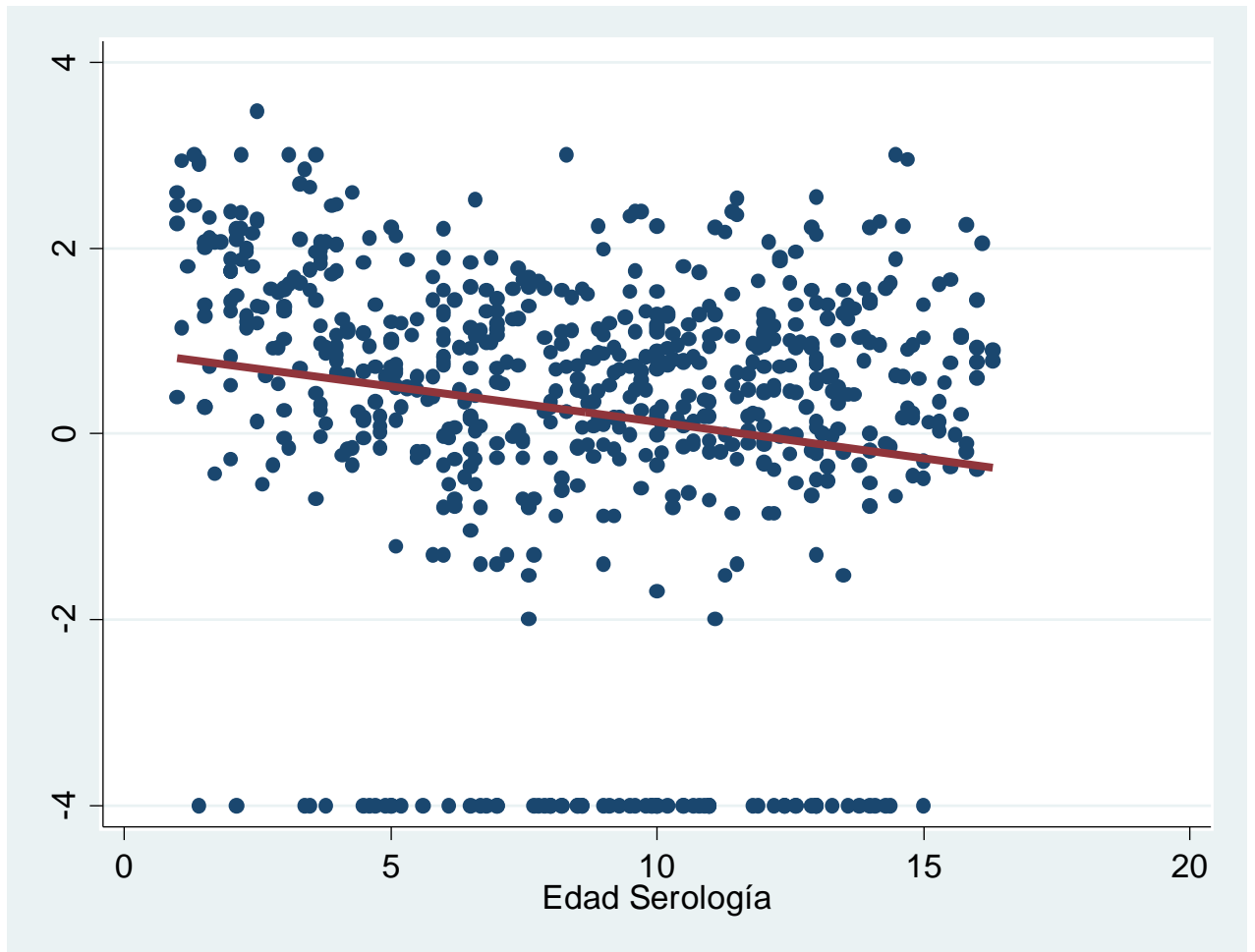
Tabla 6: Relación entre edad serología y título de anti-HBs en el total de pacientes.

Coeficiente	Intervalo confianza	p
-8,09	-11.34 -4,85	0.000

El estudio demuestra que, en nuestra población, el tiempo ejerce un efecto con marcada significación estadística en los títulos serológicos. El coeficiente es negativo, lo que implica que a medida que aumenta la edad de los pacientes los títulos son más bajos.

Para ver este resultado de manera gráfica, se han utilizado los logaritmos decimales de los valores del título de antiHBs; como el logaritmo de 0 es infinito, al valor 0 se le asignó  $10^{-4}$ . En el eje de ordenadas se sitúa el valor logarítmico del título de anti-HBs y en el de abscisas la edad, en años, a la que se realizó la serología. La línea roja refleja el valor medio de los títulos para una determinada edad.

Gráfico 5.-Variación de los títulos de anti-HBs al aumentar la edad a la que se realiza la serología.



**2.1.2. Controles**

Tabla 7.- Relación entre edad, serología y título de anti-HBs en el grupo de controles.

Coeficiente	Intervalo confianza	p
-0.1277521	-0.169 -0.086	0.000

Se observa una influencia significativa de la edad con efecto negativo: según aumenta la edad los títulos descienden.

### 2.1.3. Celíacos

Tabla 8.-Relación entre edad serología y título de anti-HBs en los pacientes celíacos.

Coeficiente	Intervalo confianza	p
-0.0585449	-0.124 -0.0073	0.081

En este grupo de pacientes el coeficiente es más bajo, aunque sigue siendo negativo, y no existe significación estadística. El efecto del tiempo en los títulos de anti-HBs es menos evidente que en el grupo control.

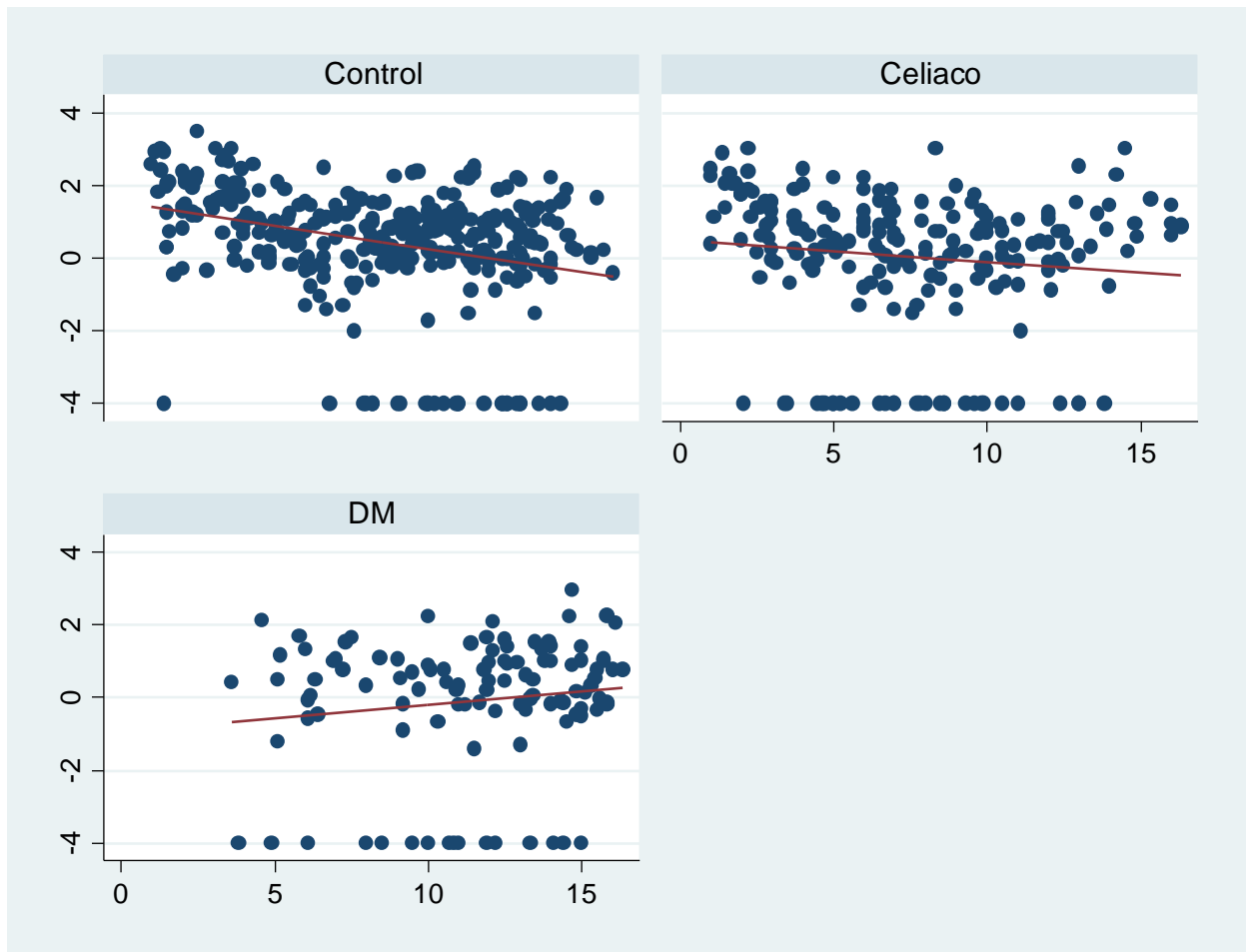
### 2.1.4. Diabéticos

Tabla 9.- Relación entre edad serología y título de anti-HBs en los pacientes diabéticos.

Coeficiente	Intervalo confianza	p
0.079	-0.027 0.177	0.151

En este grupo el coeficiente es positivo, sin significación estadística. No hay evidencia de que los títulos se modifiquen con el paso del tiempo.

Gráfico 6.- Representación gráfica del efecto del tiempo en los títulos de anti-HBs en cada uno de los 3 grupos diagnósticos.



En resumen, el efecto del tiempo transcurrido desde la vacunación en los títulos de anti-HBs es especialmente evidente en el grupo control, aunque también se ve con menor intensidad, y ya sin significación estadística, en los pacientes celíacos. En el grupo de pacientes diabéticos el efecto no existe.

## 2.2. ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA A LA VACUNA DEL VHB ENTRE LOS GRUPOS DIAGNÓSTICOS

### 2.2.1. Valores de los títulos de anti-HBs en los distintos grupos diagnósticos

Calculamos la media y la mediana del título de anti-HBs en cada grupo diagnóstico y subgrupo de edad.

Tabla 10.- Media con desviación estándar y mediana del valor del título de anti-HBs en cada grupo diagnóstico y subgrupo de edad.

EDAD	DIAGNÓSTICO	MEDIA	MEDIANA
1-4.99 años	CONTROL	167.98 ± 393	33.53
	EC	55.71 ± 119.99	9.43
	DM	33.21 ± 64.64	2.92
5-9.99 años	CONTROL	19.48 ± 51.71	3.66
	EC	13.25 ± 30.31	1.49
	DM	8.76 ± 13.46	1.35
10 o más años	CONTROL	20.18 ± 50.04	3.12
	EC	32.83 ± 139.43	2.92
	DM	27.67 ± 106.67	2.5

Al comparar los grupos diagnósticos vemos que, en los pacientes menores de 10 años, tanto la media como la mediana son más bajas en los pacientes con EC y DM que en el grupo control. En los pacientes de más de 10 años la mediana sigue siendo más



elevada en el grupo control, aunque la diferencia es mucho menor que en los individuos de menor edad.

### 2.2.2. Análisis de las diferencias entre el porcentaje de no respondedores a la vacuna entre los grupos diagnósticos

#### a) Pacientes celíacos

Tabla 11.-Porcentaje no respondedores y respondedores entre los pacientes celíacos en comparación con el grupo control, test utilizado y grado de significación estadística.

DIAGNÓSTICO	NO RESPONDEDORES	RESPONDEDORES	TOTAL	TEST	p
CONTROL	210 (60.69%)	136 (39.31%)	346	Chi <sup>2</sup>	0.055
EC	147 (68.7%)	67 (31.3%)	214		
TOTAL	357	203	560		

El porcentaje de pacientes no respondedores a la vacuna es más elevado entre los pacientes celíacos que en el grupo control. Estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas, pero se aproximan mucho.

b) Pacientes diabéticos

Tabla 12.-Porcentaje de no respondedores y respondedores entre los pacientes diabéticos en comparación con el grupo control, test utilizado y grado de significación estadística.

DIAGNÓSTICO	NO RESPONDEDORES	RESPONDEDORES	TOTAL	TEST	p
CONTROL	210 (60.69%)	136 (39.31%)	346	Chi <sup>2</sup>	0.040
DM	78 (71.6%)	31 (28.4%)	109		
TOTAL	288	167	455		

El porcentaje de individuos no respondedores a la vacuna del VHB es significativamente más elevado entre los individuos diabéticos cuando se les compara con el grupo control.

**2.2.3. Análisis de las diferencias en el porcentaje de pacientes sin anticuerpos frente al VHB entre los grupos diagnósticos.**

a) Pacientes celíacos

Tabla 13.- Porcentaje de pacientes sin anticuerpos frente al VHB en los pacientes celíacos en comparación con el grupo control, test utilizado y grado de significación estadística.

DIAGNÓSTICO	SIN ANTICUERPOS	CON ANTICUERPOS	TOTAL	TEST	p
CONTROL	29 (8.4%)	317 (91.6%)	346	Chi <sup>2</sup>	0.034
EC	30 (14%)	184 (86%)	214		
TOTAL	59	501	560		

El porcentaje de pacientes sin anticuerpos frente al VHB es más elevado entre los individuos con EC, siendo las diferencias con el grupo control significativas desde el punto de vista estadístico.

b) Pacientes diabéticos

Tabla 14.-Porcentaje de pacientes sin anticuerpos frente al VHB en los pacientes diabéticos en comparación con el grupo control, test utilizado y grado de significación estadística.

DIAGNÓSTICO	SIN ANTICUERPOS	CON ANTICUERPOS	TOTAL	TEST	p
CONTROL	29 (8.4%)	317 (91.6%)	346	Chi <sup>2</sup>	0.054
DM	16 (14.7%)	93 (85.3%)	109		
TOTAL	45	410	455		

Entre los diabéticos también existe un porcentaje más elevado de individuos sin anticuerpos frente al VHB. En este caso las diferencias con el grupo control no alcanzan la significación estadística, aunque se aproximan mucho.

**2.2.4. Análisis de las diferencias entre el porcentaje de no respondedores entre los grupos diagnósticos, según el subgrupo de edad.**

a) Pacientes celíacos

Tabla 15.-Porcentaje no respondedores y respondedores a la vacuna por subgrupo de edad, test utilizado y grado de significación estadística.

Pacientes		Respuesta vacuna		Test	p
		No respondedores	Respondedores		
Total	Control	60.7%	39.3%	Chi <sup>2</sup>	0.055
	EC	68.7%	31.3%		
1-4,99 años	Control	30.1%	69.9%	Chi <sup>2</sup>	0.015
	EC	50%	50%		
5-9,99 años	Control	70.94%	29.06%	Chi <sup>2</sup>	0.35
	EC	76.67%	23.33%		
10 o más a.	Control	69.3%	30.7%	Chi <sup>2</sup>	0.41
	EC	75%	25%		

El análisis muestra como a medida que aumenta la edad aumenta el porcentaje de no respondedores, tanto en celíacos como en controles. Los porcentajes son más elevados en los pacientes celíacos en todos los grupos, pero a medida que aumenta la edad existen

menores diferencias. Sólo se observa significación estadística en el grupo de menor edad.

b) Pacientes diabéticos

Tabla 16.-Porcentaje de no respondedores y respondedores a la vacuna por subgrupo de edad, test utilizado y grado de significación estadística.

Pacientes		Respuesta vacuna		Test	p
		No respondedores	Respondedores		
Total	Control	60,7%	39,3%	Chi <sup>2</sup>	0,04
	DM	71.6%	28.4%		
1-4,99 años	Control	30.1%	69.9%	Fisher	0,096
	DM	75%	25%		
5-9,99 años	Control	70.94%	29.06%	Chi <sup>2</sup>	0,35
	DM	70.4%	29.6%		
10 o más a.	Control	69,3%	30,7%	Chi <sup>2</sup>	0,59
	DM	72.7%	27.3%		

El análisis en los subgrupos de edad nos muestra que, al igual que sucedía con los pacientes celíacos, al aumentar la edad disminuyen las diferencias con el grupo control (en este caso, el grupo de 5 a 9.99 años muestra porcentajes de no respondedores

iguales a los del grupo control). No se observa significación estadística en ninguno de los subgrupos.

**2.2.5. Análisis de las diferencias en el porcentaje de pacientes sin anticuerpos frente al VHB en los grupos diagnósticos, según el subgrupo de edad.**

a) Pacientes celíacos

Tabla 17.- Porcentaje de pacientes sin anticuerpos frente al VHB por subgrupo de edad, test utilizado y grado de significación estadística.

Pacientes		Respuesta vacuna		Test	p
		Sin anticuerpos	Con anticuerpos		
Total	Control	8.38%	91.62%	Chi <sup>2</sup>	0.034
	EC	14.02%	85.98%		
1-4,99 años	Control	1.2%	98.80%	Chi <sup>2</sup>	0.018
	EC	9.68%	90.32%		
5-9,99 años	Control	6.84%	93.16%	Chi <sup>2</sup>	0.004
	EC	20%	80%		
10 o más a.	Control	12.86%	87.14%	Chi <sup>2</sup>	0.56
	EC	10%	90%		

Los porcentajes de individuos sin anticuerpos frente al VHB son significativamente más elevados entre los pacientes celíacos con

respecto a los controles en los dos primeros subgrupos de edad. En el grupo de 10 o más años no se observa esta diferencia.

b) Pacientes diabéticos

Tabla 18.- Porcentaje de pacientes sin anticuerpos frente al VHB por subgrupo de edad, test utilizado y grado de significación estadística.

Pacientes		Respuesta vacuna		Test	p
		Sin anticuerpos	Con anticuerpos		
Total	Control	8.38%	91.62%	Chi <sup>2</sup>	0.054
	DM	14,68%	85,32%		
1-4,99 años	Control	1.2%	98.80%	Fisher	0.004
	DM	50%	50%		
5-9,99 años	Control	6.84%	93.16%	Chi <sup>2</sup>	0.17
	DM	14.8%	85.2%		
10 o más a.	Control	12.86%	87.14%	Chi <sup>2</sup>	0.97
	DM	13%	87%		

En los pacientes diabéticos también se observa un porcentaje significativamente más elevado de individuos sin anticuerpos frente al VHB entre los menores de 5 años, con respecto al grupo control. En el siguiente grupo de edad también se observan diferencias aunque no alcanzan la significación estadística. En el grupo de mayor edad los porcentajes son similares a los de los controles.

## 2.3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA RESPUESTA A LA VACUNA Y LOS HAPLOTIPOS HLA

### 2.3.1. Diferencias en el porcentaje de individuos (controles y celíacos) no respondedores a la vacuna en función de la expresión de HLA- DQ2

Tabla 19.- Porcentaje de individuos no respondedores y respondedores a la vacuna en función de la expresión del HLA-DQ2.

RESPUESTA VACUNAL	DQ2		
	NO	SI	TOTAL
NO RESPONDEDORES	78 (60,94%)	185 (69,81%)	263
RESPONDEDORES	50 (39,06%)	80 (30,19%)	130
TOTAL	128	265	393

Pearson  $\chi^2 = 2.9179$  P = 0.088

Existe un mayor porcentaje de individuos no respondedores a la vacuna entre los que expresan el gen HLA-DQ2 con respecto a los que no lo expresan, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas.



**2.3.2. Diferencias en el porcentaje de individuos (controles y celíacos) sin anticuerpos frente al VHB en función de la expresión de HLA- DQ2**

Tabla 20.- Porcentaje de individuos con y sin anticuerpos en función de la expresión del HLA-DQ2.

RESPUESTA VACUNA	DQ2		TOTAL
	NO	SI	
CON ANTICUERPOS	123 (96,09%)	228 (86,04%)	351
SIN ANTICUERPOS	5 (3,91%)	37 (13,96%)	42
TOTAL	128	265	393

Pearson chi2 = 9.1442 P = 0.002

El porcentaje de individuos sin anticuerpos frente al VHB es más elevado entre aquellos que expresan el gen HLA-DQ2 (13,96%) con respecto a los que no lo expresan (3,91%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

**2.3.3. Diferencias en el porcentaje de individuos (controles y celíacos) no respondedores a la vacuna en función de la expresión de HLA- DQ8**

Tabla 21.- Porcentaje de individuos no respondedores y respondedores a la vacuna en función de la expresión del HLA-DQ8.

RESPUESTA VACUNA	DQ8		
	NO	SI	TOTAL
NO RESPONDEDORES	218 (65,47%)	45 (75%)	263
RESPONDEDORES	115 (34,53%)	15 (25%)	130
TOTAL	33	60	393

Pearson chi2 = 2.0878 P = 0.148

Aunque el porcentaje de individuos no respondedores es mayor entre los que expresan el HLA-DQ8, las diferencias con respecto a los que no lo expresan no alcanzan la significación estadística.

**2.3.4. Diferencias en el porcentaje de individuos (controles y celíacos) sin anticuerpos frente al VHB en función de la expresión de HLA- DQ8**

Tabla 22.- Porcentaje de individuos con y sin anticuerpos frente al VHB en función de la expresión del HLA-DQ8.

RESPUESTA VACUNA	DQ8		
	NO	SI	TOTAL
CON ANTICUERPOS	296 (88,89%)	55 (91,67%)	351
SIN ANTICUERPOS	37 (11,11%)	5 (8,33%)	42
TOTAL	333	60	393

Pearson chi2 = 0.4110 P = 0.521

Tampoco en este caso se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de individuos sin anticuerpos, en función de la expresión del HLA-DQ8.

**2.3.5. Diferencias en el porcentaje de pacientes celíacos no respondedores a la vacuna en función de la expresión de HLA- DR3**

Tabla 23.- Porcentaje de celíacos no respondedores y respondedores a la vacuna en función de la expresión del HLA-DR3.

RESPUESTA VACUNA	DR3		TOTAL
	NO	SI	
NO RESPONDEDORES	43 (52,44%)	90 (77,59%)	133
RESPONDEDORES	39 (47,56%)	26 (22,41%)	65
TOTAL	82	116	198

Pearson chi2 = 13.7769 P = 0.000

El porcentaje de celíacos no respondedores a la vacuna es un 25% más elevado entre los que expresan el HLA-DR3 que entre los que no lo expresan, siendo estas diferencias significativas desde el punto de vista estadístico.

**2.3.6. Diferencias en el porcentaje de pacientes celíacos no respondedores a la vacuna en función de la expresión de HLA- DR7**

Tabla 24.- Porcentaje de pacientes celíacos no respondedores y respondedores a la vacuna en función de la expresión del HLA-DR7.

RESPUESTA VACUNA	DR7		
	NO	SI	TOTAL
NO RESPONDEDORES	91 (63,64%)	42 (76,36%)	133
RESPONDEDORES	52 (36,36%)	13 (23,64%)	65
TOTAL	143	55	198

Pearson chi2 = 2.9179 P= 0.088

Aunque el porcentaje de no respondedores a la vacuna es mayor entre los celíacos que expresan el HLA-DR7, las diferencias no alcanzan la significación estadística.

**2.4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL RECUENTO DE LIE, GD Y CD3- EN LAS MUESTRAS DE BIOPSIA INTESTINAL DE LOS PACIENTES CELÍACOS Y LA RESPUESTA A LA VACUNA DEL VHB**

Para analizar esta relación se hizo una correlación entre el número de LIE, gamma delta y CD3- y el título de anti-HBs en mUI/mL, mediante la prueba de correlación de Spearman.

Tabla 25.-Valor de coeficiente de Spearman y significación estadística entre el número LIE, gamma delta y CD3- con los títulos de anti-HBs (en mUI/mL) en los pacientes celíacos.

	TÍTULOS ANTI-HBS
LIE	Coeficiente= -0.1874 p= 0.0280
GAMMA DELTA	Coeficiente= -0.018 p= 0.82
CD3-	Coeficiente= 0.1938 p= 0.0167

Se encuentra relación estadísticamente significativa, con valor negativo, entre el recuento de LIE y los títulos de anti-HBs, lo que indica que los pacientes con un recuento mayor de LIE en la mucosa intestinal presentan títulos de anti-HBs más bajos. La relación

también fue significativa, con valor positivo, en el caso de los CD3-, indicando que los pacientes con menores recuentos de CD3- en las muestras de biopsia presentan menores títulos de anti-HBs.

**2.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN EXISTENTE ENTRE EL TIEMPO QUE HA DURADO LA INGESTA DE GLUTEN EN LOS PACIENTES CELÍACOS Y LOS TÍTULOS DE ANTI-HBS**

**2.5.1. Relación entre la duración de la ingesta de gluten (en años decimales) y el título de anti-HBs (en mUI/mL)**

Para este estudio se realizó la correlación de Spearman.

Coeficiente de Spearman= -0.0731

El coeficiente es negativo y muy cercano a 0, lo que indica que ambas variables son independientes

**2.5.2. Relación entre la duración de la ingesta de gluten y la ausencia de anticuerpos frente al VHB**

Para este análisis se realizó una relación logística entre ambos parámetros con los siguientes resultados:

Coeficiente OR	INTERVALO CONFIANZA	p
0,8816313	0,7622198 1,01975	0.066

Aunque se observa relación entre ambos parámetros, esta no es estadísticamente significativa.

### 2.5.3. Relación entre la duración de la ingesta de gluten y ser no respondedor frente a la vacuna del VHB

También en este caso se realizó una relación logística entre ambos parámetros:

Coeficiente OR	INTERVALO CONFIANZA	p
0,8943636	0,8109504 0,9863566	0.019

En este análisis sí se encontró significación estadística, indicando que, al aumentar el tiempo de exposición al gluten, se eleva el riesgo del individuo de tener un título no protector de anticuerpos frente al VHB. Este resultado se contradice con el derivado de la correlación de Spearman, por lo que, junto al hecho de que los pacientes con mayor duración de la exposición al gluten también tenían una edad mayor en el momento de realizar la serología, se decidió realizar una regresión entre los 3 parámetros: no respondedor a la vacuna del VHB, edad de serología y tiempo de exposición al gluten

	Coeficiente	INTERVALO CONFIANZA	p
EDAD SEROLOGÍA	0,9170466	0,8285835- 1,014954	0,094
TIEMPO GLUTEN	0,9512208	0,8423119- 1,074211	0,42



La interpretación de estos resultados es la siguiente: al aumentar el tiempo de exposición al gluten, el riesgo del individuo de ser un no respondedor a la vacuna del VHB aumenta, aunque de manera no estadísticamente significativa, siendo el aumento de la edad en la que se realiza el estudio serológico la responsable fundamental de ese incremento del riesgo.

## 2.6. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA A UN "BOOSTER" DE VACUNA

De los 146 pacientes con EC que eran no respondedores frente a la vacuna del VHB, 72 recibieron un "booster" de esta vacuna. Los títulos de anti-HBs se midieron 6 meses después. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 26.-Título de anti-HBs tras "booster" vacunal en función del título previo.

TÍTULO PRE- "BOOSTER"	TÍTULO POST-"BOOSTER"			
	≥ 10 mUI/mL	>0 y < 10 UI/mL	0,000 mUI/mL	TOTAL NO RESPONDEDORES
>0 Y <10 mUI/mL	54 (91,52%)	4 (6,77%)	1 (1,69%)	5 (8,47%)
0,000 mUI/mL	7 (53,84%)	4 (30,76%)	2 (15,38%)	6 (46,15%)
Total	61 (84,72%)	8 (11,11%)	3 (4,16%)	11 (15,27%)

De los 72 pacientes que recibieron la dosis adicional de vacuna, un 15,27% continúa sin presentar respuesta inmune adecuada frente

a la misma. Este porcentaje se eleva al 46,15% cuando nos fijamos sólo en aquellos pacientes que carecían por completo de anticuerpos.

### 3. GRUPO DE PACIENTES CELÍACOS Y DIABÉTICOS

Aunque este grupo era poco numeroso y lo hemos incluido dentro de la población de celíacos para realizar todo el estudio estadístico, hemos querido analizar cómo se comportan estos pacientes.

Tabla 27.- Distribución por edad y sexo y respuesta vacunal en los pacientes celíacos y diabéticos.

DISTRIBUCIÓN POR SEXO	VARONES		MUJERES
	4 (24%)		12 (75%)
EDAD	MEDIA		MEDIANA
	7.19 ( $\pm 4,17$ )		8.1
SUBGRUPOS EDAD	1-4.99 años	5-9.99 años	$\geq 10$ AÑOS
	5 (31.25%)	7 (43.75%)	4 (25%)
RESPUESTA VACUNAL TOTAL PACIENTES	RESPONDEDORES	NO RESPONDEDORES	SIN ANTICUERPOS
	5 (31.25%)	11 (68%)	2 (12.5%)

En estos pacientes destaca un predominio de mujeres, que representa el 75% de los individuos de esta categoría, porcentaje más elevado que en los otros grupos diagnósticos. La edad media es muy parecida a la de los pacientes con EC, lo mismo que sucede con la distribución en subgrupos de edad (en el total de celíacos hubo un 29,27% menores de 5 años, un 44,45% entre 5 y 9,9 años y un 25% de 10 o más años). La respuesta vacunal en este grupo también se aproxima mucho a la del grupo de celíacos (un 68,18% de no respondedores y un 14,14% de pacientes sin anticuerpos).

# **DISCUSIÓN**

## **1. CONSIDERACIONES GENERALES**

Desde la publicación de los primeros estudios sobre la respuesta a la vacuna del VHB en los pacientes celíacos se despertó nuestro interés por valorar si los enfermos seguidos en nuestra unidad se comportaban de igual manera frente a esta vacuna. Por ello empezamos a estudiar la respuesta de nuestra población de celíacos frente a la vacuna del VHB.

A medida que fueron apareciendo nuevos estudios comenzaron a sacarse conclusiones que, para sus autores, estaban llenas de contundencia. Cuando analizamos detenidamente tales estudios, inferimos que, aunque eran muy interesantes en el planteamiento, la metodología que empleaban no era la más adecuada: pacientes de distintas edades, diferente edad de vacunación, títulos serológicos medidos en distintos momentos, tamaños muestrales pequeños...

A la vez que comenzamos el estudio de nuestros pacientes, nos planteamos realizarlo también en los enfermos con DM1. De nuestros pacientes 16 compartían ambos diagnósticos. Pensamos que la asociación de ambas enfermedades, que además comparten una base genética, podía implicar que los individuos diabéticos también presentaran una peor respuesta frente a esta vacuna. Por otro lado,

los resultados de los estudios en este grupo de enfermos no eran concluyentes. Por ello, y gracias a la colaboración de la Unidad de Endocrinología, el estudio se amplió también a los enfermos con DM1.

Contábamos por tanto con un número suficiente de pacientes celíacos y diabéticos. Pero para realizar el estudio, necesitábamos un grupo control con un tamaño muestral suficiente y unas características sociodemográficas similares a las de los pacientes. Este grupo tenía que estar formado por individuos sanos, por lo que muchos de los pacientes atendidos en nuestras consultas tenían que ser excluidos del estudio, lo que podía conllevar dificultades para conseguir un número suficiente de individuos. Pensamos que si solicitábamos la colaboración de los niños que diariamente acudían al servicio de extracciones para realizarse un análisis de sangre por otro motivo, podríamos reclutar un grupo suficiente de controles. La mayoría de estos niños se realizaban la extracción para estudios preoperatorios, estudios de cefalea, de talla baja, de obesidad y de otras muchas patologías, que no iban a afectar a los resultados del estudio. Lo que menos les gusta a los padres y a lo que más dificultades ponen es a que su hijo sufra. En este caso ese factor quedaba controlado porque la extracción de sangre tenía que hacerse de todas formas. Ello ayudó a que el porcentaje de colaboración fuera elevado.

## 2. FORTALEZAS Y LIMITACIONES METODOLÓGICAS

Diseñamos un estudio de casos y controles. Se trata de un método analítico y observacional que puede establecer una relación causal entre dos variables y medir la fuerza de dicha asociación. Por tanto, era adecuado para llevar a cabo nuestros objetivos de trabajo.

La principal limitación de este tipo de estudios son los numerosos sesgos que pueden aparecer durante su desarrollo.

El primero que hay que tener en cuenta es el sesgo de selección. Los participantes eligieron voluntariamente colaborar en el estudio. Para los casos (celíacos y diabéticos) la participación fue del 100%; al explicarles el objetivo del estudio la motivación fue absoluta. El grupo control, aunque no estaba tan motivado con el tema estudiado, se consiguió fácilmente, pues más del 90% de los individuos encuestados accedieron a participar y firmaron el consentimiento informado. La selección de estos pacientes fue aleatoria: se pidió colaboración a todos aquellos que acudían a realizarse un análisis clínico al servicio de extracciones en los días en que el investigador estaba allí presente. Los pacientes no son citados en este servicio según su edad o su patología, o la consulta de la que provengan; cada día, niños de diferentes edades y con motivos de estudio diferentes acuden a realizarse la analítica. Estos niños provenían del mismo área geográfica que el grupo de casos y, por tanto, sus características socio-demográficas eran similares. Así pues,

parece poco probable que este sesgo tenga influencia en los resultados.

Entre las variables incluidas en el estudio existen algunas que pueden actuar como factores de confusión, fundamentalmente la edad y el sexo. El sexo no se ha neutralizado dado que en ninguna referencia bibliográfica consta que la respuesta frente a la vacuna del VHB sea distinta entre mujeres y varones. Como ya hemos mencionado, la edad sí que puede hacer cambiar los resultados, por lo que este sesgo se ha neutralizado, al menos parcialmente, pareando a los participantes por grupos de edad. Esta es una de las principales limitaciones que hemos observado en los estudios existentes hasta la fecha y que hemos intentado superar.

Tampoco se ve en este trabajo sesgo de memoria, pues los datos se recogen directamente de la historia clínica del paciente, rellenada en el momento de la visita médica y no *a posteriori*. Estos datos son objetivos y por tanto no interpretables por el entrevistador.

El sesgo de medición queda también neutralizado, pues las determinaciones serológicas, el estudio de LIE de la mucosa intestinal y el estudio genético de todos los participantes en el estudio fueron realizados en el mismo laboratorio, con el mismo aparataje, la misma metodología y a cargo del mismo profesional.

En el estudio se plantea el análisis de varias variables. Para estudiar la respuesta a la vacuna del VHB nos hemos fijado en dos parámetros: respondedor o no respondedor a la vacuna (definido por

un título  $\geq 10$  mUI/mL o  $< 10$  mUI/mL, respectivamente) y la ausencia de anticuerpos anti-HBs (título = 0,000 mUI/mL). La consideración de la respuesta vacunal mediante dos variables complica el trabajo. Ninguno de los estudios previos lo hace; en ellos sólo se valora la variable respondedor/no respondedor. Pero pensamos que, a pesar de hacerlo más complejo, aumenta su precisión al reflejar en mayor medida a los verdaderos no respondedores a la vacuna (como veremos más adelante).

El tamaño muestral es suficiente para otorgar un alto poder al estudio. El máximo alfa que se asume es del 0,05 con un riesgo beta máximo del 0,10. Esto implica que la posibilidad de aceptar la hipótesis de trabajo siendo falsa es menor del 5% y, al contrario, la posibilidad de rechazarla siendo verdadera es menor del 10%.

Entre las limitaciones del estudio figuran:

- No disponer de estudio genético en los pacientes diabéticos.

Al contrario de lo que sucede en los pacientes celíacos no es práctica habitual el estudio de los genes del complejo HLA en estos enfermos. El haberlo realizado hubiera supuesto un coste excesivamente elevado, aunque hubiera permitido analizar con más precisión el papel de estos genes en la respuesta a la vacuna del VHB.

- En el grupo control, y también por cuestiones económicas, sólo se realizó el estudio de los genes HLA-DQ, y no en todos los pacientes, sólo en 204 de ellos. Para el estudio de la posible



asociación entre los haplotipos HLA-DR3 y DR7 disponíamos de un grupo más reducido de individuos. Por ello, en estos dos casos, sólo se analiza la relación con ser o no respondedor a la vacuna. El grupo de pacientes sin anticuerpos era muy reducido, lo que limita la extrapolación de datos y merma validez al análisis.

Para valorar la asociación entre los alelos HLA de clase II y la respuesta vacunal, no se consideró la homocigocia o heterocigocia del gen, sólo si este estaba presente.

- A aquellos pacientes del grupo control que carecían por completo de anticuerpos frente al VHB se les recomendó la administración de una dosis adicional de vacuna. Hubiera sido deseable conocer el título de anti-HBs unos meses después. Pero para conocer este dato, hubiera sido preciso hacer volver al paciente al hospital y repetir el estudio analítico, cosa a lo que la mayoría no estaban dispuestos y en muchos de ellos hubiera supuesto una negativa a participar.

- La distribución por edad del grupo de pacientes diabéticos no es la más idónea para el estudio. Existen muy pocos individuos en los grupos de menor edad, que son los fundamentales para sacar conclusiones. Este escaso número de pacientes puede limitar la extrapolación de resultados en este grupo diagnóstico.

### 3. CARACTERÍSTICAS POBLACIONES

La población objeto de nuestro estudio presenta una mediana de edad de 8,8 años, siendo el grupo de celíacos el más joven (mediana de 7,49 años), y el de diabéticos el de mayor edad (mediana de 12,05 años). Es entre el grupo control y el de celíacos donde se encuentran más semejanzas y los porcentajes de pacientes que forman parte de cada uno de los subgrupos de edad creados son bastante parejos.

En cuanto a la distribución por sexo, los porcentajes del total de pacientes se aproximan al 50%. Dentro de los grupos diagnósticos se observa un leve predominio de varones en el grupo control y en los pacientes con DM1. En el grupo de EC hay un predominio de mujeres, semejante a lo descrito en la bibliografía (55, 238).

Un 95% de nuestros pacientes con EC expresan el alelo HLA DQ2 y un 9% el DQ8. Estos resultados concuerdan con los de estudios realizados en nuestro país que muestran porcentajes que van desde el 70,93% (238) al 93% (239) y 95% (240) para el DQ2 y del 9,3% para el DQ8, y con otros realizados fuera de España con frecuencias del 80,64% y del 16,12% respectivamente (241). En cambio, respecto a la población general, se describe la presencia de DQ2 en porcentajes que varían del 20% (174) al 39% (240) en sujetos españoles; estudios realizados fuera de nuestro país también muestran porcentajes semejantes: un 21% en individuos del sur de Italia (242) y un 33,97% en individuos libios (243). Se han

encontrado frecuencias del 49% para el DQ2 en familiares de pacientes celíacos de Cantabria (238). Nuestro grupo control presenta, por tanto, el alelo HLA DQ2 con una frecuencia ligeramente mayor de la descrita por otros autores (42,56%). Los individuos de este grupo de estudio fueron seleccionados entre niños estudiados en consulta por diversas patologías como dolor abdominal inespecífico, talla baja (en estos dos grupos de pacientes se descartó la EC), obesidad, epilepsia, pacientes pre-quirúrgicos... No se incluyeron en este grupo pacientes con enfermedades autoinmunes ni familiares de enfermos con EC. Quizá sean necesarios más estudios para establecer la verdadera frecuencia de este haplotipo en la población española. En cualquier caso, el número de pacientes del grupo control a los que se les realizó el estudio genético no era lo suficientemente numeroso como para poder sacar conclusiones concluyentes a este respecto.

#### **4. RESPUESTA SEROLÓGICA A LA VACUNA DEL VHB**

Cuando comenzamos a analizar la tasa de pacientes no respondedores a la vacuna de VHB en el grupo control, nos llamó significativamente la atención el elevado porcentaje de no respondedores (más del 60%) entre nuestros niños, con respecto al 4-10% relatado en la bibliografía (7, 8). Ello nos llevó a investigar

qué es lo que sucede con la respuesta inmune a largo plazo generada por la vacuna de la hepatitis B administrada durante la infancia. Esta respuesta no ha sido completamente evaluada. No obstante, parece que con el paso del tiempo, los títulos de anti-HBs tienden a disminuir en diferente grado. Estudios a largo plazo de pacientes vacunados de recién nacidos muestran que los anticuerpos se negativizan en el 15-50% de los pacientes inicialmente respondedores, transcurridos 5-10 años de la vacunación (244-246). Este descenso de los títulos se ve claramente influido por la endemicidad para la infección por VHB existente en la zona en que se realice el estudio.

#### 1.- Países con alta endemicidad:

- Jack y cols. (200) publican en 1998 un estudio realizado en Gambia con 764 pacientes vacunados de hepatitis B en el período neonatal. Observan que el porcentaje de pacientes con títulos de anti-HBs mayores de 10 mUI/mL desciende del 94% al año de edad, al 84% a los 5 años y al 68% a los 7 años. Pese a este descenso de la tasa de anticuerpos, sólo dos de los niños desarrollaron infección crónica por el virus B. Los dos pacientes mostraron títulos menores de 10 mUI/mL desde el primer año de seguimiento.
- Dentinger y cols. (201) realizan un estudio en Alaska con 1279 niños que fueron vacunados en el período neonatal, valorando la evolución de los títulos de anticuerpos a lo largo de 10 años. El porcentaje de pacientes con títulos mayores de 10 mUI/mL

desciende del 47% a los 2 años al 19% a los 5 años y al 8% a los 10 años de edad. A pesar del elevado porcentaje de pacientes con un nivel de anticuerpos no protector, ninguno desarrolló infección crónica por el virus. Un 1% de los pacientes presentó un ascenso del título de anti-HBs por encima de 20 mUI/mL tras la exposición al virus, manifestando así un efecto "booster" natural.

- Tosun y cols. (247) realizan el estudio en Turquía con 1279 niños que iniciaron la vacunación al nacimiento. Miden los niveles de anti-HBs a los 7 años de edad y encuentran que el 45,7% tiene títulos menores de 10 mUI/mL. Sin embargo, sólo el 0,2% del total desarrollaron infección crónica por el virus B.
- Van der Sande y cols. (202) estudian a 492 niños de 15 años que fueron vacunados de recién nacidos en Gambia. El 66,4% tenían títulos < 10 mUI/mL y el 3,2% títulos de 0 mUI/mL. A 225 de estos pacientes les administran un "booster" y evalúan los títulos al año del mismo. El 21,6% presentaba niveles de anticuerpos menores de 10 mUI/mL. De los 492 pacientes 17,7% sufrieron infección por el VHB y 2 pacientes evolucionaron a la cronicidad.
- Williams y cols. (203) estudian a 70 niños de Samoa midiendo los títulos de anticuerpos a los 6 y a los 60 meses de recibir la vacuna. Estos niños presentan un descenso del título de anticuerpos de 56 veces a los 60 meses (un 90% tienen títulos

mayores de 10 mUI/mL a los 6 meses mientras que a los 60 meses sólo el 41%).

Administran un "booster" de vacuna a todos los pacientes y observan que el 90% muestra una respuesta amnésica, siendo ésta mayor en los niños que inicialmente tenían títulos superiores a 10 mUI/mL. De los pacientes no respondedores, el 57% tuvo respuesta amnésica al "booster". Doce meses después del "booster" el título de anti-HBs descendió 26 veces, siendo este descenso más acusado en los no respondedores iniciales.

A pesar de la continúa exposición al virus no detectaron ninguna infección en este grupo de pacientes

- Wu y cols. (204) estudian a 805 niños de Taiwán, hijos de madres HBsAg positivo, vacunados de recién nacidos con diferentes dosis de vacuna (2.5, 10 y 20 µg). A los 5 años, un 6% no tenía títulos detectables de anticuerpos, subiendo el porcentaje al 14% a los 10 años. El título de anticuerpos que presentaba el niño a los 12 meses de edad fue el predictor más fuerte de la pérdida posterior de anticuerpos (a menor título inicial mayor fue la pérdida de anticuerpos). La dosis de vacuna también desempeñó un papel importante, siendo menor la pérdida de anticuerpos en los que recibieron una dosis más alta.

Un 15% de los pacientes sufrió infección por el virus B, pero sólo en un 2,7% se cronificó. La tasa de pacientes infectados también se relacionó con la respuesta inicial a la vacuna, presentando menor tasa de infección aquellos cuyo título inicial estaba por encima de 1000 mUI/mL.

- AlFaleh y cols. (205) realizan un estudio en Arabia Saudí con 1355 pacientes procedentes de zonas de distinta endemicidad, que fueron vacunados de recién nacidos. Miden el título de anticuerpos entre los 16 y 18 años de edad. El título era inferior a 10 mUI/mL en el 39,4% de los pacientes, siendo el porcentaje más alto en el área de menor endemicidad. Ninguno de los pacientes desarrolló infección crónica por el virus.
- Juen y cols. (207) estudian a 88 niños chinos, vacunados en el período neonatal, desde el año hasta los 18 años de edad. El porcentaje de pacientes con títulos mayores de 10 desciende de un 93% al año a un 60% a los 18 años. Se detecta respuesta amnésica al contacto con el virus en 70 pacientes, incluidos 7 que inicialmente presentaban títulos menores de 10 mUI/mL. Ningún paciente desarrolló infección crónica.

## 2.- Países con baja endemicidad:

- García Llop y cols. (208) estudian a 382 niños españoles vacunados, en un 77,2%, de recién nacidos y el resto a los 12 años de edad. Al año de la vacuna sólo el 3,6% tenía títulos

menores de 10 mUI/mL, ascendiendo el porcentaje al aumentar la edad, hasta un 25,8% a los 7 años.

- Faustino y cols. (209) estudian a 533 niños italianos vacunados de recién nacidos y a 659 vacunados a los 11 años, 5 años después de completar la pauta vacunal. El 92,9% de los niños y el 94,1% de los adolescentes tenían títulos protectores. Concluyen que los niños que tenían mayor edad en el momento de recibir la vacuna presentan un título mayor de anticuerpos.
- En el trabajo realizado por Peterson y cols. (210), el 41 % de los pacientes tenían títulos protectores a los 8,9 años, descendiendo el porcentaje al 24% a los 12,6 años. Cuando estos niños recibieron un "booster" de vacuna, entre el 61 y 67% manifestó un ascenso de los títulos de anti-HBs a más de 10 mUI/mL.
- En otro estudio, realizado en Italia por Zaneti y cols. (211) con un grupo de 1212 niños vacunados de recién nacidos y otro de 446 adultos vacunados de adolescentes, se observa que el 36% de los niños y el 11% de los adultos presentan títulos de anti-HBs menores de 10 mUI/mL a los 10 años de recibir la vacuna.

Todos los estudios ponen en evidencia un descenso en los niveles de anticuerpos con el tiempo. Sin embargo, el nivel concreto de anti-HBs no se relaciona con el grado de protección ofrecido por la vacuna. Es evidente que existe memoria inmunológica y que la



protección frente a la hepatitis B depende de una interrelación compleja entre las células B, las células T helper, linfocitos T citotóxicos y complejos antígeno-anticuerpo (248). Esto explica por qué un individuo que fue vacunado con éxito, pero que ha perdido los anticuerpos, produce un "pool" de linfocitos B sensibles al HBsAg 3-5 días después de entrar en contacto con el virus. La demostración, mediante Spot-ELISA, de la existencia de células B circulantes capaces de producir anti-HBs en una población de pacientes vacunados 15 años antes corrobora la existencia de memoria inmune (249, 250). Además la administración de un "booster" de vacuna a los pacientes previamente vacunados cuyos títulos de anticuerpos han descendido a niveles no protectores genera una fuerte respuesta amnésica en la mayoría de ellos.

Debido a estos hallazgos el Grupo de Consenso Europeo sobre Inmunidad frente a la hepatitis B (251) no recomienda la administración de dosis de recuerdo de vacuna a aquellos pacientes inmunocompetentes que respondieron adecuadamente al curso primario de vacunación.

Por todo lo expuesto con anterioridad, no podemos considerar que un paciente que presenta un título de anti-HBs menor de 10 mUI/mL varios años después de completar la vacunación sea un no respondedor a la vacuna. Para conocer si un sujeto responde o no a la vacuna, los niveles de anticuerpos deben medirse en los 2-6 meses siguientes a la finalización de la pauta de vacunación. También se les

puede reconocer tardíamente viendo su respuesta a un “booster” de vacuna. Los no respondedores presentan un pequeño o ningún ascenso del nivel de anticuerpos (252). Este es el único grupo de pacientes que va a quedar sin protección frente al VHB (201).

En nuestro trabajo hemos analizado el efecto que el tiempo transcurrido tras la vacunación tenía en el título de anti-HBs. Todos los pacientes incluidos en el estudio recibieron la vacuna de recién nacidos, según establece el calendario vacunal de la Comunidad de Madrid, con dos dosis de recuerdo, a los 2 y a los 6 meses de edad. Por tanto, la edad a la que se realizó el estudio serológico expresa el tiempo transcurrido tras la vacunación en todos ellos. Se realizó una regresión logística entre la edad del estudio y los títulos de anti-HBs. En ella se observa que, a medida que aumenta la edad, descienden los títulos de anticuerpos. Este efecto fue evaluado por separado en los 3 grupos de pacientes, viendo que el efecto del tiempo era especialmente significativo en el grupo control, menos evidente en los pacientes con EC y no se observaba en el grupo de DM.

Por otro lado también vemos que tanto la media como la mediana del valor de los títulos de anti-HBs son mucho más elevadas en el subgrupo de individuos menores de 5 años que en los mayores de esa edad. En los dos subgrupos de edad siguientes se ven pocas variaciones en estos valores; de hecho, en los 3 grupos de pacientes, la media es más alta en los de mayor edad, con poca variación en el

valor de la mediana entre los dos subgrupos. Parece que, en nuestra población, se produce un descenso importante de los títulos de anti-HBs entre 5 y 10 años después de recibir la vacuna frente al VHB, permaneciendo los títulos bastante estables a partir de esa edad.

Por todo ello, y para intentar neutralizar el efecto que el tiempo tiene en los títulos de anti-HBs, dividimos a los pacientes en 3 subgrupos de edad: menores de 5 años, de 5 a 9.99 años y mayores o iguales a 10 años. Para valorar la respuesta a la vacuna calculamos, en primer lugar, la media y la mediana del valor de los títulos de anti-HBs en cada grupo diagnóstico y en cada subgrupo de edad. También valoramos otros dos parámetros: ser no respondedor a la vacuna (título  $<10$  mUI/m) (4-6) y presencia de un título igual a 0.000 (o ausencia completa de anticuerpos anti-HBs). Estudiamos las diferencias en el porcentaje de no respondedores a la vacuna y en el porcentaje de individuos sin anticuerpos, entre pacientes con EC y controles y entre pacientes con DM1 y controles, en el total de pacientes estudiados y en cada subgrupo de edad. Hemos estudiado estos dos parámetros pensando que, debido al efecto del tiempo en los títulos de anticuerpos, quizá aquellos pacientes con ausencia de anticuerpos representaran en mayor medida a los verdaderos no respondedores que el conjunto de los que presentan un título inferior a 10 mUI/mL, y que sería este grupo de pacientes el mayor expuesto a infectarse por VHB. Y esta consideración no fue equivocada pues,

como veremos más tarde al hablar de la respuesta de estos sujetos a un "booster" de vacuna, casi el 50% de los individuos sin anticuerpos no genera respuesta amnésica al recibir el "booster" de vacuna. Este porcentaje se eleva al 85% en resto de individuos, cuyos títulos son <10 mUI/mL, pero mayores de 0 mUI/mL.

**a) Valores de los títulos de anti-HBs:**

Se calculó la media y la mediana del valor de los títulos de anti-HBs. Al existir gran variabilidad en el valor de los títulos entre los pacientes (valores comprendidos entre 0-1000 mUI/mL) la medida que mejor refleja la tendencia central es la mediana.

Los pacientes del grupo control presentan unos niveles de anti-HBs más elevados en todos los subgrupos de edad. La diferencia es mayor en el subgrupo de menor edad, con una mediana de 33.53 mUI/mL en comparación con un 9.43 y 1.35 en EC y DM, respectivamente. En los siguientes grupos de edad, las diferencias se atenúan aunque siguen existiendo.

**b) No respondedores:**

**b.1.- Total de pacientes:** se observó un porcentaje ligeramente más elevado de pacientes no respondedores entre celíacos y diabéticos con respecto al grupo control. Estas diferencias son estadísticamente significativas para los pacientes con DM. En el

caso de los celíacos no se alcanza la significación estadística aunque por muy pequeño margen.

**b.2.- Pacientes menores de 5 años:** encontramos un 50% y un 75% de no respondedores entre pacientes con EC y DM, respectivamente, frente a un 30,1% en el grupo control. Estas diferencias son estadísticamente significativas para los pacientes celíacos. El escaso número de pacientes diabéticos en este grupo impide alcanzar la significación estadística.

**b.3.- Pacientes de 5 a 9.99 años:** en este subgrupo de edad el porcentaje de no respondedores es muy semejante entre los 3 grupos (70,9% en controles, 76,7% en celíacos y 70,4% en diabéticos), no existiendo significación estadística en ninguno de los dos contrastes.

**b.4.- Pacientes de 10 o más años:** en este subgrupo los porcentajes de no respondedores tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos diagnósticos, estando en todos ellos cercanos al 70% (69,3% en controles, 75% en EC y 72,7% en DM).

**c) Pacientes sin anticuerpos:**

**c.1.- Total de pacientes:** un 14% de pacientes con EC y un 14,7% de pacientes con DM carecían por completo de anticuerpos frente a un 8,4% del grupo control. Al analizar estas diferencias vemos que existe significación estadística en los pacientes celíacos;

para los diabéticos no se alcanza la significación ( $p=0,054$ ) aunque se roza el límite.

**c.2.- Pacientes menores de 5 años:** encontramos diferencias significativas en el porcentaje de pacientes con ausencia absoluta de anti-HBs entre celíacos y controles, y entre diabéticos y controles. Mientras que sólo un 1,2% de los controles carecía de anticuerpos, la frecuencia se eleva al 9,7% en los celíacos y al 50% en los diabéticos.

**c.3.- Pacientes de 5 a 9.99 años:** en este subgrupo de edad hay diferencias significativas entre celíacos y controles, aunque no se alcanzan en el caso de los diabéticos. El porcentaje asciende con respecto a los de menor edad en controles y celíacos (a un 6,8% y a un 20% respectivamente) y desciende a un 14,8% en los diabéticos.

**c.4.- Pacientes de 10 o más años:** al igual que sucedía con los no respondedores, en este subgrupo de edad los porcentajes entre los grupos diagnósticos se aproximan (12,9% en controles, 10% en EC y 13% en DM) no existiendo, por tanto, diferencias significativas entre ellos.

Nuestros resultados muestran, por un lado, que con el paso del tiempo el título de anti-HBs desciende, siendo este descenso más acusado en el grupo control. Por otro lado vemos que las diferencias entre controles, celíacos y diabéticos son mayores en los subgrupos

de menor edad, disminuyendo estas diferencias progresivamente según aumenta la edad.

En el grupo de menor edad el porcentaje tanto de pacientes no respondedores, como el de los que no tienen anticuerpos es el que más se aproxima al "real". Es en este grupo en el que menos tiempo ha transcurrido desde la vacunación y, por lo tanto, en el que menos pérdida de anticuerpos ha habido debido al paso del tiempo.

Según avanzamos en la edad, el porcentaje de no respondedores aumenta en los 3 grupos, estando este aumento relacionado, fundamentalmente, con la pérdida de anticuerpos ocasionada por el paso del tiempo. Parece evidente que este porcentaje de no respondedores se va alejando progresivamente del "real" y la mayoría de estos individuos pertenecen al grupo de respondedores iniciales, cuyos anticuerpos han descendido con el transcurso de los años.

Algo muy parecido sucede con los individuos con ausencia absoluta de anti-HBs. El porcentaje difiere en gran medida en los pacientes de menor edad y tiende a igualarse con el transcurso de los años, a medida que todos los pacientes van perdiendo anticuerpos.

Hemos de señalar que, para el grupo de pacientes diabéticos, los resultados son algo discordantes, hecho que hemos atribuido al escaso número de pacientes de corta edad (sólo 4 menores de 5 años), siendo más del 70% de ellos mayores de 10 años. Esta falta de uniformidad en la distribución por edad altera también el cálculo

de la relación entre el tiempo transcurrido tras la vacunación y el título de anti-HBs. Al ser el tamaño muestral de los pacientes menores de 5 años tan pequeño (sólo 4) la extrapolación de resultados no es posible.

Nuestros hallazgos apoyan que los pacientes con EC generan una menor respuesta inmune cuando reciben la vacuna del VHB. El hecho de que las diferencias sean mayores en los pacientes más jóvenes (aquellos en los que el valor serológico es el más aproximado al que se obtendría al medir la respuesta a los 6 meses de finalizar la vacuna), nos indica que el déficit de anticuerpos es intrínseco, debido a una alteración en la génesis de la respuesta inmune, con muy poco efecto atribuible al tiempo. En el grupo de menor edad, entre los pacientes con EC existe un porcentaje significativamente mayor tanto de individuos no respondedores como de los que carecen por completo de anti-HBs. En el caso de los pacientes diabéticos, el escaso número de individuos en este subgrupo, no permite extraer conclusiones.

Cuando estudiamos el efecto del tiempo en los títulos serológicos también observamos que este efecto era más acentuado en el grupo control. Si partimos de un teórico 5-6% de pacientes no respondedores, con títulos menores a 10 mUI/mL al año de vida (como se describe en la bibliografía), el restante 94-95% tienen un nivel alto de anticuerpos. Por tanto, la media de valores de la que parte el gráfico (la de los pacientes más jóvenes) es elevada y, por



consiguiente, la pendiente de la curva más acentuada. En el caso de los celíacos, la media de valores de la que parte la línea descendente del gráfico es más baja (más de 100 mUI/mL menor, como vimos al hablar de la media de los títulos de anti-HBs), lo que hace que la curva sea menos pronunciada y, por tanto, el efecto del tiempo menos evidente.

A partir de los 10 años, tanto los porcentajes de pacientes no respondedores, como los de los que carecen de anticuerpos tienden a igualarse en los 3 grupos diagnósticos. En el grupo de celíacos y diabéticos partimos de unos porcentajes más altos de sujetos no respondedores y sin anticuerpos que en el grupo control. A este porcentaje inicial se le van sumando todos los que, según pasa el tiempo, van perdiendo anticuerpos, por lo que a medida que asciende la edad hay más individuos con títulos bajos de anticuerpos, aumentando el porcentaje de no respondedores y de pacientes sin anticuerpos. Ello hace que las diferencias entre los tres grupos vayan disminuyendo progresivamente y los porcentajes tiendan a igualarse.

Otro dato que tenemos que valorar es que, cuando a los celíacos no respondedores se les administra un "booster" de vacuna, sólo un 85% genera una adecuada respuesta amnésica. Por tanto, un 15% de estos no respondedores de nuestro estudio son no respondedores "reales". Del grupo de pacientes con ausencia absoluta de anticuerpos, solo la mitad genera respuesta amnésica, por lo que

podemos extrapolar que el 50% de los pacientes estudiados que carecían por completo de anticuerpos son no respondedores “reales”. Este dato apoya nuestra decisión de estudiar las diferencias entre los pacientes con ausencia absoluta de anticuerpos, porque realmente es este grupo el que mejor representa a aquellos que no generan una adecuada respuesta inmune frente a la vacuna del VHB. Por dificultades logísticas no hemos podido valorar la respuesta al “booster” vacunal en el grupo control ni en los pacientes diabéticos para realizar un estudio comparativo y apoyar aún con más fuerza estos resultados.

En resumen, el hecho de que el porcentaje de no respondedores y de pacientes sin anticuerpos sea significativamente mayor en los celíacos con respecto al grupo control, en el subgrupo de individuos más jóvenes, junto con la respuesta observada al “booster” vacunal, indica que en estos enfermos existe una alteración de la respuesta inmune frente a la vacuna del VHB.

En la mayoría de los trabajos que han estudiado la respuesta a la vacuna del VHB en los pacientes celíacos no se ha tenido presente el efecto del paso del tiempo en los títulos de anti-HBs:

- En el trabajo de Noh y cols. (212) los pacientes con EC habían recibido la vacuna entre 0 y 15 años antes. No utilizan grupo control sino que lo comparan con la respuesta

descrita en la población general (en la que la medición de anti-HBs se realiza en los primeros 6 meses tras la vacunación).

- Park y cols. (213) no especifican cuanto tiempo había pasado desde la vacunación ni en los pacientes con EC ni en el grupo control. El único dato disponible es que el tiempo era mayor de 6 meses.
- En el estudio de Nemes y cols. (215) la medición de anti-HBs se realiza a las 4 semanas de finalizar la vacunación en los grupos 1 (celíacos ya diagnosticados) y 4 (celíacos no respondedores revacunados); sin embargo la medición de la respuesta en el grupo 2 (formado por pacientes con EC ya diagnosticados y no diagnosticados) y 3 (población control) se hace entre 2 y 75 meses después de finalizar la vacunación.
- Leonardi y cols. (216) realizan la medición de anticuerpos a distintas edades, con una media de 9,32 años en celíacos y 10,1 años en controles. Todos los pacientes del estudio recibieron la vacuna de recién nacidos. La valoración de la respuesta a la vacuna del VHB se realiza en el total de los pacientes sin tener en cuenta su edad.
- En la trabajo de Ertem y cols. (217) la serología se realiza entre 5-73 meses después de completar la vacunación en los celíacos. En el grupo control no está especificado el tiempo.

- Ertekin y cols. (218) tampoco especifican el tiempo, sólo sabemos que han pasado un mínimo de 6 meses desde que se completó la vacuna.
- Entre los pacientes estudiados por Zingone y cols. (219) había una significativa diferencia entre el tiempo transcurrido desde la vacunación al estudio serológico, que osciló desde 10 años de media en los controles a entre 13 y 19,5 años en los grupos de celíacos.

Solamente los trabajos de Ahishali (214) y Urganci (220) anulan el efecto del tiempo al estudiar a todos los sujetos (celíacos y controles) un mes después de completar la pauta vacunal. Ambos estudios encuentran diferencias significativas en la tasa de respuesta a la vacuna del VHB entre los dos grupos de estudio (68% de respuesta en celíacos frente a un 100% en controles en el primer trabajo y 80% frente al 90% en el segundo). Sin embargo estos dos trabajos también presentan limitaciones:

- En primer lugar, el tamaño muestral de ambos es pequeño (45 y 80 pacientes respectivamente).
- En segundo lugar, los participantes en los estudios reciben la vacunación frente al VHB a diferentes edades. Este hecho, lejos de ser banal, tiene una vital importancia en la respuesta vacunal, pues se ha demostrado que la respuesta difiere al variar la edad de vacunación, con mejor respuesta en adolescentes que en recién nacidos (209, 211). Por tanto,

existe una pérdida de homogeneidad a la hora de comparar los resultados.

Un reciente estudio realizado por Zanoni y cols. (253) analiza las diferencias en la respuesta a la vacuna del VHB entre 69 pacientes con DM1, 42 con EC y 79 controles, no encontrando diferencias significativas en el porcentaje de respondedores entre los 3 grupos diagnósticos, aunque sí obtienen un valor medio de los títulos de anti-HBs más bajos en los pacientes con DM1. Estos autores tampoco tienen en cuenta el tiempo transcurrido tras la vacunación aunque si reconocen que existen estas diferencias (la media del tiempo transcurrido desde que recibieron la vacuna es de 6,8 años en el grupo de DM1, 3,5 años en el de EC y 4,7 años en los controles) y que pueden suponer una limitación de sus conclusiones.

Nuestro trabajo supera las limitaciones de los existentes hasta la fecha porque:

- El tamaño muestral es mayor y suficiente (214 celíacos y 346 controles), y el poder del estudio elevado, por lo que los resultados son extrapolables al conjunto de la población en mayor medida que todos los obtenidos hasta la fecha.
- Hemos neutralizado, al menos parcialmente, el efecto del paso del tiempo en los títulos de anti-HBs, al valorar los resultados en función de los años transcurridos tras completar la pauta vacunal.

Los resultados que hemos encontrado en los pacientes con DM1, aunque parecen indicar una peor respuesta vacunal, no nos permiten sacar claras conclusiones. El análisis en el total de pacientes muestra significación estadística para los no respondedores, pero no para los que carecen de anticuerpos. Cuando estos pacientes se estratifican por edad, tampoco hay significación estadística, salvo en el grupo de menos de 5 años para los pacientes sin anticuerpos; y este subgrupo está formado únicamente por 4 pacientes. Los estudios publicados hasta la fecha tampoco muestran resultados homogéneos, habiendo encontrado algunos trabajos peor respuesta en los sujetos diabéticos con respecto a la población general (229), mientras que otros obtienen resultados semejantes en ambos grupos poblacionales (228, 230, 254). El metanálisis realizado por Spradling (227) parece concluir que los sujetos con DM1 responden levemente peor que la población general a esta vacuna.

En los 4 primeros trabajos mencionados el factor tiempo transcurrido tras la vacuna pierde importancia, pues 3 de ellos (228, 229, 254) miden los títulos de anti-HBs en diabéticos y controles tras finalizar la vacunación (entre 2 y 7 meses después). El trabajo de Halota (230) no utiliza grupo control y a los diabéticos les realizan el estudio serológico entre 5 y 8 meses después de finalizar la pauta vacunal.

A la vista de nuestros resultados parece conveniente que todos los pacientes con EC sean estudiados en orden a conocer su estado de protección frente al VHB. Al no estar indicada la evaluación rutinaria de la respuesta a la vacuna del VHB a los 6 meses de finalizar la pauta vacunal, consideramos que esta valoración debe hacerse en el momento en que estos individuos sean diagnosticados.

## **5. IMPLICACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS HLA EN LA CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DEL VHB**

Algunos estudios muestran que la respuesta inmunológica a las vacunaciones en los pacientes celíacos es similar a la encontrada en la población general, a excepción de la vacuna de VHB (213, 214, 255-265). En este sentido, es bien conocido que la falta de respuesta a la vacuna de VHB en pacientes sanos se ha atribuido al fallo de las moléculas HLA de clase II en su interacción con el antígeno, en la estimulación de las células T-helper o en ambos (266, 267). En numerosos estudios se ha encontrado una elevada incidencia de haplotipos HLA-B8, DR3 y DQ2 en los pacientes no respondedores a la vacuna (267, 268). Al ser el alelo HLA-DQ2 muy frecuente en la población celíaca, se ha postulado que este perfil genético desempeña un papel crucial en la predisposición que tienen los pacientes celíacos

a generar una peor respuesta inmune frente a la vacuna del VHB (212).

Hemos querido analizar si, en nuestra población, la presencia de los genes HLA-DQ2, DQ8, DR3 y DR7 se asociaba con una menor respuesta a la vacuna del VHB. El análisis de los genes HLA sólo estuvo disponible en los pacientes con EC y en el grupo control (únicamente HLA-DQ), por lo que este dato se investigó sólo en estos dos grupos de individuos. Valoramos únicamente la asociación o no con la expresión del gen, no teniendo en cuenta si este estaba presente en homo o en heterocigocia.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la ausencia de anticuerpos frente al VHB y la expresión del alelo HLA-DQ2: el 13,96% de los que lo portan carecen de anticuerpos, frente al 3,91% de los HLA-DQ2 negativos. Esta posible asociación había sido estudiada por Ertem y cols. (217) en 63 pacientes celíacos. En su trabajo no hubo relación entre la presencia del haplotipo HLA-DQ2 y la presencia de un título no protector de anti-HBs. Cuando nosotros valoramos la asociación entre DQ2 y título no protector tampoco encontramos relación.

Así mismo, la presencia del alelo HLA-DR3 mostró una asociación estadísticamente significativa con ser no respondedor a la vacuna: el 77,59% de los sujetos que lo portan tienen un título menor de 10 mUI/mL frente a un 52,44% de los HLA-DR3 negativos.



De los otros dos haplotipos analizados ninguno presentó asociación ni con la ausencia completa de anti-HBs ni con un título de este inferior a 10 mUI/mL.

Los resultados obtenidos demuestran que, en los pacientes celíacos, al igual que sucede en la población general, la expresión de los haplotipos HLA-DQ2 y DR3 se asocia, al menos en parte, a una menor respuesta inmune frente a la vacuna del VHB.

## **6. RELACIÓN ENTRE EL INMUNOFENOTIPO DE LOS LIE DE LA MUCOSA INTESTINAL Y LA CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DEL VHB**

Como hemos mencionado en la introducción, entre los factores implicados en la génesis de una inadecuada respuesta a la vacuna del VHB figura un defecto funcional en las células T necesarias para la producción de anticuerpos anti-HBs por parte de las células B (197-199).

Los LIE son considerados los responsables del daño epitelial de la mucosa intestinal observado en la EC. Son linfocitos T, fundamentalmente células T citotóxicas; su número está aumentado significativamente en el epitelio y en la lámina propia de estos pacientes y, además, expresan un repertorio mayor de receptores tipo NK activadores (45). Aunque el efecto citotóxico de estos

linfocitos se expresa de manera local en el epitelio intestinal de los pacientes celíacos, la repercusión sistémica de la respuesta inmune frente al gluten no está esclarecida.

Hemos querido evaluar si esta alteración inmunológica localizada en la mucosa intestinal de los pacientes con EC podría estar relacionada con la peor respuesta a la vacuna del VHB en los pacientes celíacos. Esta posible relación no ha sido evaluada previamente.

Para ello se valoró la relación existente entre el número de LIE (167 pacientes), de linfocitos CD3- (168 pacientes) y de linfocitos gamma delta (GD) (154 pacientes) existente en la muestra de biopsia intestinal de los pacientes celíacos estudiados, con los títulos de anti-HBs. Esta relación se estudió mediante la correlación de Spearman entre el valor de los títulos de anti-HBs (en mUI/mL) y el número de LIE, CD3- y GD existentes en la mucosa intestinal.

Los coeficientes de Spearman obtenidos son estadísticamente significativos en el caso de los LIE y CD3-. Es negativo para los primeros (los títulos son más bajos en los pacientes con mayor recuento de LIE) y positivo para los CD3- (títulos más bajos en los pacientes con menor recuento de CD3-). Parece, por tanto, que, aquellos pacientes con mayor grado de inflamación en la mucosa intestinal son los que presentan unos títulos de anti-HBs menores. Pensamos que es necesario investigar más a fondo estos datos para aclarar una posible causalidad o la mera coincidencia de esta relación.

Podríamos plantear que la molécula de HLA DQ2 es crítica tanto en la presentación eficaz a los linfocitos T del péptido del gluten como en la presentación menos óptima de los péptidos HBsAg.

## **7. IMPLICACIÓN DEL GLUTEN EN LA CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA VACUNA DEL VHB**

Otro factor que se ha implicado como responsable de la falta de respuesta a la vacuna de VHB en los pacientes celíacos es el gluten. Para algunos autores, el estar tomando gluten en el momento de recibir la vacuna puede disminuir la eficacia de la misma (216, 220). Nuestro estudio neutraliza el posible efecto del gluten en la respuesta vacunal, puesto que todos los pacientes incluidos en el estudio fueron vacunados a la misma edad, comenzando en el período neonatal inmediato y finalizando a los 6 meses de edad, momento en que ninguno de ellos estaba tomando gluten. Por tanto, en el momento en el que se genera la respuesta inmune frente a la vacuna no está presente el gluten.

No obstante, hemos querido valorar el posible efecto del gluten analizando la relación existente entre el tiempo que duró la ingesta de gluten en los pacientes celíacos (mayor cuanto más tarde fueron diagnosticados) y los títulos de anti-HBs. Dado que, en nuestro medio, el gluten se introduce en la alimentación del lactante a la edad

aproximada de 6 meses, para calcular el tiempo que cada paciente había consumido gluten descontamos 6 meses a la edad a la que se diagnosticó la EC. La relación entre el tiempo con gluten (en años decimales) y el título de anti-HBs se valoró mediante la correlación de Spearman. También se realizó una regresión logística para valorar si el riesgo de ser no respondedor a la vacuna o de carecer por completo de anticuerpos aumentaba al aumentar el tiempo de exposición al gluten.

En la primera prueba ambas variables se mostraron independientes, con un coeficiente muy cercano a 0. Este valor indica que cambios en el tiempo de exposición al gluten no se asocian a cambios en los títulos de anti-HBs y, por tanto, los pacientes con mayor tiempo de exposición al gluten no tienen títulos de anti-HBs más bajos.

En el estudio logístico encontramos que el aumento del tiempo de exposición al gluten aumentaba el riesgo de ser no respondedor a la vacuna. Este resultado era discordante con el anterior. Pero el tiempo de exposición al gluten era mayor en los sujetos de más edad (diagnosticados más tarde y, por tanto, estudiados más tarde). Por ello, incluimos en el estudio también el tiempo transcurrido tras la vacunación. Cuando valoramos las 3 variables, el resultado cambia y se interpreta de la siguiente forma: al aumentar el tiempo de exposición al gluten, el riesgo del individuo de ser no respondedor a la vacuna aumenta, aunque de manera no estadísticamente

significativa, siendo el aumento de la edad en la que se realiza el estudio serológico la responsable fundamental de ese incremento del riesgo.

De los 146 pacientes con EC no respondedores a la vacuna, 72 recibieron una dosis de recuerdo de esta. En ese momento ninguno de ellos estaba tomando gluten. Los títulos de anti-HBs fueron medidos nuevamente a los 6 meses del "booster" vacunal. El 84,72% presentaron un ascenso de los títulos por encima de 10 mUI, frente a un 15,27% que continuó presentando un título inferior a 10. El 4,16% presentó un título =0.000 después de la dosis de recuerdo. Estos resultados muestran discordancia con los realizados hasta la fecha. Por un lado, Zingone y cols. (269) encuentran sólo un 28,6% de respuesta al recuerdo vacunal, mientras que en el estudio de Nemes y cols. (215) responden el 97,3% de los pacientes. La diferencia en los resultados de estos dos trabajos es evidente, pero puede explicarse porque el protocolo que siguen los dos autores es diferente: en el segundo estudio los pacientes recibieron una pauta completa de vacunación, mientras que en el primero sólo se administró una dosis de recuerdo. Cuando a los individuos de este primer trabajo que siguen sin presentar respuesta tras la dosis de recuerdo se les administra una pauta vacunal completa, responden el 100%.

Al obtener una excelente respuesta al revacunar a estos pacientes cuando ya no toman gluten, los autores mencionados previamente concluyen que el gluten desempeña un papel importante en la falta de respuesta a la vacuna que presentan los pacientes con EC. Pero pensamos que esta conclusión tiene varias limitaciones:

- En el trabajo de Zingone los títulos iniciales los miden a los 11 años tras la vacunación, mientras que la respuesta a la revacunación es medida a los dos meses. Algo parecido sucede en el estudio de Nemes en el que el tiempo transcurrido desde la vacuna hasta la primera valoración varía entre 1 y 75 meses, mientras que el efecto de la revacunación es medido al mes. Por tanto, ninguno de los dos está teniendo en cuenta la disminución de los títulos de anti-HBs que se produce con el tiempo.
- Como hemos mencionado previamente, la respuesta a un "booster" de vacuna puede servir para identificar a un auténtico no respondedor cuando la respuesta de anticuerpos se mide tardíamente (252). Por ello, los pacientes de estos trabajos que responden a la revacunación pueden estar realmente expresando la auténtica tasa de respuesta de los pacientes con EC a la vacuna del VHB y no una interferencia del gluten en el desarrollo de una adecuada respuesta inmune.

Todos los individuos que forman parte de nuestro estudio recibieron la vacuna del VHB en un momento en el que no tomaban gluten. La génesis de la respuesta inmune frente a la vacuna se produce en un momento en el que no hay gluten en la dieta. Por lo tanto, este no puede ser el responsable de que la respuesta inmune generada sea menor. Tampoco parece que una exposición más prolongada al gluten en estos pacientes sea la responsable de una pérdida más rápida de anticuerpos.

Otro hecho a tener en cuenta es que un individuo no nace celíaco o no celíaco, sino con la predisposición a desarrollar la enfermedad. El que esta se desarrolle o no depende de que se produzca una alteración del equilibrio en los procesos de tolerancia y regulación intestinal que mantienen controlada la respuesta celular frente al gluten. Probablemente este hecho se produce a raíz de un proceso inflamatorio intestinal que provoca daño tisular y, como consecuencia, liberación de TG-2 (53). El momento en que este fenómeno se produce no tiene porque ser el mismo en todos los individuos. Por tanto, lo único que tenemos en el momento de recibir la vacuna del VHB es un "estado de riesgo" para desarrollar la enfermedad" que fundamentalmente viene determinado por los haplotipos HLA de clase II.

## **8. ESTRATEGIA VACUNAL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CELÍACA**

El diseño, la metodología seguida y el número de niños investigados en este estudio confirma los resultados preliminares obtenidos en publicaciones previas, en su mayoría con importantes defectos metodológicos: los pacientes celíacos tienen una disminución en la tasa de respuesta a la vacuna del VHB. Esta falta de respuesta puede representar un problema de salud pública, porque este grupo de no respondedores puede ser considerado como un reservorio de población susceptible al VHB. Estos individuos pueden convertirse en portadores, llevando a la difusión de la enfermedad incluso entre sujetos sanos (270).

A raíz del hallazgo de la menor tasa de respuesta a la vacuna que presentaban los pacientes con EC, se han empezado a valorar nuevas estrategias vacunales en este grupo de pacientes. Se trata de un tema controvertido, pues ni siquiera en la población general se conoce cuál es la pauta a seguir con los no respondedores a la vacuna del VHB.

El CDC (Center for Disease Control and Prevention) considera la administración de una dosis adicional de vacuna a los sujetos no respondedores (título  $<10$  mUI/mL a los 2-6 meses de completar la pauta vacunal) (271); si es necesario, pueden administrarse dos dosis adicionales. En los sujetos con factores de riesgo de baja



respuesta puede usarse una dosis más elevada de vacuna, de 40 µg (272).

The Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) (273) recomienda, para el personal sanitario, medir los títulos de anti-HBs 1-2 meses después de completar la pauta vacunal (3 dosis administradas en el mes 0, 1 y 6). En aquellos individuos en los que el título esté por debajo de 10 mUI/mL, se debe administrar una segunda serie de tres dosis de vacuna. Aquellos que después de este segundo ciclo no alcancen títulos protectores de anticuerpos se manejarán como susceptibles de infección por VHB, debiendo recibir inmunoglobulina específica en caso de exposición al virus.

Poland y cols. (274) han desarrollado un algoritmo para la vacunación de personal sanitario y de otros sujetos sin respuesta a la serie inicial de vacunación. Este algoritmo estratifica a los no respondedores en función del título de anti-HBs presente entre 1 y 6 meses después de la última dosis de vacuna, y la presencia o no de factores de riesgo de baja respuesta (como tabaquismo, obesidad...). Cuando el título de anti-HBs es menor a 10 mUI/mL recomiendan administrar una dosis adicional y medir la respuesta 4-12 semanas después. Si el título está por encima de 10 mUI/mL no son necesarias más dosis; en caso contrario se deben administrar dos dosis más. Si finalizado este segundo ciclo el título se mantiene por debajo de 10 mUI/mL el paciente debe recibir 3 dosis más, con una dosis de vacuna más elevada (40 µg).

Goldwater y cols. (275) han evaluado si la administración de interferón alfa (1 millón de U) junto con la vacuna del VHB mejoraba la respuesta, sin resultados positivos.

Se ha estudiado también la eficacia de vacunas experimentales con resultados prometedores (276, 277).

En el caso de los pacientes con EC con títulos no protectores de anti-HBs se han valorado dos estrategias:

- Leonardi y cols. (278) administran una dosis de vacuna a 58 pacientes con EC no respondedores a la vacuna (los títulos de anti-HBs se midieron al menos un año después de completar la vacunación). A 30 de los niños se les administró 2 µg de vacuna por vía intradérmica, y al resto 10 µg por vía intramuscular. La tasa de respuesta fue semejante en los dos grupos (76,7% frente a un 78,6%), aunque el porcentaje de pacientes con un título post-"booster" superior a 1000 mUI/mL fue significativamente más alto en los que recibieron la vacuna por vía intradérmica. Los pacientes que presentaron un título de anticuerpos no protector después del "booster" vacunal recibieron dos dosis más de vacuna. Como conclusión de su trabajo proponen que los pacientes con EC y títulos no protectores de anticuerpos sean revacunados por vía intradérmica.

- Para Zingone y cols. (267) la solución está en administrar más dosis o dosis más altas de vacuna en estos pacientes. Ellos administran un "booster" vacunal a adultos con EC y títulos no protectores de anticuerpos. Tras esta dosis sólo el 28,6% alcanza un nivel protector de anticuerpos. Sin embargo, en aquellos individuos que reciben dos dosis más de vacuna la protección llega al 100%. Es cierto que una de las limitaciones de este trabajo es que sólo 3 pacientes celíacos reciben la pauta vacunal completa, siendo el tamaño muestral, por tanto, demasiado pequeño para poder extrapolar los resultados.
- Un reciente metanálisis realizado por Filippeli y cols. (279) estudia los resultados obtenidos con el uso de la vacuna intradérmica en distintos grupos de enfermos con baja respuesta frente a la vacuna del VHB, como pacientes en hemodiálisis, pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, enfermedad hepática crónica, EC... En todos los grupos de enfermos la respuesta a la vacuna administrada por vía intradérmica es muy superior a la administrada por vía intramuscular, incluso utilizando dosis menores de vacuna.

Nosotros hemos administrado una dosis estándar de vacuna por vía intramuscular a 72 pacientes celíacos con títulos de anti-HBs

menores de 10 mUI/mL en el momento del estudio. El 84,72% presentó respuesta amnésica al “booster”. Está pendiente de evaluar la respuesta de estos sujetos a una pauta completa de vacunación y si el 15,27% pacientes que no presentaron ascenso del título de anticuerpos tras el “booster” (grupo que representa a los auténticos no respondedores) consigue un título protector de anticuerpos frente al VHB. Es posible que la administración, en este grupo de pacientes, de la vacuna por vía intradérmica o la utilización de una dosis más elevada consiga un porcentaje más elevado de respuesta.

En el caso de los pacientes con DM1 no hay ningún dato disponible sobre estrategias vacunales en no respondedores, posiblemente porque hasta ahora los resultados de los estudios de tasa de respuesta a la vacuna en este grupo diagnóstico no han sido concluyentes. Tras finalizar nuestro análisis tampoco podemos afirmar que la respuesta a la vacuna del VHB en este grupo de pacientes sea peor que la de la población general.

Los resultados de nuestro trabajo apuntan a la necesidad de valorar la respuesta a la vacuna del VHB en los pacientes celíacos en el momento en que son diagnosticados. Como el tiempo transcurrido desde la vacunación va a variar mucho entre unos pacientes y otros, y en todos los casos va a ser superior a los 6 meses, el valor del título de anti-HBs ya no nos va a permitir conocer con exactitud si el

sujeto es o no respondedor a la vacuna, menos cuanto mayor sea el paciente en el momento del diagnóstico. Revacunar a todos aquellos que presenten un título de anti-HBs menor de 10 mUI/mL supondría revacunar a un numeroso grupo de individuos respondedores. Una opción podría ser administrar a este grupo un “booster” vacunal y evaluar la respuesta entre 2-6 meses después, completando la pauta vacunal en aquellos en los que el título continúe por debajo de 10 mUI/mL. Este planteamiento conllevaría también un excesivo gasto (numerosas dosis de vacuna, controles serológicos) y un aumento de la yatrogenia en los pacientes (que, no lo olvidemos, son niños).

Por ello, y dado que los pacientes celíacos no suponen un grupo de riesgo para padecer infección por el VHB, consideramos que la estrategia más adecuada es administrar una pauta completa de vacunación a aquellos individuos cuyo título de anti-HBs en el momento del diagnóstico sea igual a 0.000 mUI/mL, pues, como permite inferir nuestro estudio, estos pacientes son los que reflejan con mayor exactitud a los no respondedores iniciales. La respuesta a esta segunda pauta de vacunación debe ser reevaluada entre 1-6 meses después de su finalización. La pauta a seguir con los individuos que sigan sin presentar un título de anti-HBs mayor o igual a 10 mUI/mL no está clara, pero hasta que se realicen más estudios en este sentido, pensamos que puede ser administrar un tercer ciclo de vacunación en el que se utilizará o bien el doble de dosis, o bien la vía intradérmica.

En el grupo de pacientes celíacos cuyos títulos de anti-HBs en el momento del diagnóstico sean mayores de 0 pero menores de 10 mUI/mL, debe realizarse una monitorización de los títulos, coincidiendo con los controles analíticos periódicos que se realizan a estos pacientes, revacunando a aquellos cuyo título descienda a 0.000 mUI/mL.

## **9. IMPLICACIONES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS DEL ESTUDIO**

Debido a las numerosas dudas que nos plantearon los estudios sobre la respuesta vacunal en los pacientes con EC, proyectamos esta investigación con el ánimo de conocer cómo era realmente la respuesta de este grupo de enfermos a la vacuna del VHB, así como el de intentar conocer el mecanismo causal.

Nuestro objetivo no era el meramente teórico de conocer una cifra de no respondedores a la vacuna entre estos pacientes. Un grupo numeroso de no respondedores implica una población no protegida frente al virus, que puede actuar como reservorio y ayudar a transmitir la infección, con la importancia epidemiológica que este hecho conlleva.

En los pacientes diabéticos la problemática es aún mayor por las continuas exposiciones de riesgo que presentan, que se refleja en una mayor incidencia de infección aguda por VHB (280) y en un

porcentaje un 5% mayor de evolución a la cronicidad en este grupo de pacientes (226).

El conocimiento de esta menor tasa de protección frente al VHB en los pacientes celíacos debe llevarnos a plantear, para ellos, programas de monitorización de la respuesta vacunal. También se deben desarrollar nuevas estrategias vacunales para intentar mejorar su protección frente al virus.

Pensamos que los familiares de primer grado de los pacientes con EC también deberían ser estudiados en este sentido, especialmente si expresan haplotipos HLA de riesgo de menor respuesta inmune frente a esta vacuna.

La implicación de los haplotipos HLA en la menor respuesta inmune a la vacuna del VHB observada en estos pacientes debe ser estudiada en más profundidad y debería ampliarse al grupo de pacientes diabéticos. También queremos abrir la puerta para un análisis más completo sobre la relación que pueda existir entre el inmunofenotipo de los LIE de la mucosa intestinal y la génesis de una respuesta inmune subóptima frente a la vacuna del VHB.

## 10. SUGERENCIAS PARA PRÓXIMOS ESTUDIOS

El análisis detallado de los estudios publicados sobre este tema y la reflexión sobre las limitaciones de nuestro trabajo nos permiten hacer una serie de sugerencias para próximos estudios.

El hecho de haber encontrado una peor respuesta a la vacuna en los pacientes con EC y la implicación causal de los haplotipos HLA, nos plantea la duda de lo que sucede con los familiares de primer grado de estos pacientes. La mayoría de ellos expresan los mismos haplotipos HLA que los celíacos. Pensamos que estudiar en ellos la respuesta a la vacuna del VHB es interesante y conveniente, pues pueden significar otro grupo poblacional con menor protección frente a este virus.

Nuestro trabajo no ha permitido sacar conclusiones claras sobre la respuesta a esta vacuna en los pacientes con DM1. El problema fundamental con el que nos hemos encontrado es el escaso número de pacientes de corta edad participantes en nuestro estudio, que son el grupo de individuos que refleja de manera más fiel la respuesta "real" a la vacuna del VHB. Conseguir un grupo numeroso de pacientes diabéticos con esta característica es muy difícil. El debut de la DM1 en los primeros años de la vida es poco frecuente, sólo un 19% debuta antes de los 5 años (281, 282), por lo que la mayoría de los pacientes seguidos en las Unidades de Endocrinología tienen una edad media parecida a la de nuestro grupo. Pensamos que reclutar un grupo numeroso de pacientes diabéticos menores de 5 años podría



conseguirse si se realizara un estudio multicéntrico, reuniendo todos los pacientes seguidos en varias unidades. Se conseguiría de esta manera aumentar la potencia del estudio. Dado que este grupo de enfermos supone un grupo de riesgo para la infección por VHB, resulta esencial profundizar en el estudio de la calidad de la respuesta inmune que presentan frente a la vacuna del VHB.

Ya hemos mencionado que sería muy interesante realizar el estudio genético en los diabéticos y en un número mayor de controles. De esta manera se profundizaría en la implicación de los haplotipos HLA en la respuesta vacunal de estos pacientes.

Otro punto que queda pendiente y que sería de gran interés es evaluar la respuesta al "booster" de vacuna en todos los participantes del estudio. El estudio serológico no puede realizarse a los 6 meses de finalizada la vacuna, pues ni los pacientes diabéticos ni los celíacos han sido diagnosticados a esta edad. Por ello, el estudio siempre va a tener como interferencia el tiempo transcurrido tras la vacunación. La respuesta a la dosis adicional de vacuna nos puede servir para neutralizar esta interferencia y conocer la tasa real de no respondedores a la vacuna del VHB.

Sería importante investigar sobre la pauta vacunal que debería seguirse en el grupo de pacientes no respondedores a la pauta inicial de vacunación. Distintos autores ya han abierto la puerta con la administración de dosis más elevadas de vacuna a estos pacientes y con el uso de la vacunación por vía intradérmica. Sólo hay dos

estudios en este sentido y queda por aclarar cuál sería la estrategia óptima para garantizar la protección frente al VHB del mayor número posible de pacientes. Se conseguiría de esta manera aumentar la protección frente al VHB en estos individuos, con la importante repercusión epidemiológica que ello conlleva.

## **CONCLUSIONES**

- 1.- Los pacientes con enfermedad celíaca presentan una hiporrespuesta frente a la vacuna del virus B de la hepatitis.
- 2.- Esta menor respuesta a la vacuna está relacionada con la expresión de los alelos del antígeno leucocitario humano DQ2 y DR3.
- 3.- El gluten no influye en la respuesta a la vacuna del virus B de la hepatitis en los pacientes con enfermedad celíaca vacunados en el primer año de vida.
- 4.- Los títulos de anticuerpos anti-antígeno de superficie del virus B de la hepatitis disminuyen con el tiempo cuando la vacuna es administrada en el primer año de vida.
- 5.- Los cambios de los linfocitos intraepiteliales hacia un perfil más inflamatorio se asocian a una peor respuesta a la vacunación frente al virus B de la hepatitis en los pacientes celíacos.
- 6.- Los pacientes con enfermedad celíaca deberían ser estudiados al diagnóstico de su enfermedad para conocer su nivel de anticuerpos anti-antígeno de superficie del virus B de la hepatitis. Aquellos individuos que presenten un título = 0.00 mU/mL deben ser revacunados, administrándoseles la pauta vacunal completa.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 395.
- 2.- Kane M. Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine.* 1995; 13 Suppl 1: S47-9.
- 3.- Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine.* 2008; 26: 6266.
- 4.- Dienstag JL, Werner BG, Polk BF, Snyderman DR, Craven DE, Platt R, et al. Hepatitis B vaccine in health care personnel: safety, immunogenicity, and indicators of efficacy. *Ann Intern Med.* 1984 Jul; 101 (1): 34-40.
- 5.- André FE. Summary of safety and efficacy data on a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Am J Med.* 1989 Sep 4; 87 (3A): 14S-20S.
- 6.- Greenberg DP, Vadheim CM, Marcy SM, Partridge S, Jing J, Chiu CY et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine administered to infants at 2, 4 and 6 months of age. The Kaiser-UCLA Vaccine Study Group. *Vaccine.* 1996 Jun; 14 (8): 811-6.
- 7.- Alper CA. The human immune response to hepatitis B surface antigen. *Exp Clin Immunogenet.* 1995; 12 (3): 171-81.
- 8.- Coates T, Wilson R, Patrick G, André F, Watson V. Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther.* 2001 Mar; 23 (3): 392-403.

- 9.- Durupinar B, Okten G. HLA tissue types in nonresponders to hepatitis B vaccine. *Indian J Pediatr.* 1996; 63: 369.
- 10.- McDermott AB, Zuckerman JN, Sabin CA, Marsh SG, Madrigal JA. Contribution of human leukocyte antigens to antibody response to hepatitis B vaccination. *Tissue Antigens.* 1997; 50: 8.
- 11.- Martinetti M, De Silvestri A, Belloni C, Pasi A, Tinelli C, Pistorio A et al. Humoral response to recombinant hepatitis B virus vaccine at birth: role of HLA and beyond. *Clin Immunol.* 2000; 97: 234.
- 12.- Godkin A, Davenport M, Hill AV. Molecular analysis of HLA Class II associations with hepatitis B clearance and vaccine nonresponsiveness. *Hepatology.* 2005; 41: 1383.
- 13.- Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology.* 2009 Dec; 137 (6): 1912-33.
- 14.- Guandalini S. Historical perspective of celiac disease. IN: Fasano A, Troncone R, Branski D, editors. *Frontiers in celiac disease*, vol 12. Basel, Karger; 2008. pp 1-11.
- 15.- Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953 Jan; 42 (1): 34-42.
- 16.- Zawahir S, Safta A, Fasano A. Pediatric celiac disease. *Curr Opin Pediatr.* 2009 Oct; 21 (5): 655-60.

- 17.- Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F et al. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*. 2009 Jul; 137 (1): 88-93.
- 18.- Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Nov 1; 26 (9): 1217-25.
- 19.- Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R et al. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol*. 2009 Jun 29; 9: 49.
- 20.- Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*. 2006 Jun; 55 (6): 803-8.
- 21.- Gianfrani C, Troncone R, La Cava A. Autoimmunity and celiac disease. *Mini Rev Med Chem*. 2008 Feb; 8 (2): 129-34.
- 22.- Leeds JS, Hopper AD, Sanders DS. Coeliac disease. *Br Med Bull*. 2008; 88 (1): 157-70.
- 23.- Abdulkarim AS, Murray JA. Celiac Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2002 Feb; 5 (1): 27-38.
- 24.- Ciclitira PJ, King AL, Fraser JS. AGA technical review on Celiac Sprue. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*. 2001 May; 120 (6): 1526-40.
- 25.- Farrell RJ, Kelly CP. Celiac sprue. *N Engl J Med*. 2002 Jan 17; 346 (3): 180-8.

- 26.- Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007 Oct 25; 357 (17): 1731-43.
- 27.- Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet*. 2003 Aug 2; 362 (9381): 383-91.
- 28.- Cascella NG, Kryszak D, Bhatti B, Gregory P, Kelly DL, Mc Evoy JP et al. Prevalence of celiac disease and gluten sensitivity in the United States clinical antipsychotic trials of intervention effectiveness study population. *Schizophr Bull*. 2011 Jan; 37 (1): 94-100.
- 29.- Catassi C, Räscht IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*. 1994 Jan 22; 343 (8891): 200-3.
- 30.- Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*. 2001 Feb; 120 (3): 636-51.
- 31.- Genuis SJ, Bouchard TP. Celiac disease presenting as autism. *J Child Neurol*. 2010 Jan; 25 (1): 114-9.
- 32.- Tjon JM, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get?. *Immunogenetics*. 2010 Oct; 62 (10): 641-51.
- 33.- Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002 Sep 27; 297 (5590): 2275-9.
- 34.- Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg O, Gray GM, Sollid LM et al. Identification and analysis of multivalent proteolytically

resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res.* 2005 Sep-Oct; 4 (5): 1732-41.

35.- Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W. Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Invest.* 1972 Jun; 51 (6): 1602-5.

36.- Keuning JJ, Peña AS, van Leeuwen A, van Hooff JP, va Rood JJ. HLA-DW3 associated with coeliac disease. *Lancet.* 1976 Mar 6; 1 (7958): 506-8.

37.- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med.* 1989 Jan 1; 169 (1): 345-50.

38.- Mearin ML, Biemond I, Peña AS, Polanco I, Vazquez C, Schreuder GT et al. HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut.* 1983 Jun; 24 (6): 532-7.

39.- Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet.* 2008 Apr; 40 (4): 395-402.

40.- Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med.* 1998 Jun; 4 (6): 713-7.



- 41.- Vader LW, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YM, Benckhuijsen W, Mearin ML et al. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med*. 2002 Mar 4; 195 (5): 643-9.
- 42.- Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Feb; 4 (2): 140-56.
- 43.- Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB et al. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS One*. 2008 Mar 26; 3 (3): e1861.
- 44.- Jabri B, Ebert E. Human CD8+ intraepithelial lymphocytes: a unique model to study the regulation of effector cytotoxic T lymphocytes in tissue. *Immunol Rev*. 2007 Feb; 215: 202-14.
- 45.- Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C et al. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology*. 2000 May; 118 (5): 867-79.
- 46.- Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*. 2004 Sep; 21 (3): 357-66.
- 47.- Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G et al. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. 2006 May 15; 203 (5): 1343-55.

- 48.- Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ et al. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14; 100 (21): 12390-5.
- 49.- Van de Wal Y, Kooy YM, Drijfhout JW, Amons R, Papadopoulos GK, Koning F. Unique peptide binding characteristics of the disease-associated DQ (alpha 1\*0501, beta 1\*0201) vs the non-disease-associated DQ (alpha 1\*0201, beta 1\*0202) molecule. *Immunogenetics*. 1997; 46 (6) : 484-92.
- 50.- Fallang LE, Bergseng E, Hotta K, Berg-Larsen A, Kim CY, Sollid LM. Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nat Immunol*. 2009 Oct; 10 (10): 1096-101.
- 51.- Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, Borg NA, Beissbarth T et al. A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity*. 2007 Jul; 27 (1): 23-34.
- 52.- Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg Ø, Scott H, Koning F, Jung G et al. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*. 2004 Oct; 1: e (1).
- 53.- Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease

autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol.* 2006 Oct; 101 (10): 2333-40.

54.- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54: 136.

55.- Polanco I. Celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Aug; 47 Suppl 1: S3-6.

56.- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013 Jan; 62 (1): 43-52.

57.- Eiras P, León F, Camarero C, Roy G. Intraepithelial lymphocytes in the diagnosis of latent-potential celiac disease. *Rev Clin Esp.* 2002; 202: 497.

58.- Larsson K, Carlsson A, Cederwall E, Jönsson B, Neiderud J, Jonsson B et al: Skåne Study Group. Annual screening detects celiac disease in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2008 Aug; 9 (4 Pt 2): 354-9.

59.- Ludvigsson JF, Olén O, Bell M, Ekbom A, Montgomery SM. Coeliac disease and risk of sepsis. *Gut.* 2008 Aug; 57: 1074-80.

60.- Gao Y, Kristinsson SY, Goldin LR, Björkholm M, Caporaso NE, Landgren O. Increased risk for non-Hodgkin lymphoma in individuals with celiac disease and a potential familial association. *Gastroenterology.* 2009 Jan; 136 (1): 91-8.

- 61.- Hadjivassiliou M, Aeschlimann P, Strigun A, Sanders DS, Woodroffe N, Aeschlimann D. Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol*. 2008 Sep; 64 (3): 332-43.
- 62.- Garud S, Leffler D, Dennis M, Edwards-George J, Saryan D, Sheth S et al. Interaction between psychiatric and autoimmune disorders in coeliac disease patients in the Northeastern United States. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009 Apr 15; 29 (8): 898-905.
- 63.- Geen PH, Yang J, Cheng J, Lee AR, Harper JW, Bhagat G. An association between microscopic colitis and celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Nov; 7 (11): 1210-6.
- 64.- Neuhausen SL, Steele L, Ryan S, Mousavi M, Pinto M, Osann KE et al. Co-occurrence of celiac disease and other autoimmune diseases in celiacs and their first-degree relatives. *J Autoimmun*. 2008 Sep; 31 (2): 160-5.
- 65.- Frost AR, Band MM, Conway GS. Serological screening for coeliac disease in adults with Turner's syndrome: prevalence and clinical significance of endomysium antibody positivity. *Eur J Endocrinol*. 2009 Apr; 160 (4): 675-9.
- 66.- Ford AC, Chey WD, Talley NJ, Malhotra A, Spiegel BM, Moayyedi P. Yield of diagnostic tests for celiac disease in individuals with symptoms suggestive of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2009 Apr 13; 169 (7): 651-8.

- 67.- Ensari A. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Jun; 134 (6): 826-36.
- 68.- Green HR, Rostami K, Marsh MN. Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19 (3): 389–400.
- 69.- Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology.* 2006 Dec; 131 (6): 1981-2002.
- 70.- Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology.* 2005 Apr; 128 (4 Suppl 1): S38-46.
- 71.- Hill ID. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology.* 2005 Apr; 128 (4 Suppl 1): S25-32.
- 72.- Leffler DA, Schuppan D. Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2010 Dec; 105 (12): 2520-4.
- 73.- Lewis NR, Scott BB. Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Jan; 31 (1): 73-81.
- 74.- Sugai E, Vázquez H, Nachman F, Moreno ML, Mazure R, Smecuol E et al. Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-related

peptides in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Sep; 4 (9): 1112-7.

75.- Prince HE. Evaluation of the INOVA diagnostics enzyme-linked immunosorbent assay kits for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deamidated gliadin peptides. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Jan; 13 (1): 150-1.

76.- Volta U, Granito A, Parisi C, Fabbri A, Fiorini E, Piscaglia M et al. Deamidated gliadin peptide antibodies as a routine test for celiac disease: a prospective analysis. *J Clin Gastroenterol*. 2010 Mar; 44 (3): 186-90.

77.- Bürgin-Wolff A, Dahlbom I, Hadziselimovic F, Petersson CJ. Antibodies against human tissue transglutaminase and endomysium in diagnosing and monitoring coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2002 Jun; 37 (6): 685-91.

78.- Vitoria JC, Arrieta A, Arranz C, Ayesta A, Sojo A, Maruri N et al. Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999 Nov; 29 (5): 571-4.

79.- Holding S, Abuzakouk M, Doré PC. Antigliadin antibody testing for coeliac disease in children under 3 years of age is unhelpful. *J Clin Pathol*. 2009 Aug; 62 (8): 766-7.

80.- Donaldson MR, Book LS, Leifermann KM, Zone JJ, Nehausen SL. Strongly positive tissue transglutaminase antibodies are associated

with Marsh 3 histopathology in adult and paediatric coeliac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2008; 42 (3): 256–260.

81.- Barker CC, Mitton C, Jevon G, Mock T. Can tissue transglutaminase antibody titers replace small-bowel biopsy to diagnose coeliac disease in select paediatric populations? *Paediatrics.* 2005; 115 (5): 1341–1346.

82.- Owens SR, Greenson JK. The pathology of malabsorption: current concepts. *Histopathology.* 2007; 50 (1): 64–82.

83.- Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R. Coeliac disease: an update for pathologists. *J Clin Pathol.* 2006; 59 (10): 1008–1016.

84.- Wahab PJ, Meijer JW, Mulder CJ. Histologic follow-up of people with coeliac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol.* 2002; 118 (3): 459–463.

85.- Ravelli A, Bolognini S, Gambarotti M, Villanaci V. Variability of histologic lesions in relation to biopsy site in gluten sensitive enteropathy. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100 (1): 177–185.

86.- Pais WP, Duerksen DR, Pettigrew NM, Bernstein CN. How many duodenal biopsy specimens are required to make a diagnosis of celiac disease? *Gastrointest Endosc.* 2008; 67 (7): 1082–1087.

87.- Bonamico M, Mariani P, Thanasi E, Ferri M, Nenna R, Tiberti C et al. Patchy villous atrophy of the duodenum in childhood coeliac disease. *J Paediatr Nutr.* 2004; 38 (2): 204–207.

88.- Manuel PD, Walker-Smith JA, France NE. Patchy enteropathy in childhood. *Gut.* 1979; 20 (3): 211–215.

- 89.- Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Paediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 40 (1): 1–19.
- 90.- Serra S, Jani PA. An approach to duodenal biopsies. *J Clin Pathol.* 2006; 59 (11): 1133–1150.
- 91.- Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (“coeliac sprue”). *Gastroenterology.* 1992; 102 (1): 330–354.
- 92.- Arato A, Hacsek G, Savilahti E. Immunohistochemical findings in the jejunal mucosa of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol. Suppl.* 1998; 228: 3–10.
- 93.- Maki M, Holm K, Collin P, Savilahti E. Increase in gamma/delta T cell receptor bearing lymphocytes in normal small bowel mucosa in latent celiac disease. *Gut.* 1991; 32 (11): 1412–1414.
- 94.- Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999; 11 (10): 1185–1194.
- 95.- Hayat M, Cairns A, Dixon MF, O’Mahony S. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *J Clin Pathol* 2002; 55 (5): 393–394.



- 96.- Mahadeva S, Wyatt JI, Howdle PD. Is a raised intraepithelial lymphocyte count with normal duodenal villous architecture clinically relevant? *J Clin Pathol* 2002; 55 (6): 424–428.
- 97.- Veress B, Franzen L, Bodin L, Borch K. Duodenal intraepithelial lymphocyte-count revisited. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39 (2): 138–144.
- 98.- Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*. 1971; 12 (12): 988–994.
- 99.- Ferguson A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut*. 1977; 18 (11): 921–937.
- 100.- Crowe PT, Marsh MN. Morphometric analysis of intestinal mucosa, VI: principles of enumerating intra-epithelial lymphocytes. *Virchows Arch*. 1994; 424 (3): 301–306.
- 101.- Biagi F, Luinetti O, Campanella J, Klersy C, Zambelli C, Villanacci V et al. Intraepithelial lymphocytes in the villous tip: do they indicate potential coeliac disease? *J Clin Pathol* 2004; 57 (8): 835–839.
- 102.- Järvinen TT, Collin P, Rasmussen M, Kyrönpalo S, Mäki M, Partanen J et al . Villous tip intraepithelial lymphocytes as a marker of early-stage celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2004; 39 (5): 428–433.
- 103.- Mino M, Lauwers GY. Role of lymphocytic immunophenotyping in the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy with preserved villous architecture. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27 (9): 1237–1242.

- 104.- Eiras P, Roldán E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry*. 1998 Apr 15; 34 (2): 95-102.
- 105.- Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H. et al. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gammadelta subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr*. 2000; 89: 285.
- 106.- León F, Sánchez L, Camarero C, Roy G. Cytokine production by intestinal intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2005 Mar; 50 (3): 593-600.
- 107.- Camarero C, Leon F, Sanchez L, Asensio A, Roy G. Age-related variation of intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa. *Dig Dis Sci*. 2007 Mar; 52 (3): 685-91.
- 108.- Leon F, Eiras P, RoyG, Camarero C. Intestinal intraepithelial lymphocytes and anti-transglutaminase in a screening algorithm for coeliac disease. *Gut*. 2002 May; 50 (5): 740-1.
- 109.- Marsh MN. Screening for latent gluten sensitivity: questions many but answers few. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996; 8 (1): 3–6.
- 110.- Brown I, Mino-Kenudson M, Deshpande V, Lauwers GY. Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130 (7): 1020–1025.

- 111.- Goldstein NS. Proximal small bowel mucosal villous intraepithelial lymphocytes. *Histopathology*. 2004; 44 (3): 199–205.
- 112.- Marsh MN, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1995; 9 (2): 273–293.
- 113.- Mowat AM, Ferguson A. Intraepithelial lymphocyte count and crypt hyperplasia measure the mucosal component of the graft versus host reaction in mouse small intestine. *Gastroenterology*. 1982; 83 (2): 417–423.
- 114.- Marsh MN, Loft DE, Garner V, Gordon D. Time/dose responses of celiac mucosae to graded oral challenges with Frazer's fraction III of gliadin. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1992; 4: 667–673.
- 115.- Marsh MN. Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut*. 1990; 31 (1): 111–114.
- 116.- Marsh MN. Studies of intestinal lymphoid tissue, XI: the immunopathology of cell-mediated reactions in gluten sensitivity and other enteropathies. *Scan Microsc*. 1988; 2 (3): 1663-1684.
- 117.- Marsh MN. Studies of intestinal lymphoid tissue, XIII: immunopathology of the evolving coeliac sprue lesion. *Pathol Res Pract*. 1989; 185 (5): 774–777.
- 118.- Marsh MN. The immunopathology of the small intestinal reaction in gluten-sensitivity. *Immunol Invest*. 1989; 18 (1–4): 509–531.

- 119.- Leon F, Roldan E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 2003; 125: 345.
- 120.- Leon F, Sanchez L, Camarero C, Roy G. Immunopathogenesis of celiac disease. *Inmunologia* 2005; 24: 313.
- 121.- Justinich CJ. Update in gastrointestinal allergic diseases. *Curr Opin Pediatr.* 2000; 12 (5): 456–459.
- 122.- Wright CL, Riddell RH. Histology of stomach and duodenum in Crohn's disease. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22 (4): 383–390.
- 123.- Guandalini S., Gupta P. Celiac disease: a diagnostic challenge with many facts. *Clin Appl Immunol Rev*, 2002, 2: 293-305.
- 124.- Niewinski MM. Advances in celiac disease and gluten-free diet. *J Am Diet Assoc.* 2008 Apr; 108 (4): 661-72.
- 125.- Selimoğlu MA, Karabiber H. Celiac disease: prevention and treatment. *J Clin Gastroenterol.* 2010 Jan; 44 (1): 4-8.
- 126.- Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jan; 85 (1): 160-6.
- 127.- Collin P, Mäki M, Kaukinen K. Safe gluten threshold for patients with celiac disease: some patients are more tolerant than others. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jul; 86 (1): 260.
- 128.- Briani C, Samaroo D, Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008 Sep; 7 (8): 644-50.

- 129.- Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S et al; North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Jan; 40 (1): 1-19.
- 130.- Ludvigsson JF, Reutfors J, Osby U, Ekblom A, Montgomery SM. Coeliac disease and risk of mood disorders--a general population-based cohort study. *J Affect Disord.* 2007 Apr; 99 (1-3): 117-26.
- 131.- West J, Logan RF, Card TR, Smith C, Hubbard R. Risk of vascular disease in adults with diagnosed coeliac disease: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Jul 1; 20 (1): 73-9.
- 132.- Cerf-Bensussan N, Matysiak-Budnik T, Cellier C, Heyman M. Oral proteases: a new approach to managing coeliac disease. *Gut.* 2007 Feb; 56 (2): 157-60.
- 133.- Dickey W, Kearney N. Overweight in celiac disease: prevalence, clinical characteristics, and effect of a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol.* 2006 Oct; 101 (10): 2356-9.
- 134.- Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr.* 2000 Feb; 89 (2): 165-71.
- 135.- Andersen DH, Di Santágnese PA. Idiopathic celiac disease. I. Mode of onset and diagnosis. *Pediatrics.* 1953 Mar; 11 (3): 207-23.

- 136.- Greco L, Mayer M, Grimaldi M, Follo D, De Ritis G, Auricchio S. The effect of early feeding on the onset of symptoms in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1985 Feb; 4 (1): 52-5.
- 137.- Auricchio S, Follo D, de Ritis G, Giunta A, Marzorati D, Prampolini L et al. Does breast feeding protect against the development of clinical symptoms of celiac disease in children? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1983; 2 (3): 428-33.
- 138.- Peters U, Schneeweiss S, Trautwein EA, Erbersdobler HF. A case-control study of the effect of infant feeding on celiac disease. *Ann Nutr Metab.* 2001; 45 (4): 135-42.
- 139.- Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2002 May; 75 (5): 914-21.
- 140.- Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child.* 2006 Jan; 91 (1): 39-43.
- 141.- D'Amico MA, Holmes J, Stavropoulos SN, Frederick M, Levy J, DeFelice AR et al. Presentation of pediatric celiac disease in the United States: prominent effect of breastfeeding. *Clin Pediatr (Phila).* 2005 Apr; 44 (3): 249-58.
- 142.- Juto P, Meeuwisse G, Mincheva-Nilsson L. Why has coeliac disease increased in Swedish children?. *Lancet.* 1994 May 28; 343 (8909): 1372.

- 143.- Weile B, Krasilnikoff PA. Low incidence rates by birth of symptomatic coeliac disease in a Danish population of children. *Acta Paediatr.* 1992 May; 81 (5): 394-8.
- 144.- Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki I, Miao D, Haas JE et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA.* 2005 May 18; 293 (19): 2343-51.
- 145.- Ivarsson A, Hernell O, Nyström L, Persson LA. Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *J Epidemiol Community Health.* 2003 Jan; 57 (1): 36-9.
- 146.- Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L et al . Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol.* 2006 Oct; 101 (10): 2333-40.
- 147.- Rubio O, Argente J. Diabetes mellitus en niños y adolescentes: complicaciones crónicas y enfermedades asociadas. *An Pediatr* 2007; 66 (3): 282-9.
- 148.- Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul; 92 (7): 2403-7.
- 149.- Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001 Jul 21; 358 (9277): 221-9.

- 150.- Chase HP, Jackson WE, Hoops SL, Cockerham RS, Archer PG, O'Brien D. Glucose control and the renal and retinal complications of insulin-dependent diabetes. *JAMA*. 1989 Feb 24; 261 (8): 1155-60.
- 151.- Gianini R, Putnam A, Still T, Yu L, Miao D, Gill RG et al. Initial results of screening of nondiabetic organ donors for expression of islet autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May; 91 (5): 1855-61.
- 152.- Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia*. 2005 Nov; 48 (11): 2221-8.
- 153.- Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR J*. 2004; 45 (3): 278-91.
- 154.- Chatenoud L, Bach JF. Regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes: the case of the NOD mouse. *Int Rev Immunol*. 2005 May-Aug; 24 (3-4): 247-67.
- 155.- Couper J, Donaghue KC. Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2009 Sep; 10 Suppl 12: 13-6.
- 156.- Villalba C, Aragonés Á, Carcavilla A. Diabetes mellitus tipo 1.- *Form Act Pediatr Aten Prim* 2011; 4 (3): 163-72.
- 157.- Lombardo F, Valenzise M, Wasniewska M, Messina MF, Ruggeri C, Arrigo T et al. Two-year prospective evaluation of the factors affecting honeymoon frequency and duration in children with insulin



dependent diabetes mellitus: the key-role of age at diagnosis. *Diabetes Nutr Metab.* 2002 Aug; 15 (4): 246-51.

158.- Kostraba JN, Dorman JS, Orchard TJ, Becker DJ, Ohki Y, Ellis D et al. Contribution of diabetes duration before puberty to development of microvascular complications in IDDM subjects. *Diabetes Care.* 1989 Nov-Dec; 12 (10): 686-93.

159.- Donaghue KC, Fairchild JM, Craig ME, Chan AK, Hing S, Cutler LR et al. Do all prepubertal years of diabetes duration contribute equally to diabetes complications? *Diabetes Care.* 2003 Apr; 26 (4): 1224-9.

160.- Svensson M, Eriksson JW, Dahlquist G. Early glycemc control, age at onset, and development of microvascular complications in childhood-onset type 1 diabetes: a population-based study in northern Sweden. *Diabetes Care.* 2004 Apr; 27 (4): 955-62.

161.- Kovacs M, Goldston D, Obrosky DS, Bonar LK. Psychiatric disorders in youths with IDDM: rates and risk factors. *Diabetes Care.* 1997 Jan; 20 (1): 36-44.

162.- Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002 Jun; 31 (2): 391-410.

163.- Kordonouri O, Klinghammer A, Lang EB, Grüters-Kieslich A, Grabert M, Holl RW. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: a multicenter survey. *Diabetes Care.* 2002 Aug; 25 (8): 1346-50.

- 164.- Kordonouri O, Deiss D, Danne T, Dorow A, Bassir C, Grüters-Kieslich A. Predictivity of thyroid autoantibodies for the development of thyroid disorders in children and adolescents with Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2002 Jun; 19 (6): 518-21.
- 165.- De VI, Ghirlanda G, Gasbarrini G. Prevalence of celiac disease in type 1 diabetes, a multicenter study. *Acta Paediatr.* 1996; Suppl 412: 56-57.
- 166.- Saukkonene T, Väisänen S, Akerblom HK, Savilahti E. Childhood Diabetes in Finland Study Group. Coeliac disease in children and adolescents with type 1 diabetes: a study of growth, glycaemic control, and experiences of families. *Acta Paediatr.* 2002; 91 (3): 297-302.
- 167.- De Silva BD, Schofield OM, Walker JD. The prevalence of necrobiosis lipoidica diabetorum in children with type 1 diabetes. *Br J Dermatol.* 1999 Sep; 141 (3): 593-4.
- 168.- Larkin J. Typical infections in diabetes and their treatment. In: *Pharmacology of Diabetes.* Berlin: Walter de Greyter; 1991. P. 325-42.
- 169.- Gunczler P, Lanes R, Paoli M, Martinis R, Villaroel O, Weisinger JR. Decreased bone mineral density and bone formation markers shortly after diagnosis of clinical type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001 May; 14 (5): 525-8.
- 170.- Gunczler P, Lanes R, Paz-Martinez V, Martins R, Esaa S, Colmenares V et al. Decreased lumbar spine bone mass and low bone

turnover in children and adolescents with insulin dependent diabetes mellitus followed longitudinally. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1998; 11 (3): 413-9.

171.- Valerio G, del Puente A, Esposito-del Puente A, Buono P, Mozzillo E, Franzese A. The lumbar bone mineral density is affected by long-term poor metabolic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res.* 2002; 58 (6): 266-72.

172.- Kovacs M, Obrosky DS, Goldston D, Drash A. Major depressive disorder in youths with IDDM. A controlled prospective study of course and outcome. *Diabetes Care.* 1997 Jan; 20 (1): 45-51.

173.- Liss DS, Waller DA, Kennard BD, McIntire D, Capra P, Stephens J. Psychiatric illness and family support in children and adolescents with diabetic ketoacidosis: A controlled study. *J Am Acad Child Adolesc Psych.* 1998; 37: 536-44.

174.- Barrio Castellanos R, Ros Pérez P. Insulinoterapia en la diabetes tipo 1 en la edad pediátrica. *Protoc diagn ter pediatr.* 2011; 1: 65-75.

175.- Jafarzadeh A, Shokri F. The antibody response to HBs antigen is regulated by coordinated Th1 and Th2 cytokine production in healthy neonates. *Clin Exp Immunol.* 2003 Mar; 131 (3): 451-6.

176.- Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol.* 1990 Nov 15; 145 (10): 3442-9.

- 177.- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13: 29-60.
- 178.- Shokri F, Jafarzadeh A. High seroprotection rate induced by low doses of a recombinant hepatitis B vaccine in healthy Iranian neonates. *Vaccine* 2001 Aug 14; 19 (31): 4544-8.
- 179.- Amani A, Shokri F. Immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine in Iranian neonates: High frequency of unresponsiveness independent of the carrier state of mothers. *Irn J Med Sci* 1995; 20: 87-92.
- 180.- Zannoli R, Morgese G. Hepatitis B vaccine: current issues. *Ann Pharmacother* 1997; 31: 1059-67.
- 181.- Shokri F, Amani A. High rate of seroconversion following administration of a single supplementary dose of recombinant hepatitis B vaccine in Iranian healthy nonresponder neonates. *Med Microbiol Immunol.* 1997 Mar; 185 (4): 231-5.
- 182.- Zuckerman JN, Zuckerman AJ. Is there a need for boosters of hepatitis B vaccine. *Viral Hepatitis* 1998; 4: 43-6.
- 183.- McDermott AB, Madrigal JA, Sabin CA, Zuckerman JN, Cohen SB. The influence of host factors and immunogenetics on lymphocyte responses to Hepagene vaccination. *Vaccine.* 1999 Mar 17; 17 (11-12): 1329-37.
- 184.- Zuckerman JN, Zuckerman AJ, Symington I, Du W, Williams A, Dickson B et al; UK Hepacare Study Group. Evaluation of a new

hepatitis B triple-antigen vaccine in inadequate responders to current vaccines. *Hepatology*. 2001 Oct; 34 (4 Pt 1): 798-802.

185.- Alper CA. The human immune response to hepatitis B surface antigen. *Exp Clin Immunogenet*. 1995; 12 (3): 171-81.

186.- Coates T, Wilson R, Patrick G, André F, Watson V. Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther*. 2001 Mar; 23 (3): 392-403.

187.- Shokrgozar MA, Shokri F. HLA-associated antibody response to recombinant hepatitis B vaccine in healthy Iranian adults. *Irn J Med Sce* 1999; 24: 98-103.

188.- McDermott AB, Cohen SB, Zuckerman JN, Madrigal JA. Human leukocyte antigens influence the immune response to a pre-S/S hepatitis B vaccine. *Vaccine*. 1999 Jan 28; 17 (4): 330-9.

189.- Alper CA, Kruskall MS, Marcus-Bagley D, Craven DE, Katz AJ, Brink S et al. Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. *N Engl J Med*. 1989 Sep 14; 321 (11): 708-12.

190.- Craven DE, Awdeh ZL, Kunches LM, Yunis EJ, Dienstag JL, Werner BG et al. Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in health care workers. Results of revaccination and genetic typings. *Ann Intern Med*. 1986 Sep; 105 (3): 356-60.

191.- Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol*. 1995 Feb; 7 (1): 85-96.

- 192.- McDermott AB, Zuckerman JN, Sabin CA, Marsh SG, Madrigal JA. Contribution of human leukocyte antigens to the antibody response to hepatitis B vaccination. *Tissue Antigens*. 1997 Jul; 50 (1): 8-14.
- 193.- Desombere I, Willems A, Leroux-Roels G. Response to hepatitis B vaccine: multiple HLA genes are involved. *Tissue Antigens*. 1998 Jun; 51 (6): 593-604.
- 194.- Barnaba V, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F. Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I-restricted, exogenous antigen-specific T lymphocytes. *Nature*. 1990 May 17; 345 (6272): 258-60.
- 195.- Lazizi Y, Badur S, Perk Y, Ilter O, Pillot J. Selective unresponsiveness to HBsAg vaccine in newborns related with an in utero passage of hepatitis B virus DNA. *Vaccine*. 1997 Jul; 15 (10): 1095-100.
- 196.- Milch DR, Jones JE, Hughes JI. Is a function of the secreted HBe antigen to induce immunological tolerance in utero?. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6599-603.
- 197.- Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, Lara-Marquez ML, Salazar M, Deulofeut R et al. Defect in Th1-like cells of nonresponders to hepatitis B vaccine. *Hum Immunol*. 1997 Nov; 58 (1): 42-51.
- 198.- Livingston BD, Alexander J, Crimi C, Oseroff C, Celis E, Daly K et al. Altered helper T lymphocyte function associated with chronic

hepatitis B virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans. *J Immunol* 1999 Mar 1; 162 (5): 3088-95.

199.- Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, Penne G, Leroux-Roels G, Gigase P. Deficient T-cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production. *Immunol Lett*. 1994 Feb; 39 (2): 163-8.

200.- Jack AD, Hall AJ, Maine N, Mendy M, Whittle HC. What level of hepatitis B antibody is protective? *J Infect Dis*. 1999, Feb; 179 (2): 489-92.

201.- Dentinger CM, McMahon BJ, Butler JC, Dunaway CE, Zanis CL, Bulkow LR et al. Persistence of antibody to hepatitis B and protection from disease among Alaska natives immunized at birth. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Sep; 24 (9): 786-92.

202.- Van der Sande MA, Waight PA, Mendy M, Zaman S, Kaye S, Sam O et al. Long-term protection against HBV chronic carriage of Gambian adolescents vaccinated in infancy and immune response in HBV booster trial in adolescence. *PLoS One*. 2007 Aug 15; 2 (8): e753.

203.- Williams IT , Goldstein ST, Tufa J, Tauillii S, Margolis HS, Mahoney FJ. Long term antibody response to hepatitis B vaccination beginning at birth and to subsequent booster vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Feb; 22 (2): 157-63.

- 204.- Wu JS, Hwang LY, Goodman KJ, Beasley RP. Hepatitis B vaccination in high-risk infants: 10-year follow-up. *J Infect Dis.* 1999 Jun; 179 (6): 1319-25.
- 205.- Alfaleh F, Alshehri S, Alansari S, Aljeffri M, Almazrou Y, Shaffi A et al. Long-term protection of hepatitis B vaccine 18 years after vaccination. *J Infect.* 2008 Nov; 57 (5): 404-9.
- 206.- Tosun S, Deveci S, Kaplan Y, Kasirga E. Should a booster dose be administered in children after mass immunization for hepatitis B? *Hepat Mon.* 2011 Jun; 11 (6): 440-4.
- 207.- Yuen MF, Lim WL, Chan AO, Wong DK, Sum SS, Lai CL. 18-year follow-up study of a prospective randomized trial of hepatitis B vaccinations without booster doses in children. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 Oct; 2 (10): 941-5.
- 208.- García Llop L, Asensi Alcoverro A, Coll Más P, Ramada Benedito MA, Grafiá Juan C. Títulos de anti-HBs tras un programa de vacunación en niños y adolescentes: ¿revacunar?. *An.Esp. Pediatr.* 2001 Jan; 54 (1):32-7.
- 209.- Faustini A, Franco E, Sangalli M, Spadea T, Calabrese RM, Cauletti M et al. Persistence of anti-HBs 5 years after the introduction of routine infant and adolescent vaccination in Italy. *Vaccine.* 2001 Apr 6; 19 (20-22): 2812-8.
- 210.- Petersen KM, Bulkow LR, McMahon BJ, Zanis C, Getty M, Peters H et al. Duration of hepatitis B immunity in low risk children receiving



hepatitis B vaccinations from birth. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Jul; 23 (7): 650-5.

211.- Zanetti AR, Mariano A, Romanò L, D'Amelio R, Chironna M, Coppola RC et al; Study Group. Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination and policy for booster: an Italian multicentre study. *Lancet.* 2005 Oct 15-21; 366 (9494): 1379-84.

212.- Noh KW , Poland GA, Murray JA. Hepatitis B vaccine nonresponse and celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2003 Oct; 98 (10): 2289-92.

213.- Park SD, Markowitz J, Pettei M, Weinstein T, Sison CP, Swiss SR et al. Failure to respond to hepatitis B vaccine in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007, Apr; 44 (4): 431-5.

214.- Ahishali E, Boztas G, Akyuz F, Ibrisim D, Poturoglu S, Pinarbasi B et al. Response to hepatitis B vaccination in patients with celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2008 Aug; 53 (8): 2156-9.

215.- Nemes E, Lefler E, Szegedi L, Kapitány A, Kovács JB, Balogh M et al. Gluten intake interferes with the humoral immune response to recombinant hepatitis B vaccine in patients with celiac disease. *Pediatrics.* 2008 Jun; 121 (6): e1570-6.

216.- Leonardi S, Spina M, Spicuzza L, Rotolo N, La Rosa M. Hepatitis B vaccination failure in celiac disease: is there a need to reassess current immunization strategies? *Vaccine.* 2009 Oct 9; 27 (43): 6030-3.

- 217.- Ertem D, Gonen I, Tanidir C, Ugras M, Yildiz A, Pehlivanoğlu E et al. The response to hepatitis B vaccine: does it differ in celiac disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Jul; 22 (7): 787-93.
- 218.- Ertekin V, Tosun MS, Selimoglu MA. Is there need for a new hepatitis B vaccine schedule for children with celiac disease? *Hepat Mon.* 2011 Aug; 11 (8): 634-7.
- 219.- Zingone F, Capone P, Tortora R, Rispo A, Morisco F, Caporaso N et al. Role of gluten intake at the time of hepatitis B virus vaccination in the immune response of celiac patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2013 May; 20 (5): 660-2.
- 220.- Urganci N, Kalyoncu D. Response to hepatitis A and B vaccination in pediatric patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013 Apr; 56 (4): 408-11.
- 221.- Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell.* 1996; 85: 291.
- 222.- Mancuso M, Caruso-Nicoletti M, Bianca S, Granata G, Li Volti G, Li Volti S. Immune responses to hepatitis B vaccine with and without the pre-S2 antigen in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2001; 24: 1841-2.
- 223.- Marseglia G, Alibrandi A, d'Annunzio G, Gulminetti R, Avanzini MA, Marconi M et al. Long term persistence of anti-HBs protective levels in young patients with type 1 diabetes after recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 2000; 22; 19 (7-8): 680-3.

- 224.- Bouter KP, Diepersloot RJ, Wismans PJ, Gmelig Meyling FH, Hoekstra JB, Heijtkink RA et al. Humoral immune response to a yeast-derived hepatitis B vaccine in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1992: 966-9.
- 225.- Arslanoğlu I, Cetin B, Işgüven P, Karavuş M. Anti-HBs response to standard hepatitis B vaccination in children and adolescents with diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002 ; 15: 389-95.
- 226.- Use of Hepatitis B vaccination for adults with diabetes mellitus: Recommendations of the Advisory Comité on Immunization Practices. *CDC* 2011/60 (50):1709-1711.
- 227.- Schillie SF, Spradling PR, Murphy TV. Immune response of hepatitis B vaccine among persons with diabetes: a systematic review of the literature. *Diabetes Care.* 2012 Dec; 35 (12): 2690-7.
- 228.- Marseglia GL, Scaramuzza A, d'Annunzio G, Comolli G, Gatti M, Lorini R. Successful immune response to a recombinant hepatitis B vaccine in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1996 Jul; 13 (7): 630-3.
- 229.- Wismans PJ, van Hattum J, de Gast GC, Bouter KP, Diepersloot RJ, Maikoe T et al. A prospective study of in vitro anti-HBs producing B cells (spot-ELISA) following primary and supplementary vaccination with a recombinant hepatitis B vaccine in insulin dependent diabetic patients and matched controls. *J Med Virol.* 1991 Nov; 35 (3): 216-22.

- 230.- Halota W, Muszyńska M, Pawłowska M. Hepatitis B virus serologic markers and anti-hepatitis B vaccination in patients with diabetes. *Med Sci Monit.* 2002 Jul; 8 (7): CR516-9.
- 231.- Klonoff DC, Perz JF. Assisted monitoring of blood glucose: special safety needs for a new paradigm in testing glucose. *J Diabetes Science Technol* 2010; 4: 1027–31.
- 232.- El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. La diabetes aumenta el riesgo de enfermedad hepática crónica y carcinoma hepatocelular. *Gastroenterología* 2004; 126: 460-8.
- 233.- Sawyer MH, Hoerger TJ, Murphy TV, Schillie SF, Hu D, Spradling PR et al. Use of hepatitis B vaccination for adults with diabetes mellitus: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011; 60: 1709-11.
- 234.- Elkayam O, Yaron M, Caspi D. Safety and efficacy of vaccination against hepatitis B in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jul; 61 (7): 623-5.
- 235.- Kasapçopur O, Cullu F, Kamburoğlu-Goksel A, Cam H, Akdenizli E, Calýkan S et al. Hepatitis B vaccination in children with juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004 Sep; 63 (9): 1128-30.
- 236.- Kuruma KA, Borba EF, Lopes MH, de Carvalho JF, Bonfá E. Safety and efficacy of hepatitis B vaccine in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007; 16 (5): 350-4.

- 237.- Vida L, Gómez F, García V, Iglesias EM, Castillo L, Cerezo A et al. Eficacia de la vacuna contra el virus de la hepatitis B en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. *Med Clin* 2009; 132 (9): 331-335.
- 238.- Díaz de Entresotos Villazán L, de la Rubia Fernández L, López Hoyos M, Ruiz de Alegría C, Sánchez Velasco P, Fernández García P. Study of celiac disease in the pediatric population of Cantabria (Spain) and first-degree relatives. *Gastroenterol Hepatol*. 2008 Feb; 31 (2): 53-8.
- 239.- Farré C, Humbert P, Vilar P, Varea V, Aldeguer X, Carnicer J et al. Serological markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. Catalanian Coeliac Disease Study Group. *Dig Dis Sci*. 1999 Nov; 44 (11): 2344-9.
- 240.- Ruiz del Prado MY, Olivares López JL, Lázaro Almarza A, Lasierra Díaz MP. HLA system. Phenotypic and gene frequencies in celiac and healthy subjects from the same geographical area. *Rev Esp Enferm Dig*. 2001 Feb; 93 (2): 106-13.
- 241.- Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Mäki M, Sanz A et al. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol*. 1998 Mar; 59 (3): 169-75.
- 242.- DiGiacomo D, Santonicola A, Zingone F, Troncone E, Caria MC, Borgheresi P et al. Human leukocyte antigen DQ2/8 prevalence in non-celiac patients with gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2013 Apr 28; 19 (16): 2507-13.

- 243.- Alarida K, Harown J, Di Pierro MR, Drago S, Catassi C. HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes in celiac and healthy Libyan children. *Dig Liver Dis.* 2010 Jun; 42 (6): 425-7.
- 244.- Wu JS, Hwang LY, Goodman KJ, Beasley RP. Hepatitis B vaccination in high-risk infants: 10-year follow-up. *J Infect Dis.* 1999; 179: 1319-1325.
- 245.- Huang LM, Chiang BL, Lee CY, Lee PI, Chi WK, Chang MH. Long-term response to hepatitis B vaccination and response to booster in children born to mothers with hepatitis B e antigen. *Hepatology.* 1999; 29: 954-959.
- 246.- Wainwright RB, Bulkow LR, Parkinson AJ, Zanis C, McMahon BJ. Protection provided by hepatitis B vaccine in a Yupik Eskimo population--results of a 10-year study. *J Infect Dis.* 1997; 175: 674-677.
- 247.- Tosun S, Deveci S, Kaplan Y, Kasirga E. Should a booster dose be administered in children after mass immunization for hepatitis B? *Hepat Mon.* 2011 Jun; 11 (6): 440-4.
- 248.- Van Damme P, Van Herck K. A review of the long-term protection after hepatitis A and B vaccination. *Travel Med Infect Dis.* 2007 Mar; 5 (2): 79-84.
- 249.- Wang RX, Boland GJ, van Hattum J, de Gast GC. Long-term persistence of T cell memory to HBsAg after hepatitis B vaccination. *World J Gastroenterol.* 2004 Jan 15; 10 (2): 260-3.

- 250.- Wismans PJ, van Hattum J, de Gast GC, Bouter KP, Diepersloot RJ, Maikoe T et al. A prospective study of in vitro anti-HBs producing B cells (spot-ELISA) following primary and supplementary vaccination with a recombinant hepatitis B vaccine in insulin dependent diabetic patients and matched controls. *J Med Virol.* 1991 Nov; 35 (3): 216-22.
- 251.- European Consensus Group on Hepatitis B Immunity. Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity? *Lancet.* 2000 Feb 12; 355 (9203): 561-5.
- 252.- Sjogren MH. Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination. *Am J Med.* 2005 Oct; 118 Suppl 10A: 34S-39S.
- 253.- Zaroni G, Contreas G, Valletta E, Gabrielli O, Mengoli C, Veneri D. Normal or defective immune response to Hepatitis B vaccine in patients with diabetes and celiac disease: An open issue. *Hum Vaccin Immunother.* 2014 Aug 6; 11 (1).
- 254.- M. Oyarzáball , M. Chueca, M.J. López, C. Luzuriaga, I. Rica, M. Rodríguez. Diabetes tipo 1 en el niño menor de 5 años. *Av Diabetol* 1999; 16: 57-59.
- 255.- Chen J, Liang Z, Lu F, Fang X, Liu S, Zeng Y et al. Toll-like receptors and cytokines/cytokine receptors polymorphisms associate with non-response to hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 2011; 29: 706-71.

- 256.- Murray JA. The widening spectrum of celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69: 354-365.
- 257.- Freeman HJ, Chopra A, Clandinin MT, Thomson AB. Recent advances in celiac disease. *World J Gastroenterol.* 2011; 17: 2259-2272.
- 258.- Van Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. *Gut.* 2006; 55: 1037-1046.
- 259.- Leonardi S, La Rosa M. Are hepatitis B virus and celiac disease linked?. *Hepat Mon.* 2010; 10: 173-175.
- 260.- Rubio-Tapia A, Murray JA. The liver in celiac disease. *Hepatology.* 2007; 46: 1650-1658.
- 261.- Cammarota G, Cuoco L, Cianci R, Pandolfi F, Gasbarrini G. Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet.* 2000; 356: 1494-1495.
- 262.- Wasmuth HE, Stolte C, Geier A, Gartung C, Matern S. Induction of multiple autoantibodies to islet cell antigens during treatment with interferon alpha for chronic hepatitis C. *Gut.* 2001; 49: 596-597.
- 263.- Adinolfi LE, Durante Mangoni E, Andreana A. Interferon and ribavirin treatment for chronic hepatitis C may activate celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 607-608.
- 264.- Monteleone G, Pender SL, Alstead E, Hauer AC, Lionetti P, McKenzie C et al. Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut.* 2001; 48: 425-429.



- 265.- Leonardi S, Longo R, Cotugno M, Tardino L, Spina M, Lionetti E et al. Vaccination and celiac disease: results of a retrospective study. *Minerva Pediatr.* 2011; 63: 363-367.
- 266.- Desombere I, Gijbels Y, Verwulgen A, Leroux-Roels G. Characterization of the T cell recognition of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by good and poor responders to hepatitis B vaccines. *Clin Exp Immunol.* 2000 Dec; 122 (3): 390-9.
- 267.- Godkin A , Davenport M, Hill AV. Molecular analysis of HLA class II associations with hepatitis B virus clearance and vaccine nonresponsiveness. *Hepatology.* 2005 Jun; 41(6): 1383-90.
- 268.- Alper CA, Kruskall MS, Marcus-Bagley D, Craven DE, Katz AJ, Brink SJ et al. Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. *N Engl J Med.* 1989 Sep 14; 321 (11): 708-12.
- 269.- Zingone F, Morisco F, Zanetti A, Romanò L, Portella G, Capone P et al . Long-term antibody persistence and immune memory to hepatitis B virus in adult celiac patients vaccinated as adolescents. *Vaccine.* 2011 Jan 29; 29 (5): 1005-8.
- 270.- Vitaliti G, Praticò AD, Cimino C, Di Dio G, Lionetti E, La Rosa M et al. Hepatitis B vaccine in celiac disease: yesterday, today and tomorrow. *World J Gastroenterol.* 2013 Feb 14; 19 (6): 838-45.
- 271.- Center for disease control and prevention. Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination: recommendations of

the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 1991; 40 (RR-13): 1-25.

272.- Poland GA, Jacobson RM. Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine. *N Engl J Med.* 2004 Dec 30; 351 (27): 2832-8.

273.- Kaltsas A , Sepkowitz K. Vaccinations for healthcare personnel: update on influenza, hepatitis B, and pertussis. *Curr Opin Infect Dis.* 2013 Aug; 26 (4): 366-77.

274.- Poland GA. Hepatitis B immunization in health care workers. Dealing with vaccine nonresponse. *Am J Prev Med.* 1998 Jul; 15 (1): 73-7.

275.- Goldwater PN. Randomized comparative trial of interferon-alpha versus placebo in hepatitis B vaccine non-responders and hyporesponders. *Vaccine.* 1994 Apr; 12 (5): 410-4.

276.- Bertino JS Jr, Tirrell P, Greenberg RN, Keyserling HL, Poland GA, Gump D et al. A comparative trial of standard or high-dose S subunit recombinant hepatitis B vaccine versus a vaccine containing S subunit, pre-S1, and pre-S2 particles for revaccination of healthy adult nonresponders. *J Infect Dis.* 1997 Mar; 175 (3): 678-81.

277.- Heinerman TC, Clements-Mann ML, Poland GA, Jacobson RM, Izu AE, Sakamoto D et al. A randomized, controlled study in adults of the immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing MF59 adjuvant. *Vaccine.* 1999 Jul 16; 17 (22): 2769-78.

- 278.- Leonardi S, Praticò AD, Lionetti E, Spina M, Vitaliti G, La Rosa M. Intramuscular vs intradermal route for hepatitis B booster vaccine in celiac children. *World J Gastroenterol*. 2012 Oct 28; 18 (40): 5729-33.
- 279.- Filippelli M, Lionetti E, Gennaro A, Lanzafame A, Arrigo T, Salpietro C et al. Hepatitis B vaccine by intradermal route in non responder patients: An update. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 14; 20 (30): 10383-10394.
- 280.- Reilly ML, Schillie SF, Smith E, Poissant T, Vonderwahl CW, Gerard K et al. Increased risk of acute hepatitis B among adults with diagnosed diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol*. 2012 Jul 1; 6 (4): 858-66.
- 281.- De Luis DA, Alonso M, González M, Aller R, Izalola O, Marín J et al. Estudio descriptivo del comienzo de la diabetes mellitus tipo 1 y sus familiares de primer grado. *An. Med. Interna (Madrid)* 21 n.8 Madrid ago. 2004.
- 282.- Bertholt ML, Malodonado E, De la Torre S, González MC, Rubiera G, De Llano JA. Características de la diabetes mellitus tipo 1 al debut. Evolución de la patología durante los últimos 21 años en un hospital de referencia de segundo nivel. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2012; 3 (1): 52-57.