

Tiempo de exposición al gluten y marcadores de riesgo de diabetes mellitus insulino dependiente en pacientes celíacos

Sandra Verbeke P^{1a}, Sylvia Cruchet M^{1,4}, Martín Gotteland R^{1b}, Gloria Ríos M², Bessie Hunter M³, Eduardo Chávez C⁴, Oscar Brunser T¹, Magdalena Araya Q¹.

Risk markers for insulin-dependent diabetes mellitus and duration of exposure to gluten in celiac patients

Background: Celiac patients are at high risk of developing insulin-dependent diabetes mellitus, a condition that has a long pre-diabetic period. During this lapse, anti-islet cell antibodies serve as markers for future disease. This may be related with the duration of the exposure to gluten. **Aim:** To test the hypothesis that long term adherence to a gluten free diet decreases the frequency of risk markers for insulin dependent diabetes mellitus during adolescence and early adulthood. **Patients and methods:** 158 celiac patients were classified as: G1, (n=30 patients) studied at the time of diagnosis; G2 (n=97 patients) exposed to gluten as a result of non compliance with the gluten free diet and, G3 (n=31 patients) who had maintained a long term, strict gluten free diet. Isotype IgG anti-islet cell antibodies were detected by indirect immunofluorescence using monkey pancreas; results were reported in Juvenile Diabetes Foundation (JDF) units. **Results:** Celiac patients exposed to a gluten containing diet had a significantly higher prevalence of anti-islet cell antibodies than those who had been exposed only briefly ($p < 0.017$). In addition, a significantly higher prevalence of anti-islet cell antibodies was observed in those patients whose exposure to gluten was longer than 5 years than in those whose exposure was shorter ($p < 0.02$). **Conclusions:** Celiac patients long exposed to gluten have a significantly higher prevalence of anti-islet cell antibodies than those exposed for a short period. This fact supports the hypothesis that the development of these antibodies is associated with the length of the exposure to gluten (Rev Méd Chile 2004; 132: 979-84). **(Key Words:** Diabetes mellitus, type I; Gluten-sensitive enteropathy; Pancreatic beta cells; Pre-diabetic state)

Recibido el 19 de diciembre, 2003. Aceptado en versión corregida el 21 de junio, 2004. Financiado por: Proyecto Fondecyt 101-0578, DID EO63/97, DID 065/97, PG 08/97, Universidad de Chile.

¹Unidad de Gastroenterología, División de Nutrición Humana, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, Macul 5540, Santiago, Chile. ²Gastroenterología Pediátrica, Hospital Clínico Exequiel González Cortés, Santiago, Chile. ³Hospital Luis Calvo Mackenna, Santiago, Chile. ⁴Unidad de Gastroenterología Pediátrica, Hospital San Borja Arriarán, Santiago, Chile.

^aDoctor en Bioquímica

^bDoctor en Fisiología

Correspondencia a: Dra. Sandra Verbeke P. Unidad de Gastroenterología, INTA, Universidad de Chile, Casilla 138-11, Santiago, Chile. Tel: 56-2-6781523. Fax: 56-2-2214030. E mail: sverbeke@globalcom.cl

La enfermedad celíaca es una enteropatía gluten-dependiente que puede presentar una amplia variedad de manifestaciones clínicas, digestivas o extradigestivas. Existe un daño importante de la mucosa intestinal y se detectan anticuerpos, que sirven para el diagnóstico de esta enfermedad, a la vez que aportan evidencia sobre los mecanismos autoinmunes involucrados en su desencadenamiento¹⁻³. Aunque se ha demostrado que los pacientes celíacos tienen mayor riesgo de asociación con otras patologías autoinmunes que la población general, tales como hipotiroidismo, lupus, artritis reumatoidea o diabetes mellitus insulino-dependiente⁴⁻⁶, aún no ha sido posible establecer las causas que determinan este incremento de riesgo^{7,8}. Los grupos de Ventura y Toscano también mostraron que los pacientes a quienes se diagnosticó tardíamente la enfermedad celíaca, y por ende habían estado expuestos al gluten por mayor tiempo, presentaban una mayor prevalencia de asociación con dichas patologías autoinmunes que quienes fueron diagnosticados tempranamente^{7,8}.

Algunos estudios han evaluado la posible asociación entre diabetes mellitus y enfermedad celíaca a través de la medición de anticuerpos anti células del islote pancreático (ICA) como índice predictivo de la aparición de diabetes tipo I en sus pacientes, encontrando una prevalencia de 4,5% a 6,6%, semejante a la de parientes en primer grado de diabéticos insulino-dependientes⁹⁻¹¹. Estos anticuerpos son indicadores de agresión autoinmune sobre las células β pancreáticas y su aparición en pacientes con enfermedad celíaca estaría relacionada con el posible desarrollo futuro de esta forma de diabetes^{12,13}.

El objetivo de este estudio fue medir la frecuencia de aparición de anticuerpos ICA en pacientes celíacos y analizar si dicha frecuencia está relacionada con la adherencia y duración de la dieta sin gluten.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes. Se incluyeron 158 pacientes celíacos diagnosticados según los criterios revisados de la *European Society of Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (EPSGHAN)³, es decir, con al menos dos biopsias de la mucosa intestinal que muestran las lesiones histológicas características y anticuerpos antiendomiso (EmA) positivos. Los pa-

cientes o sus tutores fueron interrogados respecto del mantenimiento de la dieta sin gluten y su condición clínica con el fin de correlacionar sus comentarios con los hallazgos histológicos y del laboratorio. Los pacientes fueron divididos en 3 grupos: G1) 30 niños estudiados al momento del diagnóstico (varones: 33,3%; <3 años) con dieta sin restricción de gluten; G2) 97 pacientes celíacos (varones: 40,2%; mediana para la edad: 15,0 años, [rango: 4-46 años]) considerados «expuestos» al gluten por no haber mantenido una dieta estricta o por haber sido diagnosticados después de los 4 años de edad. Estos pacientes presentaban daño histológico de mediana intensidad o intenso de la mucosa intestinal, y eran reiteradamente EmA positivos; la duración promedio de su exposición al gluten era de 11,5 años (5-39 años). El grupo G3 incluyó 31 pacientes (varones: 58,1%, mediana para la edad: 11,5 años, [rango: 3-23 años]), considerados «no expuestos» al gluten, quienes declaraban haber mantenido una dieta estrictamente libre de gluten por más de 5 años (10 años como promedio, rango 3-18 años); estos sujetos tenían una biopsia de mucosa intestinal normal y EmA reiteradamente negativos. Ninguno de los pacientes incluidos en este estudio presentaba otra condición o patología asociada, tal como diabetes mellitus insulino dependiente ni antecedentes familiares de autoinmunidad.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile; los pacientes o sus tutores, en el caso de menores de edad, fueron informados detalladamente y dieron su consentimiento por escrito para la obtención de las respectivas muestras de sangre.

Métodos. En todos los casos se obtuvo una muestra de sangre y se separó el suero, el que fue alicuotado y conservado a -20°C hasta su procesamiento. Los anticuerpos EmA isotipo IgA se detectaron por inmunofluorescencia indirecta utilizando esófago de mono (*The Binding Site, Cambridge, UK*) como sustrato y antisuero anti-cadena alfa humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Sigma Chemical Company*) como conjugado. Fueron observados en un microscopio de epifluorescencia e informados como positivos o negativos según el patrón característico.

I. Screening: Los anticuerpos ICA isotipo IgG fueron detectados por inmunofluorescencia indi-

recta utilizando un kit comercial que emplea páncreas de mono (*IMMCO Diagnostics, Buffalo, NY, USA*) como sustrato. Brevemente, las muestras (suero o plasma), previamente descongeladas y en la dilución adecuada se incubaron por 60 min sobre el sustrato mencionado a temperatura ambiente; posteriormente los cortes se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se incubaron con antisuero anti-cadena gamma humana conjugado con FITC. A continuación las preparaciones fueron lavadas con PBS y montadas con glicerol para su observación. Se utilizaron controles positivos y negativos provistos por el mismo kit comercial.

II. Determinación de las unidades JDF en las muestras ICA positivas: Las muestras que arrojaron un resultado positivo en el screening anterior fueron diluidas en forma seriada, al igual que el control positivo provisto por el fabricante [valorado en Unidades JDF (*Juvenile Diabetes Foundation*)], y procesadas como se describió anteriormente. Los resultados finales fueron informados de manera semicuantitativa; los títulos fueron calculados como la inversa de la última dilución en la que se observó un patrón positivo, y expresados en unidades JDF mediante la siguiente fórmula:

$$U \text{ JDF de la muestra} = \frac{\text{Título de la muestra} \times U \text{ JDF del control (+)}}{\text{Título del control (+)}}$$

Para el análisis de los resultados se utilizaron la prueba de chi cuadrado (χ^2) y el test exacto de Fisher.

detección de anticuerpos ICA fue 1/30 (3,3%) en el G1; 24/97 (24,7%) en el G2 y 1/31 (3,2%) en G3. Mientras que los resultados arrojaron diferencias significativas ($p < 0,017$) entre los grupos G1 (al diagnóstico) y G2 («expuestos»), la comparación no fue estadísticamente significativa para los grupos G1 y G3 («no expuestos») (Tabla 2).

Los pacientes del G2 que habían transgredido la dieta e ingerido gluten («expuestos») por más de 5 años ($n=68$), mostraron una positividad de ICA significativamente mayor ($n=22$, 32,4%) que aquellos «expuestos» por menos de 5 años ($n=29$, ICA positivos=2; 6,9%) ($p < 0,02$). Cuando el corte se efectuó a los 10 años se apreció una tendencia, sin llegar a valores significativamente diferentes; los pacientes con una «exposición» al gluten por más de 10 años ($n=65$), mostraban porcentaje de positividad de ICA mayor ($n=19$; 29,2%) que aquellos «expuestos» por períodos menores de 10 años ($n=32$; ICA positivo=5; 15,6%). Si tenemos en cuenta la distribución de los individuos ICA positivos respecto de la duración de la exposición al gluten en el grupo G2, los resultados muestran que la frecuencia de positividad de ICA aumenta cuando la «exposición» al gluten sobrepasa los 5 años (22/68 [32,4%] vs 2/29 [6,9%]); ($p < 0,02$) (Tabla 3).

En los pacientes cuyos anticuerpos ICA eran positivos, los resultados fueron expresados en Unidades JDF. La Tabla 4 muestra que todos los pacientes presentaron valores entre 40 y 160 U JDF excepto uno, cuyo nivel fue 20 U JDF.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra las características más relevantes de los pacientes estudiados. La frecuencia de

DISCUSIÓN

La enfermedad celiaca es considerada actualmente una patología frecuente¹⁴; su diagnóstico precoz

Tabla 1. Características de los pacientes celíacos estudiados

	G1* (n=30)	G2* (n=97)	G3* (n=31)
Rango de edades (años)	0-3	4-46	3-23
Varones/mujeres	10/20	39/58	18/13
Duración de la exposición (años)	<3	>3	>3

*G1: al momento del diagnóstico; G2: pacientes celíacos «expuestos» al gluten por no mantener un régimen estricto libre de gluten; G3: pacientes celíacos «no expuestos» quienes mantenían una dieta estricta libre de gluten.

Tabla 2. Anticuerpos anticélulas de islote pancreático (ICA) en pacientes celíacos expuestos y no expuestos al gluten

	G1* (n=30)	G2* (n=97)	G3* (n=31)
ICA positivos	1/30 (3,33%)	24/97 (24,74%)	1/31 (3,22%)

G1 vs G2: p <0,017 (test exacto de Fisher)

*G1: al momento del diagnóstico; G2: pacientes celíacos «expuestos» al gluten por no mantener un régimen estricto libre de gluten; G3: pacientes celíacos «no expuestos» quienes mantenían una dieta estricta libre de gluten.

Tabla 3. Frecuencia de aparición de ICA en relación al tiempo de exposición al gluten en pacientes celíacos expuestos al gluten

Pacientes Expuestos, ICA positivos (n=24)		
<5 años	2/29	(6,9%)
>5 años	22/68	(32,4%)

< 5 años vs >5 años: p< 0,02

Tabla 4. Descripción de las Unidades JDF obtenidas en el grupo de pacientes expuestos al gluten, que presentaron ICA positivo, con menos (2/24) y más de 5 años de exposición (22/24).

Se indica la edad al momento del estudio, identificando a los pacientes transgresores y aquellos que fueron diagnosticados después de los 4 años

Años exposición	Paciente N°	Unidades JDF	Edad (años)	Sexo	Transgresores	Al diagnóstico
<5	1	80	9	M	X	
<5	2	40	4	M		X
>5	3	160	11	M		X
>5	4	160	16	F		X
>5	5	160	11	M		X
>5	6	160	15	M	X	
>5	7	80	25	M	X	
>5	8	80	11	F	X	
>5	9	80	14	F	X	
>5	10	40	17	F	X	
>5	11	40	18	F	X	
>5	12	40	19	F	X	
>5	13	80	25	F	X	
>5	14	40	25	F	X	
>5	15	40	26	F	X	
>5	16	40	43	F	X	
>5	17	80	14	F	X	
>5	18	80	42	F		X
>5	19	40	29	F		X
>5	20	160	46	F		X
>5	21	80	21	F		X
>5	22	40	18	M	X	
>5	23	80	13	F	X	
>5	24	20	14	M	X	

es muy importante para el crecimiento y desarrollo normales del niño. Recientemente ha cobrado importancia la búsqueda de asociaciones de la enfermedad celiaca con otras patologías autoinmunes, que interfieren con su evolución, el adecuado manejo clínico de los pacientes y su calidad de vida^{3,15,16}. Un estudio multicéntrico realizado en 1999 por Ventura y cols, reveló que cuando el diagnóstico de la enfermedad celiaca es tardío, la asociación con otras enfermedades autoinmunes aumenta, lo que según estos autores probablemente estaría relacionado con una mayor duración de la exposición al gluten. Los resultados mostraron que el riesgo de asociación con otra enfermedad autoinmune aumentaba de 3,3% en aquellos pacientes diagnosticados en los primeros años de vida, a 26,3% en quienes fueron diagnosticados después del tercer año de vida⁷. Posteriormente Toscano y cols, al igual que Ventura, demostraron que los enfermos celíacos constituyen un grupo de alto riesgo de asociación con otras patologías autoinmunes, explorando el posible papel del gluten en la inducción de autoanticuerpos y relacionando sus resultados con la duración de la exposición y el grado de adhesión del paciente a la dieta sin gluten⁸.

Los estudios retrospectivos comentados permiten plantear que si el tiempo de exposición al gluten aumenta el riesgo de asociación de enfermedades autoinmunes, sería interesante contar con marcadores serológicos que pusieran en evidencia esta posible asociación. Dado que los anticuerpos anti-islole pancreático (ICA) han sido propuestos como un marcador prodrómico de diabetes mellitus insulino-dependiente, en este estudio evaluamos si era posible demostrar diferencias en la frecuencia de aparición de ICA entre enfermos celíacos que tuvieran mayor o menor tiempo de exposición al gluten.

Nuestros resultados muestran que, al momento del diagnóstico, 3,3% de los pacientes celíacos diagnosticados antes de los 36 meses de vida ya manifiestan este marcador, lo que concuerda con los hallazgos de Ventura y cols; además estos porcentajes concuerdan con lo expresado por otros autores quienes han estudiado la aparición de este anticuerpo confirmando su valor predictivo para IDDM en sus pacientes⁹⁻¹¹. Dichos estudios indicaron que la prevalencia de ICA es de aproximadamente 4,5% a 6,6%, semejante a la de

parientes de primer grado de diabéticos insulino-dependientes. Más aún, en el estudio de Ventura et al, se demostró que 3,9% de los pacientes celíacos ya manifestaban IDDM al momento del diagnóstico. En nuestro caso demostramos además que los pacientes expuestos al gluten, ya sea por transgresiones frecuentes en la dieta o por haber sido diagnosticados después de los 36 meses de vida, presentaron una frecuencia de aparición de ICA significativamente mayor (24,7% vs 3,3%), y que en los que llevaban más de 5 años de exposición al gluten la presencia de ICA se incrementó aún más (32,4% vs 6,9%).

Al realizar el corte teniendo como punto de separación 10 años de exposición, consideramos que en nuestro caso los resultados no arrojaron diferencia significativa, aunque sí una tendencia, debido a que el número de casos no es suficiente. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que a mayor tiempo de exposición al gluten es mayor el riesgo de aparición de autoanticuerpos (ICA). De la misma manera, los pacientes celíacos que mantienen una dieta libre de gluten estricta (no expuestos) tienen una frecuencia de aparición de ICA similar a la observada en el grupo al momento del diagnóstico (3,2% vs 3,3%), en concordancia con la hipótesis en discusión.

La IDDM se caracteriza por una larga fase prodrómica, con destrucción autoinmune, progresiva y selectiva, de las células pancreáticas β . En esta fase, que precede por años al inicio de la enfermedad, es posible detectar marcadores serológicos predictivos tales como autoanticuerpos ICA, anti-insulina (IAA) y anti-glutámico decarboxilasa (GAD); sin embargo, para pensar en medidas de prevención es necesario obtener un valor significativo de ICA, entre 20 y 80 unidades JDF¹².

En los pacientes celíacos, la dieta libre de gluten hace que los marcadores propios de la enfermedad tales como los EmA y anti-transglutaminasa (tTG) se vuelvan negativos; sin embargo, una vez que los autoanticuerpos aparecen, como es el caso de los antitiroideos e ICA, ya no se volverán negativos^{11,12}. Vale la pena resaltar la falta de paralelismo entre la desaparición de los anticuerpos específicos de EC en los pacientes tratados con dieta libre de gluten, en comparación con la persistencia de los otros autoanticuerpos asociados, ya que no se ha logrado demostrar que la dieta, por

sí misma, sea capaz de aminorar los otros desórdenes orgánicos relacionados; esto indicaría que algunos mecanismos, una vez puestos en marcha no se detienen ni revierten. Esto agrega importancia a la necesidad de un diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca para iniciar inmediatamente la dieta sin gluten, de manera de reducir el riesgo de aparición de otros autoanticuerpos y disminuir la posibilidad de desarrollar enfermedades autoinmu-

nes asociadas^{7,16,17}. Los resultados de este estudio resaltan la importancia del diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca y de la necesidad de un régimen sin gluten estricto y mantenido; además, sugieren que la búsqueda de marcadores serológicos es una herramienta útil para detectar posibles asociaciones en pacientes que, a pesar de mantener una dieta libre de gluten, presentan complicaciones en su respuesta a la dieta y en su evolución.

REFERENCIAS

1. FARRELL RJ, KELLY CP. Celiac sprue. *N Engl J Med* 2002; 346: 180-8.
2. FERGUSON A, ARRANZ E, O'MAHONEY S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease active, silent, latent, potential. *Gut* 1993; 34: 150-1.
3. WALKER-SMITH JA, GUANDALINI S, SCHMITZ J, SHMERLING DH, VISAKORPI JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of working group of European Society of Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-11.
4. KUMAR V, RAJADHYAKSHA M, WORTMAN J. Celiac disease associated autoimmune endocrinopathies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 678-85.
5. COOPER BT, HOLMES GKT, COOKE WT. Coeliac disease and immunological disorders. *BMJ* 1978; 1: 537-9.
6. NOT T, TOMMASINI A, TONINI G, BURATTI E, POCECCO M, TORTUL C ET AL. Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001; 44: 151-5.
7. VENTURA A, MAGAZZU G, GRECO L. Duration of exposure to gluten a risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 297-303.
8. TOSCANO V, CONTI FG, ANASTASI E, MARIANI P, TIBERTI C, POGGI M ET AL. Importance of gluten in the induction of endocrine autoantibodies and organ dysfunction in adolescent celiac patients. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1742-8.
9. RAPOPORT MJ, BISTRITZER T, VARDI O, BROIDE E, AZIZI A, VARDI P. Increased prevalence of diabetes related autoantibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 23: 524-7.
10. DI MARIO U, ANASTASI E, MARIANI P, BALLATI G, PERFETTI R, TRIGLIONE P ET AL. Diabetes related autoantibodies do appear in children with coeliac disease. *Acta Paediatr* 1992; 81: 593-7.
11. GALLI-TSINOPOULOU A, NOUSIA-ARVANITAKIS S, DRACOUACOS D, XEFTERI M, KARAMOUZIS M. Autoantibodies predicting diabetes mellitus type I in celiac disease. *Horm Res* 1999; 52: 119-24.
12. BONIFACIO E, BINGLEY PJ, SHATTOCK M, DEAN BM, DUNGER D, GALE EA ET AL. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990; 335: 147-9.
13. VERGE CF, STENGER D, BONIFACIO E, COLEMAN PG, PILCHER C, BINGLEY PJ ET AL. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibody) in type 1 diabetes. *Diabetes* 1998; 47: 1857-66.
14. FERGUSON A, GILLET H, HUMPHREYS K, KINGSTON K. Heterogeneity of celiac disease: clinical, pathological, immunological and genetic. *Ann NY Acad Sci* 1998; 859: 112-20.
15. HILL I, BHATNAGAR S, CAMERON D, DE ROSA S, MAKI M, RUSSELL G ET AL. Celiac Disease: Working Group of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35 (suppl 2): 74-7.
16. RUIZ-DÍAZ A, POLANCO I. Exposición al gluten y aparición de enfermedades autoinmunes en la enfermedad celíaca. *Pediatriska* 2002; 22: 311-9.
17. HEKKENS WTH. The quest for gliadin: limit and tolerance. En: Mearin ML, Mulder CJJ (Eds.) *Coeliac disease: 40 years gluten free*. Dordrecht: Kluwer-Wolters Academic Publishers 1991; 101-6.