



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Estudi de paràmetres immunològics i hormonals gàstrics en pacients amb diabetis mellitus tipus 1

Tesi doctoral presentada per **Núria Alonso Pedrol**
per optar al grau de DOCTOR EN MEDICINA I CIRURGIA

Dirigida per les Doctores **Anna Sanmartí i Sala i**
Eva María Martínez Cáceres

Barcelona, 2010

A la M^a Rosa i el Rafael, els meus pares, per ser com són
Al Guillermo, el meu marit, per estar sempre al meu costat
A la Laia, la meva filla, per fer-me tan feliç

Índex

1.- AGRAÏMENTS	9
2.- ABREVIATURES	13
3.- INTRODUCCIÓ	17
3.1 Diabetis mellitus tipus 1. Genètica i autoanticossos	18
3.2 Regulació de la resposta immunitària per cèl·lules T	21
3.2.1 <i>Cèl·lules T reguladores</i>	21
3.2.2 <i>Cèl·lules T col·laboradores (helper)</i>	26
3.3 Diabetis mellitus tipus 1 i la seva associació a altres malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan	31
3.3.1 <i>Diabetis mellitus tipus 1 i malaltia autoimmunitària tiroïdal</i>	32
3.3.2 <i>Diabetis mellitus tipus 1 i malaltia celíaca</i>	33
3.3.3 <i>Diabetis mellitus tipus 1 i malaltia d'Addison</i>	35
3.4 Gastritis autoimmunitària	37
3.4.1 <i>Definició i característiques immunològiques</i>	37
3.4.2. <i>Fisiopatologia del seu substracte anatòmic: atròfia del cos gàstric</i>	41
3.4.2.1 <i>Pepsinogen i infecció per l'Helicobacter pylori</i>	42
3.4.2.2 <i>Ghrelina</i>	45
3.4.3 Presentació clínica	48
3.4.3.1 <i>Anèmia per malabsorció de vitamina B12 i/o de ferro</i>	48

3.4.3.2 <i>Associació de la gastritis autoimmunitària amb altres malalties autoimmunitàries</i>	50
3.4.4 Seguint endoscòpic	52
3.5 Diabetis mellitus tipus 1 i gastritis autoimmunitària	53
3.5.1 <i>Estudi del metabolisme del ferro</i>	54
3.5.2 <i>Estudi de la cobalamina</i>	56
3.5.3 <i>Estudis histopatològics</i>	56
4.- JUSTIFICACIÓ	59
5.- HIPÒTESIS DE TREBALL	63
6.- OBJECTIUS DE LA TESI	67
7.- MATERIAL I MÈTODES	71
7.1 Subjectes d'estudi	72
7.2 Mètodes	72
7.2.1 <i>Determinacions sèriques i/o plasmàtiques</i>	72
7.2.2 <i>Examen histològic</i>	76
7.2.2.1 <i>Immunohistoquímica</i> <i>(ghrelina i cèl·lules T reguladores)</i>	77
7.2.2.2 <i>Immunofluorescència</i> <i>(cèl·lules T reguladores)</i>	78
7.3 Anàlisi estadística	79
7.3.1 <i>Estadística descriptiva</i>	79

7.3.2 Comparació entre grups (dades quantitatives)	79
7.3.2.1 Comparació de 2 grups	79
7.3.2.2 Comparació de més de 2 grups	80
7.3.3 Estudis de correlació	80
7.3.4 Comparació de freqüències (variables qualitatives)	80
8.- ARTICLES ORIGINALS DE LA TESI	81
8.1 Article 1: <i>Serum pepsinogen I: an early marker of pernicious anemia in patients with type 1 diabetes</i>	
8.2 Article 2: <i>Plasma ghrelin concentrations in type 1 diabetic patients with autoimmune atrophic gastritis</i>	
8.3 Article 3: <i>Regulatory T cells in type 1 diabetic patients with autoimmune chronic atrophic gastritis</i>	
8.4 Article 4: <i>Serum autoimmune gastritis markers, pepsinogen I and parietal cell antibodies, in patients with type 1 diabetes mellitus: a 5-year prospective study</i>	
9.- DISCUSSIÓ	83
10.- CONCLUSIONS	97
11.- BIBLIOGRAFIA	101
12.- PUBLICACIONS RELACIONADES (ANNEX)	131

Agraiments

A la Dra. Anna Sanmartí, per la seva gran vàlua personal i professional que fan que sigui una persona excepcional. Ella m'ha transmès els seus coneixements, la seva inquietud i el seu entusiasme tan necessaris per a la realització dels treballs de recerca publicats en aquesta tesi. Sempre serà un referent al llarg de la meua trajectòria professional.

A la Dra. Marisa Granada, per ser la persona que, de forma humil, rigorosa i incondicional, m'ha recolzat i assessorat en tots els treballs d'aquesta tesi.

Al Dr. Juncà, hematòleg, i al Dr. Humbert, digestòleg, per ser les persones, que ja fa temps, es varen interessar per l'estudi de marcadors de lesió de la mucosa gàstrica com el pepsinogen. Sense els seus treballs previs aquesta tesi no s'hauria pogut realitzar.

A la Dra. Eva Martínez-Cáceres, per introduir-me i assessorar-me en l'interessantíssim món de la immunologia.

A la Dra. Berta Soldevila per tot el seu suport incondicional. Per estar sempre disposada a ajudar-me i per ser una molt bona amiga amb qui espero compartir en un futur nous projectes endocrinològics.

A tots els companys del Servei d'Endocrinologia i Nutrició, Dr. Jordi Reverter per la seva indispensable ajuda amb els problemes informàtics, Dra. Salinas, Dra. Aguilera, Dra. Pellitero, Dra. Lucas, Dra. Joaquin, Dra. Colomé, Dra Puig, Dra. Julián. A tots ells gràcies per la seva ajuda i disposició per tot allò en que els he necessitat i per compartir les preocupacions i també les alegries dels resultats d'aquesta tesi .

A les infermeres del Servei d'Endocrinologia i Nutrició del nostre hospital, Carme, Isabel i Maribel, per la seva paciència, sobretot amb el meu desordre, i per la col·laboració en l'extracció de mostres.

A la Luci, l'Antònia i la Montse, infermeres del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'ambulatori de St. Adrià, perquè són unes persones excel·lents disposades sempre a ajudar i a fer-te costat.

A la Yolanda Alba, tècnica de laboratori, perquè de forma pacient, m'ha ajudat a la realització de la seroteca de la tesi i sobretot per ser una persona que fa la seva feina d'una forma excepcional.

A la Dra. María-Jesús Martínez, immunòloga, perquè sense ella no s'haurien pogut realitzar tots els estudis immunològics de la tesi. Gràcies per la teva paciència i per totes les hores que hi has dedicat.

Als meus pares per la seva ajuda i suport incondicionals. Per haver-me educat dins d'un ambient de coneixement i felicitat. Per estimar-me, tenir-los sempre al meu costat i transmetre'm l'optimisme necessari per afrontar qualsevol de les adversitats que puguin sorgir.

Al Guillermo i a la Laia pels centenars d'hores robades. Ells dos són la meva font d'energia i l'alegria de la meva vida.

A tots els pacients que han col·laborat en els diversos estudis. Sense ells aquesta tesi no hauria estat possible.

Abreviatures

Abreviatures

aCPG	<i>Anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
aFI	<i>Anticossos contra el factor intrínsec</i>
aIA-2	<i>Anticossos contra la tirosin fosfatasa-2</i>
aTg	<i>Anticossos contra la tiroglobulina</i>
aTPO	<i>Anticossos contra la peroxidasa tiroïdal</i>
CD	<i>Cluster de diferenciació</i>
CgA	<i>Cromogranina A</i>
CTLA-4	<i>Proteïna 4 associada als limfòcits T citotòxics</i>
CMH	<i>Complexe major d'histocompatibilitat</i>
DM1	<i>Diabetis mellitus tipus 1</i>
ECL	<i>Cèl·lules enterocromafin-like</i>
Foxp3	<i>Factor de transcripció Forkhead box P3</i>
GAD	<i>Descarboxilasa de l'àcid glutàmic</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
ICA	<i>Anticossos contra cèl·lules de l'illot pancreàtic</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IFN	<i>Interferó</i>
MAT	<i>Malaltia autoimmunitària tiroïdal</i>
PI	<i>Pepsinogen I</i>
PII	<i>Pepsinogen II</i>

PTPN22	<i>Proteïna tirosina fosfatasa no receptora tipus 22</i>
sTfR	<i>Receptor soluble de la transferrina</i>
SPA	<i>Síndrome poliglandular autoimmunitària</i>
Tc	<i>Cèl·lules T citotòxiques</i>
TGFβ	<i>Factor de creixement transformant beta</i>
Th	<i>Cèl·lules T helper o col·laboradores</i>
TNFα	<i>Factor de necrosi tumoral alfa</i>
TSH	<i>Tirotropina</i>
Tregs	<i>Cèl·lules T reguladores</i>

Introducció

3.1 Diabetis mellitus tipus 1. Genètica i autoanticossos

La diabetis mellitus tipus 1 (DM1) és una malaltia autoimmunitària deguda a una destrucció selectiva de les cèl·lules beta (β) pancreàtiques productores d'insulina ⁽¹⁾. La seva incidència ha augmentat notablement en les últimes dècades, sobretot en nens i en països desenvolupats ^(2,3). A Europa es preveu que els casos de nou diagnòstic en nens menors de 5 anys es doblin entre els anys 2005 i 2020 i que la prevalença en edats menors a 15 anys augmenti un 70% ⁽⁴⁾. La DM1 s'associa a la presència d'una autoimmunitat, de tipus humoral i cel·lular, contra els illots pancreàtics que estaria relacionada amb un defecte de la immunoregulació ^(1,5). Malgrat tot, en el moment actual, es desconeix l'etiologia exacta i la patogènesi de la DM1.

El model d'història natural de la DM1 suggereix l'existència de varies etapes que s'iniciarien amb una susceptibilitat genètica, seguida d'una fase d'autoimmunitat sense malaltia i, una fase final de diabetis clínica ⁽⁶⁾.

La DM1 és una malaltia poligènica que no segueix un model clàssic d'herència dominant o recessiva de determinats gens ⁽⁷⁾. De fet, no s'ha identificat cap variant al·lèlica que per si sola sigui capaç de causar la malaltia. Se sap que els gens que s'associen a un major risc de desenvolupar una DM1 són els que codifiquen les molècules de classe II del complex major d'histocompatibilitat o CMH (HLA o *Human Leukocyte Antigen* en humans), localitzats al cromosoma 6 (6p21) (IDDM1). Aquests gens serien els responsables de fins el 50% del risc genètic de desenvolupar una DM1 ⁽⁸⁾. Les molècules de classe II (HLA-DR, DQ i DP) estan formades per dues glicoproteïnes, cadenes alfa (α) i beta (β), i la seva principal funció és la de presentar pèptids antigènics als limfòcits T CD (cluster de diferenciació) 4⁺ ⁽⁹⁾. Aquestes molècules estan codificades per diferents gens del CMH que, en general, són molt polimòrfics. Aquest polimorfisme genètic és el responsable de que hi hagi una gran varietat de molècules HLA (producte d'aquests gens) a les poblacions humanes. La regió HLA-DR té un únic gen DRA que codifica la cadena α (invariable) i un o varis gens que codifiquen les cadenes β (DRB1, DRB3, DRB4), cadascun d'ells, molt polimòrfic. D'altra banda, les molècules HLA-DQ presenten variabilitat tant en les cadenes α com en les β , codificades,

respectivament, pels gens DQA1 i DQB1. Per tant, cada individu té dues cadenes DQ α i dues DQ β (una per cada haplotip, matern i patern, heretats) i en la formació de les molècules DQ, aquestes cadenes s'aparellen entre si (una α amb una β). Els gens de l'HLA es situen molt pròxims entre ells, motiu pel qual es dóna el fenomen anomenat *desequilibri de lligament* o tendència de certs al·lels de locus lligats, a heretar-se de forma conjunta amb una freqüència superior a la que s'esperaria per l'herència a l'atzar. En termes generals, els gens HLA es transmeten a la descendència en « bloc » i, aquest, rep el nom d'*haplotips* ⁽¹⁰⁾. Cada individu hereta dos haplotips (matern i patern) que contenen els gens HLA, i s'expressen de forma codominant. Els al·lels HLA DR4 i DR3 s'associen de forma important a la DM1. Aquests es presenten en el 95% dels pacients amb DM1 mentre que a la població general el seu percentatge és inferior al 50% ⁽¹¹⁾. En població caucàsica, tant l'autoimmunitat contra els illots com la DM1, s'han associat de forma important amb els haplotips HLA DR3-DQ2 i DR4-DQ8 ⁽⁹⁾. Part de l'associació d'aquests al·lels amb la DM1 és probablement deguda al *desequilibri de lligament* entre el DR i el DQ ⁽⁹⁾. Més concretament, estudis realitzats a varis països europeus han confirmat que el genotip HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 és el que s'associa amb un risc més alt per a desenvolupar una DM1. Aquest genotip està present en un 20-30% dels pacients amb DM1 i en fins a un 50% dels que es diagnostiquen abans dels 10 anys d'edat ⁽⁸⁾. D'altra banda, també s'han descrit genotips protectors del HLA que s'han relacionat amb un menor risc d'aparició de DM1, més concretament els que contenen l'al·lel DQ6, freqüentment associat a DR2 ⁽¹²⁾. Tanmateix, s'han identificat altres gens que no pertanyen a la regió HLA i que s'associen a un major risc de DM1, tot i que la seva contribució al risc relatiu de la malaltia és menor. Els més importants d'aquests són el gen de la insulina, localitzat al cromosoma 11p15 (IDDM2) i responsable del 10% de la susceptibilitat genètica per desenvolupar una DM1, el gen del CTLA-4 (proteïna 4 associada als limfòcits T citotòxics), localitzat al cromosoma 2q33 (IDDM12), el gen del receptor α de la interleucina 2 (IL 2RA) i el gen de la PTPN22 (proteïna tirosina fosfatasa no receptora tipus 22) localitzat al cromosoma 1p13 ⁽¹³⁾. La CTLA-4 és una molècules reguladora de la immunitat que s'expressa a la superfície dels limfòcits T activats i és un inhibidor clau de l'activació de les cèl·lules T ⁽¹⁴⁾. El ratolí *knockout* CTLA-4 desenvolupa una

síndrome limfoproliferativa que causa la mort per autoimmunitat a les 3-4 setmanes del seu naixement ⁽¹⁵⁾. La malaltia autoimmunitària tiroïdal (MAT), que inclou la malaltia de Graves-Basedow i la tiroïditis de Hashimoto, és en la que s'ha demostrat més clarament la seva relació amb el polimorfisme del gen del CTLA-4 ^(16,17). D'altra banda, el gen de la PTPN22 codifica una fosfatasa intracel·lular que té efectes reguladors negatius sobre l'activació de les cèl·lules T. Els estudis efectuats en pacients amb DM1 o MAT han demostrat que els polimorfismes del gen del PTPN22 suposen un risc incrementat d'aparició d'aquestes malalties inferior a 2. En canvi, en aquells pacients en els que les dues malalties es presenten de forma conjunta el risc està incrementat fins a 4 vegades ⁽¹⁸⁾. Darrerament el polimorfisme del gen del PTPN22 també s'ha descrit associat a la malaltia d'Addison ⁽¹⁹⁾. En relació a la DM1, un metanàlisi publicat recentment en el que s'ha estudiat a un número important de casos (7514) i controls (9045), ha suggerit d'altres gens com a possibles candidats per a desenvolupar la malaltia. Entre aquests hi ha el de la interleucina (IL) 10, IL-17, IL-19, IL-20, GLIS3 (factor de transcripció gli3) i el CD 69 ⁽²⁰⁾.

La DM1 està precedida d'una fase pre-clínica que es pot detectar per la presència d'autoanticossos dirigits contra les cèl·lules dels illots pancreàtics. Els primers anticossos que es varen descriure van ser els dirigits contra antígens localitzats al citoplasma de totes les cèl·lules dels illots pancreàtics (ICA). Posteriorment es va poder disposar d'assaigs quantitius amb una alta sensibilitat i especificitat que detectaven els principals antígens dels illots: la insulina (IAA), la isoforma de 65-kDa de la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD) i les molècules relacionades amb la proteïna tirosin fosfatasa IA-2 (anticòs contra IA-2, IA-2A) i IA-2 β ⁽¹⁾. En els últims anys, varis grups de treball han dut a terme un seguiment prospectiu des del naixement de nadons amb un alt risc genètic de desenvolupar una DM1, fet que ha permès estudiar la patogènia de la malaltia ⁽²¹⁻²⁴⁾. Aquests estudis han demostrat que els autoanticossos apareixen varis anys abans del debut clínic de la DM1 i que, per tant, poden ser utilitzats per a identificar a aquells individus amb un major risc per a desenvolupar una DM1. També s'ha comprovat que el risc d'aparició de DM1 i el període de temps des de l'aparició dels autoanticossos fins a la DM1 es relacionen de forma directa amb el títol dels ICA i

amb el número d'autoanticossos positius. Així, els pacients amb múltiples autoanticossos mostren un grau més elevat de progressió que els que només en tenen un. A més, s'ha vist que el risc varia en funció del tipus d'autoanticòs contra els illots, essent els dirigits contra la IA-2A els que s'associen a un major risc de progressió a DM1 ⁽⁹⁾.

3.2 Regulació de la resposta immunitària per cèl·lules T

3.2.1 Cèl·lules T reguladores

D'altra banda, ja en el segle passat, Paul Ehrlich va constatar ⁽²⁵⁾ que el sistema immunològic podia atacar de forma errònia antígens propis enlloc d'atacar només els foranis i va suggerir que aquest fet podria ser el responsable de diverses malalties agudes i cròniques entre les quals hi hauria la DM1. Les malalties autoimmunitàries com la DM1 es caracteritzen per una errada dels mecanismes de tolerància cap als antígens propis. Els mecanismes de tolerància centrals i perifèrics són els encarregats de protegir els individus de l'acció dels limfòcits autoreactius. Els mecanismes centrals tenen lloc als òrgans limfoides primaris (moll de l'os i timus) i la seva funció és la d'eliminar els clons de limfòcits T i B abans de que surtin a sang perifèrica en cas de que aquests tinguin receptors que reconeixin els antígens propis amb una alta afinitat. Com que aquests mecanismes no són perfectes, i amb l'objectiu de que el repertori sigui el més ampli possible, alguns limfòcits autoreactius aconsegueixen escapar-se i arribar als òrgans limfoides secundaris. En aquest cas, els mecanismes de tolerància perifèrica s'encarregarien de la inactivació d'aquestes cèl·lules impedit que reaccionessin contra els antígens propis. És un fet cada cop més acceptat que les cèl·lules T autoreactives estan presents en individus sans i que la seva presència per si sola, no implica necessàriament l'inici d'una malaltia autoimmunitària ⁽²⁶⁾. Per tant, és probable que per tal de que apareixi una malaltia autoimmunitària es requereixi, a més de la presència de cèl·lules T autoreactives, una ruptura en els mecanismes de tolerància perifèrica, fet que recolzaria una errada a varis nivells en el procés autoimmunitari. Les cèl·lules T reguladores (Tregs) són un subgrup de limfòcits T

que formen part dels mecanismes immunològics de tolerància perifèrica. La seva funció és la d'evitar que les cèl·lules T autoreactives que han escapat de la selecció tímica reaccionin contra els antígens propis. Tot i que el terme utilitzat ha estat el de reguladores, en realitat la seva funció és la de suprimir. Aquestes cèl·lules foren descrites i caracteritzades fenotípicament per primer cop a l'any 1995 per l'equip de S Sakaguchi ⁽²⁸⁾. És conegut que la timectomia de soques sensibles de ratolins al tercer dia de vida, dóna lloc a diverses malalties autoimmunitàries òrgan-específiques entre les quals hi ha la gastritis, l'ooforitis, l'orquitis, la tiroïditis i la pancreatitis. El model que més s'ha estudiat és el de la gastritis. Concretament, aquesta la desenvolupen el 60% dels ratolins timectomitzats ⁽²⁹⁾. De fet, la gastritis autoimmunitària experimental en ratolins és un dels models de malaltia autoimmunitària més ben caracteritzat a tots els nivells (molecular, cel·lular i genètic) i, per tant, representa un molt bon model per a l'estudi de l'anèmia perniciosa en humans ⁽³⁰⁾. Sakaguchi i col·laboradors van observar, en un model murí d'autoimmunitat induïda per una timectomia, l'absència de la població de limfòcits CD4⁺CD25⁺ en els ratolins que estaven malalts. A més, també van constatar que la malaltia es podia evitar si a aquests ratolins se'ls transferia aquest mateix subgrup de limfòcits T, procedents de la melsa d'altres animals que no patien malalties autoimmunitàries (no estaven timectomitzats). Per tant, inicialment, les Tregs foren definides per la co-expressió de CD4 i CD25 (cadena α del receptor de la IL-2). Posteriorment s'ha comprovat que només les cèl·lules que presenten una alta expressió de CD25 (CD4⁺CD25^{high}) són les que exerceixen realment una funció supressora ⁽³¹⁾. De fet, el CD25, a més de a les Tregs, també s'expressa a les cèl·lules T durant la seva activació antigènica i, per tant, no es considera un marcador específic de les Tregs ⁽³²⁾. Posteriorment s'ha identificat un marcador que s'expressa de forma específica a les Tregs, el factor de transcripció Forkhead box P3 (Foxp3) que, a més, és bàsic tant pel seu desenvolupament com per la seva funcionalitat ⁽³³⁾. Les mutacions del gen que codifica el Foxp3 donen lloc, tant en humans com en ratolins, a trastorns en el desenvolupament i la funcionalitat de les Tregs que són les causants d'una patologia autoimmunitària inflamatòria. La mutació del gen del Foxp3 és la responsable, en humans, de la malaltia IPEX i en ratolins del ratolí *scurfy* ⁽³⁴⁾. Ambdós presenten en comú una

inflamació multi-orgànica letal en la majoria de casos. L' IPEX és una síndrome inflamatòria greu que es diagnostica a la infància, les inicials de la qual corresponen a: immunodisregulació, poliendocrinopatia, enteropatia, lligada al cromosoma X. Aquesta síndrome es caracteritza per la presència d'una malaltia autoimmunitària (DM1 i tiroïditis), al·lèrgia i, malaltia inflamatòria intestinal ⁽³⁵⁾. Fins al moment actual, s'han identificat fins a 20 mutacions del gen del Foxp3 en els pacients amb IPEX ⁽³⁴⁾. Els estudis efectuats en pacients amb IPEX mostren que, el nombre de Tregs en la sang perifèrica d'aquests pacients pot variar, essent inclús normal. En canvi, en tots ells hi ha una alteració de la funcionalitat de les Tregs, el grau de la qual estaria relacionada amb la gravetat de la mutació del gen ⁽³⁶⁾. D'altra banda, les dades experimentals en ratolins han evidenciat que el dèficit de Tregs estaria implicat en la patogènesi del ratolí *scurfy* ⁽³⁷⁾.

S'han descrit altres marcadors presents a les cèl·lules Tregs com el CD45RB, CD152, CTLA-4, GITR (receptor del factor de necrosi tumoral induït per glucocorticoides), CD134 i CD62L. Tot i així, aquests també s'expressen a d'altres tipus cel·lulars, motiu pel qual es consideren de poca utilitat ⁽³⁸⁾. L'últim dels marcadors descrits per a definir les Tregs és la baixa expressió cel·lular de CD127 (cadena α del receptor de la interleucina 7) ⁽³⁹⁾ que permetria diferenciar-les de les cèl·lules T convencionals que presentarien una alta expressió de CD127 ⁽⁴⁰⁾. És per aquest motiu, que alguns grups de treball utilitzen, pels estudis de funcionalitat *in vitro*, la baixa expressió cel·lular de CD127 com a biomarcador per aïllar i identificar les Tregs, sovint en combinació amb el CD25⁽⁴¹⁾.

S'ha suggerit que les Tregs es sintetitzen en el timus normal com a llinatge independent, és a dir, exerceixen la seva funció supressora sense la necessitat de ser activades per l'antigen. Tot i així, se sap que les Tregs també es poden generar a la perifèria (Tregs induïdes) a partir de cèl·lules T *naïve*, és a dir que mai han contactat amb l'antigen, que es diferencien cap a Tregs després del seu contacte amb l'antigen ⁽⁴²⁾. D'aquesta forma, les Tregs es poden dividir en dos grans grups: les cèl·lules naturals derivades del timus (nTregs) i les perifèriques induïdes (iTregs).

El mecanisme pel qual les Tregs realitzen la supressió no es coneix de forma precisa, però se sap que per tal de que aquesta es realitzi és necessari el factor de

transcripció Foxp3^(43,44). Es creu que la supressió l'exercirien mitjançant un contacte cèl·lula a cèl·lula⁽⁴⁵⁾.

L'anàlisi quantitatiu de Tregs en sang perifèrica de la majoria de malalties autoimmunitàries estudiades fins a l'actualitat ha estat normal⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾, mentre que en d'altres s'ha trobat disminuït⁽⁵¹⁻⁵³⁾. De totes formes, la comparació entre els diferents estudis es troba limitada pel fet que els marcadors moleculars utilitzats per a definir les Tregs no sempre han estat els mateixos. A més, els primers estudis analitzaren la població de Tregs utilitzant els marcadors CD4⁺CD25⁺ per a definir-les. Degut a que en l'actualitat és conegut que el marcador CD25⁺ també s'expressa a les cèl·lules T activades, és difícil afirmar que realment totes les cèl·lules CD4⁺CD25⁺ que foren evaluades en aquells estudis eren realment Tregs.

Els estudis inicials efectuats en pacients amb DM1 van suggerir que el nombre de Tregs en sang perifèrica d'aquests pacients estaria disminuït⁽⁵¹⁾. Malgrat tot, la majoria d'estudis publicats posteriorment, en els que s'ha utilitzat marcadors més específics de les Tregs com el Foxp3, coincideixen en afirmar que el nombre de Tregs en sang perifèrica d'aquests pacients no està disminuït quan es compara amb el d'un grup control sa^(41,49,50,54).

La majoria d'estudis realitzats en pacients amb malalties autoimmunitàries han valorat únicament les Tregs en sang perifèrica. De totes formes en alguna de les malalties avaulades, com l'artritis reumatoide i la malaltia inflamatòria intestinal en fase activa, les Tregs també s'han estudiat a nivell tissular. En les dues malalties, s'ha descrit que el nombre de Tregs és més elevat en el teixit diana que en sang perifèrica^(53,55). Per aquest motiu, s'ha suggerit que en aquests casos, les Tregs migrarien des de la sang perifèrica cap al teixit diana inflamat, fet que explicaria que les Tregs estiguessin disminuïdes a la circulació. De fet, els estudis efectuats en pacients amb artritis reumatoide suggereixen que les Tregs migren cap a les articulacions afectades i allà són inactivades per citocines pro-inflamatòries⁽⁵⁵⁾. En aquests pacients, el líquid sinovial és ric en citocines pro-inflamatòries com el TNF- α (factor de necrosi tumoral alfa), la IL-6 i la IL-17. En aquest sentit, estudis *in vitro* de pacients amb artritis reumatoide han demostrat que el TNF disminueix la funció supressora de les Tregs⁽⁵⁶⁾ i que la IL-6 indueix una resistència de les cèl·lules T CD4⁺ efectores a ser suprimides per les Tregs⁽⁵⁷⁾.

La confirmació clínica d'aquest mecanisme la demostra el fet que el defecte supressor de les Tregs d'aquests pacients millora quan se'ls hi administra anti-TNF⁽⁵⁸⁾. Aquesta resistència de les cèl·lules T efectores a la supressió per part de les Tregs en presència d'un ambient de citocines pro-inflamatòries (IL-6 i TNF- α), també s'ha pogut demostrar en el model animal d'esclerosi múltiple, l'encefalomielitis autoimmunitària experimental⁽⁵⁹⁾. En relació a l'expressió tissular de Tregs, recentment s'ha descrit que els pacients afectes de cèliaquia presenten, a la mucosa de l'intestí prim, una major expressió de Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) que l'observada a la mucosa intestinal normal. Concretament, el nombre més elevat de Tregs s'observa en el subgrup de pacients que, a més de la cèliaquia, presenten una DM1⁽⁶⁰⁾.

D'altra banda, la majoria d'estudis realitzats en pacients amb malalties autoimmunitàries en els que s'ha valorat la funcionalitat de les Tregs coincideixen en afirmar que aquesta es troba disminuïda en comparació amb la d'una població sana^(48,52,61,62) tot i que els estudis efectuats en pacients amb DM1 han descrit resultats controvertits^(50,63). Tot i així, varis grups han descrit que les cèl·lules Tregs CD4⁺CD25⁺, directament obtingudes de pacients amb DM1, mostren una alteració en la supressió de les cèl·lules que responen de forma autòloga^(49,51). Estudis recents han suggerit que l'alteració de la funcionalitat de les Tregs dels pacients amb DM1 no seria deguda a un defecte intrínsec d'aquestes cèl·lules sinó a una resistència dels limfòcits T efectors a ser suprimits per les Tregs^(64,65). La possible utilitat de les Tregs com a teràpia cel·lular ha estat valorada en el model animal de DM1, el *non-obese diabetic (NOD) mouse*^(66,67). En aquest cas, s'ha pogut demostrar que la transferència de Tregs, estimulades *in vitro*, en aquests animals pot superar els defectes intrínsecs i restablir la tolerància immunològica a la DM1. En humans, recentment s'ha aconseguit aïllar i expandir *in vitro* cèl·lules Tregs de pacients amb DM1 de recent diagnòstic, que podrien ser utilitzades en un futur com a possible immunoteràpia cel·lular⁽⁴³⁾.

3.2.2 Cèl·lules T col·laboradores (*helper*)

El sistema immunològic està format per dos tipus d'immunitat: 1) innata: anomenada així perquè els seus components estan sempre presents i disposats a actuar immediatament sense temps de latència entre l'estímul i el desencadenament de la seva acció i 2) adaptativa: és una segona línia de defensa que elimina els patògens que aconsegueixen escapar de la immunitat innata. Es caracteritza per ser una resposta més tardana i específica (és capaç de reconèixer múltiples substàncies i microorganismes existents a la naturalesa) i dotada de memòria immunològica que permet una resposta immunològica immediata en cas de que l'organisme es torni a infectar pel mateix patògen o un de similiar. Els limfòcits són els principals components de la resposta immunològica adaptativa. Les cèl·lules T immadures migren des del moll de l'os fins al timus, on comencen a expressar receptors per l'antigen. La majoria d'aquests receptors, tenen dues cadenes, α i β , i per aquest motiu, se'ls anomena receptors $\alpha\beta$ ⁽⁶⁸⁾. Els limfòcits T, a diferència dels B, només reconeixen l'antigen si aquest està unit, és a dir, és presentat, per una molècula de l'HLA. Les molècules de l'HLA són molt polimòrfiques i poden ser de tipus I, expressades en la pràctica totalitat de les cèl·lules nucleades, o de tipus II que s'expressen únicament a les cèl·lules presentadores d'antigen. D'aquests, les considerades com a cèl·lules presentadores d'antigen professionals, és a dir, que internalitzen, procesen i presenten fragments d'antigen a la membrana associats a l'HLA, són les cèl·lules dendrítiques, els macròfags i els limfòcits B. Quan una cèl·lula T no activada o *naïve*, és a dir que mai ha contactat amb l'antigen, interacciona amb el complex antigen-HLA, la cèl·lula T prolifera i es diferencia en cèl·lules T memòria i efectores. Clàssicament s'han descrit dos tipus de subpoblacions de cèl·lules T, les col·laboradores o *helper* (Th) i les citotòxiques (Tc). Les glicoproteïnes de membrana CD4 i CD8 permeten diferenciar les Th de les Tc, ja que el CD4 és característic de les primeres i el CD8 ho és de les segones. La relació Th/Tc sol ser aproximadament de 2:1 en sang perifèrica d'una persona sana. Aquesta proporció pot modificar-se de forma significativa en cas d'existir una malaltia autoimmunitària o que cursi amb immunodeficiència. Les Tc reconeixen l'antigen únicament quan aquest està unit a

una molècula HLA de classe I, mentre que les Th únicament s'activen quan l'antigen està unit a una molècula de classe II. Un cop interaccionen amb l'antigen, les Th es poden diferenciar cap a cèl·lules T memòria o cap a cèl·lules efectores, és a dir, que "col·laboren" en l'activació de les cèl·lules B, els Tc, els macròfags i d'altres grups cel·lulars.

En funció del patró de citocines secretat, inicialment es varen descriure 2 subgrups de cèl·lules Th efectores: les Th1 i les Th2. El predomini d'un o altre estarà en funció de l'ambient de citocines, sintetitzades pel sistema immunològic innat, en el moment en què les cèl·lules Th *naïve* contactin amb l'antigen. Concretament, l'interferó (IFN)-gamma (γ) i la IL-12 promouen la diferenciació cap a una resposta Th1, mentre que la IL-4 afavoreix la diferenciació cap a una resposta de tipus Th2 ⁽⁶⁹⁾. L'origen de les citocines que afavoreixen la diferenciació cap a Th1 o Th2 prové de les cèl·lules del sistema immunitari innat (cèl·lules dendrítiques, macròfags, cèl·lules *Natural Killer*) en resposta a antígens microbials, parasitaris, o al·lèrgics. Cadascun d'aquests subgrups (Th1/Th2) secreta un patró de citocines diferent que explicaria la diferent resposta immunològica a la qual donen lloc. Les Th1 secreten principalment IFN- γ . Aquesta citocina és la principal responsable de que el tipus de resposta immunològica associada al subgrup Th1 sigui de tipus cel·lular i provoqui un dany tissular. La resposta Th1 excessiva s'ha demostrat en múltiples models animals de malalties autoimmunitàries com la DM1, l'esclerosi múltiple, i la tiroïditis de Hashimoto ⁽⁷⁰⁾. En canvi, les cèl·lules Th2 secreten IL-4 que participa en l'activació de les cèl·lules B, TGF- β (factor de creixement transformant beta) i IL-10. La resposta Th2 és fonamental per organitzar la defensa de l'hoste contra els patògens extracel·lulars i per a col·laborar amb els limfòcits B en la producció d'anticossos. Per tant, estaria implicada en una resposta de tipus humoral ⁽⁷¹⁾. La seva resposta exagerada seria la responsable de malalties al·lèrgiques i també de malalties autoimmunitàries com el lupus eritematós sistèmic.

Malgrat tot, les citocines secretades per cadascun d'aquests subgrups presenten uns trets comuns: 1) promouen la replicació (creixement) del subgrup que les ha produït, 2) inhibeixen el desenvolupament i l'activitat del subgrup

oposat, efecte denominat *cross-regulation*. Concretament l'IFN- γ inhibeix la resposta Th2 i la IL-10 la Th1.

Recentment el model Th1/Th2 s'ha hagut d'actualitzar. En els últims 5 anys s'han descrit nous subgrups de cèl·lules T, diferents a les Th1 i les Th2, entre les que hi haurien les Th17, Th9 i Th22 ⁽⁷²⁾. Concretament, les Th17 foren identificades a partir de l'observació, en estudis experimentals, que els ratolins deficients en IFN- γ podien presentar també malalties autoimmunitàries. Inclús, en presència de determinades condicions experimentals, els ratolins deficients en IFN- γ podien ser més susceptibles a presentar aquestes malalties ⁽⁷³⁾. Les cèl·lules Th17 secreten, entre d'altres, la IL-17, una potent citocina pro-inflamatòria. La funció principal de les Th17 seria la d'eliminar els patògens que no han pogut eliminar les Th1 i Th2. A més, s'ha suggerit que les cèl·lules Th17 són potents inductores de la inflamació tissular i s'han associat amb la patogènesi de varies malalties autoimmunitàries experimentals i situacions inflamatòries en humans. A diferència de les Th1 i Th2 que depenen de les pròpies citocines secretades (IFN- γ i IL-4) per a la seva diferenciació, les Th17 no requereixen la IL-17 per a diferenciar-se. En canvi, la presència conjunta de IL-6 i TGF β (dues citocines amb efectes oposats: IL-6 pro-inflamatòria i TGF- β anti-inflamatòria) indueix el desenvolupament o diferenciació de les Th17. En una fase posterior, la IL-21 amplificaria la resposta i la IL-23 l'estabilitzaria ⁽⁷⁴⁾. Fins fa poc es creia que les malalties autoimmunitàries eren causades, de forma quasi exclusiva, per una resposta Th1. Malgrat tot, després del descobriment de les cèl·lules Th17 es creu que aquestes juguen un paper clau en la resposta autoimmunitària. En aquest sentit, s'ha suggerit que cadascun d'aquest subgrups tindria una funció diferent en el procés autoimmunitari. Les Th17, serien un potent inductor de l'autoimmunitat afavorint la migració d'altres cèl·lules Th (com les Th1) cap a l'òrgan diana. Aquestes últimes, s'encarregarien de propagar i modular la inflamació i el dany tissulars ⁽⁷⁵⁾. A més, les Th17 també s'encarregarien d'eliminar els patògens extracel·lulars no eliminats prèviament per les Th2 o les Th1.

El TGF β , a més del seu paper en la diferenciació de les Th17, indueix el factor de transcripció Foxp3 de les Tregs. S'ha vist que quan s'afegeix IL-6 al TGF β s'inhibeix la producció de Tregs i, com s'ha comentat prèviament, se n'afavoreix la

de Th17. En aquest sentit, varis grups han descrit l'existència d'una relació recíproca entre les Tregs i les Th17 en la qual la IL-6 hi jugaria un paper primordial, ja que marcaria el balanç entre aquestes dues subpoblacions ^(76,77).

Recentment, s'ha pogut comprovar, en models animals de diferents malalties autoimmunitàries, com la deplecció de les cèl·lules Th17 mitjançant l'administració d'anticossos contra la IL-17 és capaç de reduir la inflamació a l'òrgan diana ^(78,79). Aquestes troballes també s'han confirmat en el model animal de la DM1, el ratolí NOD. En aquest cas, la inhibició de les Th17 és capaç d'evitar en els animals pre-diabètics la progressió cap a DM1, disminueix la inflamació de l'illot pancreàtic i evita la formació d'anticossos anti-GAD ⁽⁸⁰⁾. En la gastritis autoimmunitària, els estudis histològics efectuats en models animals, han demostrat que el patró de lesió gàstrica varia en funció del tipus de Th que hi predomina, essent el més destructiu el del Th17. A més, s'ha vist que la transferència de Tregs és capaç de suprimir l'activitat de les Th1 i en menor grau la de les Th2. En canvi, és incapaç de suprimir la de les Th17 ⁽⁸¹⁾ (figura 1).

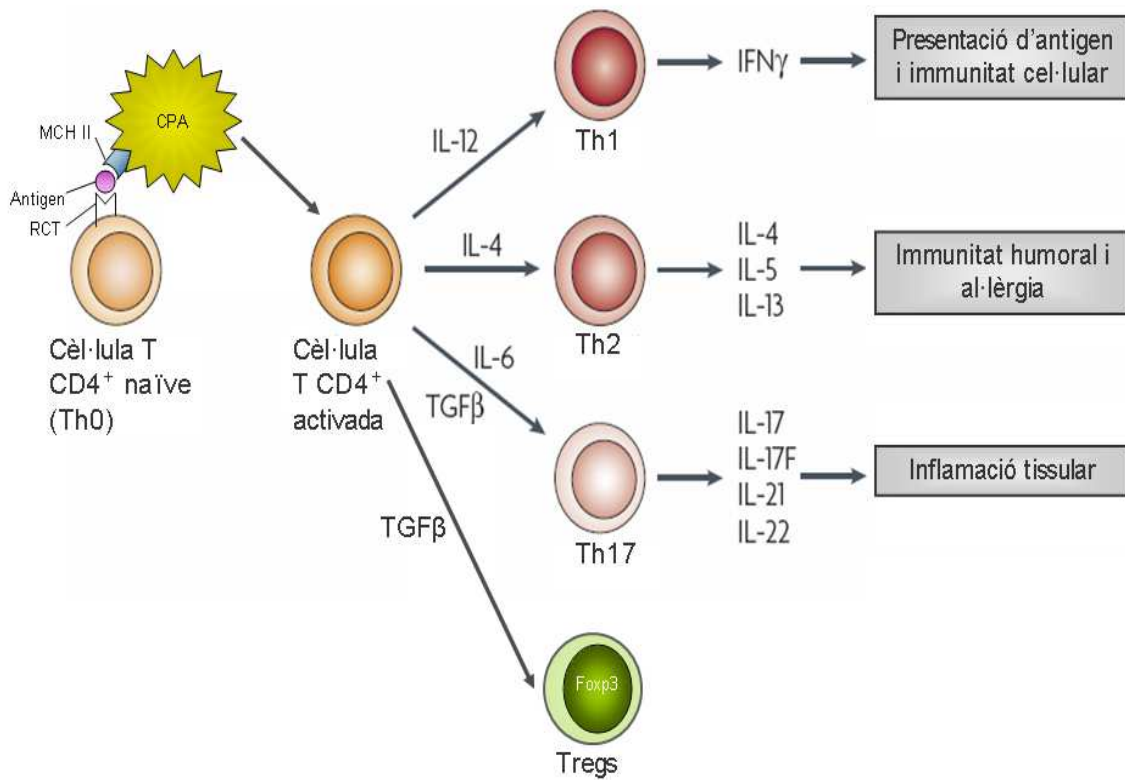


Figura 1. Cèl·lules T reguladores (Tregs) i els diferents subgrups de limfòcits T col·laboradors amb les seves respectives funcions efectores. La cèl·lula T no activada o *naïve* (Th0) interacciona amb la molècula MCH formant el complex antigen-MCH. La cèl·lula T prolifera i es diferencia en cèl·lules T col·laboradores (Th1/Th2/Th17) i cèl·lules reguladores en funció de l'ambient de citocines sintetitzades pel sistema immunològic innat.

CMH II: complex major d'histocompatibilitat tipus II; CPA: cèl·lula presentadora d'antigen; RCT: receptor de la cèl·lula T; TGF-β: factor de creixement transformant beta; IL: interleucina; Th: limfòcit T col·laborador.

3.3 Diabetis mellitus tipus 1 i la seva associació a altres malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan

Els pacients amb DM1 presenten una prevalença incrementada d'altres malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan. L'associació de com a mínim dues malalties autoimmunitàries en un mateix individu constitueix l'anomenada síndrome pluriglandular autoimmunitària (SPA). De totes les possibles associacions, la més freqüent és entre la DM1 i la malaltia autoimmunitària tiroïdal (MAT). Aquesta inclou la malaltia de Hashimoto i la de Graves-Basedow ⁽⁸²⁾. La síndrome poliglandular autoimmunitària es pot subdividir en una forma juvenil molt poc freqüent (SPA-I) i en una més freqüent d'aparició a l'edat adulta, la SPA-II. A l'edat adulta també s'ha descrit la SPA-III, que a diferència de la SPA-I i II, no inclou entre els seus criteris diagnòstics la insuficiència suprarenal autoimmunitària ⁽⁸³⁾. La SPA-I, també anomenada *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dysplasia* (APECED), es caracteritza per la presència de com a mínim 2 de les 3 següents manifestacions clíniques: candidiasi mucocutània crònica, malaltia d'Addison i hipoparatiroidisme. Aquesta síndrome s'inclou dintre de les malalties autoimmunitàries monogèniques, és a dir, és deguda a mutacions en un únic gen que codifica la proteïna reguladora d'autoimmunitat (AIRE), situat en el cromosoma 21 i s'hereta de forma autosòmica recessiva. El seu diagnòstic sol realitzar-se a la infància o a l'adolescència. No s'han descrit diferències entre els dos sexes ni associació amb l'HLA ⁽⁸⁴⁾.

La SPA-II es caracteritza per la presència d'una insuficiència suprarenal primària autoimmunitària juntament amb una malaltia autoimmunitària tiroïdal (síndrome d'Schmidt) (70-90%) i/o una DM1 (síndrome de Carpenter) (20-50%) ⁽⁸⁵⁾. El seu patró d'herència és més complexe que el de la SPA-I. Hi estan implicats els gens de la regió HLA del cromosoma 6 ^(86,87), el gen del CTLA-4 i el del PTPN22, essent els que tenen un major pes relatiu els localitzats a la regió HLA. S'ha suggerit que la seva associació amb el gens del CTLA-4 i del PTPN22 s'explicaria per la relació que aquests presenten amb la malaltia autoimmunitària tiroïdal ⁽⁸⁸⁾ i la malaltia d'Addison, respectivament ⁽⁸⁹⁾. La SPA-II es pot diagnosticar a qualsevol edat, tot i que sol ser més freqüent durant els primers anys de la vida adulta i

afecta de forma predominant al sexe femení amb una proporció dona/home de 3:1⁽⁹⁰⁾ Els pacients, al igual que en el cas de la SPA-I, poden presentar, a més, d'altres malalties autoimmunitàries que no formen part dels "principals" components de la síndrome entre les quals hi ha: vitiligen (4,5-11% pacients), alopecia (1-4% pacients), hepatitis crònica (4% pacients), gastritis crònica atròfica amb o sense anèmia perniciosa (4,5-11% pacients) i hipofisitis⁽⁹¹⁾. La SPA-III, segons la classificació original de Neufeld i Blizzard⁽⁹²⁾, inclou l'associació de la malaltia autoimmunitària tiroïdal amb una o varies de les següents malalties autoimmunitàries entre les quals no hi ha la insuficiència suprarenal primària: DM1 (III3a), anèmia perniciosa (III3b), vitiligen, alopecia i miastènia gravis (III3c).

3.3.1 Diabetis mellitus tipus 1 i malaltia autoimmunitària tiroïdal

La malaltia autoimmunitària tiroïdal (MAT), que inclou tant l'hipotiroïdisme degut a una tiroïditis crònica autoimmunitària com l'hipertiroïdisme degut a una malaltia de Graves-Basedow, és la malaltia immunològica més prevalent en els pacients amb DM1^(93,94). Els tres antígens principals contra els quals van dirigits els anticossos contra la glàndula tiroide són la tiroglobulina (aTg), la peroxidasa tiroïdal (aTPO) i el receptor de la tirotropina o TSH (aTBII/TRAb). S'ha descrit que, pel diagnòstic de la MAT, la positivitat dels anticossos aTPO és discretament més sensible que la dels aTg⁽⁹⁵⁾. Entre el 20 i el 30% dels pacients amb DM1 presenten aTPO i/o aTg positius^(96,97). En canvi, la positivitat d'aquests autoanticossos en la població general oscil·la entre el 11 i el 13%⁽⁹⁸⁾. La prevalença d'anticossos anti-tiroïdals (aTPO i/o aTg) en els pacients amb DM1, tal i com també s'ha descrit per a la població general⁽⁹⁹⁾, és més elevada en les dones que en els homes i incrementa amb l'edat^(97,101). A més, la duració de la diabetis també s'ha descrit com a factor de risc per la positivitat d'aquests autoanticossos⁽¹⁰⁰⁾. D'altra banda, la prevalença d'hipotiroïdisme en els pacients amb DM1 és d'un 12-24% en les dones i d'un 6% en els homes^(93,94), mentre que la d'hipertiroïdisme és d'entre un 1 i un 2%⁽¹⁰¹⁾.

Tal i com s'ha descrit en la població general⁽¹⁰²⁾, en els pacients amb DM1 la incidència d'hipotiroïdisme, clínic o subclínic, incrementa amb l'edat i en aquells

casos amb positivitat prèvia d'anticossos antitiroïdals (aTPO) ^(101,103). La seva prevalença pot arribar a ser d'un 80% en aquells pacients amb DM1 i aTPO positius seguits durant un període de fins a 20 anys ⁽¹⁰⁴⁾.

L'associació entre la DM1 i la MAT podria explicar-se, al menys en part, per factors de risc genètic compartits entre les dues malalties. En aquest sentit, els gens descrits que estarien implicats en aquesta associació són els de classe II del sistema major d'histocompatibilitat (HLA-II), el del CTLA-4 i el de la PTPN22 ⁽¹⁸⁾, tots ells relacionats amb la resposta immunitària.

Degut a que els pacients amb DM1 presenten una prevalença incrementada de disfunció tiroïdal, en el moment actual, s'accepta que el seu cribratge està justificat en aquesta població tot i que no hi ha consens en quin és el millor paràmetre (TSH o aTPO) ni en quina hauria de ser la freqüència de la seva determinació. Així, l'associació americana de diabetis (ADA) i varis autors ⁽¹⁰¹⁾ recomanen la determinació anual de TSH, mentre que d'altres recomanen pel seu cribratge l'ús conjunt (anual o bianual) de TSH i anticossos aTPO ^(100,96). Finalment, hi ha un últim grup d'autors que recomana la determinació de TSH únicament quan els aTPO són positius ^(103,105).

3.3.2 *Diabetis mellitus tipus 1 i malaltia celíaca*

La malaltia celíaca és una malaltia autoimmunitària que es caracteritza per una inflamació crònica i una destrucció de les vellositats de l'intestí prim ⁽¹⁰⁶⁾. La seva prevalença a la població general és del 0,3-1% ⁽¹⁰⁷⁾. La descrita en els pacients amb DM1 varia entre el 1 i el 8,3% ⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾. El factor ambiental que la desencadena és el gluten ⁽¹⁰⁸⁾. Aquest és una proteïna que es troba al blat, al sègol i l'ordi. La malaltia és deguda a la interacció del gluten amb varis factors immunològics, genètics i ambientals ⁽¹⁰⁸⁾. En relació als factors de risc genètic, l'al·lel HLA-DQ2 s'ha identificat en el 90-95% dels pacients mentre que a la majoria de la resta s'ha identificat l'HLA-DQ8 ⁽¹¹²⁾. Degut a que aquests al·lells estan presents en un 30-40% de la població general, la seva absència té un alt valor predictiu negatiu ⁽¹¹³⁾. En la majoria d'estudis de pacients amb DM1, s'ha observat, que el risc de malaltia celíaca està incrementat en aquells que presenten l'al·lel DQB1*0201-DQA1*05 de

la molècula HLA-DQ2^(114,115). El risc més alt és pels que són homozigots DR3-DQ2⁽⁹⁶⁾. Recentment, s'han descrit varis al·lels de risc de DM 1 i malaltia celíaca localitzats a la regió no-HLA. Entre aquests hi hauria el RGS1 (regulador de la senyalització de la proteïna G1), l'IL18RAP (cadena β del receptor de la IL 18 o proteïna accessòria del receptor de la IL18) i el TAGAP (*T-cell activation GTPase activating protein*)⁽¹¹⁶⁾.

El diagnòstic de la malaltia celíaca requereix, d'una banda, la pràctica d'una biòpsia intestinal que mostri els trets característics d'una limfocitosi intraepitelial, una hiperplàsia críptica i atròfia de les vellositats i, d'una altra, una resposta positiva a una dieta sense gluten⁽¹⁰⁸⁾. Pel seu cribratge, s'aconsella la determinació d'anticossos IgA contra la transglutaminasa tissular, autoantigen contra el que es dirigeixen aquests autoanticossos, juntament amb la dosificació de IgA, ja que el dèficit selectiu de IgA és fins a 5 vegades més freqüent en els pacients celíacs que en la població general⁽¹¹⁷⁾. En cas de que n'existeixi un dèficit, es recomana fer la determinació amb anticossos IgG⁽¹¹⁸⁾. La sensibilitat dels anticossos contra la transglutaminasa pel diagnòstic de la malaltia és superior al 90%⁽¹¹⁹⁾. Els títols d'aquests anticossos es correlacionen amb el grau de lesió de la mucosa intestinal i, per tant, la seva sensibilitat per detectar la malaltia disminueix en aquells estudis en els que s'ha inclòs a un elevat nombre de pacients amb mínimes lesions intestinals⁽¹²⁰⁾.

Les manifestacions clíniques de la malaltia celíaca poden ser inespecífiques o de tipus subclínic. Entre aquestes hi hauria la presència d'un retard de creixement, dolor abdominal inespecífic, infertilitat, disminució de la densitat mineral òssia, hipocalcèmia amb dèficit de vitamina D i hiperparatiroidisme secundari o malalties psiquiàtriques^(121,122). A més, cal tenir present que en els pacients amb DM1 una de les manifestacions clíniques de la malaltia és la presència de freqüents hipoglucèmies que milloren amb la retirada del gluten de la dieta⁽¹²³⁾. En la majoria del pacients amb DM1 (90%), la malaltia celíaca sol diagnosticar-se després de la diabetis. Un percentatge no despreciable d'aquests pacients refereix no presentar cap tipus de simptomatologia clínica. Malgrat tot, alguns autors han remarcat que si a aquests pacients se'ls realitza una anamnesi

més detallada, la majoria d'ells presenten unes molèsties de tipus lleu que havien passat desapercebudes a l'anamnesi inicial ⁽¹²⁴⁾.

Degut a que la malaltia celíaca es pot desenvolupar varis anys després del debut de la diabetis ⁽¹²⁵⁻¹²⁷⁾, a que pot cursar de forma asimptomàtica en alguns casos i a que la seva presència s'associa a un major risc de comorbiditats que milloren amb la supressió del gluten de la dieta, alguns autors recomanen el seu cribratge en els pacients amb DM1 en el moment del diagnòstic i posteriorment cada 2-3 anys ^(96,129). Una revisió sistemàtica de 7 estudis publicats realitzats a Europa i Nord-Amèrica demostra que un 7,4% dels nens amb DM1 tenen anticossos positius contra la transglutaminasa o l'endomisi ⁽¹²⁸⁾. Tot i així, en aquests estudis, només un 32,5% dels pacients estaven simptomàtics fet que recolza la importància de realitzar el cribratge serològic de la malaltia. En canvi, d'altres autors ⁽¹²⁸⁾ i l'ADA ⁽¹³⁰⁾ recomanen el cribratge de la malaltia únicament en el moment del diagnòstic de la DM1 i posteriorment només en cas de que hi hagi símptomes suggestius de la malaltia com serien el retard de creixement, pèrdua de pes o símptomes gastrointestinals ⁽¹²⁴⁾. En cas de que els anticossos contra l'endomisi i/o la transglutaminasa tissular siguin positius, tots els autors coincideixen en que el pas posterior seria la realització d'una biòpsia intestinal.

3.3.3 Diabetis mellitus tipus 1 i malaltia d'Addison:

La malaltia d'Addison es diagnostica en 1 de cada 10.000 individus de la població general ⁽¹³¹⁾. El procés autoimmunitari responsable de la malaltia es pot diagnosticar mitjançant la detecció d'anticossos contra l'escorça suprarenal, concretament contra l'enzim 21 hidroxilasa (21-OHasa). Aquests presenten una elevada sensibilitat pel diagnòstic de la malaltia ⁽¹³²⁾. En els pacients amb DM1, la prevalença d'aquests anticossos és d'entre el 1 i el 2% ^(96,133). El seguiment prospectiu de pacients de la població general amb anticossos contra la 21-OHasa positius sense insuficiència suprarenal associada ha mostrat que hi hauria una sèrie d'alteracions analítiques que es detectarien en una fase prèvia al debut clínic de la malaltia. D'aquestes, la primera d'elles seria un increment de la renina plasmàtica, que se seguiria d'un increment de l'ACTH, una disminució del cortisol

estimulat per l'ACTH i finalment alteracions basals del cortisol ⁽¹³⁴⁾. A més, en els pacients adults, hi hauria una sèrie de factors que s'associarien a un major risc d'evolució cap a la malaltia clínica en aquells casos únicament amb anticossos positius. Entre els descrits hi hauria: l'alteració subclínica de la funció adrenal ^(135,136), un títol alt d'anticossos ^(137,138), el sexe masculí ⁽¹³⁸⁾ i la presència prèvia d'hipoparatiroidisme i/o candidiasi ⁽¹³⁸⁾ (en aquest cas formant part de la síndrome poliglandular autoimmunitària tipus I). En els pacients amb DM1, un estudi transversal efectuat a 814 pacients, ha descrit una associació entre la positivitat dels anticossos contra la 21-OHasa i la dels anticossos antitiroïdals, de forma que, en aquest estudi, el 70% dels pacients amb DM1 i anticossos contra la 21-OHasa presenten, de forma associada, anticossos antitiroïdals positius ⁽⁹⁶⁾.

En l'actualitat, s'accepta cada vegada més que la malaltia d'Addison, tant en la seva forma aïllada com formant part de la síndrome poliglandular autoimmunitària, s'associa de forma important amb l'haplotip DR3-DQ2 (DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201) i el DR4-DQ8 (DRB*04-DQA1*0301-DQB1*0302) ^(137,138). En pacients amb DM1, concretament els que presenten el DQ8, s'ha descrit que l'al·lel DRB1*0404 s'associa de forma important a la malaltia d'Addison ⁽¹³⁹⁾. Tot i així, hi ha algun estudi que ha suggerit que la malaltia d'Addison, a diferència de la DM1, no s'associaria al DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) ⁽¹⁴⁰⁾. D'altra banda, de forma similar a l'objectivat a altres malalties autoimmunitàries, també s'ha descrit una associació entre la insuficiència suprarenal autoimmunitària i el polimorfisme del gen del CTLA-4 ^(141,142).

Finalment, un estudi recent ha descrit un polimorfisme del gen que codifica la proteïna rica en leucina NACHT (NALP 1), una molècula bàsica de la immunitat innata, que s'associaria a la malaltia d'Addison (Odds ratio de 1,25) i també a la DM1 (Odds ratio 1,15) ⁽¹⁴³⁾. Aquest fet, segons els autors de l'estudi, podria indicar que la NALP1 i el sistema immunològic innat podrien estar implicats en la patogènesi de la malaltia d'Addison i la DM1, ambdues malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan.

En relació al cribratge de la malaltia en els pacients amb DM1, alguns autors ⁽¹⁴⁴⁾ recomanen fer una determinació d'anticossos contra la 21-OHasa en tots els pacients amb DM1. En els casos amb resultat positiu, caldria realitzar un estímul

del cortisol amb ACTH per tal de descartar la insuficiència suprarenal. L'ADA fins al moment actual, a diferència del recomanat per la malaltia autoimmunitària tiroïdal i la malaltia celíaca, no ha manifestat quan ni quins serien els paràmetres que caldria determinar per fer el cribratge de la malaltia d'Addison en els pacients amb DM1.

3.4 Gastritis autoimmunitària

3.4.1 Definició i característiques immunològiques

La gastritis autoimmunitària, també anomenada gastritis crònica atròfica tipus A, és una malaltia inflamatòria crònica que afecta al fundus i al cos gàstrics on es localitzen les cèl·lules parietals, productores d'àcid clorhídric i factor intrínsec, i les zimogèniques productores de pepsinogen I mentre que l'antre es troba conservat ⁽¹⁴⁵⁾. En canvi, a la gastritis tipus B o no autoimmunitària hi ha una afectació de l'antre juntament amb el fundus i cos gàstrics. El principal factor etiològic d'aquesta última és la infecció per *Helicobacter pylori* (*H.pylori*), un bacteri gram-negatiu.

La gastritis autoimmunitària presenta els trets d'una resposta inflamatòria tipus Th1. En el model animal de gastritis autoimmunitària s'ha pogut observar que l'infiltrat limfocitari present a la mucosa gàstrica en les fases inicials de la malaltia està format per cèl·lules CD4⁺ i macròfags. Aquestes cèl·lules secreten diverses citocines com l'IFN- γ , la IL-10 i el TGF- β , però no la IL-4. Aquest fet, juntament amb l'evidència de que els limfòcits T gàstrics de ratolins amb gastritis autoimmunitària secreten més IL- γ que els de la mucosa normal, recolzen la implicació de la resposta immunològica tipus Th1 en la patogènia de la malaltia ⁽¹⁴⁶⁾. La gastritis autoimmunitària es caracteritza per la presència d'anticossos dirigits contra les cèl·lules parietals gàstriques (aCPG) i contra el factor intrínsec (aFI), secretat per aquestes últimes. Concretament, els aCPG es detecten en el 60-85% dels casos i els aFI en el 30-50%. Aquests autoanticossos es troben presents tant en el sèrum com en el suc gàstric. Els antígens diana de la gastritis autoimmunitària són la subunitat catalítica α , de 100-kDa, i la subunitat β , una

glicoproteïna de 60 a 90 kDa. Ambdues formen part de la bomba gàstrica de protons H^+/K^+ -ATP asa ^(144,147). Els estudis experimentals han demostrat que la responsable de l'inici de la gastritis és la subunitat β ⁽¹⁴⁸⁾. No hi ha cap evidència de que hi hagi una reacció autoimmunitària dirigida contra les cèl·lules zimogèniques productores de pepsinogen I. Malgrat tot, estudis efectuats en ratolins han suggerit que la pèrdua d'aquestes cèl·lules podria estar relacionada amb una afectació de les vies implicades en la seva síntesi ⁽¹⁴⁹⁾. Els estudis realitzats en pacients amb gastritis autoimmunitària confirmada histològicament, han demostrat que el títol d'aCPG és inversament proporcional a la concentració de cèl·lules parietals i es correlaciona amb la gravetat de l'atròfia del cos gàstric ⁽¹⁵⁰⁾. Clàssicament, s'ha considerat que els aCPG eren més sensibles i els aFI més específics pel diagnòstic de l'anèmia perniciosa. El motiu és que la detecció dels aCPG sol associar-se a la presència d'una gastritis atròfica, en la majoria dels casos sense anèmia associada. En canvi, la positivitat dels aFI s'acompanya en la quasi totalitat dels casos d'una malabsorció de vitamina B12, és a dir, d'una anèmia perniciosa. Tot i així, alguns autors han descrit, en pacients amb anèmia perniciosa, una major prevalença d'aFI, concretament en els pacients de raça negra, i una menor prevalença d'aCPG, sobretot en pacients joves ⁽¹⁵¹⁾, suggerint una menor sensibilitat dels aCPG pel diagnòstic de la malaltia. Eixisteixen poques dades a la literatura del seguiment prospectiu d'ambdós autoanticossos en pacients amb anèmia perniciosa. Davidson i col·laboradors ⁽¹⁵²⁾ realitzaren un seguiment durant un promig de 70 mesos a 113 pacients diagnosticats d'anèmia perniciosa. Els resultats mostraren que, amb el temps d'evolució de la malaltia, hi havia una tendència a la negativització dels aCPG. En canvi, els aFI presentaven una tendència a la positivització. El motiu, segons els autors de l'estudi, podria ser degut a la progressiva destrucció de l'antigen contra el qual es dirigeix la resposta immunològica dels aCPG, les cèl·lules parietals gàstriques.

D'altra banda, la infecció per *H.pylori* ha estat proposada, per alguns autors, com a factor desencadenant de la gastritis atròfica autoimmunitària. Aquesta hipòtesi es recolza en la similitud de trets histopatològics i clínics, observats tant en l'atròfia gàstrica autoimmunitària com en la deguda a una infecció per *H.pylori*. A més, un 20-30% dels pacients amb infecció per *H.pylori* presenten aCPG positius

i alguns autors han descrit, en pacients amb gastritis autoimmunitària, una correlació positiva entre els aCPG i els anticossos contra *H.pylori* ^(153,154). Malgrat tot, aquestes troballes no s'han confirmat en tots els estudis ⁽¹⁵⁵⁾. D'altra banda, el tractament per a l'eradicació de la infecció per *H.pylori* en pacients amb gastritis autoimmunitària dóna lloc a una milloria de la secreció àcida gàstrica en molts dels pacients i a una remissió completa de la gastritis atròfica en una proporció variable d'aquests ⁽¹⁵⁶⁾. De totes formes, el temps necessari per observar una milloria és molt lent i aquesta només és significativa després de molts anys de seguiment ⁽¹⁵⁷⁾. El fet que no s'aconsegueixi una remissió completa de la gastritis atròfica autoimmunitària en la majoria de pacients amb el tractament per a l'eradicació de *H.pylori* no va necessàriament en contra de la implicació de la infecció en la patogènesi de la gastritis autoimmunitària. Molt probablement indica l'existència d'un punt de « no retorn » a partir del qual el procés autoimmunitari ja no requereix la presència continuada del patògen inductor ⁽¹⁵⁸⁾. El mecanisme que s'ha proposat pel qual *H.pylori* podria induir l'autoimmunitat gàstrica, en persones genèticament susceptibles, és l'existència de varis epítops comuns entre les proteïnes de *H.pylori* i les de la bomba H⁺/K⁺-ATPasa gàstrica ⁽¹⁵⁹⁾.

En relació a la susceptibilitat genètica, s'ha descrit, en ratolins, dues regions distals del cromosoma 4, anomenades Gasa1 i Gasa2, que estarien relacionades amb un major risc de desenvolupar una gastritis autoimmunitària⁽¹⁶⁰⁾. Posteriorment s'han identificat altres locus menors, el Gasa 3 i 4 ⁽¹⁶¹⁾ localitzats al cromosoma 6. En humans, hi ha algunes dades que suggereixen una predisposició genètica per desenvolupar una gastritis autoimmunitària/anèmia perniciosa. Entre aquestes hi hauria l'agregació familiar de la malaltia i la positivitat d'anticossos aCPG en un 20-30% dels familiars de pacients afectes d'anèmia perniciosa ⁽¹⁶²⁾. En relació al HLA, no existeix una evidència clara de la relació entre determinats haplo/genotips i l'anèmia perniciosa. Així, s'han descrit associacions de l'anèmia perniciosa amb l'HLA-DR4, DR2 ⁽¹⁶³⁾ i el DR5 ⁽¹⁶⁴⁾. D'altra banda, els pacients que presenten una anèmia perniciosa juntament amb una malaltia endocrinològica sovint presenten el genotip DR3/DR4 ⁽¹⁶⁵⁾. Per tant, aquestes dades recolzen una heterogeneïtat genètica de la malaltia. Finalment, no s'ha descrit cap associació

entre l'anèmia perniciosa/gastritis autoimmunitària i dos gens que s'han relacionat amb altres malalties autoimmunitàries, l'AIRE i el del CTLA-4 ⁽¹⁶⁶⁾.

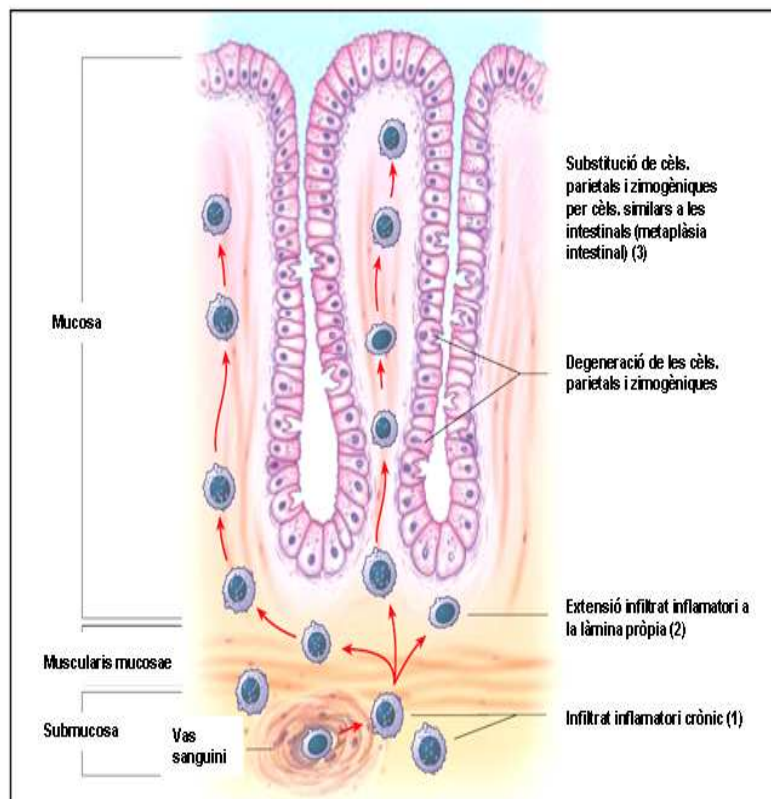


Figura 2. Lesió gàstrica de l'anèmia perniciosa

La lesió inicial es caracteritza per un infiltrat inflamatori crònic de la submucosa amb cèl·lules inflamatòries (1). L'infiltrat inflamatori crònic s'exten a la lamina pròpia (2) i s'associa a una degeneració de les cèl·lules parietals i zimogèniques. La lesió avançada es caracteritza per una pèrdua de les cèl·lules parietals i zimogèniques que són substituïdes per cèl·lules similars a les de la mucosa intestinal (metaplàsia intestinal (3). *Modificat de Toh i col·laboradors*

3.4.2 Fisiopatologia del seu substracte anatòmic: atròfia del cos gàstric

La destrucció de les cèl·lules parietals productores d'àcid clorhídric dóna lloc a una hipo/aclorhidria. L'aclorhidria és la responsable de que es perdi el *feedback* inhibitori de l'àcid clorhídric sobre la secreció de gastrina per part de l'antra i, que per tant, de que hi hagi una hipergastrinèmia. La síntesi de forma prolongada de gastrina té un efecte tròfic de tipus proliferatiu sobre la mucosa gàstrica, de forma més concreta, sobre les cèl·lules enterocromafins-like (ECL) localitzades a les glàndules oxíntiques del fundus gàstric. El ventall de lesions a les cèl·lules ECL inclou l'hiperplàsia (simple, lineal o micronodular), la displàsia i finalment el tumor carcinoide ⁽¹⁶⁷⁾. El tumor carcinoide es diagnostica en un 4-9% dels pacients amb gastritis autoimmunitària/anèmia perniciosa i és 13 vegades més freqüent que en un grup control ^(168,169). Des d'un punt de vista patològic, els tumors carcinoïdes que es diagnostiquen en presència d'una gastritis crònica atròfica solen ser petits, muticèntrics i localitzats al fundus gàstric. A més, es comporten d'una forma menys agressiva que els tumors carcinoïdes gàstrics esporàdics ⁽¹⁷⁰⁾.

Dels possibles marcadors serològics utilitzats pel cribratge dels tumors neuroendocrins, la cromogranina A (CgA) és la que ha demostrat tenir una major sensibilitat ⁽¹⁷¹⁾. La CgA és una glicoproteïna de 49 kDa que s'expressa àmpliament a les cèl·lules neuroendocrines. De fet, n'és el principal producte dels seus grànuls de secreció ⁽¹⁷²⁾. Estudis recents indiquen que les concentracions sèriques de CgA es correlacionen de forma positiva amb la massa de cèl·lules ECL en pacients que presenten una atròfia del cos gàstric d'etiologia autoimmunitària ⁽¹⁷³⁾. Malgrat tot, també s'ha suggerit que la concentració de CgA, per si sola, no és capaç d'identificar quin dels pacients amb hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines presenta un tumor carcinoide i per tant, no evita la necessitat de realitzar una fibrogastroscòpia. En canvi, la normalitat de la concentració de CgA pràcticament exclou la presència d'un tumor carcinoide, ja que presenta un valor predictiu negatiu del 100% ⁽¹⁷⁴⁾.

3.4.2.1 Pepsinogen i infecció per *Helicobacter pylori*

Al fundus i cos gàstric s'hi sintetitzen, entre d'altres, dos pèptids: el pepsinogen I i la ghrelina. Hi ha dos tipus de pepsinogen, el I (PI), que es secreta a les glàndules oxíntiques del cos gàstric i el II (PII) que es sintetiza de forma uniforme a tot l'estómac. Quan hi ha una atròfia del cos gàstric la concentració de pepsinogen I disminueix mentre que la del pepsinogen II no es modifica o disminueix discretament. Per aquest motiu, s'ha considerat que la concentració de pepsinogen I i/o del quocient pepsinogen I/pepsinogen II (PI/PII) reflexen amb una alta fiabilitat el nombre de cèl·lules i glàndules oxíntiques del cos gàstric, és a dir, reflexen el grau d'atròfia de la mucosa del cos gàstric ⁽¹⁷⁵⁾. Amb la progressió de l'atròfia del cos gàstric, les concentracions sèriques de pepsinogen I disminueixen i també ho fa el quocient pepsinogen I/II. Existeixen varis estudis que confirmen la utilitat de la determinació del pepsinogen I i del quocient pepsinogen I/II pel diagnòstic de la gastritis atròfica. En aquest sentit, un quocient PI/PII inferior a 3 es considera un marcador fidedigne d'atròfia del cos gàstric ⁽¹⁷⁶⁾. Una de les causes d'atròfia del cos gàstric és la infecció per *H.pylori*. De fet, la meitat dels casos amb gastritis crònica per *H.pylori* evolucionen cap a una gastritis atròfica ⁽¹⁷⁷⁾. En aquest cas, s'ha pogut comprovar que els pacients infectats amb una atròfia greu presenten un PI sèric i un quocient PI/II baix ⁽¹⁷⁸⁾. La infecció per *H.pylori*, cursa inicialment, amb una inflamació de la mucosa de l'estómac que pot donar lloc a una concentració sèrica alta de pepsinogen I. Amb el temps d'evolució, la infecció pot donar lloc a una atròfia gàstrica. En aquest cas, hi haurà una disminució de la concentració sèrica de pepsinogen I i/o de gastrina, en funció de la localització de l'atròfia. Si aquesta està localitzada únicament a l'antra, la concentració de gastrina serà baixa, degut a la destrucció de les cèl·lules G antrals, i la de pepsinogen I serà normal. En canvi, si l'atròfia és total (cos i antra) tant la concentració sèrica de gastrina com la de pepsinogen I seran baixes. Finalment, hi podria haver únicament una atròfia localitzada al cos gàstric. Entre les causants hi hauria la gastritis de causa autoimmunitària o tipus A i alguns casos d'infecció per l'*H. pylori*. Els dos casos cursarien amb una concentració sèrica baixa de pepsinogen I i una concentració alta de gastrina.

L'atròfia gàstrica, tant la de causa infecciosa com l'autoimmunitària, s'acompanya de la substitució de la mucosa gàstrica normal per glàndules d'aspecte metaplàstic que no secreten àcid ni gastrina (metaplàsia intestinal) i que expressen varies de les característiques de la mucosa colònica o intestinal. Amb la progressió de l'atròfia, les glàndules metaplàstiques són cada cop més immadures i hi ha un canvi de la metaplàsia intestinal completa ("tipus intestí prim"), cap a formes incompletes ("tipus colònic"). Aquest canvi, seria el responsable del risc incrementat de càncer gàstric associat a la gastritis atròfica ⁽¹⁷⁹⁾. A més, la presència d'una hipo/aclorhidria permet la colonització de l'estómac per diferents bacteris, entre ells *H. pylori*, alguns dels quals produïrien substàncies mutagèniques i carcinogèniques ⁽¹⁸⁰⁾. Per tant, en l'actualitat s'accepta que la gastritis atròfica, i per tant la infecció per *H.pylori* que la causa, és un factor de risc important del carcinoma gàstric ⁽¹⁸¹⁾. S'ha calculat que fins a un 80% dels casos de càncer gàstric serien deguts a processos derivats de la infecció per *H.pylori* ⁽¹⁸²⁾. El risc de càncer gàstric s'ha relacionat amb la gravetat i el grau d'extensió de la gastritis atròfica. Així, el risc més alt és per aquells pacients que tenen una gastritis greu que afecta a la totalitat de l'estómac (pangastritis: cos i antre) seguit d'aquells que tenen únicament afectació de l'antre ⁽¹⁸³⁾. De fet, al Japó, un país amb una elevada morbi-mortalitat per càncer gàstric, ja són molts els estudis que han demostrat la utilitat de la determinació conjunta de PI i quocient PI/II, pel seu cribratge ⁽¹⁸⁴⁾.

En relació a l'anèmia perniciosa i, per tant, al seu substracte histopatològic, la gastritis crònica atròfica tipus A, la majoria d'estudis han descrit que la incidència d'adenocarcinoma gàstric està incrementada de 2 a 3 vegades en aquests pacients ^(185,186). Tot i així, no tots els estudis estan d'acord en aquest increment de risc. Així, a un estudi americà en el qual es va incloure un nombre important de pacients amb anèmia perniciosa es va descriure una incidència de càncer gàstric del 1,2%, resultat molt similar a l'observat a la població general ⁽¹⁸⁷⁾. En qualsevol cas, sembla que el risc més elevat seria durant el primer any després del diagnòstic ^(186,188).

En l'actualitat, es disposa de dues opcions per poder fer el diagnòstic d'una gastritis atròfica i poder diferenciar una mucosa normal d'una patològica. La

primera d'elles és la biòpsia gàstrica que permet un examen microscòpic de la mucosa tant del cos com de l'antre gàstrics. Actualment, la valoració histològica de la gastritis es realitza segons els criteris del *Sydney System* ⁽¹⁸⁹⁾. Per a fer una correcta valoració, aquest sistema recomana disposar com a mínim de dues biòpsies del cos i dues de l'antre gàstric. Per a l'anàlisi, es realitza una valoració semiquantitativa de 5 paràmetres que es classifiquen en lleuger, moderat o greu. Aquests són: 1) inflamació crònica (cèl·lules mononuclears), 2) "activitat" (inflamació per polimorfonuclears, aguda), 3) atròfia, definida com una pèrdua de les glàndules normals, 4) metaplàsia intestinal, 5) colonització de les biòpsies per *H.pylori* a zones no metaplàstiques de l'epiteli. La segona, és una opció no invasiva que consisteix en la determinació sèrica o plasmàtica de varis marcadors biològics gàstrics. Recentment, ha estat validat a Europa un test en el que s'inclou la determinació per ELISA de PI, PII, gastrina i anticossos IgG i IgA contra *H.pylori*, anomenat "GastroPanel"[®] (Biohit, Helsinki, Finlàndia). El test ha demostrat ser útil pel cribratge de l'atròfia gàstrica ja que mostra una molt bona correlació amb la histologia ⁽¹⁹⁰⁾. A més, permet valorar també l'estructura i funció de la mucosa de l'antre. La realització del test estaria indicada en aquells casos en que no hi hagués simptomatologia digestiva. En la resta de casos, caldria fer un estudi histopatològic de la mucosa mitjançant una fibrogastrosccòpia. En funció del resultat dels diferents paràmetres inclosos en el test s'obtindrien 3 grups diferents amb les seves respectives recomanacions: A) mucosa normal i absència d'infecció per *H.pylori*. En aquest cas la fibrogastrosccòpia no aportaria una informació adicional, B) gastritis de tipus no atròfica amb infecció per *H.pylori*. La malaltia relacionada amb la infecció es curaria amb el tractament mèdic per a l'eradicació i en aquest cas, tampoc la fibrogastrosccòpia tindria un valor afegit, C) gastritis atròfica amb o sense infecció per *H.pylori*. Es recomanaria remetre el pacient al digestòleg per estudiar amb fibrogastrosccòpia la mucosa gàstrica. En cas d'existir una infecció per *H.pylori* associada a la gastritis atròfica es recomanaria el seu tractament. De fet, es recomana tractar la infecció quan aquesta es presenta en el contexte d'una patologia considerada "major" entre les quals hi ha l'atròfia gàstrica ⁽¹⁹¹⁾.

En relació al diagnòstic de la infecció per *H.pylori* no existeix una prova "gold standard". De totes formes, la fiabilitat de la majoria dels mètodes utilitzats

pel seu diagnòstic és bona en el cas de pacients amb gastritis no atròfica. Així, la sensibilitat i especificitat dels tests histològics solen ser superiors al 90% tot i que, degut a que només es biopsia una petita zona de la mucosa, poden existir errors deguts al mostreig. En canvi, el test de la urea marcada amb ^{13}C (UBT o *urea breath test*) i la serologia depenen menys d'un error de la mostra. La seva sensibilitat i especificitat solen ser superiors al 90% ⁽¹⁹²⁾. La sensibilitat de la serologia amb IgA és menor que amb IgG. De totes formes, un 2-7% dels pacients infectats presenten únicament un increment dels anticossos IgA ⁽¹⁹³⁾. Quan la infecció per l'*H.pylori* es presenta en pacients amb una atròfia gàstrica és ben conegut que el diagnòstic de la infecció pot ser difícil ja que el bacteri pot desaparèixer, amb el temps, degut al microambient hostil de la mucosa gàstrica. Per aquest motiu, els casos d'infecció que es detecten mitjançant l'histologia i el test de la urea disminueixen i, en canvi, la majoria dels casos (84%) poden diagnosticar-se mitjançant la serologia (anticossos IgG i IgA) ⁽¹⁹⁴⁾. Un estudi recent ha descrit que la seropositivitat contra els antígens virulents CagA i VacA de l'*H.pylori*, detectat mitjançant un Western blot, està present en un alt percentatge de pacients amb atròfia del cos gàstric. En aquest estudi, un 47,8% dels pacients amb atròfia del cos gàstric presentava, a més, una anèmia perniciosa. Només en dos d'ells la serologia contra els antígens CagA i VacA del *H.pylori* va ser negativa ⁽¹⁹⁴⁾.

3.4.2.2 Ghrelina

Al cos gàstric, a més del pepsinogen I, també s'hi sintetiza un altre pèptid anomenat ghrelina. La ghrelina és un peptid de 28 aminoàcids que fou descrit per primer cop a l'any 1999 per l'equip de Kojima i col·laboradors ⁽¹⁹⁵⁾ com el lligand endogen del receptor secretagog de l'hormona de creixement tipus 1a (GHS-R 1a). Existeixen dues formes de ghrelina: la *n*-octanoyl (acilada) i la des-*n*-octanoyl (desacilada). El grup *n*-octanoyl al tercer aminoàcid (serina 3) de la molècula de ghrelina és essencial per a la seva unió al receptor específic (GHS-R1a), per a estimular la secreció de GH i molt probablement perquè sigui biològicament activa en les seves funcions endocrinològiques. La forma no acilada de la ghrelina,

present en el sèrum a concentracions més altes que l'acilada, es creu que no té funcions endocrinològiques. Tot i així, exerciria algunes funcions no-endocrinològiques de tipus cardiovascular o antiproliferatiu, probablement unint-se a d'altres subtipus de GHS-R ⁽¹⁹⁶⁾. L'estómac, concretament les cèl·lules neuroendocrines X/A del cos gàstric, n'és el lloc principal de la seva secreció tot i que també es produeix en d'altres localitzacions com l'intestí, el pàncrees, el ronyó, la placenta, la hipòfisi i l'hipotàlem. La ghrelina té múltiples accions fisiològiques entre les quals hi ha la d'incrementar la gana (orexígen) mitjançant l'estimulació de neurones hipotalàmiques que secreten substàncies anabòliques com el neuropèptid Y i l' *agouti-related protein* ⁽¹⁹⁷⁾, la d'estimular la secreció de GH i la de regular la motilitat i secreció àcida gàstrica. En persones sanes, la secreció de ghrelina incrementa just abans de l'inici de cada àpat i disminueix de forma ràpida després de la ingesta, fet que ha suggerit que la ghrelina podria estar implicada en la sensació de gana prèvia a la ingesta alimentària ⁽¹⁹⁸⁾. Alguns autors han suggerit que la insulina estaria implicada en aquesta disminució post-ingesta de la ghrelina ⁽¹⁹⁹⁾. De fet, en persones sanes, tant primes com obeses, s'ha observat que les concentracions sèriques de ghrelina i insulina es correlacionen negativament ^(200,201). En pacients amb DM1, s'ha pogut comprovar que la ghrelina post-ingesta no disminueix quan hi ha un dèficit insulínic greu no tractat mentre que el tractament amb insulina basal d'aquests pacients és suficient per a disminuir la ghrelina ⁽¹⁹⁹⁾. Tot i així, en els pacients amb DM1 tractats amb insulina la disminució posprandial de ghrelina és superior quan s'utilitza una insulina ràpida abans de l'àpat que quan s'administra únicament una insulina basal ^(199,202). Per aquest motiu, s'ha suggerit que la disminució de ghrelina deguda a la insulina podria ser deguda, al menys en part, a l'efecte que la insulina exerceix sobre la glicèmia, i no tant a un efecte intrínsec de la insulina ⁽²⁰⁰⁾. Els estudis que han valorat la ghrelina en pacients en DM1 s'han realitzat principalment en nens. La major part d'ells mostren unes concentracions de ghrelina, tant total ⁽²⁰³⁻²⁰⁵⁾ com acilada ⁽²⁰⁶⁾, més baixes en els pacients amb DM1 que en el grup control.

La ghrelina es produeix principalment al cos gàstric. Per aquest motiu, varis estudis han valorat la possibilitat de que la seva síntesi pogués estar afectada en casos d'atròfia i inflamació del cos gàstric, més concretament en presència d'una

infecció per *H.pylori*. Els estudis han demostrat una menor síntesi gàstrica de ghrelina i unes menors concentracions sèriques d'aquesta en presència de la infecció. En aquest cas, les concentracions sèriques de ghrelina total (acilada i no acilada) s'han correlacionat amb el grau de lesió histopatològica gàstrica, en concret amb el grau d'atròfia, essent les concentracions més baixes les observades en presència d'una atròfia greu ⁽²⁰⁷⁾. S'ha demostrat, també, que les concentracions sèriques baixes de ghrelina total s'associaven a unes concentracions sèriques baixes de pepsinogen I i a un quocient pepsinogen I/II baix, ambdós considerats marcadors bioquímics d'atròfia del cos gàstric. En canvi, els estudis que han valorat la forma acilada de la ghrelina en pacients amb atròfia gàstrica han mostrat resultats controvertits. Així, s'ha descrit un augment tant de la ghrelina acilada i del quocient ghrelina acilada/ghrelina total ⁽²⁰⁸⁾ com una disminució de ghrelina acilada ⁽²⁰⁹⁾ en pacients amb atròfia gàstrica. Existeix un únic estudi ⁽²¹⁰⁾ que hagi valorat les concentracions de ghrelina en pacients amb gastritis autoimmunitària. Els resultats obtinguts mostren que els pacients amb anticossos aCPG positius presenten unes concentracions sèriques totals de ghrelina significativament més baixes que les d'un grup control sa. A més, l'estudi suggereix la determinació de les concentracions sèriques totals de ghrelina per a fer el cribratge de l'atròfia del cos gàstric ja que la seva sensibilitat i especificitat pel diagnòstic serien més altes que les de la gastrina i el quocient PI/PII.

Tal i com s'ha comentat prèviament, la ghrelina és sintetitzada per un grup de cèl·lules neuroendocrines gàstriques, les X/A. A la gastritis crònica autoimmunitària, en fase d'atròfia, hi ha una hipergastrinèmia que estimula la proliferació d'un altre grup de cèl·lules neuroendocrines gàstriques, les enterochromoafins-like (ECL). La proliferació d'aquestes cèl·lules pot donar lloc a una hiperplàsia o, en una fase més evolucionada, a un tumor carcinoide. Els estudis immunohistoquímics efectuats en pacients, tant amb hiperplàsia de cèl·lules neuroendocrines com amb tumors carcinoïdes, han mostrat que la majoria d'aquestes lesions expressen i sintetitzen ghrelina ⁽²¹¹⁻²¹⁵⁾, tot i que la hiperplàsia és de les ECL i no de les cèl·lules X/A. Aquest augment d'expressió de ghrelina també s'ha descrit en tumors neuroendocrins d'altres localitzacions com el pàncrees, el pulmó, la tiroïde, la paratiroïde i la glàndula pituïtària. Malgrat la

presència de cèl·lules productores de ghrelina en aquestes lesions tumorals neuroendocrines, les xifres de ghrelina a la circulació perifèrica en aquests casos solen ser normals ^(212,216,217). A més, sembla ser que les concentracions sèriques de ghrelina no es relacionen amb la quantitat de pèptid sintetitzat per part de les cèl·lules tumorals ^(212,213). D'altra banda, s'han descrit a la literatura casos aïllats de carcinomes neuroendocrins de localització gàstrica i pancreàtica, en els quals s'han detectat xifres sèriques molt altes de ghrelina, anomenats genèricament ghrelinomes, de significat clínic incert ^(214,218). Finalment, alguns estudis realitzats *in vitro* indiquen que la ghrelina tindria propietats anti-inflamatòries. Aquesta acció seria deguda a una inhibició de la síntesi de citocines pro-inflamatòries (IL-1 β , IL-6, TNF- α) per part dels monòcits i dels limfòcits T ⁽²¹⁹⁾. Les seves propietats anti-inflamatòries s'han pogut demostrar en el model animal d'artritis ⁽²²⁰⁾, sepsi ⁽²²¹⁾, colitis ⁽²²²⁾ i esclerosi múltiple ⁽²²³⁾. Concretament, en aquesta última s'ha pogut demostrar que l'administració subcutània de ghrelina als ratolins era capaç de disminuir la gravetat de l'encefalomielitis experimental autoimmunitària, model experimental de l'esclerosi múltiple. D'altra banda, en diverses malalties inflamatòries com l'esclerosi múltiple ⁽²²⁴⁾, la vasculitis ⁽²²⁵⁾, la malaltia celíaca ⁽²²⁶⁾ i la colitis ⁽²²⁷⁾, s'han descrit concentracions perifèriques elevades de ghrelina total que, segons alguns autors ⁽²²²⁾, podrien correspondre a un mecanisme compensatori per intentar controlar el procés pro-inflamatori d'aquests pacients.

3.4.3 Presentació clínica:

3.4.3.1 Anèmia per malabsorció de vitamina B12 i/o de ferro

La gastritis atròfica autoimmunitària pot cursar amb una malabsorció de vitamina B12 i/o de ferro. D'una banda, existeix una destrucció de les cèl·lules parietals que sintetitzen el factor intrínsec, necessari per a l'absorció de la vitamina B12 a l'intestí prim. A més, la presència d'anticossos contra el factor intrínsec impedeix la formació del binomi vitamina B12-factor intrínsec. Per aquest motiu, amb l'evolució natural de la malaltia els dipòsits de vitamina B12 disminueixen progressivament fins a l'aparició, a la fase final de la malaltia, d'una anèmia clínica anomenada anèmia perniciosa, també coneguda com a malaltia de

Bierner o anèmia addisoniana ⁽²²⁸⁾. Aquesta és una anèmia de tipus macrocític i la desenvolupen aproximadament un 10-15% dels pacients amb gastritis autoimmunitària. Tot i així, es creu que el temps necessari perquè la gastritis autoimmunitària evolucioni cap a una anèmia perniciosa pot arribar a ser de entre 20 i 30 anys ⁽²²⁹⁾. El terme “anèmia perniciosa” sovint s'utilitza com a sinònim de dèficit de cobalamina o d'anèmia macrocítica, però, en realitat, s'hauria d'utilitzar únicament per aquelles situacions que cursen amb una alteració de la secreció del factor intrínsec i una gastritis crònica atròfica ⁽²³⁰⁾. Existeixen molts pocs estudis a la literatura que hagin realitzat un seguiment prospectiu de les concentracions sèriques de vitamina B12 en pacients afectes d'una atròfia gàstrica ⁽²³¹⁻²³³⁾. Els resultats d'aquests estudis, amb un promig de seguiment entre 2 i 14 anys, han mostrat una incidència de malabsorció de vitamina B12 entre el 14 i el 23%. De tots ells, l'estudi de Irvine i col·laboradors ⁽²³⁴⁾ és el que ha inclòs un major nombre de pacients. En aquest estudi, es realitzà un seguiment prospectiu (1-15 anys) de 90 pacients amb una gastritis autoimmunitària atròfica. Durant el període de seguiment, un 19% dels pacients va desenvolupar una malabsorció de vitamina B12. Només un d'aquests pacients presentava anèmia clínica en el moment del diagnòstic mentre que a la resta de pacients l'hemograma fou normal. La detecció del dèficit de vitamina B12 és important ja que aquesta és un co-factor necessari per la metionina sintetasa. Aquest enzim és un factor clau en la metilació de l'homocisteïna que la transforma en metionina. Per tant, el dèficit de vitamina B12 dóna lloc a un acúmulo d'homocisteïna a les cèl·lules i a la circulació que provoca un dany cel·lular, especialment al sistema nerviós. L'organisme disposa de 3 mecanismes per convertir l'homocisteïna en productes menys lesius que puguin ser eliminats per part de les cèl·lules. El fet que l'hiperhomocisteïnèmia afecti de forma especial al sistema nerviós és degut a que les cèl·lules d'aquest sistema únicament disposen de la via de la metionina sintetasa, que necessita a la vitamina B12, per poder metabolitzar l'homocisteïna. A més, es considera que el dany provocat al sistema nerviós és irreversible, i a diferència de l'anèmia, no millora, o ho fa molt discretament, amb l'administració de la vitamina B12 ⁽²³⁵⁾. Cal remarcar, a més, que un percentatge no despreciable de pacients amb trastorns neurològics

deguts a un dèficit de vitamina B12 no presenten anèmia ni augment del volum corpuscular mig dels hematies ⁽²³⁶⁾.

D'altra banda, els pacients amb gastritis autoimmunitària també poden presentar una anèmia ferropènica. De fet, el 20-30% de pacients amb anèmia ferropènica refractària sense evidència de sagnat gastrointestinal presenten una atròfia gàstrica amb aclorhidria com a causant de l'anèmia ⁽²³⁷⁻²³⁹⁾. Aquesta és deguda a que l'aclorhidria no permet la reducció de la forma fèrrica del ferro, present a la majoria d'aliments, cap a la ferrosa, necessària per a la seva absorció. Alguns autors ⁽²⁴⁰⁾ han suggerit que el tipus d'anèmia dels pacients amb gastritis autoimmunitària podria estar relacionat amb alguns paràmetres com l'edat i el sexe. D'aquesta manera, l'anèmia ferropènica seria més freqüent en dones joves, en les quals les pèrdues menstruals agreujarien la malabsorció de ferro. En canvi, l'anèmia perniciosa, deguda a un dèficit de cobalamina, seria un tret de presentació més característic de gent gran ja que, perquè aquesta es presenti, és necessari una disminució important de la secreció del factor intrínsec i, per tant, de la vitamina B12, fet que requereix una llarga evolució de la malaltia.

3.4.3.2 Associació de la gastritis autoimmunitària amb altres malalties autoimmunitàries

Finalment, s'ha descrit una associació entre l'anèmia perniciosa i d'altres malalties autoimmunitàries com la DM1 ⁽¹⁶⁴⁾ (3-4%), el vitiligen (2-8%) ⁽²⁴¹⁾, algunes citopènies autoimmunitàries com l'anèmia hemolítica i la púrpura trombopènica idiopàtica ^(242,243) i sobretot amb la malaltia autoimmunitària tiroïdal (3-32%) ⁽²⁴⁴⁾ (també anomenada autoimmunitat tirogàstrica). De fet, l'associació entre la malaltia autoimmunitària tiroïdal i l'anèmia perniciosa està inclosa en la SPA tipus III b. Concretament, en els pacients amb malaltia de Graves-Basedow s'ha descrit una positivitat d'aCPG del 22% i en els pacients amb hipotiroïdisme autoimmunitari d'entre el 32 i el 40% ^(245,246). A més, s'ha descrit que una tercera part dels pacients amb malaltia autoimmunitària tiroïdal presenten atròfia del cos gàstric confirmada histològicament i que d'aquests, un 82% presenten anèmia ⁽²⁴⁷⁾. Aquesta associació entre l'autoimmunitat gàstrica i

tiroïdal suggereix la possible existència d'un factor immunològic comú entre les dues malalties. En aquest sentit, un únic grup ha descrit la presència d'un epítot comú entre la peroxidasa tiroïdal i l'antigen de la cèl·lula parietal gàstrica, la bomba H^+/K^+ -ATPasa ⁽²⁴⁸⁾. Tot i així, en el moment actual no existeix una explicació patogènica de l'associació entre ambdues malalties.

La gastritis autoimmunitària cursa amb una hipo/aclorhidria deguda a una destrucció de les cèl·lules parietals productores d'àcid clorhídric. Recentment, s'ha pogut comprovar que els pacients amb una alteració de la secreció àcida gàstrica presenten una malabsorció de la levotiroxina que requereix un increment de la seva dosificació ⁽²⁴⁹⁾. En el cas de la gastritis autoimmunitària, un estudi recent ha demostrat que els requeriments del tractament substitutiu amb levotiroxina són més alts en els pacients amb aCPG positius que en els amb aCPG negatius. Concretament, aquells que requereixen una dosi diària de levotiroxina més alta ($\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$) són els que presenten una atròfia de la mucosa gàstrica associada a la positivitat dels aCPG ⁽²⁵⁰⁾.

Les concentracions sèriques de pepsinogen I s'han avaluat en dues malalties autoimmunitàries: la tiroïdal i la púrpura trombopènica idiopàtica. L'estudi de Segni i col·laboradors ⁽²⁴⁶⁾ avaluà a 129 nens diagnosticats d'una malaltia autoimmunitària tiroïdal. D'aquests, un 30% presentaren aCPG positius. Les concentracions sèriques de pepsinogen I foren baixes en un 12% dels pacients amb aCPG positius en comparació amb un 2% dels aCPG negatius. La fibrogastrosccòpia d'un subgrup de pacients amb aCPG positius va demostrar que tots els pacients que tenien una atròfia moderada o greu del cos gàstric presentaven concentracions sèriques baixes de pepsinogen I. D'altra banda, Juncà i col·laboradors ⁽²⁵¹⁾, varen estudiar les concentracions sèriques de pepsinogen I, juntament amb les de gastrina, vitamina B12 i el títol d'aCPG a 179 pacients diagnosticats de púrpura trombopènica idiopàtica. L'estudi mostrà que un 20,3% dels pacients presentaven concentracions sèriques baixes de pepsinogen I. D'aquests, 10/27 presentaven una hipergastrinèmia associada. A més, les concentracions sèriques de vitamina B12 foren significativament més baixes en els pacients amb pepsinogen I sèric baix que els que tenien un pepsinogen I normal. Segons els autors, les troballes de l'estudi,

confirmarien la coexistència de dues malalties autoimmunitàries: l'anèmia perniciosa i la púrpura trombopènica idiopàtica.

3.4.4 Seguiment endoscòpic

En relació a la indicació de realitzar o no una fibrogastrososcòpia en els pacients amb anèmia perniciosa, la majoria d'autors estan d'acord en recomanar-la en el moment del seu diagnòstic ⁽²⁵²⁾. En canvi, és un tema controvertit si els pacients amb gastritis autoimmunitària/anèmia perniciosa han de seguir un programa en el que es realitzi un seguiment endoscòpic de forma regular amb l'obtenció de múltiples biòpsies gàstriques. Així, alguns autors recomanen el seu seguiment de forma regular ^(253,254) mentre que d'altres només aconsellen realitzar-lo en cas de que hi hagin símptomes del tracte digestiu alt ⁽²⁴⁶⁾.

De fet, els tumors carcinoides que es diagnostiquen en aquests pacients no són molt agressius i a més no està encara clar que el risc de carcinoma gàstric estigui incrementat. En relació al risc d'aparició d'un tumor carcinoide, alguns autors han suggerit un seguiment endoscòpic cada 5 anys en aquells casos amb hiperplàsia de les ECL, més concretament quan la gastrina i la CgA són altes (>300 ng/L i >120 ng/ml, respectivament) ^(255,256). El tractament proposat pels tumors carcinoides en el contexte d'una gastritis autoimmunitària varia en funció de la seva mida i el seu número. Així, si la mida és inferior a 1 cm i/o n'hi ha menys de 3, es podria adoptar una actitud expectant o bé fer una ressecció ⁽²⁵⁷⁾. En canvi, si són més grans d'un centímetre i/o un número superior a 5, alguns autors han proposat la realització d'una antrectomia que disminuiria el nombre de cèl·lules G, productores de gastrina ⁽²⁵⁸⁾. Tant si es realitza una antrectomia com una polipectomia, en aquests casos, s'aconsellaria un seguiment endoscòpic cada 6 mesos. D'altra banda, en un nombre limitat de casos (n=8), l'administració d'un anàleg de la somatostatina com l'octeòtride ha demostrat, en els pacients amb gastritis atròfica i hipergastrinèmia, una disminució de la hiperplàsia de les ECL ⁽²⁵⁹⁾.

En relació al risc de carcinoma gàstric, la majoria d'estudis han demostrat que aquest es troba incrementat de 2 a 3 vegades en els pacients amb gastritis

autoimmunitària/anèmia perniciosa (187,189, 256, 260). Es recomana un seguiment endoscòpic cada 5 anys en presència d'una displàsia lleu/moderada (256).

3.5 Diabetis mellitus tipus 1 i gastritis autoimmunitària

La prevalença de gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1 està incrementada entre 3 i 5 vegades (164). Els aCPG es consideren un bon marcador de gastritis autoimmunitària o tipus A ja que aquests són citotòxics per a la mucosa gàstrica (261). La prevalença descrita d'aCPG en els pacients amb DM1 oscil·la entre el 10 i el 15% en els nens i entre el 15 i el 20% en població adulta (97,261,164). Alguns autors han descrit una prevalença augmentada en el sexe femení (254,262), tot i que d'altres no ho han confirmat (162). Els factors de risc de tipus immunològic que s'han associat amb la positivitat dels aCPG inclouen la persistència de la positivitat dels anticossos contra els illots (255,263), la positivitat dels GAD (264) i la positivitat contra la peroxidasa tiroïdal (associació tiro-gàstrica). Una de les possibles explicacions de l'associació dels aCPG amb els anticossos contra GAD-65 podria ser el fet que la descarboxilasa 65 de l'àcid glutàmic, a més d'expressar-se al pàncrees i al cervell, també s'expressa a la glàndula tiroïde i a l'estómac (97). Alguns autors han suggerit que la presència d'uns anticossos contra GAD positius podria representar un major risc d'autoimmunitat general, mentre que els anticossos contra la IA-2 serien un marcador més específic de destrucció de la cèl·lula beta pancreàtica (99). El terme "autoimmunitat tiro-gàstrica" s'ha utilitzat per a definir la prevalença d'anticossos antitiroïdals i/o MAT en pacients amb anèmia perniciosa (247). En pacients amb DM1, els estudis transversals en els que s'han determinat varis autoanticossos associats a la malaltia, han confirmat aquesta associació tiro-gàstrica (97,164,261). Així, un 33-45% dels pacients amb DM1 i aCPG positius presenta positivitat pels aTPO, mentre que la seva positivitat disminueix al 17-22% en els pacients amb aCPG negatius. En relació a la malaltia clínica, en els pacients amb DM1 també s'ha descrit un major risc de desenvolupar una anèmia perniciosa en aquells que presenten una malaltia autoimmunitària tiroïdal (94). Així, la prevalença descrita d'anèmia perniciosa en els pacients amb DM1 i malaltia autoimmunitària

tiroïdal ha estat del 6,3% (8,5% en les dones) ⁽²⁶⁵⁾, percentatge més elevat que el 4% descrit per a pacients únicament amb DM1 ⁽²⁶⁶⁻²⁶⁸⁾.

En relació a la predisposició genètica, fins al moment actual, en els pacients amb DM1 no s'ha descrit cap haplotipus HLA que s'hagi associat de forma clara a un major risc de gastritis autoimmunitària. Únicament s'ha descrit una associació dèbil amb l'haplotip HLA-DQA1*0501-B1*0301, lligat a l' HLA-DR5 ⁽²⁶⁴⁾.

Existeix un únic treball a la literatura que hagi valorat la histologia de la mucosa gàstrica de pacients amb DM1 en funció de la positivitat o no dels aCPG ⁽¹⁵⁰⁾. Aquest estudi mostra que els pacients amb aCPG positius presenten, en comparació amb els aCPG negatius, una major prevalença de gastritis autoimmunitària amb o sense atròfia total associada, una major infiltració de la mucosa gàstrica per cèl·lules T i B i menys cèl·lules parietals a les glàndules oxíntiques. Concretament, la prevalença de gastritis autoimmunitària, en els pacients amb aCPG positius és del 57% en comparació amb el 10% dels aCPG negatius. La definició utilitzada a l'estudi per a la gastritis autoimmunitària fou la presència, a la biòpsia gàstrica, d'una infiltració limfocitària difusa de la làmina pròpia, una destrucció focal de les glàndules oxíntiques per part dels limfòcits i una pseudohipertròfia de les cèl·lules parietals. A més, l'estudi descriu una correlació inversa entre la gravetat de l'atròfia del cos gàstric, mesurada amb el percentatge de les cèl·lules parietals de les glàndules oxíntiques, i el títol d'aCPG.

3.5.1 Estudi del metabolisme del ferro

L'estudi del metabolisme del ferro en els pacients amb DM1 i la seva relació amb la positivitat o no dels aCPG ha estat valorada en varis treballs. L'estudi de Riley i col·laboradors ⁽²⁶¹⁾, en el que es varen incloure 771 pacients amb DM1 d'una edat mitja de 13±0,4 anys, va mostrar que les concentracions sèriques de ferritina eren significativament més baixes en els pacients amb aCPG positius (n=24) que en els negatius (n=65). Posteriorment s'han publicat d'altres estudis que han valorat el metabolisme del ferro en pacients amb DM1 i la seva relació amb els aCPG, tots ells realitzats pel mateix grup de treball. Els resultats han mostrat que la

prevalença d'anèmia ferropènica és més elevada en els pacients amb aCPG positius (15-32%) que en els pacients amb aCPG negatius (7-12%)^{150,164}. Per a la valoració del metabolisme del ferro s'utilitzaren paràmetres com la siderèmia, la transferrina, l'índex de saturació de la transferrina i la ferritina, tots ells àmpliament acceptats. El ferro, al plasma, és transportat per la transferrina. Mitjançant la interacció amb el seu receptor (receptor soluble de la transferrina (sTfR)) el ferro s'allibera a les cèl·lules. Pràcticament totes les cèl·lules, a excepció de les cèl·lules madures de la sèrie roja, expressen el sTfR a la seva superfície. La densitat del receptor a les cèl·lules depen de la disponibilitat del ferro. Així, el dèficit de ferro s'associa a un augment de la síntesi del sTfR mentre que el seu excés la suprimeix. S'accepta que el sTfR que es mesura a plasma és proporcional a la quantitat existent a nivell cel·lular. Aquest prové majoritàriament dels eritroblastes i en menor proporció dels eritròcits ⁽²⁶⁹⁾ i és utilitzat per a la síntesi d'hemoglobina. La causa més freqüent d'un augment de les concentracions de sTfR és la presència d'una eritropoesi amb un dèficit de ferro. La determinació sèrica del sTfR ha demostrat ser útil per a diferenciar l'anèmia ferropènica de l'anèmia present a la inflamació crònica ⁽²⁷⁰⁾ ja que, a diferència de la ferritina i de la transferrina, les concentracions del sTfR no s'afecten en presència d'una inflamació crònica, mantenint-se dintre del rang de la normalitat. A més, ha demostrat ser un bon indicador d'anèmia ferropènica en les seves fases inicials ⁽²⁷¹⁾. Existeix un únic treball a la literatura que hagi valorat les concentracions sèriques de sTfR en pacients amb DM1 així com la seva relació amb la presència o no d'aCPG ⁽²⁷²⁾. Els resultats de l'estudi mostren que les concentracions sèriques de sTfR són més altes en els pacients amb DM1 i aCPG positius que en els aCPG negatius. A més, també s'observa una correlació negativa del sTfR amb la siderèmia, la transferrina i el quocient sTfR/ferritina. Aquest fet, segons els autors, indica que la determinació del sTfR seria més sensible per la detecció de ferropènia que d'altres paràmetres que s'utilitzen habitualment. Per aquest motiu, la conclusió de l'estudi és que, també en els pacients amb DM1, la determinació del sTfR és un paràmetre sensible per a la valoració del balanç del ferro.

3.5.2 Estudi de la cobalamina

L'anèmia perniciosa es considera la fase final de la gastritis autoimmunitària. Aquesta està present en aproximadament un 10-15% dels pacients amb DM1 i aCPG positius mentre que el percentatge incrementa fins a un 25% en aquells que presenten una gastritis autoimmunitària ^(150,166). Hi ha molt pocs estudis descrits a la literatura que hagin valorat la prevalença d'anèmia perniciosa en fase latent o pre-clínica en els pacients amb DM1, és a dir, la presència d'unes concentracions sèriques baixes de cobalamina d'origen autoimmunitari gàstric sense anèmia associada. La prevalença descrita en aquests estudis ha estat entre el 1,1 i el 4% ^(164,261,267). Cal remarcar que el criteri diagnòstic utilitzat per a definir l'anèmia perniciosa latent no ha estat homogeni, és a dir, ha variat en funció de l'estudi.

3.5.3 Estudis histopatològics

L'estudi que ha realitzat un examen histopatològic de la mucosa gàstrica a un major nombre de pacients amb DM1 i aCPG positius ha estat el de De Block i col·laboradors ⁽¹⁵⁰⁾. Concretament, es biopsiaren 47 pacients amb DM1 i aCPG positius, un 57% dels quals presentaren una gastritis autoimmunitària. Els pacients amb gastritis autoimmunitària presentaren, en comparació amb el que tenien una mucosa gàstrica normal, un major grau d'hipoclorhidria, concentracions sèriques més altes de gastrina, una menor massa de cèl·lules parietals i un major grau d'atròfia del cos gàstric i de metaplàsia intestinal.

A la gastritis autoimmunitària hi ha una hipergastrinèmia, deguda a l'aclorhidria gàstrica, que és la responsable de que hi hagi una hiperplàsia de les cèl·lules ECL (figura 3). En els pacients amb DM1 i aCPG positius, la prevalença descrita d'hiperplàsia de les ECL és del 9% i de fins un 30% quan la positivitat dels aCPG s'associa a una gastritis autoimmunitària ⁽²⁵⁵⁾. A més, en els pacients amb DM1, també s'ha estudiat la possible utilitat de marcadors bioquímics de tumors

carcinoides (gastrina i la cromogranina A) com a complement a la histologia. En aquest sentit, l'estudi realitzat per De Block i col·laboradors ha descrit que els dos són bons paràmetres per a detectar la presència d'una hiperplàsia de les cèl·lules ECL. Concretament, la CgA presenta una sensibilitat del 100% i una especificitat del 59% que incrementen fins el 100% i el 80%, respectivament, si la seva determinació es realitza conjuntament amb la de la gastrina ⁽²⁵⁵⁾. En canvi la sensibilitat de la gastrina és del 83% i l'especificitat del 23%. Per aquest motiu, l'estudi suggereix que aquests marcadors bioquímics podrien utilitzar-se de forma complementària a la histologia per detectar l'hiperplàsia de l'ECL ja que, a més, aquesta és difícilment detectable a l'endoscòpia i, per tant, podria passar inadvertida. La concentració sèrica suggerida pels autors per a la sospita d'una hiperplàsia de les ECL és la d'una gastrina > 300 ng/l i la d'una CgA >120 ng/ml.

En relació a la necessitat de realitzar una exploració endoscòpica en els pacients amb DM1, el grup de treball liderat pel Dr. De Block, que és el que ha estudiat més àmpliament la gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1, ha suggerit que aquesta s'hauria de realitzar com a mínim en una ocasió en aquells casos amb aCPG positius, anèmia i/o xifres altes de gastrina ⁽¹⁶⁶⁾.

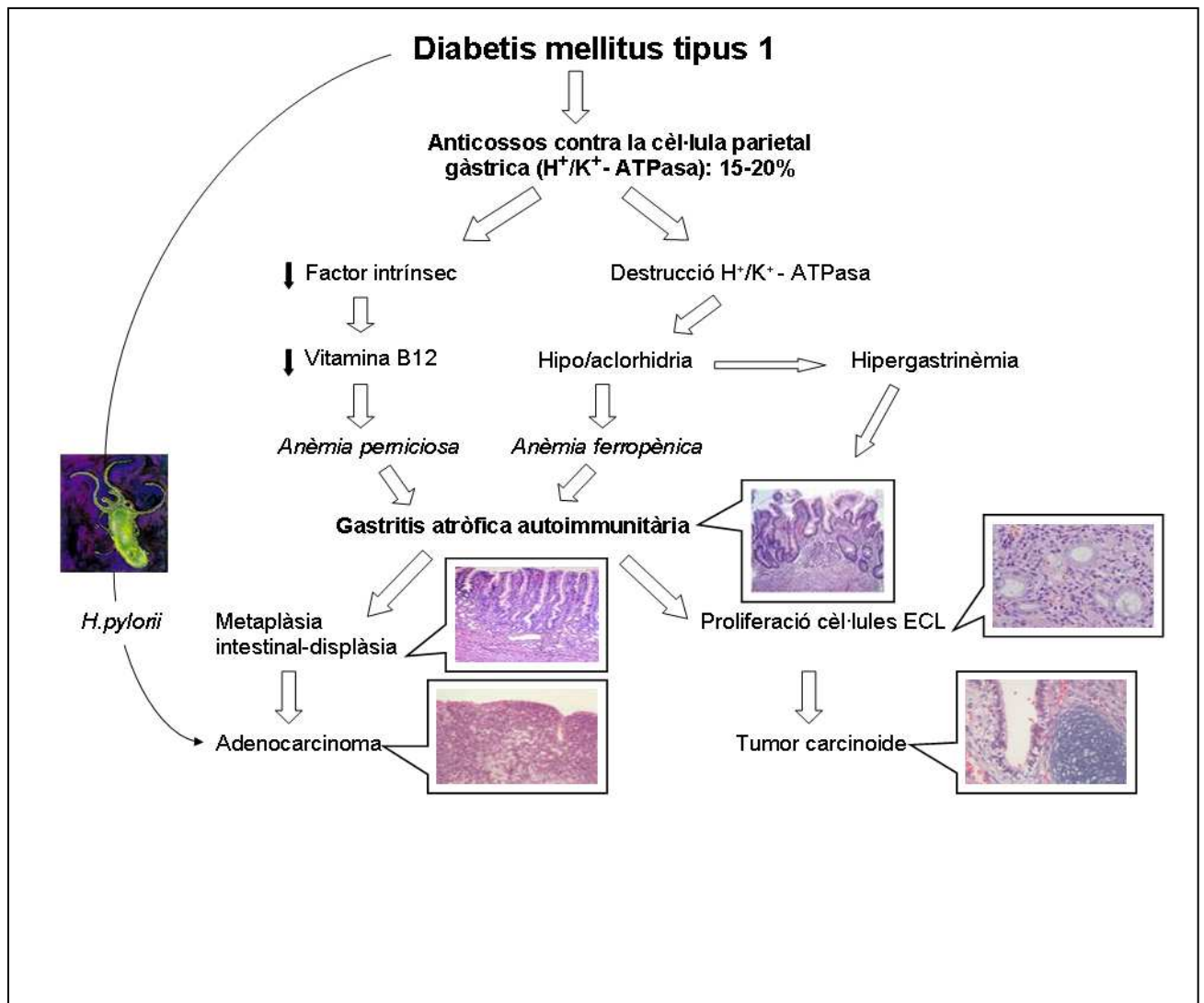


Figura 3. Representació esquemàtica de les manifestacions de la gastritis autoimmunitària.

En les fases inicials de la gastritis autoimmunitària l'estudi histològic mostra la presència d'un infiltrat limfocitari a la submucosa i a la làmina pròpia. En una etapa posterior, hi ha una disminució en el nombre de glàndules oxíntiques, cèl·lules parietals i zimogèniques, que seran substituïdes per glàndules d'aspecte metaplàstic que no secreten àcid ni gastrina (metaplàsia intestinal). La proliferació de les cèl·lules enterocromafin-like (ECL), deguda a l'hipergastrinèmia mantinguda, és la responsable de la progressió cap a un tumor carcinoide gàstric en una petita proporció dels pacients. *Modificat de De Block et al (166)*

Justificació

La diabetis mellitus tipus 1 s'associa a la presència d'altres malalties autoimmunitàries com la tiroïdal, la celiàquia, l'anèmia perniciosa i l'adrenal. Cadascuna d'elles està associada a la producció d'autoanticossos específics d'òrgan que permeten la detecció del procés autoimmunitari en una fase prèvia a l'inici de la malaltia clínica. Així, la malaltia autoimmunitària tiroïdal s'associa a anticossos positius contra la peroxidasa i la tiroglobulina tiroïdals, la celiàquia a anticossos contra la transglutaminasa, l'anèmia perniciosa a anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica i contra el factor intrínsec i la insuficiència suprarenal a anticossos contra l'escorça adrenal. Un subgrup dels pacients amb autoanticossos positius desenvoluparà malaltia clínica durant el seguiment. Tot i així, en el moment actual, no hi ha consens en quin hauria de ser la freqüència del cribratge d'aquestes malalties en els pacients amb DM1, en quin hauria de ser el paràmetre a determinar (anticossos i/o proves hormonals) ni tampoc en quin hauria de ser el seguiment en aquells casos amb autoanticossos positius. Així, alguns autors recomanen el seu cribratge de forma regular, mentre que d'altres el recomanen únicament en presència de simptomatologia clínica. De totes elles, les malalties més estudiades han estat la tiroïdal i la celíaca. En canvi, les dades a la literatura relacionades amb la gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1 són més escasses. Aquesta última es caracteritza per l'atròfia del cos i fundus gàstrics i per la presència d'anticossos contra les cèl·lules parietal gàstriques i contra el factor intrínsec. L'anèmia perniciosa, deguda a un dèficit de vitamina B12, apareix a les fases finals de la malaltia. Existeixen pocs estudis a la literatura que hagin valorat l'autoimmunitat gàstrica en els pacients amb DM1 i la majoria dels que ho han fet han estat realitzats pel mateix grup de treball. En el moment actual, les recomanacions del seu cribratge en els pacients amb DM1 són les aconsellades per aquest únic grup de treball mentre que les diferents societats científiques no s'han pronunciat en quin hauria de ser el seu cribratge. De fet, en relació a la gastritis autoimmunitària, la darrera guia de recomanacions per a pacients amb DM1 aconsellades per l'ADA, únicament menciona que caldria considerar el cribratge del dèficit de vitamina B12 quan hi hagi una sospita clínica, mentre que qüestiona

el seu cribratge en pacients asimptomàtics ⁽²⁷³⁾ .Els resultats obtinguts en els diferents treballs d'aquesta tesi permetran ampliar les dades relacionades amb l'autoimmunitat gàstrica en els pacients amb DM1. D'altra banda, en aquesta tesi s'ha volgut analitzar, en els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària, la possible utilitat de la determinació de dos paràmetres bioquímics (pepsinogen I i ghrelina) per la valoració de l'estat morfològic de la mucosa gàstrica d'aquests pacients. Prèviament a la publicació dels nostres estudis, les concentracions de ghrelina a sang perifèrica s'havien estudiat en pacients amb gastritis crònica atròfica d'una etiologia diferent a l'autoimmunitària, la infecciosa (*H.pylori*). D'altra banda, les concentracions sèriques de pepsinogen I s'havien estudiat pel cribratge de la gastritis atròfica, situació associada a un major risc de càncer gàstric a la població general.

Tanmateix, s'ha considerat interessant aprofundir en l'estudi fisiopatològic de la gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1. Concretament, s'ha estudiat la subpoblació de cèl·lules Tregs, per valorar la possible implicació que aquest grup cel·lular podria tenir en l'aparició d'una segona malaltia autoimmunitària com la gastritis en els pacients amb DM1. Les Tregs són les encarregades de suprimir l'acció dels limfòcits T efectors contra antígens propis que han escapat de la selecció tímica i, per tant, estan relacionades amb la tolerància immunològica a nivell perifèric.

Finalment, els estudis que han valorat diferents aspectes relacionats amb la gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1 han estat de tipus transversal. Manquen, en el moment actual, estudis prospectius que clarifiquin la freqüència i el temps durant el qual s'hauria de fer el cribratge d'aquesta malaltia en els pacients amb DM1. Per aquest motiu, es va considerar interessant realitzar un seguiment prospectiu a 5 anys d'un grup de pacients amb DM1 en el qual els principals paràmetres utilitzats per l'estudi de la gastritis autoimmunitària foren els anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica i la concentració sèrica de pepsinogen I.

Hipòtesis de treball

Es plantejen les següents hipòtesis que seran desenvolupades a les successives publicacions:

1.- Estudi de les concentracions sèriques de pepsinogen I en una població de pacients amb diabetis mellitus tipus 1

Els pacients amb diabetis mellitus tipus 1 presenten una prevalença incrementada d'altres malalties autoimmunitàries entre les quals hi ha la gastritis autoimmunitària o tipus A. Aquesta es caracteritza per ser una gastritis crònica amb atrofia del fundus i cos gàstric. Les concentracions sèriques baixes de pepsinogen I, pèptid sintetitzat a les cèl·lules zimogèniques o principals del fundus o cos gàstric, es consideren un marcador bioquímic amb una alta sensibilitat pel diagnòstic de l'atrofia del cos gàstric.

Prèviament a la publicació del primer estudi de la tesi, s'havia descrit que el percentatge de pacients afectes de púrpura trombopènica idiopàtica, una malaltia d'etiologia autoimmunitària, que presentava concentracions sèriques baixes de pepsinogen I, utilitzat com a marcador d'anèmia perniciosa latent, era clarament superior a l'observat en un grup control sa. A més, les concentracions sèriques de cobalamina foren significativament més baixes en els pacients amb pepsinogen I sèric baix que en els que el pepsinogen I fou normal. Aquest fet suggerí l'associació entre la púrpura trombopènica idiopàtica i l'anèmia perniciosa en la seva forma latent, ambdues d'etiologia autoimmunitària.

D'acord amb els resultats d'aquest estudi, la meva hipòtesi de treball és que els pacients amb DM1, malaltia també d'etiologia autoimmunitària, presenten concentracions sèriques baixes de pepsinogen I en un percentatge superior a l'observat a un grup control.

2.- Concentracions plasmàtiques de ghrelina en pacients amb gastritis crònica atròfica autoimmunitària

En els pacients amb gastritis crònica atròfica deguda a una infecció per *H.pylori* s'han descrit concentracions plasmàtiques baixes de ghrelina. Aquest és un pèptid sintetitzat a les cèl·lules neuroendocrines X/A del fundus i cos gàstric. D'altra banda la hipergastrinèmia present en els pacients amb gastritis autoimmunitària és la responsable de que hi hagi una hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines enterocromafin-like (ECL) del fundus i cos gàstric. Els estudis immunohistoquímics han mostrat que aquesta hiperplàsia tenyeix per ghrelina, tot i que es desconeix la seva correlació amb les seves concentracions plasmàtiques. La gastritis autoimmunitària o tipus A cursa amb una atròfia del cos gàstric i una hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines.

La segona hipòtesi d'aquesta tesi és que les concentracions plasmàtiques de ghrelina en els pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica són diferents a les d'un grup control. Concretament, aquestes poden ser baixes per l'atròfia gàstrica o bé altes degut a la hiperplàsia de cèl·lules neuroendocrines.

3.- Cèl·lules T reguladores en els pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica autoimmunitària

Les malalties autoimmunitàries com la DM1 es caracteritzen per una pèrdua dels mecanismes de tolerància cap als antígens propis. Les cèl·lules T reguladores (Tregs) són un subgrup de limfòcits T, que intervenen en el manteniment de la tolerància perifèrica, que s'encarreguen de suprimir les cèl·lules T autoreactives dirigides contra antígens propis.

La tercera hipòtesi és que els pacients amb DM1 i una segona malaltia autoimmunitària com la gastritis tipus A presenten un menor percentatge de Tregs a sang perifèrica i/o a mucosa gàstrica, en comparació amb els pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades i un grup control.

4.- Estudi prospectiu dels marcadors de gastritis autoimmunitària, pepsinogen I i anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica, en un grup de pacients amb DM1

El pepsinogen I es considera un bon marcador bioquímic d'atròfia de la mucosa gàstrica. La lesió histopatològica de la gastritis autoimmunitària consisteix en una gastritis crònica atròfica que, amb la progressió del temps (20 a 30 anys), és la responsable de l'anèmia perniciosa que presenten aquests malalts.

La quarta hipòtesi de la tesi és que les concentracions sèriques de pepsinogen I són un bon marcador d'anèmia perniciosa en fase pre-clínica en pacients amb DM1. Per tant, les concentracions sèriques de pepsinogen I persistiran baixes després de 5 anys de seguiment, en aquells pacients que presentaven, a l'estudi inicial, concentracions sèriques baixes de pepsinogen I i anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica positius. D'altra banda, si el pepsinogen I és un bon marcador d'anèmia perniciosa latent, les concentracions de cobalamina en el seguiment hauran de disminuir més en els pacients que a l'estudi transversal inicial presentaven concentracions sèriques baixes de pepsinogen I que en aquells en els que les seves concentracions eren normals.

Objectius

El principal objectiu d'aquesta tesi ha estat estudiar la malaltia autoimmunitària gàstrica en els pacients amb DM1 mitjançant la determinació de paràmetres bioquímics i immunològics. Per tal de poder seleccionar, en el grup de pacients amb DM1, aquells que presentaven autoimmunitat gàstrica, es realitzà un estudi inicial, de tipus transversal, en el que es varen plantejar els següents objectius:

- 1.- Valorar la prevalença d'autoanticossos de malalties autoimmunitàries (òrgan i no òrgan específiques) associades a la DM1.
- 2.- Estudiar la prevalença d'anèmia perniciosa en fase pre-clínica o latent mitjançant l'ús de marcadors bioquímics (concentracions sèriques de pepsinogen I) i immunològics (anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica) relacionats amb la gastritis autoimmunitària.
- 3.- En els pacients amb pepsinogen I baix, anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica positius i concentracions elevades de gastrina, confirmar, mitjançant l'estudi histopatològic de la mucosa gàstrica, la presència d'una atròfia del cos gàstric per tal de validar la utilitat dels marcadors bioquímics d'atròfia gàstrica, de forma més concreta, el pepsinogen I.

Els objectius s'han assolit i s'han publicat a l'article:

*N. Alonso, M.L Granada, I. Salinas, A. Lucas, J.L. Reverter, J. Juncà, A. Oriol, A. Sanmartí. Serum pepsinogen I: an early marker of pernicious anemia in patients with type 1 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 5254-5258
(factor d' impacte 2009: 6,02)*

En el segon dels treballs realitzats es va aprofundir en l'estudi d'un possible marcador de lesió de la mucosa gàstrica en els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària, concretament la ghrelina. Aquesta és una hormona sintetitzada a

les cèl·lules neuroendocrines X/A de la mucosa del cos gàstric, que és l'òrgan diana lesionat a la gastritis autoimmunitària. Els objectius d'aquest estudi foren:

- 1.- Investigar les concentracions plasmàtiques de ghrelina en pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica autoimmunitària i comparar-les amb les d'un grup de pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades i les d'un grup control.
- 2.- Valorar la relació de les concentracions plasmàtiques de ghrelina amb la d'altres marcadors bioquímics d'atròfia del cos gàstric (pepsinogen I, quocient pepsinogen I/II i gastrina) i d'hiperplàsia de cèl·lules neuroendocrines (cromogranina A).
- 3.- Valorar l'expressió a mucosa gàstrica de ghrelina en els pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica autoimmunitària.

Els objectius s'han assolit i s'han publicat a l'article:

N. Alonso, M.L Granada, I. Salinas, J.L Reverter, L. Flores, I. Ojanguren, E.M Martínez-Cáceres, A. Sanmartí. Plasma ghrelin concentrations in type 1 diabetic patients with autoimmune atrophic gastritis. Eur J Endocrinol 2007; 157: 1-8 (factor d'impacte 2009:3,53)

En el tercer treball s'ha estudiat, en el grup de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària, una subpoblació limfocitària, les cèl·lules T reguladores o Tregs, encarregada de suprimir els limfòcits T efectors que reaccionen contra els antígens propis. L'objectiu de l'estudi ha estat:

- 1.- Valorar el percentatge de cèl·lules T reguladores en sang perifèrica de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària i comparar-lo amb el dels pacients amb DM1 sense altres autoanticossos associats i amb el d'un grup control.
- 2.- Valorar l'expressió de cèl·lules T reguladores a la mucosa gàstrica de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària.

Els objectius s'han assolit i s'han publicat a l'article:

N. Alonso, M.J Martínez-Arconada, M.L Granada, B. Soldevila, A. Cantón, J.L Mate, A. Sanmartí, E. M Martínez-Cáceres. Regulatory T cells in type 1 diabetic patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. Endocrine 2009; 35: 420-428 (factor d'impacte 2009: 1,27)

En el quart dels treballs s'ha realitzat un estudi prospectiu dels diferents marcadors d'autoimmunitat gàstrica que foren valorats en el grup de pacients amb DM1 inclosos a l'estudi transversal inicial per avaluar l'evolució natural de la gastritis autoimmunitària en pacients amb DM1. Per tant, l'objectiu d'aquest estudi va ser:

- 1.- Valorar l'evolució natural dels marcadors de gastritis autoimmunitària, pepsinogen I i anticossos contra la cèl·lula parietal gàstrica, en un grup de pacients amb DM1. De forma més concreta, estudiar el percentatge de casos en el que qualsevol dels dos paràmetres es normalitza o persisteix alterat amb el temps de seguiment.
- 2.- Valorar l'evolució de les concentracions sèriques de vitamina B12 després de 5 anys de seguiment en els pacients estudiats, de forma més concreta, en aquells que presentaven concentracions baixes de pepsinogen I i/o aCPG positius a l'inici de l'estudi.

Els objectius s'han assolit i s'han publicat a l'article:

N. Alonso, M.L Granada, B. Soldevila, I. Salinas, C. Joaquin, J.L. Reverter, J. Juncà, E. M. Martínez-Cáceres, A. Sanmartí. Serum autoimmune gastritis markers, pepsinogen I and parietal cell antibodies, in patients with type 1 diabetes mellitus: a 5-year prospective study. J Endocrinol Invest 4 de juny 2010 (DOI: 10.3275/7104) (factor d'impacte 2009:1,35)

Material i mètodes

7.1 Subjectes d'estudi

Tots els pacients amb DM1 procedien de la consulta externa del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Universitari "Germans Trias i Pujol" on s'hi visitaven de forma regular. El grup control utilitzat en tots els estudis estava format per personal sanitari sa, sense antecedents de DM1 ni d'altres malalties autoimmunitàries, procedents del mateix hospital.

Tots els pacients varen signar el consentiment informat i el protocol d'estudi fou aprovat pel comitè ètic del nostre centre.

7.2 Mètodes

7.2.1 Determinacions sèriques i/o plasmàtiques:

A tots els pacients amb DM1 se'ls va realitzar les següents determinacions, entre les 8:00 i les 9:00h del matí, després de 12 hores de dejuni:

- Glicèmia: es va mesurar per un analitzador automatitzat de bioquímica pel mètode de la glucosa-hexoquinasa/glucosa-6 fosfat-deshidrogenasa.
- HbA1c: es va mesurar en sang descoagulada amb àcid etilendiaminoetraacètic (EDTA) per cromatografia d'intercanvi iònic (HPLC) amb un analitzador automatitzat Menarini HI-AUTO A1c 8140 manufacturat per Arkray (Kyoto, Japó). Els coeficients de variació (CV) inter-assaig foren < 2%.
- Hemograma: les variables hematològiques foren determinades en base al mètode Coulter (1956), mitjançant un comptador automatitzat STKR Coulter Counter (Coulter, Hialeah, FU).

- Cobalamina o vitamina B12: les seves concentracions, a l'any 2001, es van mesurar per radioimmunoassaig (Chiron Corp, Emeryville, CA). Els CV intra-assaig foren de 8,5% a 144,6 pg/mL i 7,3% a 604,9 pg/mL i els CV inter-assaig de 4,3% i 4,5%, respectivament, a les mateixes concentracions. El límit de detecció de l'assaig fou de 60 pg/mL. A partir de l'any 2002, es va mesurar mitjançant un enzimoimmunoassaig quimiluminiscent (Access-Sanofi Pasteur System, França).
- Pepsinogen I: es va mesurar per un radioimmunoassaig de doble anticòs (Pepsik, Sorin Biomedica Diagnostics, Saluggia, Itàlia) El coeficient de variació intra-assaig fou de 7,6% a 19,4 ug/L, 7% a 66,4 ug/L i 6,9% a 316 ug/L. Els coeficients de variació inter-assaig foren de 9,9% a 51 ug/L i 9,4% a 202 ug/L. El límit de detecció del assaig fou de 1 µg/L (interval de referència: 30-117 ug/L). A partir de l'any 2002, degut a que es va deixar de comercialitzar el mètode utilitzat fins a l'any 2001, es va mesurar mitjançant un enzimoimmunoassaig (Pepsinogen I ELISA kit, Biohit, Helsinki, Finalàndia). Els valors de CV intra-assaig foren inferiors a 5,6% i els inter-assaig inferiors a 8,3%. La sensibilitat de l'assaig fou de 1,0 µg/L.
- Gastrina: es va mesurar per duplicat amb radioimmunoassaig de doble anticòs (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EEUU). Els CV intra-assaig foren de 6,0% i de 4,0% a les concentracions de 50 i 600 ng/L, respectivament, i els CV inter-assaig de 6,8% i 5%, respectivament, a les mateixes concentracions. El límit de detecció de l'assaig fou de 4,5 ng/L (interval de referència: indetectable a 100 ng/L).
- Anticòsos contra la cèl·lula parietal gàstrica (aCPG): es van determinar mitjançant immunofluorescència indirecta sobre mucosa gàstrica de rata. Es va considerar positiu un títol superior a 1:40.
- Anticòsos contra el factor intrínsec: es van mesurar per enzimoimmunoassaig (D-Tek, SA, Mons, Bèlgica). Valor de normalitat del índex de lligament <1.
- Anticòsos contra la peroxidasa tiroïdal (aTPO) i la tiroglobulina (aTg): es van determinar amb un enzimoimmunoassaig (Orgentec Diagnostica,

Mainz, Alemanya). Es va considerar positiu uns valors superiors a 100 i a 150 U/ml, respectivament.

- Anticossos anti-nuclears (ANA): es van determinar per immunofluorescència indirecta sobre cèl·lules Hep-2 (*human epithelioma type 2*) amb l'ús d'un Kallestad Hep-2 slide (Bio-Rad AS, Marnes-La Coquette, França). Es va considerar positiu un títol superior a 1:80.
- Anticossos contra la transglutaminasa tissular: es van determinar per enzimoinmunoassaig (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Alemanya). Es va considerar positiu un títol > 10 UI/ml.

En el subgrup de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica (n=15), a un subgrup de 15 pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades i a 15 subjectes controls sans, a més de les determinacions prèviament descrites, se'ls va mesurar:

- Concentracions plasmàtiques de ghrelina: es van mesurar per duplicat amb un radioimmunoassaig de doble anticòs (Total ghrelin, Linco Research Inc., Saint Louis MO, EEUU). Els valors de CV intra-assaig foren inferiors a 10% i els inter-assaig inferiors a 16%. La sensibilitat de l'assaig fou de 93 pg/ml.
- Concentracions sèriques de Pepsinogen II: es va mesurar per duplicat mitjançant un enzimoinmunoassaig (Pepsinogen II ELISA kit, Biohit, Helsinki, Finalàndia). Els valors de CV intra-assaig foren inferiors a 5,6% i els inter-assaig inferiors a 8,3%. La sensibilitat de l'assaig fou de 1,0 µg/L.
- Quocient pepsinogen I/pepsinogen II (PI/PII) : el resultat es va obtenir de la divisió entre la concentració sèrica de pepsinogen I i la de pepsinogen II. Es considera altament suggestiva d'una atròfia del cos gàstric un valor del quocient igual o inferior a 3.
- Concentració sèrica d'insulina: es va mesurar mitjançant un immunoassaig quimiluminiscent automatitzat (Immulite 2000, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EEUU). La sensibilitat de l'assaig fou de 2 mIU/L i els CV inter-assaig inferior a 7,3%.

- Concentració sèrica de cromogranina A: es va mesurar amb un assaig immunoradiomètric (IRMA) (CGA-RIATC, CIS Bio International, Schering S.A, Sur-Yvette, Cedex, França). El CV intra-assaig fou inferior al 6% i l'inter-assaig inferior a 8,5%. La sensibilitat de l'assaig fou de 1,5 ng/ml.
- Concentració sèrica del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α): es va mesurar amb un immunoassaig quimiluminiscent automatitzat (Immulite ONE, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EEUU). La sensibilitat de l'assaig fou de 1,7 pg/ml i el CV inter-assaig inferior a 6,5%.
- Proteïna C reactiva: es va mesurar per nefelometria amb un assaig comercial d'alta sensibilitat (N High Sensitivity CRP, Dade Behring Marburg GMBH, Marburg, Alemanya) amb un CV inter-assaig inferior al 3,9%. El límit de detecció de l'assaig fou de 0,175 mg/L, utilitzant una mostra de dilució a 1:20.
- Test de l'alè (urea breath test, UBT): es va mesurar amb el mètode TAU-KIT, Isomed, SL, Madrid, Espanya, segons el protocol europeu estandaritzat ⁽²⁷⁴⁾. Els valors superiors a 5 es van considerar positius (+C-DOB, *delta over baseline*). El test de l'alè és un mètode indirecte que es basa en la presència de l'ureasa de l' *H.pylori*. El pacient ingereix una sol.lució d'urea, marcada de forma isotòpica, amb ¹³C (no radioactiu) i es recull l'alè als 30 minuts de la ingesta de la sol.lució. Prèviament es recull una mostra d'alè basal. Si l'*H.pylori* està present a l'estómac, aquest hidrolitza l'urea mitjançant l'ureasa i s'allibera CO₂ marcat (¹³C) que s'aborveix i es difon a la sang des d'on es transporta als pulmons per a ser alliberat amb l'alè. Els resultats es medeixen com la relació del ¹³C/¹²C de la prova respecte a l'estandard.
- Cèl·lules T reguladores (Tregs): la tinció limfocitària es va realitzar amb mostres de 100 μ l de sang total perifèrica seguint els procediments estandaritzats: les cèl·lules foren tenyides per les diferents molècules de superfície amb els seus corresponents anticossos monoclonals: CD4-allophycocyanin (APC), CD27-phycoerythrin (PE), CD25-PE-Cychrom (PECy5) (tots ells de BD Biosciences, San José, CA, USA) durant 20 minuts a temperatura ambient. Després de la lisi dels eritròcits (FACS lysing solution,

Becton Dickinson ®(BD)), San José, CA, USA), les cèl·lules foren rentades i fixades/permeabilitzades (fixation/permeabilization buffer®, eBiosciences Inc., San Diego, CA, USA) durant 45 minuts a la foscor i rentades dues vegades amb un tampó de permeabilització (eBiosciences). Després de la centrifugació, es va realitzar un bloqueig amb un sèrum de ratolí normal al 2% en una sol·lució permeabilitzadora a 4°C durant 15 minuts. Posteriorment es varen afegir 20 µl d'anticòs anti-Foxp3 humà conjugat amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC) (PCH101 eBioscience) o bé un isotip control i es varen incubar durant 45 minuts a 4°C a la foscor. Després les cèl·lules foren rentades dues vegades amb una sol·lució permeabilitzadora. Finalment es varen analitzar al citòmetre de flux FACScalibur® (BD Biosciences, San José, CA, EEUU). Les dades foren recollides i analitzades amb el software CellQuest. Per analitzar la població es va seleccionar, en primer lloc, una regió de limfòcits segons volum i rugositat de les cèl·lules de sang perifèrica (FSC/SSC). D'aquesta població, es van seleccionar els limfòcits CD4+. En un subgrup de pacients i controls es varen analitzar, també, les següents molècules de superfície: CD-127-PE, GITR-PE, CD49d-PE, CD122-PE, CCR5-PE, CD62L-PE, CCR4-PE, CD45RO-PE o el CD95-PE i la tinció citoplasmàtica de CD152 (CTLA-4). Aquest estudi es va realitzar de forma « cega », és a dir, la persona encarregada d'analitzar i analitzar els estudis desconeixia el diagnòstic clínic del pacient.

7.2.2 Examen histològic:

Es va realitzar en els 15 pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica.

La mostra de biòpsia gàstrica es va obtenir per fibrogastroscòpia (endoscopi GIF-Q145: Olympus Optical Co.Ltd, Japó). Per a la realització de l'examen histològic es varen obtenir 3 biòpsies de l'antre gàstric i 3 biòpsies de la zona mitja del cos gàstric. Les biòpsies foren analitzades per un patòleg el qual desconeixia el diagnòstic clínic del pacient. Es varen obtenir seccions de 5µm de gruix que foren tenyides amb hematoxilina-eosina per l'examen histopatològic convencional. Es va realitzar una tinció amb Giemsa per valorar la infecció per

H.pylori. El grau d'atròfia fou classificat en lleu, moderat o greu segons els criteris diagnòstics del *Updated Sydney System* ⁽¹⁸⁹⁾. Les cèl·lules endocrines de la mucosa gàstrica es varen valorar amb immunohistoquímica mitjançant la utilització d'un anticòs monoclonal dirigit contra la CgA (dilució 1:200; Dako, Glostrup, Dinamarca) seguit d'una tècnica estàndar d'immunohistoquímica amb immunoperoxidasa. Els graus d'hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines es van classificar segons Solcia i col·laboradors, de menor a major potencial risc oncològic en: hiperplàsia (simple, lineal, micronodular, adenomatosa), displàsia i neoplàsia⁽¹⁶⁷⁾.

7.2.2.1 Immunohistoquímica (ghrelina i cèl·lules T reguladores):

En els 15 pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica es va realitzar una tinció immunohistoquímica per ghrelina i cèl·lules reguladores. La tinció amb ghrelina es va realitzar sobre teixit fixat en formol i inclòs en parafina. La immunohistoquímica es va realitzar sobre talls en portes xilanitzats a 4 µ. L'anticòs primari utilitzat fou un anticòs anti-ghrelina humana policlonal (aminoàcids 13-28; Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, USA) a una dilució 1:300 durant una hora a temperatura ambient. Posteriorment, les mostres es varen incubar amb el complex estrepavidina-peroxidasa durant 30 minuts i es varen revelar utilitzant la sol·lució tetraclorhidrat de 3,3'-diaminobenzidina, preparada segons les instruccions del fabricant. El control negatiu es realitzà amb l'anticòs primari prèviament bloquejat tota la nit a 4°C amb els seus respectius antígens o utilitzant TBS sense anticòs. Com a controls positius de la tinció immunohistoquímica de ghrelina s'utilitzaren portes de mucosa gàstrica, glàndula hipofisària i hipotàlem normals.

L'anàlisi immunohistoquímica de cèl·lules reguladores a mucosa gàstrica es va realitzar en els 15 pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica i també a 10 biòpsies gàstriques normals procedents dels arxius del servei d'Anatomia Patològica del nostre centre i a 10 biòpsies de pacients amb gastritis crònica atròfica deguda a una infecció per *H. pylori*. Per a valorar l'expressió de Foxp3 a les cèl·lules CD4 es va realitzar una doble tinció amb immunohistoquímica

(Foxp3⁺CD4⁺). Es varen tallar i desparafinar seccions de mucosa gàstrica de 4 µm de gruix. Els anticossos primaris utilitzats foren el anti-Foxp3 (clone PHC101 IgG2a, dilució 1:20, eBiosciences) i l'anti-CD4 (clone 1F6, dilució 1:25, Novocastra). Les seccions foren incubades amb l'anticòs anti-Foxp3 durant 1 hora. Per a demostrar el Foxp3, el sistema de visualització utilitzat va ser el EnVision system (DAKO, Roskilde, Denmark) i el cromogen la diaminobenzidina. Posteriorment, les seccions foren incubades amb l'anticòs anti-CD4 durant 1 hora i amb un anticòs secundari anti-ratolí. El sistema de visualització utilitzat pel CD4 fou el complexe fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina (DAKO) i el cromogen el vermell permanent (DAKO). El nombre de cèl·lules positives CD4⁺/Foxp3⁺ a la mucosa de la làmina pròpia es va avaluar comptabilitzant el nombre de cèl·lules positives en 10 camps d'alta resolució de cada secció. El percentatge de cèl·lules CD4⁺Foxp3⁺ expressat a la mucosa gàstrica es va obtenir de la divisió entre el número de cèl·lules CD4⁺Foxp3⁺ i les CD4⁺(CD4⁺Foxp3⁺/CD4⁺). La quantificació es va realitzar per dos investigadors independents que desconeixien el diagnòstic dels pacients.

7.2.2.2 Immunofluorescència (cèl·lules T reguladores):

Per a la realització de la tinció amb immunofluorescència s'utilitzaren blocs de 4-µm de gruix de mucosa gàstrica fixats en formalina i integrats amb parafina així com també amígdala. Els blocs es varen tallar, deparafinitzar i foren sotmesos a una recuperació de l'epítot induïda per la calor (30 min, 100 °C) amb un tampó de citrat sòdic a un pH de 6.0). Prèviament a la incubació amb els anticossos, les seccions foren incubades amb un sèrum normal de cabra al 10% durant 30 minuts amb l'objectiu de disminuir la tinció no específica. L'anticòs primari (Mouse anti-human Foxp3 (236A/E7 (IgG1), AbCAM) es va afegir a una dilució 1:20 en el tampó fosfat salí (PBS) suplementat amb un 1% d'albumina de sèrum boví i un 10% de sèrum normal de cabra i incubat durant la nit a 4°C. Deprés de 3 fases de rentat, les seccions foren incubades amb l'anticòs anti-ratolí de cabra IgG1 Alexa fluor-488 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) 1:400 en PBS/1% BSA durant 30 minuts a temperatura ambient. Les seccions foren rentades (x3) i posteriorment incubades amb anti-CD3-humà de ratolí (IgG2a, Novocastra Laboratorios,

Newcastle, UK) a una dilució 1:20 durant una hora. Les seccions foren rentades i posteriorment incubades amb l'anticòs anti-ratolí de cabra IgG2a-TRIC (Dako, Roskilde, Denmark) a 1:400 durant 30 minuts a temperatura ambient. Els portes foren examinats amb un microscopi Zeiss Axioplan® equipat amb UV i connectat a una càmera fotogràfica Leica d'alta sensibilitat. Els controls negatius es van realitzar afegint un anticòs de control d'un isotip irrelevant o amb l'omissió dels anticossos primaris.

7.3 Anàlisi estadística

Per a l'anàlisi de dades es varen utilitzar els paquets estadístics SPSS (SPSS/Windows version 12, Spss inc., Chicago, IL, USA).

7.3.1 *Estadística descriptiva*

Les variables quantitatives foren presentades com a mitja±desviació estàndard quan les variables seguien una distribució normal i com a mitjana (rang interquartil) per a les variables sense distribució normal. La normalitat de la distribució de les dades fou provada mitjançant el test de Kolmogorov Smirnov.

Les variables qualitatives foren presentades com a percentatge.

7.3.2 *Comparació entre grups (dades quantitatives)*

7.3.2.1 *Comparació de 2 grups*

Per a comparar les mitjanes entre dos grups independents s'ha utilitzat la prova t de Student-Fisher per a dades independents o la prova no paramètrica de comparació de rangs amb dades independents d'U de Mann Whitney.

Per a comparar mitjanes entre dos grups de dades relacionades es va utilitzar la prova t de Student-Fisher per a dades aparellades o la prova no paramètrica de la suma de rangs Wilcoxon.

7.3.2.2 Comparació de més de 2 grups

Per a comparar les mitjanes en més de dos grups s'ha utilitzat l'anàlisi de la variança (ANOVA) y l'aproximació de Tukey per a explorar les diferències entre els diferents grups.

Si la distribució de les variables no s'ajustava a la normalitat es va utilitzar la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis per a la comparació de K grups. Si la diferència entre grups era significativa, a continuació es varen analitzar les diferències entre el grups mitjançant la prova no paramètrica de comparació de rangs amb dades independents d'U de Mann Whitney. En aquest cas es va fer una correcció per a múltiples comparacions amb l'aplicació de la correcció de Bonferroni.

7.3.3 Estudis de correlació

Per a l'estudi de l'associació entre dues variables contínues es va utilitzar el coeficient de correlació de Pearson o el coeficient de correlació no paramètric de Spearman.

7.3.4 Comparació de freqüències(variables qualitatives)

Les diferències de freqüències es van analitzar mitjançant la prova de X² (chi-quadrat) o el test exacte de Fisher.

El llindar de significació estadística per a l'obtenció de resultats va ser d'una $p \leq 0,05$.

Articles originals de la tesi

Discussió

Els pacients amb DM1 presenten una prevalença incrementada d'anèmia perniciosa. Aquesta es caracteritza per presentar una fase latent prolongada prèvia a l'aparició de l'anèmia clínica ⁽²²⁹⁾. L'objectiu del primer dels treballs d'aquesta tesi fou estudiar la prevalença d'anèmia perniciosa latent mitjançant l'ús de marcadors bioquímics així com marcadors d'autoimmunitat en un grup de pacients amb DM1 procedents de les consultes externes d'Endocrinologia i Nutrició del nostre hospital. El criteri utilitzat pel diagnòstic de l'anèmia perniciosa latent fou la presència d'unes concentracions sèriques baixes de pepsinogen I (<30µg/L) en absència de cirurgia gàstrica o malaltia infiltrativa de l'estómac. No existeixen treballs a la literatura que hagin inclòs la determinació sèrica de pepsinogen I en els pacients amb DM1 per a l'estudi de la gastritis autoimmunitària. D'altres paràmetres utilitzats per a l'estudi de la gastritis tipus A en els pacients amb DM1 han estat els hematològics (hemoglobina, cobalamina, ferritina) ^(150,164,261,272) així com els bioquímics d'hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines (gastrina i CgA) ⁽²⁵⁵⁾.

Els resultats del nostre estudi mostren que les concentracions sèriques de pepsinogen I són significativament més baixes en els pacients amb DM1 que en el grup control. Concretament, un 12,4 % (23/186) dels pacients amb DM1 varen presentar concentracions sèriques baixes de pepsinogen I en comparació amb el 0,9% del grup control. Degut a que cap dels pacients havia estat intervingut d'una cirurgia gastrointestinal, i pressuposant que les concentracions sèriques baixes de pepsinogen I eren degudes a una pèrdua de les glàndules oxíntiques de la mucosa gàstrica, es va assumir que la disminució de les concentracions sèriques de pepsinogen I era deguda a una atròfia de la mucosa gàstrica, substracte anatómic de l'anèmia perniciosa. De fet, la biòpsia gàstrica realitzada als 9 pacients que presentaven concentracions sèriques baixes de pepsinogen I juntament amb hipergastrinèmia i aCPG positius va mostrar la presència d'una atròfia del cos gàstric. Els resultats del nostre estudi són similars als descrits per Juncà i col·laboradors ⁽²⁵¹⁾ que avaluaren a 179 pacients afectes de púrpura trombopènica idiopàtica, una malaltia d'etiologia autoimmunitària com la DM1. Concretament, el percentatge descrit en aquest estudi de pacients que presentaren concentracions sèriques baixes de pepsinogen I va ser del 20,3% en comparació amb el 1,6% del

grup control. La major prevalença de concentracions sèriques baixes de pepsinogen I en els pacients amb malalties autoimmunitàries com la púrpura trombopènica i la DM1 en comparació amb el grup control recolzaria l'associació d'aquestes malalties amb l'anèmia perniciosa ja que es considera que la concentració sèrica baixa de pepsinogen I és un marcador molt sensible d'atròfia del cos gàstric, substrate anatòmic de l'anèmia perniciosa. Cal remarcar que tant en el nostre estudi com en el de Juncà i col·laboradors ⁽²⁵¹⁾, tots els pacients amb pepsinogen I sèric baix es trobaven en una fase pre-clínica, es a dir, no presentaven anèmia tot i la presència de concentracions sèriques baixes de cobalamina en algun dels casos.

L'anàlisi dels pacients amb DM1 efectuat al nostre estudi mostra que les concentracions sèriques de pepsinogen I varien en funció del títol d'aCPG. D'aquesta forma, les concentracions sèriques de pepsinogen I en els pacients que presenten títols baixos d'aCPG (1/40-1/320) no són diferents a les observades en els pacients amb aCPG negatius. En canvi, els pacients amb títols alts d'aCPG ($\geq 1/640$) presenten concentracions sèriques de pepsinogen I significativament més baixes que els pacients amb aCPG negatius o a títols baixos. Aquest fet podria estar relacionat amb el grau de lesió de la mucosa gàstrica. De fet, els estudis histopatològics efectuats en pacients amb DM1 i gastritis atròfica autoimmunitària han demostrat que el percentatge de cèl·lules parietals de les glàndules oxíntiques es correlaciona de forma inversa amb el títol d'aCPG ⁽¹⁵⁰⁾.

L'anàlisi de les concentracions sèriques de pepsinogen I en funció de la positivitat o no dels aCPG s'ha valorat, també, en pacients diagnosticats d'una malaltia autoimmunitària tiroïdal. En aquest cas, l'estudi de Segni i col·laboradors ⁽²⁴⁶⁾, efectuat en 124 nens amb malaltia autoimmunitària tiroïdal, no va objectivar diferències en les concentracions sèriques de pepsinogen I entre els pacients amb aCPG positius i els aCPG negatius. En aquest treball no es va fer un subanàlisi en funció del títol d'aCPG. Malgrat tot, el percentatge de pacients amb concentracions sèriques de pepsinogen I per sota el límit inferior de la normalitat fou superior en els pacients amb aCPG positius que en els negatius (12% vs 2%). A més, la fibrogastrosccòpia efectuada a un subgrup dels pacients amb aCPG positius

(n=18) va demostrar que tots els pacients que tenien una atròfia moderada o greu del cos gàstric presentaven concentracions sèriques baixes de pepsinogen I.

Aquest primer estudi de la tesi també ha valorat, en el nostre grup de pacients amb DM1, la prevalença d'autoanticossos associats a la DM1. Els resultats obtinguts mostren una positivitat dels aCPG del 26%, un 18% d'aTPO positius, un 5,8% d'aTg positius i un 36% d'ANA positius. En relació als aCPG, principal paràmetre utilitzat en els estudis que han valorat la gastritis autoimmunitària en pacients amb DM1, la majoria d'estudis han descrit una major positivitat en els pacients d'edat més avançada ⁽¹⁶⁰⁾. D'altra banda, la major positivitat dels aCPG descrita en el sexe femení ⁽²⁵⁸⁾ no s'ha confirmat en tots els treballs ⁽⁹⁹⁾. En el nostre estudi, no es va objectivar diferències en la positivitat d'aCPG en funció del sexe ni tampoc de l'edat. Una de les possibles explicacions de les diferències objectivades entre els diferents estudis podria ser la diferència en el component genètic de les poblacions estudiades. De fet, alguns autors han descrit que els pacients amb DM1 i aCPG positius presenten amb més freqüència positivitat d'anticossos contra la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD) i l'haplotipus HLA-DQA1 o 501-B1*0301 ⁽²⁶⁴⁾. Tot i ser el paràmetre més utilitzat per a l'estudi de la gastritis autoimmunitària, els aCPG no presenten una molt bona sensibilitat i especificitat pel diagnòstic de l'anèmia perniciosa. Entre les possibles explicacions de la negativitat dels aCPG hi hauria l'absència d'anticòs deguda a la desaparició de l'antigen, la unió total de l'anticòs a l'antigen que explicaria la no detecció d'anticossos circulants en el moment de la seva determinació o bé l'absència de producció de l'anticòs. Per aquest motiu, i tenint en compte els resultats obtinguts a l'estudi, el nostre grup considera que el que realment suggereix la lesió de la mucosa gàstrica és una concentració sèrica baixa de pepsinogen I, mentre que la positivitat dels aCPG confirma l'etiologia autoimmunitària de l'atròfia gàstrica.

L'associació entre l'autoimmunitat gàstrica i la tiroïdal (autoimmunitat tirogàstrica) descrita en la majoria d'estudis previs no es va objectivar en el nostre grup de pacients amb DM1. Entre les possibles explicacions hi hauria l'edat més jove dels nostres pacients i un component genètic diferent. En canvi, si que es va trobar que el percentatge de pacients amb aTPO positius era més alt en els pacients amb aCPG a títols alts ($\geq 1/640$) (28,6%) que a títols baixos (16,2%).

Els beneficis del cribratge de l'anèmia perniciosa a la població general encara no estan del tot ben establerts. En canvi, el seu cribratge en els pacients amb DM1 podria ser més productiu degut a la seva major prevalença. En el nostre estudi, la prevalença d'anèmia perniciosa latent en els pacients amb DM1, definida com la presència d'unes concentracions sèriques baixes de pepsinogen I, fou considerablement més alta que l'obtinguda en un grup control sa. Per aquest motiu, i tenint en compte els estudis previs en els que s'ha valorat la gastritis autoimmunitària en pacients amb DM1, el nostre grup suggereix la determinació de les concentracions sèriques de pepsinogen I, a més dels aCPG, pel cribratge de l'anèmia perniciosa latent en els pacients amb DM1. En aquells casos amb pepsinogen I baix, caldria fer una determinació de gastrina i si aquesta fos alta realitzar una fibrogastrosccòpia per confirmar l'atròfia del cos gàstric i descartar la presència de lesions pre-malignes o malignes (tumor carcinoide, carcinoma gàstric i metaplàsia intestinal).

El seguiment prospectiu a 5 anys del grup de 186 pacients amb DM1 avaluats l'any 2001 es publica en el quart dels treballs de la tesi. L'anàlisi es focalitza en dos dels paràmetres utilitzats per a la valoració de la gastritis autoimmunitària, la concentració sèrica de pepsinogen I i els aCPG. Existeixen varis estudis a la literatura que demostren un increment de la prevalença de gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1 ^(164,261). Malgrat tot, manquen estudis longitudinals en els que s'hagi valorat l'evolució natural dels diferents marcadors serològics de gastritis autoimmunitària en aquests pacients. Els resultats del seguiment a 5 anys del nostre grup de pacients amb DM1 demostren la importància de fer de forma conjunta la determinació sèrica de pepsinogen I i la d'aCPG per a la valoració de la gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1. El motiu és que els dos paràmetres es varen mantenir alterats (pepsinogen I baix i aCPG positius) a l'any 2006, en tots els casos en els que també ho estaven a l'any 2001. En canvi, quan només un dels 2 paràmetres estava alterat a l'any 2001, aquest es normalitzà a l'any 2006 en un percentatge no despreciable dels casos. En relació als aCPG, la seva negativització a l'any 2006 només s'objectivà en aquells pacients que a l'any 2001 presentaven títols positius baixos ($\leq 1/80$) amb concentracions sèriques de pepsinogen I normals. Aquesta dada demostra la

importància del títol dels aCPG quan aquests són positius. De fet, en els pacients amb DM1 s'ha pogut demostrar l'existència d'una correlació entre el grau d'atròfia del cos gàstric i el títol d' aCPG ⁽¹⁵⁰⁾. D'altra banda, els aCPG poden ser negatius en alguns dels pacients amb anèmia perniciosa, probablement degut a la pèrdua progressiva de les cèl·lules parietals on es localitza l'antigen contra el que van dirigits els aCPG.

En relació al pepsinogen I, les seves concentracions sèriques es varen mantenir baixes a l'any 2006 en un subgrup de pacients amb aCPG negatius. La causa d'aquesta disminució del pepsinogen I fou una atròfia del cos gàstric deguda a una infecció per *H.pylori* en algun d'aquests casos. Per aquest motiu, i també tenint en consideració que un percentatge de pacients amb anèmia perniciosa presenten aCPG negatius, el nostre grup considera que la determinació de la concentració sèrica de pepsinogen I sèric pot ser d'utilitat per avaluar l'estat morfològic de la mucosa gàstrica, ja que si aquesta és baixa pot fer sospitar la presència d'una atròfia del cos gàstric, tant si és d'etiologia autoimmunitària com infecciosa. El fet que els pacients amb pepsinogen I baix presentin un major grau de lesió de la mucosa gàstrica que els que tenen pepsinogen I normal estaria recolzat per les xifres de cobalamina sèrica que s'obtingueren en el seguiment del nostre estudi. Així, les concentracions sèriques de cobalamina després de 5 anys de seguiment foren significativament més baixes en els pacients amb pepsinogen I baix i aCPG positius a l'any 2001 que en els que presentaven únicament aCPG positius amb pepsinogen I normal. Existeixen pocs estudis a la literatura que hagin avaluat la prevalença d'anèmia perniciosa latent en els pacients amb DM1, i a més, tots ells han estat de tipus transversal. Així, l'estudi de Ungar i col·laboradors ⁽²⁶⁸⁾ va descriure una prevalença del 4% de dèficit de cobalamina latent en un grup de 200 pacients amb DM1 mentre la descrita a l'estudi de Davis i col·laboradors ⁽²⁶⁷⁾ en 371 pacients amb DM1 fou del 1,08%. En el nostre grup de pacients amb DM1, la prevalença descrita de concentracions sèriques baixes de cobalamina, publicada en el primer dels treballs de la tesi fou del 1,6%. La diferència de prevalença entre els diferents estudis podria ser deguda a l'edat dels pacients avaluats. Així, els de major edat foren els de l'estudi de Ungar ⁽²⁶⁸⁾ i, per tant, probablement per aquest motiu, presentaven un temps d'evolució de la gastritis crònica autoimmunitària

més llarg. En relació al seguiment prospectiu de pacients amb gastritis autoimmunitària, l'estudi de Irvine i col·laboradors ⁽²³⁴⁾ és el que ha inclòs a un major nombre de pacients. Concretament, l'estudi realitzà un seguiment promig de 6 anys a 90 pacients (edat mitja 52 anys) amb gastritis atròfica autoimmunitària, 5 dels quals presentaven una DM1. Durant el seguiment, un 19% dels pacients va presentar un dèficit de cobalamina. Aquest percentatge és similar al descrit a altres estudis prospectius de pacients amb gastritis atròfica, en els que el número de pacients avaluats ha estat inferior al de Irvine i col·laboradors ⁽²³⁴⁾. En el nostre estudi, dos dels pacients amb pepsinogen I baix i aCPG positius a l'any 2001 varen evolucionar cap a un dèficit de cobalamina l'any 2006. Com que el tractament substitutiu amb cobalamina de la neuropatia secundària al seu dèficit no corregeix completament la lesió neurològica seria important que aquests pacients es poguessin diagnosticar abans de l'inici de la clínica ⁽²³⁵⁾. En aquest sentit, la determinació conjunta de les concentracions sèriques de pepsinogen I i d'aCPG podria ser d'utilitat per a poder detectar el subgrup de pacients amb DM1 que tenen un major risc de presentar un dèficit de cobalamina.

En resum, els resultats del quart estudi de la tesi demostren la importància de la determinació sèrica de pepsinogen I juntament amb els aCPG per a la detecció de la gastritis autoimmunitària en els pacients amb DM1. La seva determinació permet valorar l'estat morfològic de la mucosa gàstrica així com identificar, quan el pepsinogen I sèric baix s'associa a uns aCPG positius, aquells pacients amb un risc més alt de presentar un dèficit de cobalamina.

L'objectiu del nostre segon treball fou analitzar les concentracions plasmàtiques de ghrelina total en un grup de pacients amb DM1 i gastritis crònica atròfica de causa autoimmunitària i comparar-les amb les d'un grup de pacients amb DM1 sense atròfia gàstrica i les d'un grup control sa per tal d'avaluar la possible utilitat de la ghrelina com a marcador d'atròfia gàstrica en aquests pacients. Prèviament a la publicació del segon article d'aquesta tesi, les concentracions perifèriques de ghrelina havien estat estudiades a la gastritis crònica deguda a una infecció per l' *H.pylori*. En la majoria d'aquests treballs es va objectivar que els pacients amb infecció per *H.pylori* i qualsevol grau d'atròfia del cos gàstric presentaven unes concentracions de ghrelina (sèriques o plasmàtiques)

més baixes que les del grup control ⁽²⁰⁷⁾. Els resultats del nostre estudi mostren, a diferència del descrit a la gastritis per *H.pylori*, que no hi ha diferència en les concentracions plasmàtiques de ghrelina entre el grup control i el grup de pacients amb DM1 i atròfia gàstrica de causa autoimmunitària. A més, també a diferència de l'observat en la gastritis crònica atròfica de causa infecciosa (*H.pylori*), no es va observar cap correlació entre les concentracions plasmàtiques de ghrelina i els marcadors bioquímics d'atròfia del cos gàstric (pepsinogen I i quocient pepsinogen I/II). Una possible explicació de la diferència observada en les concentracions perifèriques de ghrelina entre ambdues causes de gastritis atròfica (infecciosa o autoimmunitària) podria ser la possible síntesi de ghrelina, per part de les cèl·lules neuroendocrines, en els pacients amb gastritis autoimmunitària o tipus A. Els motiu és que, tot i que se sap que la ghrelina es sintetiza a les cèl·lules neuroendocrines X/A del cos gàstric, s'ha descrit que tant la hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines enterocromafins de la gastritis autoimmunitària com la majoria dels tumors carcinoides gàstrics presenten una tinció immunohistoquímica positiva per ghrelina ⁽²¹²⁻²¹⁵⁾. Tot i així, la majoria d'estudis que han avaluat les concentracions plasmàtiques de ghrelina de pacients amb hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines no han mostrat diferències amb les d'un grup control ^(212,216,217). En el nostre estudi, tampoc es varen objectivar diferències en les concentracions plasmàtiques de ghrelina entre els pacients amb DM1 que presentaven hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines i els que no. D'altra banda, la destrucció de les cèl·lules neuroendocrines de la mucosa gàstrica dels pacients amb una gastritis atròfica de causa infecciosa (*H.pylori*) podria ser la responsable de les baixes concentracions perifèriques de ghrelina descrites en aquests pacients. En aquest sentit, s'ha pogut demostrar que en els pacients amb infecció per *H.pylori* la disminució de les concentracions perifèriques de ghrelina s'acompanya d'una disminució de l'expressió gàstrica dels nivells de RNAm de ghrelina i d'un menor número de cèl·lules gàstriques que tenyeixen per ghrelina quan es comparen amb la mucosa gàstrica de pacients no infectats ⁽²⁷⁵⁾. En el nostre estudi, els pacients amb infecció per *H.pylori* també varen presentar unes concentracions perifèriques més baixes de ghrelina que els no infectats.

L'anàlisi immunohistoquímica de la mucosa gàstrica dels pacients amb DM1 i gastritis atròfica, realitzat en el nostre estudi, va mostrar un increment de tinció per ghrelina localitzat a les zones d'hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines, aquesta última valorada mitjançant la tinció amb CgA. Tot i així, no es varen objectivar diferències en les concentracions plasmàtiques de ghrelina total entre els pacients que presentaven hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines i els que no, probablement degut a que només la meitat dels pacients amb hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines presentaven una tinció positiva per ghrelina. D'altra banda, tal i com han descrit altres autors, les concentracions sèriques de gastrina i CgA foren més altes en els pacients amb DM1 i hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines que en els que en els pacients amb DM1 sense hiperplàsia ⁽²⁵⁵⁾. A més, la concentració de CgA es va correlacionar de forma positiva amb la de la gastrina sèrica i de forma negativa amb la de pepsinogen I i el quocient pepsinogen I/pepsinogen II.

Recentment, s'ha suggerit que la ghrelina podria estar implicada en la regulació de la resposta immunitària i en els processos inflamatoris. De fet, els estudis que han avaluat algunes malalties inflamatòries han descrit concentracions perifèriques elevades de ghrelina així com una correlació positiva d'aquesta amb citocines inflamatòries com el TNF- α ⁽²²⁴⁻²²⁷⁾. Els resultats del nostre estudi mostren que els pacients amb DM1 i gastritis atròfica sense infecció per *H.pylori* presenten unes concentracions plasmàtiques més altes de ghrelina que els pacients amb DM1 sense atròfia gàstrica. D'altra banda, no es varen objectivar diferències en les concentracions sèriques de TNF- α ni de PCR entre els pacients amb DM1 que presentaven una gastritis atròfica i els que no. Per tant, les diferències observades en les concentracions de ghrelina entre ambdós grups difícilment podrien explicar-se per la presència d'un procés inflamatori.

Les concentracions de ghrelina a sang perifèrica s'han avaluat en alguns estudis de pacients amb DM 1, tots ells amb pacients d'edat pediàtrica. La majoria d'aquests han descrit una disminució de les concentracions perifèriques de ghrelina, tant de la seva forma total ⁽²⁰³⁻²⁰⁵⁾ com de l'acilada ⁽²⁰⁶⁾, en comparació amb les d'un grup control sa. Tot i així, algun estudi ha descrit concentracions de ghrelina total similars a les del grup control i una disminució de la ghrelina acilada

únicament en el moment del debut de la DM1. Cap d'aquests estudis ha valorat la possible presència d'una gastritis autoimmunitària en els seus pacients. Els resultats del nostre estudi, de forma similar a la majoria d'estudis previs, mostren que els pacients amb DM1 presenten, si s'exclouen de l'anàlisi aquells que presenten una gastritis atròfica, unes concentracions plasmàtiques de ghrelina total més baixes que les del grup control.

En persones no diabètiques les concentracions sèriques/plasmàtiques de ghrelina s'han correlacionat negativament tant amb la insulinèmia com amb la glucèmia ^(200,201). Els estudis efectuats en pacients amb DM1 també han objectivat una relació inversa amb la insulinèmia ⁽²⁰¹⁾ i en algun d'ells s'ha descrit una relació inversa amb la dosi d'insulina administrada als pacients. A més, aquests estudis han pogut demostrar que la insulinèmia és un factor clau en la supressió de la ghrelina postprandial ⁽¹⁹⁹⁾. Aquesta correlació inversa entre la insulinèmia i la concentració plasmàtica de ghrelina total també es va objectivar en el nostre estudi, tot i que únicament quan l'anàlisi s'efectuava incloent-hi la totalitat dels pacients de l'estudi.

En resum, els resultats del nostre treball mostren que les concentracions plasmàtiques de ghrelina no són un bon marcador bioquímic d'atròfia de la mucosa gàstrica en els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica. Una possible explicació podria ser que es produeixi una síntesi de ghrelina per part de les cèl·lules neuroendocrines que es troben hiperplasiades a la gastritis autoimmunitària.

L'objectiu del tercer treball de la tesi fou analitzar el nombre de Tregs en sang perifèrica de pacients amb DM1 i una segona malaltia autoimmunitària com la gastritis tipus A i comparar-lo amb el d'un grup de pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades i amb el d'un grup control sa. A més, en el grup de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica també es va analitzar l'expressió de Tregs al teixit diana inflammat, en aquest cas, la mucosa gàstrica.

El nombre de Tregs a sang perifèrica descrit a la majoria d'estudis de malalties autoimmunitàries ha estat normal ⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾, tot i que en algun d'ells s'ha trobat disminuït ⁽⁵¹⁻⁵³⁾. No obstant, la comparació dels resultats entre els diferents

estudis és difícil degut a que no tots ells han utilitzat els mateixos marcadors fenotípics per a definir la població de cèl·lules Tregs. A més, només alguns d'ells ha inclòs a l'anàlisi el marcador més específic d'aquestes cèl·lules, el factor de transcripció nuclear Foxp3 ⁽²⁷⁶⁾. No hi ha dades a la literatura de treballs que hagin estudiat les Tregs a la gastritis autoimmunitària en humans. En relació a la DM1, els primers estudis efectuats en pacients van descriure una disminució perifèrica de les Tregs, definides com les CD4⁺CD25^{hi}, en comparació amb un grup control ⁽⁵¹⁾. Aquesta troballa no es va confirmar en estudis posteriors, en els quals es va utilitzar per a l'estudi de les Tregs, el marcador Foxp3 ^(47-49,54). En canvi, si que es va descriure en la majoria d'estudis, una disminució de la capacitat supressora de les Tregs d'aquests pacients en comparació amb els subjectes control ^(47,48). Més recentment, s'ha suggerit que el defecte en la supressió podria ser degut a una resistència de les cèl·lules T efectores a ser suprimides per les Tregs ^(64,65). Els resultats del nostre estudi mostren, de forma similar a la descrita a la majoria d'estudis efectuats en pacients amb DM1, que el percentatge de Tregs, definides com aquelles cèl·lules CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, a sang perifèrica dels pacients amb DM1 és similar a la d'un grup control sa. Tot i així, cal remarcar que el subgrup de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atrofica presentava un percentatge de Tregs a sang perifèrica més elevat que els pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades i que el grup control. A més, aquestes cèl·lules presentaven una baixa expressió del marcador fenotípic CD127, fet que recolza la naturalesa reguladora de la població analitzada. Existeixen poques dades a la literatura d'estudis que hagin analitzat les Tregs en pacients amb més d'una malaltia autoimmunitària. De fet, existeix un únic estudi en el que es va analitzar el percentatge de Tregs (CD4⁺CD25⁺) a sang perifèrica en 8 pacients amb síndrome poliglandular autoimmunitària tipus II i no es van objectivar diferències amb els individus sans ⁽⁵⁰⁾. Cap dels pacients analitzats a l'estudi presentava una gastritis autoimmunitària. A més, a diferència del realitzat al nostre estudi, no es va incloure a l'anàlisi el marcador fenotípic Foxp3. Tal i com s'ha comentat prèviament, el nombre de Tregs en sang perifèrica de pacients amb DM1 no és diferent al de la població sana. Malgrat tot, l'estudi de Liu i col·laboradors⁽³⁹⁾ que va analitzar la població de Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{low}) en sang perifèrica

d'un grup de 16 pacients amb DM1, va descriure que varis d'aquests pacients presentaven un nombre més elevat de Tregs que el grup control, tot i que quan s'analitzava el total del grup de pacients amb DM1 (n=16) no hi havia diferències amb el grup control. Aquesta elevació objectivada en algun dels pacients, tenint en compte els resultats obtinguts al nostre estudi, podria explicar-se, al menys en part, per la presència d'una segona malaltia autoimmunitària associada a la DM1, circumstància que no fou analitzada a l'estudi de Liu i col·laboradors.

En el nostre treball, per tal de poder determinar si l'elevació de Tregs objectivada en els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica, era deguda a l'associació de les dues malalties o bé únicament a la gastritis, hauria estat necessària la inclusió d'un grup de pacients afectes únicament de gastritis autoimmunitària. Tot i així, no es va considerar la inclusió d'aquest grup de pacients degut a que la gastritis autoimmunitària aïllada en fase atròfica clàssicament afecta a gent d'edat avançada i, per tant, amb comorbilitats associades, fet que fa difícil la comparació amb el nostre grup de pacients amb DM1 i gastritis que presentaven una edat mitja de 36,8 anys.

En la majoria d'estudis de pacients amb malalties autoimmunitàries les Tregs s'han analitzat únicament en sang perifèrica. L'anàlisi conjunt de Tregs a sang perifèrica i al teixit diana inflammat s'ha realitzat en pocs estudis. Entre aquests hi hauria els efectuats a pacients amb artritis reumatoide i amb malaltia inflamatòria intestinal ^(55,56). En els dos casos, s'ha objectivat una menor freqüència de Tregs (CD4⁺CD25⁺) a sang perifèrica que al teixit inflamatori. Una possible explicació, segons els autors dels estudis, podria ser la migració de les Tregs des de la sang perifèrica cap al teixit inflammat. Concretament, els estudis efectuats a pacients amb artritis reumatoide suggereixen que les Tregs migren cap a les articulacions inflamades i allà són inactivades per substàncies inflamatòries com la IL-6 o el TNF- α ⁽⁵⁶⁾. En el model animal d'esclerosi múltiple, la producció de citocines inflamatòries al teixit inflammat també ha estat suggerida com la causant de la menor efectivitat de les Tregs per a controlar el procés inflamatori ⁽⁵⁹⁾. Finalment, Marazuela i col·laboradors ⁽²⁷⁷⁾ varen analitzar les Tregs en sang perifèrica i en teixit de 20 pacients amb MAT (12 amb malaltia de Graves-Basedow i 8 amb malaltia de Hashimoto) i les comparà amb un grup control. L'estudi mostrà

que els pacients amb MAT presentaven, en comparació amb el grup control, un major percentatge de Tregs a sang perifèrica. L'anàlisi immunohistoquímic del teixit tiroïdal d'aquests pacients mostrà la presència d'una infiltració important de cèl·lules amb capacitat supressora com els limfòcits T CD69⁺ i GITR⁺. Tot i així, els estudis funcionals mostraren una menor capacitat supressora de les Tregs (CD4⁺CD25^{hi}) d'aquests pacients.

Segons les nostres dades, aquest és el primer estudi que analitza l'expressió de Foxp3 a la mucosa gàstrica de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària. Els resultats de l'anàlisi mostren que els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica presenten una major proporció de Tregs *in situ* (a la mucosa gàstrica) que l'observada a la mucosa gàstrica normal. Per aquest motiu, es va considerar convenient analitzar la proporció de Tregs a mucosa gàstrica de pacients amb una gastritis inflamatòria en fase atròfica d'una etiologia diferent a l'autoimmunitària com és la deguda a una infecció per *H.pylori*. Els resultats mostren que la proporció de Tregs a mucosa gàstrica és més elevada en els pacients amb gastritis atròfica de causa infecciosa (*H.pylori*) que en els pacients amb DM1 i gastritis atròfica d'etiologia autoimmunitària. De fet, els estudis efectuats a mucosa gàstrica de pacients amb infecció per *H.pylori* han demostrat que aquests presenten una major freqüència de Tregs que l'observada a la mucosa gàstrica normal ⁽²⁷⁸⁾. Aquesta troballa ha suggerit que l'augment de Tregs a la mucosa gàstrica d'aquests pacients podria ser la responsable d'una supressió de la resposta immunològica gàstrica que estaria implicada en la persistència de la infecció per *H.pylori*. Tenint en compte els resultats obtinguts en el nostre estudi, es podria argumentar que el nombre de Tregs necessari per a la cronificació d'una gastritis seria diferent en funció de la seva etiologia, és a dir, seria major en la de causa infecciosa i menor en l'autoimmunitària.

En resum, el nostre estudi demostra que els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica presenten una major freqüència de Tregs a sang perifèrica que els pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades i que un grup control sa. A més, les Tregs es troben presents a la mucosa gàstrica d'aquests pacients, fet que suggereix que el sistema immunològic intenta controlar el procés inflamatori. Malgrat tot, i probablement degut a

l'ambient pro-inflamatori existent a la mucosa gàstrica d'aquests pacients, les Tregs no aconsegueixen controlar la malaltia autoimmunitària. Curiosament, el nombre de Tregs a la mucosa gàstrica dels pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària va ser menor que l'observat en pacients amb gastritis infecciosa (*H.pylori*), fet que podria posar de manifest la influència del percentatge de Tregs *in situ* necessari per a la cronificació d'una gastritis autoimmunitària o infecciosa.

Conclusions

- La prevalença d'anèmia perniciosa latent o pre-clínica, definida únicament per la presència d'una concentració sèrica baixa de pepsinogen I, en els pacients amb DM1 és del 12,3%, xifra clarament superior al 0,9% del grup control. D'aquests, 11 (47,82%) presenten, de forma associada, aCPG positius.
- La prevalença d'aCPG positius en la població de pacients amb DM1 avaluats és del 26%, la d'aTPO d'un 18%, els aTg un 5,8% i la d'anticossos anti-nuclears (ANA) d'un 36%.
- La biòpsia gàstrica confirma la presència d'una atròfia de la mucosa del cos gàstric en els pacients amb DM1, concentració sèrica baixa de pepsinogen I, hipergastrinèmia i aCPG positius.
- Tots els pacients amb pepsinogen I baix i aCPG positius a l'inici de l'estudi presenten un pepsinogen I baix als 5 anys de seguiment.
- El pepsinogen I sèric baix es normalitza als 5 anys de seguiment en un 63% dels pacients amb DM1 quan s'associa a uns aCPG negatius.
- Els pacients que negativitzen els aCPG durant els seguiment presenten, basalment, títols baixos d'aCPG ($\leq 1/80$) i concentracions sèriques normals de pepsinogen I.
- Les concentracions de cobalamina, als 5 anys de seguiment, disminueixen de forma significativa en aquells pacients que presenten aCPG positius i pepsinogen I baix a l'inici de l'estudi en comparació amb els pacients que presenten, a l'inici, únicament alteració d'un dels dos paràmetres (aCPG positius o pepsinogen I). Concretament, 2 dels pacients amb pepsinogen I

baix i aCPG positius han presentat un dèficit de cobalamina als 5 anys de seguiment.

- No hi ha diferències en les concentracions plasmàtiques de ghrelina entre els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica i els pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades ni tampoc amb un grup control. Per tant, la concentració plasmàtica de ghrelina no és un bon marcador d'atròfia de la mucosa gàstrica en els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària.
- En els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica, les concentracions plasmàtiques de ghrelina no es correlacionen amb marcadors bioquímics d'atròfia del cos gàstric com la concentració sèrica de pepsinogen I o el quocient PI/PII.
- L'estudi immunohistoquímic de la biòpsia gàstrica mostra que el 50% dels pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica presenten expressió gàstrica de ghrelina que es localitza a les zones d'hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines. Tot i així, no s'han objectivat diferències en les concentracions plasmàtiques de ghrelina entre els pacients amb DM1 que presenten o no una hiperplàsia de les cèl·lules neuroendocrines.
- Els pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica presenten un major percentatge de cèl·lules T reguladores (Tregs) a sang perifèrica que els pacients amb DM1 sense altres malalties autoimmunitàries associades i que els subjectes sans.
- Les cèl·lules T reguladores (Tregs) s'expressen a la mucosa gàstrica de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica en una proporció superior a la de la mucosa gàstrica normal. Aquest fet podria suggerir que es tracta d'una resposta del sistema immunològic per intentar controlar el procés inflamatori gàstric.

- El percentatge de cèl·lules T reguladores (Tregs) a la mucosa gàstrica de pacients amb DM1 i gastritis autoimmunitària en fase atròfica és més elevat que l'observat a la mucosa gàstrica normal però inferior al de la gastritis atròfica de causa infecciosa (*H.pylori*). Aquest fet podria posar de manifest la influència del percentatge de Tregs *in situ* necessari per a la cronificació d'una gastritis autoimmunitària o infecciosa.

Bibliografia

1. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001; 358:221-9.
2. Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes*. 2002; 51:3353-61.
3. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet*. 2000; 355:873-6.
4. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009; 373:2027-33.
5. Atkinson MA. ADA Outstanding Scientific Achievement Lecture 2004. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: why can't we prevent or reverse this disease? *Diabetes*. 2005; 54:1253-63.
6. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986; 314:1360-8.
7. Todd JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioessays*. 1999; 21:164-74.
8. Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54 Suppl 2:S25-31.
9. Redondo MJ, Eisenbarth GS. Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia*. 2002; 45:605-22.
10. Bilbao JR, Calvo B, Urrutia I, Castaño L. Bases genéticas de la diabetes tipo I. *Endocrinología y Nutrición*. 1996; 312-20.
11. Maclaren N, Riley W, Skordis N, Atkinson M, Spillar R, Silverstein J, Klein R, Vadheim C, Rotter J. Inherited susceptibility to insulin-dependent diabetes is associated with HLA-DR1, while DR5 is protective. *Autoimmunity*. 1988; 1:197-205.
12. Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, Awdeh ZL, Alper CA, Erlich HA, Jackson RA, Eisenbarth GS. HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes*. 1995; 44:608-13.

13. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2007; 39:857-64.
14. Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E, Barber M, Restivo VA Jr, Ke X, Gray GS, et al. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 31; 92:811-5.
15. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science.* 1995; 270:985-8.
16. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997; 46:551-4.
17. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, Ghaderi A, Gough SC, Hiromatsu Y, Ploski R, Wang PW, Ban Y, Bednarczuk T, Chistiakova EI, Chojm M, Heward JM, Hiratani H, Juo SH, Karabon L, Katayama S, Kurihara S, Liu RT, Miyake I, Omrani GH, Pawlak E, Taniyama M, Tozaki T, Ioannidis JP. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:3162-70.
18. Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev.* 2008; 29:697-725.
19. Roycroft M, Fichna M, McDonald D, Owen K, Zurawek M, Gryczyńska M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Fichna P, Cordell H, Donaldson P, Nowak J, Pearce S. The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene predisposes to autoimmune Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009 ;70:358-62.
20. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS; The Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Genome-wide association

- study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2009; 41: 657-65.
21. Ziegler AG, Hillebrand B, Rabl W, Mayrhofer M, Hummel M, Mollenhauer U, Vordemann J, Lenz A, Standl E. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia.* 1993; 36:402-8.
22. Kupila A, Muona P, Simell T, Arvilommi P, Savolainen H, Hämäläinen AM, Korhonen S, Kimpimäki T, Sjööros M, Ilonen J, Knip M, Simell O; Juvenile Diabetes Research Foundation Centre for the Prevention of Type I Diabetes in Finland. Feasibility of genetic and immunological prediction of type I diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia.* 2001; 44:290-7.
23. Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M, McDuffie RS Jr, Hamman RF, Klingensmith G, Eisenbarth GS, Erlich HA. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia.* 1996; 39:807-12.
24. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, Gellert SA, Goldwater PN, Steele CE, Couper JJ, Tait BD, Colman PG, Harrison LC. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes.* 2000; 49:1319-24.
25. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA 2007. Tolerance and autoimmunity. A: Immunology. Kuby, 6th edition. Ed: W.H. Freeman and Company, 401-424 pp.
26. Mannering SI, Morris JS, Stone NL, Jensen KP, VAN Endert PM, Harrison LC. CD4+T cell proliferation in response to GAD and proinsulin in healthy, pre-diabetic, and diabetic donors. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1037:16-21.
27. Bach JF. Autoimmune diseases as the loss of active "self-control". *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 998:161-77.
28. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155:1151-64.
29. Tung KS, Smith S, Teuscher C, Cook C, Anderson RE. Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by

- day 3 thymectomy. *Immunopathology. Am J Pathol.* 1987; 126:293-302.
30. van Driel IR, Read S, Zwar TD, Gleeson PA. Shaping the T cell repertoire to a bona fide autoantigen: lessons from autoimmune gastritis. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17:570-6.
31. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001; 167:1245-53.
32. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2004; 16: 89-98.
33. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol.* 2007; 8:359-68.
34. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001; 27:20-1.
35. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet.* 2002; 39:537-45.
36. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, Roncarolo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest.* 2006; 116:1713-22.
37. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med.* 2007;204:57-63.
38. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunologica self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002; 3:135-42.
39. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates

- with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006; 203:1701-11.
40. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006; 203:1693-700.
41. Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A. CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. *J Invest Dermatol.* 2010;130:492-9.
42. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science.* 2007; 317:627-9.
43. Putnam AL, Brusko TM, Lee MR, Liu W, Szot GL, Ghosh T, Atkinson MA, Bluestone JA. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2009; 58:652-62.
44. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299:1057-61.
45. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol.* 2009; 21:1105-11.
46. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, Vetter T, Milkova L, Korporal M, Fritz B, Storch-Hagenlocher B, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2005; 35:3343-52.
47. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54:92-9.
48. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* 2005; 24:55-62.
49. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54:1407-14.

50. Kriegl MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med.* 2004; 199:1285-91.
51. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest.* 2002; 109:131-40.
52. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2005;128:1868-78.
53. Valencia X, Lipsky PE. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007; 3:619-26.
54. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, Haller M, Rockell J, Gottlieb P, Clare-Salzler M, Atkinson M. No alterations in the frequency of FOXP3⁺ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2007; 56:604-12.
55. Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2003; 33:215-23.
56. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood.* 2006; 108:253-61.
57. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003; 299:1033-6.
58. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med.* 2004; 200:277-85.
59. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007; 13:423-31.
60. Vorobjova T, Uibo O, Heilman K, Rägo T, Honkanen J, Vaarala O, Tillmann V, Ojakivi I, Uibo R. Increased FOXP3 expression in small-

- bowel mucosa of children with coeliac disease and type I diabetes mellitus. *Scand J Gastroenterol.* 2009; 44:422-30.
61. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004; 199:971-9.
62. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* 2005; 174:164-73.
63. Tree TI, Roep BO, Peakman M. A mini meta-analysis of studies on CD4+CD25+ T cells in human type 1 diabetes: report of the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1079:9-18.
64. Schneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, Buckner JH. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2008; 181:7350-5.
65. Lawson JM, Tremble J, Dayan C, Beyan H, Leslie RD, Peakman M, Tree TI. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2008; 154:353-9.
66. Brusko T, Bluestone J. Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes and transplantation. *Eur J Immunol.* 2008; 38:931-4.
67. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2004; 199:1455-65.
68. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med.* 2006; 354:1166-76.
69. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; 136:2348-57.
70. Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid.* 2009; 19:495-501.

71. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:145-73.
72. Bluestone JA, Kuchroo V. Autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21:579-81.
73. Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2000; 192:123-8.
74. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature.* 2008; 454:350-2.
75. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008; 453:1051-7.
76. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; 441:235-8.
77. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 2007; 317:256-60.
78. Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Di Padova FE, Boots AM, Gram H, Joosten LA, van den Berg WB. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol.* 2005; 167:141-9.
79. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005; 237:123-30.
80. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2009; 58:1302-11.
81. Stummvoll GH, DiPaolo RJ, Huter EN, Davidson TS, Glass D, Ward JM, Shevach EM. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune

- gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J Immunol.* 2008; 181:1908-16.
82. Jenkins RC, Weetman AP. Disease associations with autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 2002; 12:977-88.
83. Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes. *Eur J Endocrinol.* 2009; 161:11-20.
84. Gylling M, Tuomi T, Björnses P, Kontiainen S, Partanen J, Christie MR, Knip M, Perheentupa J, Miettinen A. ss-cell autoantibodies, human leukocyte antigen II alleles, and type 1 diabetes in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:4434-40.
85. Owen CJ, Cheetham TD. Diagnosis and management of polyendocrinopathy syndromes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009; 38:419-36, x.
86. Robles DT, Fain PR, Gottlieb PA, Eisenbarth GS. The genetics of autoimmune polyendocrine syndrome type II. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002; 31:353-68, vi-vii.
87. Eisenbarth GS, Lebovitz HE. Immunogenetics of the polyglandular failure syndrome. *Life Sci.* 1978; 22:1675-83.
88. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:41-5.
89. Roycroft M, Fichna M, McDonald D, Owen K, Zurawek M, Gryczyńska M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Fichna P, Cordell H, Donaldson P, Nowak J, Pearce S. The tryptophan 620 allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) gene predisposes to autoimmune Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009; 70:358-62.
90. Laureti S, Vecchi L, Santeusano F, Falorni A. Is the prevalence of Addison's disease underestimated? *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:1762.
91. Betterle C, Dal Pra C, Mantero F, Zanchetta R. Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr Rev.* 2002; 23:327-64.
92. Neufeld M, Maclaren NK, Blizzard RM. Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular

- autoimmune (PGA) syndromes. *Medicine (Baltimore)*. 1981; 60:355-62.
93. Riley WJ, Maclaren NK, Lezotte DC, Spillar RP, Rosenbloom AL. Thyroid autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus: the case for routine screening. *J Pediatr*. 1981; 99:350-4.
94. Perros P, McCrimmon RJ, Shaw G, Frier BM. Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening. *Diabet Med*. 1995; 12:622-7.
95. Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med*. 1996; 335:99-107.
96. Barker JM, Yu J, Yu L, Wang J, Miao D, Bao F, Hoffenberg E, Nelson JC, Gottlieb PA, Rewers M, Eisenbarth GS. Autoantibody "subspecificity" in type 1 diabetes: risk for organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care*. 2005; 28:850-5.
97. De Block CE, De Leeuw IH, Vertommen JJ, Rooman RP, Du Caju MV, Van Campenhout CM, Weyler JJ, Winnock F, Van Autreve J, Gorus FK; Belgian Diabetes Registry. Beta-cell, thyroid, gastric, adrenal and coeliac autoimmunity and HLA-DQ types in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2001; 126:236-41.
98. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:489-99.
99. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T, Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977; 7:481-93.
100. Kordonouri O, Klinghammer A, Lang EB, Grütters-Kieslich A, Grabert M, Holl RW. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: a multicenter survey. *Diabetes Care*. 2002; 25:1346-50.
101. Umpierrez GE, Latif KA, Murphy MB, Lambeth HC, Stentz F, Bush A, Kitabchi AE. Thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes: a longitudinal study. *Diabetes Care*. 2003; 26:1181-5.
102. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, Grimley Evans J, Hasan DM, Rodgers H, Tunbridge F, et al. The

- incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995; 43:55-68.
103. González GC, Capel I, Rodríguez-Espinosa J, Mauricio D, de Leiva A, Pérez A. Thyroid autoimmunity at onset of type 1 diabetes as a predictor of thyroid dysfunction. *Diabetes Care*. 2007; 30:1611-2.
 104. Hoffman RP. Thyroid stimulating hormone screening is more sensitive for detecting thyroid abnormalities in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26:255.
 105. Maugendre D, Guilhem I, Karacatsanis C, Poirier JY, Leguerrier AM, Lorcy Y, Derrien C, Sonnet E, Massart C. Anti-TPO antibodies and screening of thyroid dysfunction in type 1 diabetic patients. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2000; 61:524-530.
 106. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007; 357:1731-43.
 107. Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet*. 1997; 349:1755-9.
 108. Cronin CC, Shanahan F. Insulin-dependent diabetes mellitus and coeliac disease. *Lancet*. 1997; 349:1096-7.
 109. Barera G, Bianchi C, Calisti L, Cerutti F, Dammacco F, Frezza E, Illeni MT, Mistura L, Pocecco M, Prisco F, et al. Screening of diabetic children for coeliac disease with antigliadin antibodies and HLA typing. *Arch Dis Child*. 1991; 66:491-4.
 110. Not T, Tommasini A, Tonini G, Buratti E, Pocecco M, Tortul C, Valussi M, Crichiutti G, Berti I, Trevisiol C, Azzoni E, Neri E, Torre G, Martelossi S, Soban M, Lenhardt A, Cattin L, Ventura A. Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2001; 44:151-5.
 111. Valerio G, Maiuri L, Troncone R, Buono P, Lombardi F, Palmieri R, Franzese A. Severe clinical onset of diabetes and increased prevalence of other autoimmune diseases in children with coeliac disease diagnosed before diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002; 45:1719-22.
 112. Johnson TC, Diamond B, Memeo L, Negulescu H, Hovhanissyan Z, Verkarre V, Rotterdam H, Fasano A, Caillat-Zucman S, Grosdidier E, Winchester R, Cellier C, Jabri B, Green PH. Relationship of HLA-DQ8 and severity of celiac disease: comparison of New York and Parisian cohorts. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004; 2:888-94.

113. Kaukinen K, Partanen J, Mäki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97:695-9.
114. Sumnik Z, Cinek O, Bratanic N, Kordonouri O, Kulich M, Roszai B, Arato A, Lebl J, Soltesz G, Danne T, Battelino T, Schober E. Risk of celiac disease in children with type 1 diabetes is modified by positivity for HLA-DQB1*02-DQA1*05 and TNF -308A. *Diabetes Care.* 2006; 29:858-63.
115. Sumník Z, Kolousková S, Cinek O, Kotalová R, Vavrínek J, Snajderová M. HLA-DQA1*05-DQB1*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. *Acta Paediatr.* 2000; 89:1426-30.
116. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, Howson JM, Stevens H, McManus R, Wijmenga C, Heap GA, Dubois PC, Clayton DG, Hunt KA, van Heel DA, Todd JA. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med.* 2008; 359:2767-77.
117. Farrell RJ, Kelly CP. Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96:3237-46.
118. Lenhardt A, Plebani A, Marchetti F, Gerarduzzi T, Not T, Meini A, Villanacci V, Martellosi S, Ventura A. Role of human-tissue transglutaminase IgG and anti-gliadin IgG antibodies in the diagnosis of coeliac disease in patients with selective immunoglobulin A deficiency. *Dig Liver Dis.* 2004; 36:730-4.
119. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, MacNeil J, Mack D, Patel D, Moher D. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology.* 2005; 128(4 Suppl 1):S38-46.
120. Abrams JA, Diamond B, Rotterdam H, Green PH. Seronegative celiac disease: increased prevalence with lesser degrees of villous atrophy. *Dig Dis Sci.* 2004; 49:546-50.
121. Hoffenberg EJ, Emery LM, Barriga KJ, Bao F, Taylor J, Eisenbarth GS, Haas JE, Sokol RJ, Taki I, Norris JM, Rewers M. Clinical features of children with screening-identified evidence of celiac disease. *Pediatrics.* 2004; 113:1254-9.
122. Nuti R, Martini G, Valenti R, Giovani S, Salvadori S, Avanzati A. Prevalence of undiagnosed coeliac syndrome in osteoporotic women. *J Intern Med.* 2001; 250:361-6.

123. Mohn A, Cerruto M, Iafusco D, Prisco F, Tumini S, Stoppoloni O, Chiarelli F. Celiac disease in children and adolescents with type I diabetes: importance of hypoglycemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 32:37-40.
124. Holmes GK. Coeliac disease and Type 1 diabetes mellitus - the case for screening. *Diabet Med.* 2001; 18:169-77.
125. Mäki M, Huupponen T, Holm K, Hällström O. Seroconversion of reticulín autoantibodies predicts coeliac disease in insulin dependent diabetes mellitus. *Gut.* 1995; 36:239-42.
126. Barera G, Bonfanti R, Viscardi M, Bazzigaluppi E, Calori G, Meschi F, Bianchi C, Chiumello G. Occurrence of celiac disease after onset of type 1 diabetes: a 6-year prospective longitudinal study. *Pediatrics.* 2002; 109:833-8.
127. Glastras SJ, Craig ME, Verge CF, Chan AK, Cusumano JM, Donaghue KC. The role of autoimmunity at diagnosis of type 1 diabetes in the development of thyroid and celiac disease and microvascular complications. *Diabetes Care.* 2005; 28:2170-5.
128. Freemark M, Levitsky LL. Screening for celiac disease in children with type 1 diabetes: two views of the controversy. *Diabetes Care.* 2003; 26:1932-9.
129. Buysschaert M, Tomasi JP, Hermans MP. Prospective screening for biopsy proven coeliac disease, autoimmunity and malabsorption markers in Belgian subjects with type 1 diabetes. *Diabetic medicine.* 2005; 22: 889-892.
130. Summary of revisions for the 2009 clinical practice recommendations. *Diabetes Care* 2009; 32: S3-S5.
131. Løvås K, Husebye ES. High prevalence and increasing incidence of Addison's disease in western Norway. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002; 56:787-91.
132. Falorni A, Laureti S, Nikoshkov A, Picchio ML, Hallengren B, Vandewalle CL, Gorus FK, Tortoioli C, Luthman H, Brunetti P, Santeusanio F. 21-hydroxylase autoantibodies in adult patients with endocrine autoimmune diseases are highly specific for Addison's disease. Belgian Diabetes Registry. *Clin Exp Immunol.* 1997; 107:341-6.

133. Brewer KW, Parziale VS, Eisenbarth GS. Screening patients with insulin-dependent diabetes mellitus for adrenal insufficiency. *N Engl J Med.* 1997; 337:202.
134. Betterle C, Scalici C, Presotto F, Pedini B, Moro L, Rigon F, Mantero F. The natural history of adrenal function in autoimmune patients with adrenal autoantibodies. *J Endocrinol.* 1988; 117:467-75.
135. Betterle C, Volpato M, Rees Smith B, Furmaniak J, Chen S, Greggio NA, Sanzari M, Tedesco F, Pedini B, Boscaro M, Presotto F. I. Adrenal cortex and steroid 21- hydroxylase autoantibodies in adult patients with organ-specific autoimmune diseases: markers of low progression to clinical Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:932-8.
136. Coco G, Dal Pra C, Presotto F, Albergoni MP, Canova C, Pedini B, Zanchetta R, Chen S, Furmaniak J, Rees Smith B, Mantero F, Betterle C. Estimated risk for developing autoimmune Addison's disease in patients with adrenal cortex autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:1637-45.
137. Erichsen MM, Løvås K, Skinningsrud B, Wolff AB, Undlien DE, Svartberg J, Fougner KJ, Berg TJ, Bollerslev J, Mella B, Carlson JA, Erlich H, Husebye ES. Clinical, immunological, and genetic features of autoimmune primary adrenal insufficiency: observations from a Norwegian registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:4882-90.
138. Yu L, Brewer KW, Gates S, Wu A, Wang T, Babu SR, Gottlieb PA, Freed BM, Noble J, Erlich HA, Rewers MJ, Eisenbarth GS. DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21-hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:328-35.
139. Erichsen MM, Løvås K, Skinningsrud B, Wolff AB, Undlien DE, Svartberg J, Fougner KJ, Berg TJ, Bollerslev J, Mella B, Carlson JA, Erlich H, Husebye ES. Clinical, immunological, and genetic features of autoimmune primary adrenal insufficiency: observations from a Norwegian registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:4882-90.
140. Huang W, Connor E, Rosa TD, Muir A, Schatz D, Silverstein J, Crockett S, She JX, Maclaren NK. Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:2559-63.

141. Vaidya B, Imrie H, Geatch DR, Perros P, Ball SG, Baylis PH, Carr D, Hurel SJ, James RA, Kelly WF, Kemp EH, Young ET, Weetman AP, Kendall-Taylor P, Pearce SH. Association analysis of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) and autoimmune regulator-1 (AIRE-1) genes in sporadic autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:688-91.
142. Brozzetti A, Marzotti S, Tortoioli C, Bini V, Giordano R, Dotta F, Betterle C, De Bellis A, Arnaldi G, Toscano V, Arvat E, Bellastella A, Mantero F, Falorni A; Italian Addison Network. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 Ala17 polymorphism is a genetic marker of autoimmune adrenal insufficiency: Italian association study and meta- analysis of European studies. *Eur J Endocrinol.* 2010; 162:361-9.
143. Magitta NF, Bøe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, Undlien DE, Joner G, Njølstad PR, Kvien TK, Førre Ø, Knappskog PM, Husebye ES. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun.* 2009;10:120-4.
144. Barker JM. Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:1210-7.
145. Strickland RG, Mackay IR. A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. *Am J Dig Dis.* 1973; 18:426-40.
146. Alderuccio F, Toh BH. Immunopathology of autoimmune gastritis: lessons from mouse models. *Histol Histopathol.* 2000; 15:869-79.
147. Callaghan JM, Khan MA, Alderuccio F, van Driel IR, Gleeson PA, Toh BH. Alpha and beta subunits of the gastric H⁺/K⁽⁺⁾-ATPase are concordantly targeted by parietal cell autoantibodies associated with autoimmune gastritis. *Autoimmunity.* 1993; 16:289-95.
148. Alderuccio F, Gleeson PA, Berzins SP, Martin M, Van Driel IR, Toh BH. Expression of the gastric H/K-ATPase alpha-subunit in the thymus may explain the dominant role of the beta-subunit in the pathogenesis of autoimmune gastritis. *Autoimmunity.* 1997; 25:167-75.
149. Judd LM, Gleeson PA, Toh BH, van Driel IR. Autoimmune gastritis results in disruption of gastric epithelial cell development. *Am J Physiol.* 1999; 277:G209-18.
150. De Block CE, De Leeuw IH, Bogers JJ, Pelckmans PA, Ieven MM, Van Marck EA, Van Acker KL, Van Gaal LF. Autoimmune gastropathy in

- type 1 diabetic patients with parietal cell antibodies: histological and clinical findings. *Diabetes Care*. 2003; 26:82-8.
151. Carmel R. Reassessment of the relative prevalences of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. *Clin Exp Immunol*. 1992; 89:74-7.
 152. Davidson RJ, Atrah HI, Sewell HF. Longitudinal study of circulating gastric antibodies in pernicious anaemia. *J Clin Pathol*. 1989; 42:1092-5.
 153. Ma JY, Borch K, Sjöstrand SE, Janzon L, Mårdh S. Positive correlation between H,K-adenosine triphosphatase autoantibodies and *Helicobacter pylori* antibodies in patients with pernicious anemia. *Scand J Gastroenterol*. 1994; 29:961-5.
 154. Claeys D, Faller G, Appelmelk BJ, Negrini R, Kirchner T. The gastric H⁺,K⁺-ATPase is a major autoantigen in chronic *Helicobacter pylori* gastritis with body mucosa atrophy. *Gastroenterology*. 1998; 115:340-7.
 155. Oksanen A, Sipponen P, Karttunen R, Miettinen A, Veijola L, Sarna S, Rautelin H. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in outpatients referred for gastroscopy. *Gut*. 2000; 46:460-3.
 156. Annibale B, Di Giulio E, Caruana P, Lahner E, Capurso G, Bordi C, Delle Fave G. The long-term effects of cure of *Helicobacter pylori* infection on patients with atrophic body gastritis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002; 16:1723-31.
 157. Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuelo MB, Camargo MC, Correa P. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 2005; 54:1536-40.
 158. Hershko C, Skikne B. Pathogenesis and management of iron deficiency anemia: emerging role of celiac disease, *Helicobacter pylori*, and autoimmune gastritis. *Semin Hematol*. 2009; 46:339-50.
 159. D'Elis MM, Appelmelk BJ, Amedei A, Bergman MP, Del Prete G. Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol Med*. 2004; 10:316-23.
 160. Silveira PA, Baxter AG, Cain WE, van Driel IR. A major linkage region on distal chromosome 4 confers susceptibility to mouse autoimmune gastritis. *J Immunol*. 1999; 162:5106-11.

161. Silveira PA, Wilson WE, Esteban LM, Jordan MA, Hawke CG, van Driel IR, Baxter AG. Identification of the Gasa3 and Gasa4 autoimmune gastritis susceptibility genes using congenic mice and partitioned, segregative and interaction analyses. *Immunogenetics*. 2001; 53:741-50.
162. Whittingham S, Mackay IR 1985. Pernicious anemia in gastric atrophy. A: The autoimmune diseases. Ed:Rose NR, Mackay, New York Academic Press;; 243-266 pp.
163. Van den Berg-Loonen EM, Hilterman TC, Bins M, Nijenhuis LE, Engelfriet CP. Increased incidence of HLA-DR2 in patients with pernicious anemia. *Tissue Antigens*. 1982; 19:158-60.
164. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibody-positive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:4062-7.
165. Ungar B, Mathews JD, Tait BD, Cowling DC. HLA patterns in pernicious anaemia. *Br Med J*. 1977; 1:798-800.
166. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. Autoimmune gastritis in type 1 diabetes: a clinically oriented review. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:363-71.
167. Solcia E, Fiocca R, Villani L, Luinetti O, Capella C. Hyperplastic, dysplastic, and neoplastic enterochromaffin-like-cell proliferations of the gastric mucosa. Classification and histogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1995; 19 Suppl 1:S1-7.
168. Kokkola A, Sjöblom SM, Haapiainen R, Sipponen P, Puolakkainen P, Järvinen H. The risk of gastric carcinoma and carcinoid tumours in patients with pernicious anaemia. A prospective follow-up study. *Scand J Gastroenterol*. 1998; 33:88-92.
169. Hsing AW, Hansson LE, McLaughlin JK, Nyren O, Blot WJ, Ekblom A, Fraumeni F Jr. Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer*. 1993; 71:745-50.
170. Modlin IM, Kidd M, Lye KD. Biology and management of gastric carcinoid tumours: a review. *Eur J Surg*. 2002; 168:669-83.
171. Bajetta E, Ferrari L, Martinetti A, Celio L, Procopio G, Artale S, Zilembo N, Di Bartolomeo M, Seregini E, Bombardieri E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and

- hydroxyindole acetic acid evaluation in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer*. 1999; 86:858-65.
172. Deftos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev*. 1991; 12:181-7.
173. Borch K, Stridsberg M, Burman P, Rehfeld JF. Basal chromogranin A and gastrin concentrations in circulation correlate to endocrine cell proliferation in type-A gastritis. *Scand J Gastroenterol*. 1997; 32:198-202.
174. Peracchi M, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C, Massironi S, Conte D. Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *Eur J Endocrinol*. 2005; 152:443-8.
175. Sipponen P, Härkönen M, Alanko A, Suovaniemi O. Diagnosis of atrophic gastritis from a serum sample. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2003; 49:11-21.
176. Samloff IM, Varis K, Ihamaki T, Siurala M, Rotter JI. Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II, and gastric mucosal histology. A study in relatives of patients with pernicious anemia. *Gastroenterology*. 1982; 83:204-9.
177. Valle J, Kekki M, Sipponen P, Ihamäki T, Siurala M. Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol*. 1996; 31:546-50.
178. Kiyohira K, Yoshihara M, Ito M, Haruma K, Tanaka S, Chayama K. Serum pepsinogen concentration as a marker of *Helicobacter pylori* infection and the histologic grade of gastritis; evaluation of gastric mucosa by serum pepsinogen levels. *J Gastroenterol*. 2003; 38:332-8.
179. Filipe MI, Muñoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kirn V, Jutersek A, Teuchmann S, Benz M, Prijon T. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer*. 1994; 57:324-9.
180. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up. *Cancer Res*. 1990; 50:4737-40.
181. Sipponen P, Kekki M, Haapakoski J, Ihamäki T, Siurala M. Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *Int J Cancer*. 1985; 35:173-7.

182. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Infection with *Helicobacter pylori*. Lyon: IARC Scientific Publications, 1994; 61: 177-240.
183. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992; 52:6735-40.
184. Oishi Y, Kiyohara Y, Kubo M, Tanaka K, Tanizaki Y, Ninomiya T, Doi Y, Shikata K, Yonemoto K, Shiota T, Matsumoto T, Iida M. The serum pepsinogen test as a predictor of gastric cancer: the Hisayama study. *Am J Epidemiol.* 2006; 163:629-37.
185. Sjöblom SM, Sipponen P, Järvinen H. Gastroscopic follow up of pernicious anaemia patients. *Gut.* 1993; 34:28-32.
186. Brinton LA, Gridley G, Hrubec Z, Hoover R, Fraumeni JF Jr. Cancer risk following pernicious anaemia. *Br J Cancer.* 1989; 59:810-3.
187. Schafer LW, Larson DE, Melton LJ 3rd, Higgins JA, Zinsmeister AR. Risk of development of gastric carcinoma in patients with pernicious anemia: a population-based study in Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 1985; 60:444-8.
188. Hsing AW, Hansson LE, McLaughlin JK, Nyren O, Blot WJ, Ekobom A, Fraumeni JF Jr. Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer.* 1993; 71:745-50.
189. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol.* 1996; 20:1161-81.
190. Väänänen H, Vauhkonen M, Helske T, Kääriäinen I, Rasmussen M, Tunturi-Hihnala H, Koskenpato J, Sotka M, Turunen M, Sandström R, Ristikankare M, Jussila A, Sipponen P. Non-endoscopic diagnosis of atrophic gastritis with a blood test. Correlation between gastric histology and serum levels of gastrin-17 and pepsinogen I: a multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 15:885-91.
191. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut.* 2007; 56:772-81.

192. Kokkola A, Rautelin H, Puolakkainen P, Sipponen P, Färkkilä M, Haapiainen R, Kosunen TU. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with atrophic gastritis: comparison of histology, ¹³C-urea breath test, and serology. *Scand J Gastroenterol*. 2000; 35:138-41.
193. Jaskowski TD, Martins TB, Hill HR, Litwin CM. Immunoglobulin A antibodies to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1997; 35:2999-3000.
194. Annibale B, Lahner E, Santucci A, Vaira D, Pasquali A, Severi C, Mini R, Figura N, Delle Fave G. CagA and VacA are immunoblot markers of past *Helicobacter pylori* infection in atrophic body gastritis. *Helicobacter*. 2007; 12:23-30.
195. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402:656-60.
196. Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*. 2004; 25:426-57.
197. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. Role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001; 409:194-8.
198. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50:1714-9.
199. Murdolo G, Lucidi P, Di Loreto C, Parlanti N, De Cicco A, Fatone C, Fanelli CG, Bolli GB, Santeusanio F, De Feo P. Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes*. 2003;52:2923-7.
200. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001;50:707-9.
201. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3997-4000.
202. Griffen SC, Oostema K, Stanhope KL, Graham J, Styne DM, Glaser N, Cummings DE, Connors MH, Havel PJ. Administration of Lispro insulin with meals improves glycemic control, increases circulating leptin, and suppresses ghrelin, compared with regular/NPH insulin in female

- patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:485-91.
203. Soriano-Guillén L, Barrios V, Lechuga-Sancho A, Chowen JA, Argente J. Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res.* 2004;55:830-5.
204. Martos-Moreno GA, Barrios V, Soriano-Guillén L, Argente J. Relationship between adiponectin levels, acylated ghrelin levels, and short-term body mass index changes in children with diabetes mellitus type 1 at diagnosis and after insulin therapy. *Eur J Endocrinol.* 2006;155:757-61.
205. Celi F, Bini V, Papi F, Santilli E, Ferretti A, Mencacci M, Berioli MG, De Giorgi G, Falorni A. Circulating acylated and total ghrelin and galanin in children with insulin-treated type 1 diabetes: relationship to insulin therapy, metabolic control and pubertal development. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;63:139-45.
206. Martos-Moreno GA, Barrios V, Soriano-Guillén L, Argente J. Relationship between adiponectin levels, acylated ghrelin levels, and short-term body mass index changes in children with diabetes mellitus type 1 at diagnosis and after insulin therapy. *Eur J Endocrinol.* 2006;155:757-61.
207. Isomoto H, Nakazato M, Ueno H, Date Y, Nishi Y, Mukae H, Mizuta Y, Ohtsuru A, Yamashita S, Kohno S. Low plasma ghrelin levels in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am J Med.* 2004;117:429-32.
208. Campana D, Nori F, Pagotto U, De Iasio R, Morselli-Labate AM, Pasquali R, Corinaldesi R, Tomassetti P. Plasma acylated ghrelin levels are higher in patients with chronic atrophic gastritis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(5):761-6.
209. Kawashima J, Ohno S, Sakurada T, Takabayashi H, Kudo M, Ro S, Kato S, Yakabi K. Circulating acylated ghrelin level decreases in accordance with the extent of atrophic gastritis. *J Gastroenterol.* 2009;44:1046-54.
210. Checchi S, Montanaro A, Pasqui L, Ciuoli C, Cevenini G, Sestini F, Fioravanti C, Pacini F. Serum ghrelin as a marker of atrophic body gastritis in patients with parietal cell antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4346-51.

211. Rindi G, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, Cocchi D, Paolotti D, Solcia E. Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:521-5.
212. Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5052-9.
213. Srivastava A, Kamath A, Barry SA, Dayal Y. Ghrelin expression in hyperplastic and neoplastic proliferations of the enterochromaffin-like (ECL) cells. *Endocr Pathol.* 2004;15:47-54.
214. Tsolakis AV, Stridsberg M, Grimelius L, Portela-Gomes GM, Falkmer SE, Waldum HL, Janson ET. Ghrelin immunoreactive cells in gastric endocrine tumors and their relation to plasma ghrelin concentration. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42:381-8.
215. Tsolakis AV, Grimelius L, Stridsberg M, Falkmer SE, Waldum HL, Saras J, Janson ET. Obestatin/ghrelin cells in normal mucosa and endocrine tumours of the stomach. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:941-9.
216. Corbetta S, Peracchi M, Cappiello V, Lania A, Lauri E, Vago L, Beck-Peccoz P, Spada A. Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3117-20.
217. Ekeblad S, Lejonklou MH, Grimfjård P, Johansson T, Eriksson B, Grimelius L, Stridsberg M, Ståhlberg P, Skogseid B. Co-expression of ghrelin and its receptor in pancreatic endocrine tumours. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66:115-22.
218. Tsolakis AV, Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Sundin A, Eriksson BK, Oberg KE, Janson ET. Malignant gastric ghrelinoma with hyperghrelinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3739-44.
219. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW Jr, Taub DD. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest.* 2004;114:57-66.
220. Granado M, Priego T, Martín AI, Villanúa MA, López-Calderón A. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E486-92.

221. Chorny A, Anderson P, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Ghrelin protects against experimental sepsis by inhibiting high-mobility group box 1 release and by killing bacteria. *J Immunol.* 2008;180:8369-77.
222. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology.* 2006;130:1707-20.
223. Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H, Theil J, von Hörsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin. *J Immunol.* 2009;183:2859-66.
224. Berilgen MS, Bulut S, Ustundag B, Tekatas A, Ayar A. Patients with multiple sclerosis have higher levels of serum ghrelin. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005;26:819-22.
225. Kämpers P, Horn R, Brabant G, Woywodt A, Schiffer M, Haller H, Haubitz M. Serum leptin and ghrelin correlate with disease activity in ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:484-7.
226. Peracchi M, Conte D, Terrani C, Pizzinelli S, Gebbia C, Cappiello V, Spada A, Bardella MT. Circulating ghrelin levels in celiac patients. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:2474-8.
227. Peracchi M, Bardella MT, Caprioli F, Massironi S, Conte D, Valenti L, Ronchi C, Beck-Peccoz P, Arosio M, Piodi L. Circulating ghrelin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2006;55:432-3.
228. Meecham J, Jones EW. Addison's disease and Addisonian anaemia. *Lancet.* 1967;1:535-8.
229. Toh BH, van Driel IR, Gleeson PA. Pernicious anemia. *N Engl J Med.* 1997;337:1441-8.
230. Lahner E, Annibale B. Pernicious anemia: new insights from a gastroenterological point of view. *World J Gastroenterol.* 2009;15:5121-8.
231. Wood IJ, Ralston M, Ungar B, Cowling DC. Vitamin B12 deficiency in chronic gastritis. *Gut.* 1964;5:27-37.
232. Siurala M, Varis K, Wiljasalo M. Studies of patients with atrophic gastritis: a 10-15-year follow-up. *Scand J Gastroenterol.* 1966;1:40-8.
233. Rose MS, Doniach D, Chanarin I, Brostoff J, Ardeman S. Intrinsic-factor antibodies in absence of pernicious anaemia. 3-7 year follow-up. *Lancet.* 1970;2:9-12.

234. Irvine WJ, Cullen DR, Mawhinney H. Natural history of autoimmune achlorhydric atrophic gastritis. A 1-15-year follow-up study. *Lancet*. 1974;2:482-5.
235. Shevell MI, Rosenblatt DS. The neurology of cobalamin. *Can J Neurol Sci*. 1992;19:472-86.
236. Lindenbaum J, Heaton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med*. 1988;318:1720-8.
237. Dickey W, Kenny BD, McMillan SA, Porter KG, McConnell JB. Gastric as well as duodenal biopsies may be useful in the investigation of iron deficiency anaemia. *Scand J Gastroenterol*. 1997;32:469-72.
238. Annibale B, Capurso G, Chistolini A, D'Ambra G, DiGiulio E, Monarca B, DelleFave G. Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms. *Am J Med*. 2001;111:439-45.
239. Hershko C, Hoffbrand AV, Keret D, Souroujon M, Maschler I, Monselise Y, Lahad A. Role of autoimmune gastritis, *Helicobacter pylori* and celiac disease in refractory or unexplained iron deficiency anemia. *Haematologica*. 2005;90:585-95.
240. Hershko C, Ronson A, Souroujon M, Maschler I, Heyd J, Patz J. Variable hematologic presentation of autoimmune gastritis: age-related progression from iron deficiency to cobalamin depletion. *Blood*. 2006;107:1673-9.
241. Howitz J, Schwartz M. Vitiligo, achlorhydria, and pernicious anaemia. *Lancet*. 1971;1:1331-4.
242. Albahary C, Martin S, Sourisseau A. [Autoimmune Biermer's disease and chronic thrombocytopenic purpura. An uncommon association]. *Nouv Presse Med*. 1980;9:1034.
243. Rabinowitz AP, Sacks Y, Carmel R. Autoimmune cytopenias in pernicious anemia: a report of four cases and review of the literature. *Eur J Haematol*. 1990 ;44:18-23.
244. Feldt-Rasmussen U, Bech K, Bliddal H, Høier-Madsen M, Jørgensen F, Kappelgaard E, Nielsen H, Lanng Nielsen J, Ryder LP, Thomsen M. Autoantibodies, immune complexes and HLA-D in thyrogastric autoimmunity. *Tissue Antigens*. 1983 ;22:342-7.

245. Carmel R, Spencer CA. Clinical and subclinical thyroid disorders associated with pernicious anemia. Observations on abnormal thyroid-stimulating hormone levels and on a possible association of blood group O with hyperthyroidism. *Arch Intern Med.* 1982;142:1465-9.
246. Segni M, Borrelli O, Pucarelli I, Delle Fave G, Pasquino AM, Annibale B. Early manifestations of gastric autoimmunity in patients with juvenile autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4944-8.
247. Centanni M, Marignani M, Gargano L, Corleto VD, Casini A, Delle Fave G, Andreoli M, Annibale B. Atrophic body gastritis in patients with autoimmune thyroid disease: an underdiagnosed association. *Arch Intern Med.* 1999;159:1726-30.
248. Elisei R, Mariotti S, Swillens S, Vassart G, Ludgate M. Studies with recombinant autoepitopes of thyroid peroxidase: evidence suggesting an epitope shared between the thyroid and the gastric parietal cell. *Autoimmunity.* 1990;8:65-70.
249. Centanni M, Gargano L, Canettieri G, Viceconti N, Franchi A, Delle Fave G, Annibale B. Thyroxine in goiter, *Helicobacter pylori* infection, and chronic gastritis. *N Engl J Med.* 2006;354:1787-95.
250. Checchi S, Montanaro A, Pasqui L, Ciuli C, De Palo V, Chiappetta MC, Pacini F. L-thyroxine requirement in patients with autoimmune hypothyroidism and parietal cell antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:465-9.
251. Juncà J, Flores A, Granada ML, Jiménez O, Sancho JM. The relationship between idiopathic thrombocytopenic purpura and pernicious anaemia. *Br J Haematol.* 2000;111:513-6.
252. Hirota WK, Zuckerman MJ, Adler DG, Davila RE, Egan J, Leighton JA, Qureshi A, Rajan E, Fanelli R, Wheeler-Harbaugh J, Baron TH, Faigel DO; Standards of Practice Committee, American Society for Gastrointestinal Endoscopy. ASGE guideline: the role of endoscopy in the surveillance of premalignant conditions of the upper GI tract. *Gastrointest Endosc.* 2006;63:570-80.
253. Sjöblom SM, Sipponen P, Järvinen H. Gastroscopic follow up of pernicious anaemia patients. *Gut.* 1993;34:28-32.

254. Armbrecht U, Stockbrügger RW, Rode J, Menon GG, Cotton PB. Development of gastric dysplasia in pernicious anaemia: a clinical and endoscopic follow up study of 80 patients. *Gut*. 1990;31:1105-9.
255. De Block CE, Colpin G, Thielemans K, Coopmans W, Bogers JJ, Pelckmans PA, Van Marck EA, Van Hoof V, Martin M, De Leeuw IH, Bouillon R, Van Gaal LF. Neuroendocrine tumor markers and enterochromaffin-like cell hyper/dysplasia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:1387-93.
256. Kokkola A, Sjöblom SM, Haapiainen R, Sipponen P, Puolakkainen P, Järvinen H. The risk of gastric carcinoma and carcinoid tumours in patients with pernicious anaemia. A prospective follow-up study. *Scand J Gastroenterol*. 1998 ;33:88-92.
257. Gilligan CJ, Lawton GP, Tang LH, West AB, Modlin IM. Gastric carcinoid tumors: the biology and therapy of an enigmatic and controversial lesion. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:338-52.
258. Hirschowitz BI, Griffith J, Pellegrin D, Cummings OW. Rapid regression of enterochromaffinlike cell gastric carcinoids in pernicious anemia after antrectomy. *Gastroenterology*. 1992;102:1409-18.
259. Ferraro G, Annibale B, Marignani M, Azzoni C, D'Adda T, D'Ambra G, Bordi C, delle Fave G. Effectiveness of octreotide in controlling fasting hypergastrinemia and related enterochromaffin-like cell growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:677-83.
260. Sjöblom SM, Sipponen P, Järvinen H. Gastroscopic follow up of pernicious anaemia patients. *Gut* 1993;34:28-32.
261. Riley WJ, Toskes PP, Maclaren NK, Silverstein JH. Predictive value of gastric parietal cell autoantibodies as a marker for gastric and hematologic abnormalities associated with insulin-dependent diabetes. *Diabetes*. 1982;31:1051-5.
262. Maclaren NK, Riley WJ. Thyroid, gastric, and adrenal autoimmunities associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1985 Sep-Oct;8 Suppl 1:34-8.
263. Betterle C, Zanette F, Pedini B, Presotto F, Rapp LB, Monciotti CM, Rigon F. Clinical and subclinical organ-specific autoimmune manifestations in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients and their first-degree relatives. *Diabetologia*. 1984;26:431-6.

264. De Block CE, De Leeuw IH, Rooman RP, Winnock F, Du Caju MV, Van Gaal LF. Gastric parietal cell antibodies are associated with glutamic acid decarboxylase-65 antibodies and the HLA DQA1*0501-DQB1*0301 haplotype in Type 1 diabetes mellitus. *Belgian Diabetes Registry. Diabet Med.* 2000;17:618-22.
265. Perros P, Singh RK, Ludlam CA, Frier BM. Prevalence of pernicious anaemia in patients with Type 1 diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease. *Diabet Med.* 2000;17:749-51.
266. Munichoodappa C, Kozak GP. Diabetes mellitus and pernicious anemia. *Diabetes.* 1970;19:719-22.
267. Davis RE, McCann VJ, Stanton KG. Type 1 diabetes and latent pernicious anaemia. *Med J Aust.* 1992;156:160-2.
268. Ungar B, Stocks AE, Martin FI, Whittingham S, Mackay IR. Intrinsic-factor antibody, parietal-cell antibody, and latent pernicious anaemia in diabetes mellitus. *Lancet.* 1968;2:415-7.
269. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta.* 2003;329:9-22.
270. Skikne BS. Serum transferrin receptor. *Am J Hematol.* 2008; 83:872-5.
271. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood.* 1990; 75:1870-6.
272. De Block CE, Van Campenhout CM, De Leeuw IH, Keenoy BM, Martin M, Van Hoof V, Van Gaal LF. Soluble transferrin receptor level: a new marker of iron deficiency anemia, a common manifestation of gastric autoimmunity in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2000;23:1384-8.
273. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care.* 2010;33:S11-61.
274. Logan RH, Dill S, Bauer FE, Walker MM, Hirschl AM, Gummett PA. The European C-breath test for the detection of *Helicobacter pylori*. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 1991; 3: 915-921.
275. Osawa H, Nakazato M, Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiiya T, Satoh K, Ishino Y, Sugano K. Impaired production of gastric ghrelin in chronic gastritis associated with *Helicobacter pylori*. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:10-6.

276. Torgerson TR. Regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Springer Sem Immunopathol* 2006; 28: 63-76.
277. Marazuela M, García-López MA, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sánchez B, Monsiváis-Urenda A, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3639-46.
278. Lundgren A, Strömberg E, Sjöling A, Lindholm C, Enarsson K, Edebo A, Johnsson E, Suri-Payer E, Larsson P, Rudin A, Svennerholm AM, Lundin BS. Mucosal FOXP3-expressing CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect Immun.* 2005;73:523-31.

Annex
