

INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E INMUNOLOGIA

Aspectos inmunológicos en la enfermedad celíaca

*Dra. María Nila Santos Lagresa**

*Lic. Rinaldo Villaescusa Blanco***

*Lic. René Rivero Jiménez****

*Dr. Heriberto Vidal Rodríguez*****

*Dr. Benito Bernal Carrero******

*Dr. Eladio Blanco Rabassa******

Santos Lagresa, M. N. y otros: *Aspectos inmunológicos en la enfermedad celíaca.*

Se estudian ocho pacientes con enfermedad celíaca, siete de los cuales se encontraban sin tratamiento y uno con dieta libre de gluten. Se les evaluó la inmunidad celular, humoral, niveles de oligoelementos y función leucocitaria. Los niveles de IgA sérica estaban elevados en el 37,5% de los casos, lo que coincidió con la presencia de inmunocomplejos circulantes. Se indica que los estudios celulares mostraron una baja respuesta a la fitohemaglutinina y la concanavalina A en comparación con los controles. Los valores disminuidos de transformación blástica coincidieron con bajos niveles de hierro y zinc en el 75 y el 63,5% de los casos respectivamente. El índice fagocítico del polimorfonuclear se encontró deprimido en el 62,5 y el 37,5% de los pacientes presentaron alteraciones en la reducción del azul de nitrotetrazolio. Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de ampliar el estudio, particularmente en aquellos pacientes con niveles de hierro y zinc normales.

* Médico Especialista de I Grado en Inmunología, Instituto de Hematología e Inmunología.

** Licenciado en Bioquímica, Jefe Sección Inmunología, Instituto de Hematología e Inmunología.

*** Licenciado en Microbiología, Jefe Sección Producción Reactivos Biológicos, Instituto de Hematología e Inmunología.

**** Médico Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica, Jefe de Departamento de Anemias Nutricionales, Instituto de Hematología e Inmunología.

***** Médico Especialista de I Grado en Pediatría, Jefe Sección de Inmunología Clínica, Instituto de Hematología e Inmunología.

***** Médico Especialista de II Grado en Pediatría, Jefe del Servicio de Pediatría, Instituto de Gastroenterología.

INTRODUCCION

La enfermedad celíaca es una enfermedad del intestino delgado caracterizada por trastornos funcionales y cambios estructurales que pueden llegar a la atrofia completa e infiltrado inflamatorio.¹

Hace más de 25 años se demostró que el gluten era el agente causal y se plantearon dos teorías sobre el origen de la misma. La primera plantea una deficiencia enzimática, y la segunda, que la enfermedad ocurre por una reacción de hipersensibilidad al gluten, o a alguno de sus componentes al nivel de la mucosa intestinal.² Diversas investigaciones han demostrado alteraciones inmunológicas en pacientes con esta enfermedad,^{3,4} como son trastornos en la función del linfocito T, en los niveles de inmunoglobulinas y la frecuencia de inmunocomplejos circulantes; muchos de estos parámetros han sido evaluados aisladamente en diferentes individuos con estadios clínicos heterogéneos.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar un grupo de pacientes celíacos para lograr una evaluación integral del sistema inmune en estos enfermos, así como la determinación de oligoelementos y ácido fólico.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 8 pacientes (4 masculinos y 4 femeninos) con una edad promedio de 7 años (rango de 6-11 años) con el diagnóstico de enfermedad celíaca, provenientes del Servicio de Pediatría del Instituto de Gastroenterología. Uno de los pacientes tenía dieta libre de gluten, el resto se encontraba sin tratamiento.

La inmunidad celular se evaluó a través de la formación de roseta espontánea (RE)⁵ y la roseta activa (RA)⁶ que permiten cuantificar los linfocitos T.

Las células B se estudiaron con sueros antiinmunoglobulina humana: anti total (anti γ , anti ϵ , anti μ), anti IgA (anti α) y anti IgM (anti μ) marcados con isocianato de fluoresceína (Hyland Lab. USA)⁷ y la roseta mediada por complemento (EAC).⁸

Los linfocitos con receptores Fc se evaluaron por la técnica de roseta mediada por eritrocitos y anticuerpos (EA)⁹ y la roseta con hematíes humanos del grupo O^{D+} C⁻ sensibilizados con suero humano anti D⁺ C⁺ (roseta tipo Ripley).¹⁰

La actividad funcional de los linfocitos T se estudió por la respuesta a los activadores policlonales fitohemaglutinina (FHA) (Wellcome, HA-15, USA) y concanavalina A (Con A) (Sigma Lab. USA).¹¹ Para la evaluación del porcentaje de blastos se utilizó la coloración con naranja de acridina.

La función de los leucocitos polimorfonucleares se evaluó por la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT),¹² el índice fagocítico con *Candida albicans*¹³ y la adherencia a fibra de nylon por una combinación de técnicas descritas por *McGregor*¹⁴ y *Klempner*.¹⁵

Los niveles de inmunoglobulinas séricas se evaluaron por el método de inmunodifusión radial simple,¹⁶ utilizando placas de cuantificación comerciales (Behring Institute, RFA).

El complemento hemolítico total se determinó por la técnica propuesta por Mayer¹⁷ y los niveles de C₃, C₄ y C_{3d} por inmunodifusión radial simple empleando antiseros específicos. (Central Laboratorie of Blood Transfusion, Holanda).

Los inmunocomplejos circulantes se midieron por la técnica de inhibición de la roseta EAC,¹⁸ presencia de inmunoconglutinas,¹⁹ actividad complementaria²⁰ y precipitación con polietilenglicol 6 000 a una concentración final de 3,75%.²¹

Los niveles de cobre, zinc, calcio, y magnesio se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica.²²⁻²⁵

El hierro sérico, la capacidad total e índice de saturación por el método descrito por Loria.²⁶ El ácido fólico sérico por la técnica de Watara.²⁷

Los valores normales de roseta y actividad funcional del linfocito se obtuvieron de 30 niños normales; los de inmunoglobulinas de superficie del linfocito en 13 niños evaluados paralelamente con los pacientes. Los valores normales del resto de los parámetros proceden del estudio de 30 individuos sanos con edades comprendidas dentro del rango de los pacientes investigados.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra la distribución de los pacientes por edad, sexo, raza y los resultados obtenidos en los parámetros evaluados en la inmunidad celular, donde se observa una disminución cuantitativa de la población total de linfocitos T a través de la roseta espontánea ($56,3 \pm 11,7\%$) y la roseta activa ($30,0 \pm 10,0\%$) en comparación con los controles normales ($73,8 \pm 8,8\%$ y $40,2 \pm 6,9$ respectivamente) lo cual es estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Esto coincidió con una depresión en la función de estas células en respuesta a la estimulación con la FHA ($33,1 \pm 8,9\%$) y la Con A ($32,8 \pm 14,8\%$) al compararlas con los controles que fueron de $45,0 \pm 6,0\%$ y $43,5 \pm 6,5\%$ respectivamente ($p < 0,001$).

La población de linfocitos B se encontró dentro de los valores normales evaluadas mediante la determinación de inmunoglobulinas de superficie; mientras que las subpoblaciones de linfocitos con receptores para C₃ y Fc se encontraron disminuidas en el 62,5 y 100% de los casos respectivamente,

En el 50% de los pacientes se demostraron inmunocomplejos circulantes, lo que coincidió con valores bajos de C₃ y un aumento en el producto de ruptura C_{3d} (tabla 2).

En la tabla 3 se observa que las concentraciones de zinc y hierro se encontraron por debajo de los límites normales en el 62,5 y 75% de los pacientes respectivamente el índice de saturación fue bajo en el 87,5% en cambio los niveles de ácido fólico fueron normales.

Los niveles de inmunoglobulina sérica fueron normales, excepto en tres de los casos que presentaron un aumento de IgA.

La función leucocitaria más efectuada fue el índice fagocítico en un 68,5% de los pacientes a los 15 y 60 minutos (tabla 5).

Tabla 1. *Parámetros celulares estudiados en pacientes con enfermedad celiaca*

Paciente No.	Sexo /Edad (Años)	Marcadores					Inmunoglobulinas de superficie			Transformación blástica		
		Raza	RE %	RA %	REAC %	REA %	IMPLEY (%)	Antitonal (%)	Anti IgA (%)	Anti IgM (%)	FHA (%)	Con A (%)
1	F 5	B	56	20	16	17	15	15	15	9	34	37
2	M 5	B	54	16	6	11	13	25	19	7	38	40
3	M 11	B	64	26	5	12	10	30	28	4	33	30
4	F 5	B	55	46	6	12	0	8	18	15	36	27
5	F 7	B	40	26	15	17	6	18	16	15	28	42
6	F 6	M	41	34	27	13	6	27	20	7	26	19
7	M 8	B	71	32	21	14	10	10	18	8	20	10
8	M 10	M	70	40	5	11	13	11	16	14	50	58
Pacientes $\bar{x} \pm DS$			56,3±11,7	30 ±10	12,6± 3,4	12,3± 2,4	9,1± 4,9	18 ± 8,4	18,7± 4,0	9,8± 4,2	33,1± 8,9	32,8±14,8
Rango			44,6-68,0	20 -40	4,2-21,0	0,3-14,7	4,2-14,0	9,6-26,4	14,7-22,7	5,6-14,0	24,2-42,0	18 -47,6
Controles $\bar{x} \pm DS$			73,0± 8,8	40,2± 6,9	25 ± 9,0	24 ± 6,0	12,5± 6,5	16,5± 8,5	12,5 ± 5,5	12 ± 4,0	45 ± 6,0	43,5 ± 6,5
Normales Rango			65 -92,6	33,3-47,1	16 -34	18 -30	6 -19,0	8 -25,0	7 -18,0	8 -16	39 -51	37 -50

$\bar{X} \pm DS$: media \pm desviación estándar

RE: roseta espontánea

RA: roseta activa

REAC: roseta mediada por complemento

REA: roseta mediada por la porción FC de la IgG

FHA: fitohemaglutinina

ConA: concanavalina A

Tabla 2. *Inmunocomplejos circulantes y niveles de complemento en pacientes con enfermedad celiaca*

Paciente (No.)	Inmunocomplejos circulantes				Complemento			
	Inhibi- ción Rose- ta EAC (%)	Actividad Anticomplementaria (Uds. CH ₅₀ Residuales)	Precipitación PEG 6 000 (Uds. D.O.)	Título inmunocon- glutininas	Complemento hemolítico total (CH ₅₀)	C4 (mg/dl)	C3 (mg/dl)	C3d (µg/dl)
1	0	1,25	0,01	1: 64	25,7	25	60	12,1
2	40	1,10	0,04	1:128	26,5	19	36,5	18,2
3	50	0,98	0,06	1:128	28,8	28	37	20,5
4	10	1,35	0,018	1: 32	26,8	30	70	11,1
5	35	0,96	0,025	1:128	25,6	18,3	42	16,8
6	20	1,15	0,015	1: 64	30,0	40,1	63	11,4
7	38	1,25	0,03	1:128	22,1	25	38	NR
8	12	1,40	0,02	1: 32	27,5	35	85	10,8
Controles normales	≤ 25	1,05 — 1,60	0,004 — 0,022	≤ 1: 64	21 — 34	20 — 35	50 — 120	7,4 — 15

U.D.O.: *Unidades de densidad óptica*

NR: *No realizado*

Tabla 3: Niveles del oligoelemento en pacientes con enfermedad celíaca

Paciente No.	Calcio (mg/dl)	Magnesio (mg/dl)	Cobre (µg/dl)	Zinc (µg/dl)	Hierro (mg/dl)	Capacidad Total (mg/dl)	Índice de Saturación (%)	Ácido Fólico (ng/dl)
1	8,2	1,9	98,2	76,1	38	383	10	6,3
2	9,0	2,2	110,0	55,5	36	464	8	3,6
3	8,6	2,2	94,6	72,2	16	371	4	5,4
4	8,4	1,9	96,8	85,1	31	377	8,2	NR
5	9,3	2,0	99,1	70,3	40	365	9	5,3
6	10,8	2,1	100,4	86,2	45	374	12	4,6
7	8,1	1,9	98,6	78,1	68	462	14,7	5,1
8	8,5	2,1	100,2	82,2	63	450	17	4
Controles normales	10-12	1,8-2,5	80-130	80-130	60-160	250-400	16-50	3-20

NR: No realizado.

Tabla 4: *Concentración de las inmunoglobulinas séricas en pacientes con enfermedad celiaca*

Paciente No.	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)
1	900	150	120
2	950	550	55
3	1050	600	58
4	1200	200	85
5	950	530	52
6	1000	400	90
7	1320	150	220
8	950	230	130
Controles normales	800-1800	90-450	60-250

Tabla 5: *Función leucocitaria en pacientes con enfermedad celiaca*

Paciente (No.)	Indice fagocítico (%)	NBT (%)	Adherencia (%)
1	t- 0' = 100	11	89,8
	t-15' = 70		
	t-60' = 64		
2	t- 0' = 100	7	76,7
	t-15' = 68		
	t-60' = 73		
3	t- 0' = 100	7	75,1
	t-15' = 100		
	t-60' = 85		
4	t- 0' = 100	10	80,1
	t- 5' = 66,3		
	t-60' = 43,4		
5	t- 0' = 100	6	79,4
	t-15' = 45		
	t-60' = 12,1		
6	t- 0' = 100	8	80,3
	t-15' = 50		
	t-60' = 9,8		
7	t- 0' = 100	0	88,8
	t-15' = 221		
	t-60' = 9,2		
8	t- 0' = 100	9	88,0
	t-15' = 47,4		
	t-60' = 66,2		
Controles normales	t- 0' = 100 t-15' = 25-59 t-60' = 10-20	4-12	78-100

t- 0': fagocitosis inicial

t- 15': fagocitosis a los 15 minutos

t- 60': fagocitosis a los 60 minutos

DISCUSION

Los principales resultados en nuestro trabajo fueron la disminución en la población de linfocitos T y las alteraciones funcionales en respuesta a la FHA; también se encontraron variaciones en las subpoblaciones de linfocitos con receptores para C₃ y Fc, lo que plantea un trastorno general de las células inmunocompetentes en estos pacientes.

Es importante señalar las alteraciones demostradas en el suero, las cuales pudieran explicar los trastornos en el linfocito T, como son: la disminución de hierro y zinc en el 75 y 62% de los casos respectivamente, y es interesante el resultado obtenido en el paciente número 8, el cual tenía una inmunocompetencia normal con valores adecuados de los mencionados oligoelementos. Esto plantea la necesidad de ampliar el estudio con un mayor número de pacientes con niveles normales de estos oligoelementos, pues ha sido demostrado el papel central de los mismos para un funcionamiento adecuado de los linfocitos T, existiendo experiencias en las cuales con tratamiento de hierro y zinc se logra un restablecimiento de la inmunidad celular de tipo T en individuos desnutridos.²⁸

Otro dato interesante es la demostración de inmunocomplejos circulantes, lo que puede estar en relación con la alteración funcional del linfocito.^{28,30} La presencia de complejos solubles brinda la oportunidad de evaluar el componente antigénico del mismo, lo que pudiera facilitar el estudio del papel del sistema inmune en la patogenia de esta enfermedad.

Las alteraciones de la función leucocitaria pueden ser secundarias a los bajos niveles de los oligoelementos,²⁸ a la presencia de los complejos circulantes que pueden alterar la función de estas células a través del bloqueo de sus receptores para inmunoglobulinas, o bien a ambos factores.

Consideramos que nuestro trabajo ofrece una visión integral acerca de las alteraciones inmunológicas en la enfermedad celíaca, lo cual puede contribuir a un mejor manejo clínico. Es recomendable continuar este estudio en un mayor número de pacientes.

SUMMARY

Santos Lagresa, M. N. et al. *Immunologic aspects in the celiac disease.*

Eight patients undergoing celiac disease are studied. Seven of the patients have not treatment and one has free gluten diet. Tolthem, cell and humoral immunity, oligoelement levels and leukocyte function were evaluated. Serum IgA levels were high in 37.5% of the cases, which agreed with occurrence of circulating immunocomplexes. Cell studies showed a poor response to phytohemagglutinin and concanavilin A when are compared with the controls. Decreased blastic transformation values were related to low iron and zinc levels in 75% and 63.5% of the cases, respectively. Polymorphonuclear phagocytic index was found to be lower in 62.5% of the cases, and 37.5% of the patients presented alterations in nitroblue tetrazolium reduction. Results obtained suggest the need of extending the study, particularly in those patients with normal iron and zinc levels.

RÉSUMÉ

Santos Lagresa, M. N. et al. *Aspects immunologiques dans la maladie coeliaque.*

L'étude a porté sur huit sujets atteints de maladie coeliaque, dont sept étaient sans traitement et un suivait un régime libre de gluten. On a évalué l'immunité cellulaire,

humorale, les taux d'oligoéléments et la fonction leucocytaire. Les taux d'IgA sérique étaient élevés dans 37,5% des cas, ce qui a coïncidé avec la présence d'immunocomplexes circulants. Les études cellulaires ont montré une faible réponse à la phytohématagglutinine et à la concanavaline A par rapport aux témoins. Les valeurs diminuées de transformation blastique ont coïncidé avec de faibles taux de fer et de zinc dans 75 et 63,5% des cas, respectivement. L'indice phagocytaire du polymorphonucléaire était déprimé dans 62,5% des cas et 37,5% des malades ont présenté des altérations dans la réduction du bleu de nitrotétrazolium. Les résultats obtenus suggèrent le besoin d'approfondir l'étude, notamment chez les malades ayant des taux de fer et de zinc normaux.

BIBLIOGRAFIA

1. *Fontaine, J. L. y colaboradores*: Small intestinal biopsy in cow's milk protein allergy in infancy. *Arch Dis Child* 50: 357, 1975.
2. *Ferguson, A.*: Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract. *Ferguson, A.* (Ed), M.R.S.C. R. N., MTP Press, London, 154, 1976.
3. *Brown, I. L. y colaboradores*. Autoantibodies in children with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 13: 373, 1973.
4. *Blecher, T. E. y colaboradores*. Serum immunoglobulins and lymphocyte transformation studies in coeliac disease. *GUT* 10: 57, 1969.
5. *Bach, J. F.*: Evaluation of T cells and tymphic serum factors in man using the rosette technique. *Transplant Rev* 16: 196, 1973.
6. *Felsburg, P. J. y colaboradores*: The active E-rosette test. A sensitive *in vitro* correlate for human delayed type hypersensitivity. *J. Immunol* 118: 62, 1977.
7. *Hudson, L. y colaboradores*: Practical immunology. *Hudson, L., F. C. Hay* (Eds). Blackwell Scientific publications. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1979. P. 46.
8. *Ehlen Berger, A. G. y colaboradores*: In vitro methods in cell-mediated an tumor immunity. *Blom B. R., J. R. David*; (Eds). Academic Press. New York, San Francisco, London. 1976. P. 123.
9. *Gutiérrez, F. y colaboradores*: Citotoxicidad dependiente de anticuerpos en seres humanos. Relación entre células linfoides con receptores Fc y ADCC. *Sangre* 24: 135, 1979.
10. *Santos, M. N. y colaboradores*: Técnica de roseta para la identificación de linfocitos con receptores Fc para anticuerpos Rh anti C⁺D⁺ (manuscrito en preparación)
11. *Galeazzi, R. y colaboradores*: Cyclic variation in the response of lymphocyte to phytohemagglutinin in healthy individuals. *Transplantation* 13: 550, 1973.
12. *Okamura, K.*: An improved nitro blue tetrazolium test and his correlation with toxic neutrophils. *Am J Clin Path* 62: 27, 1974.
13. *Leijh, P. C. J. y colaboradores*: Kinetics of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* infection and immunity, 17: 313, 1977.
14. *McGregor, R. R. y colaboradores*: Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin measured with an assay system. *N Engl J Med* 291: 642, 1974.
15. *Klempner, M. S. y colaboradores*: Separation and functional characterization of human neutrophil subpopulations. *Blood* 51: 659, 1978.
16. *Mancini, G. y colaboradores*: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2: 235, 1965.
17. *Mayer, M. M.*: Complement and complement fixation. *Experimental Immunochemistry*. *Kabat, E. A.; M. M. Mayer* (Eds.) Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 1961. P. 133.

18. *Hayward, A. R. y colaboradores:* Inhibition of complement dependent lymphocyte rosette formation. *Ann Rheum Dis* 36: 21, 1977.
19. *Hautaneu, A. y colaboradores:* Use of Elisa for measuring immuncongulinins. *J Imm Methods* 21: 4, 1978.
20. *Johnson, A. y col.:* Detection of circulating immunecomplexes in pathological sera. *Lancet* 1: 762, 1975.
21. *Hasková, V. y colaboradores:* Simple method of circulating immune complexes detection in human sera by polyethyleneglycol precipitation. *Immun Forsch* 154: 399, 1978.
22. *Ichida, T. y colaboradores:* Determination of serum copper with atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem Acta* 14: 294, 1969.
23. *Hackley, B. M. y colaboradores:* A simplified method for plasma zinc determination by atomic absorption Spectrophotometry. *Clin Chem* 14: 1, 1968.
24. *Willis, J. B.:* The determination of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopy. II Magnesium. *Spectrochim Acta* 16: 273, 1960.
25. *Willis, J. B.:* The determination of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopy I. Calcium. *Spectrochim Acta* 16, 259, 1960.
26. *Loria, A. y colaboradores:* Técnicas de dosificación sérica de hierro y capacidad de fijación de hierro. *Rev Invest Clin (México)* 20: 34, 1966.
27. *Watara, A. H. y colaboradores:* Studies on the folic acid activity of human serum. *J Clin Path* 14: 335, 1961.
28. *Chandra, R. K.:* Deficiencies of minerals and trace elements. *Arnold, D. (Ed.). The Camelot Press Ltd. South ampton. London, 1980. P. 45.*
29. *Moore, D. L. y colaboradores:* PHA induce lymphocyte transformations in leukocyte cultures from malarious, malnourished and control gambian children. *Clin Exp Immunol* 17: 647, 1974.
30. *Moore, D. L. y colaboradores:* Effects of autologous plasma and lymphocyte transformation in malaria and acute protein-energy malnutrition. Comparison of purified lymphocyte and whole blood cultures. *Immunology* 33: 777, 1977.

Recibido: 4 de abril de 1984

Aprobado: 18 de mayo de 1984

Dra. *María Nila Santos Lagresa*

Instituto de Hematología e Inmunología

Apartado 8070

Ciudad de La Habana 8

Cuba