

Trabajos originales

Instituto Nacional de Endocrinología

CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS ANTIISLOTES DEL ADULTO, DIABÉTICO TIPO I DE RECIENTE DIAGNÓSTICO, FAMILIARES DE PRIMER GRADO DE DIABÉTICOS TIPO 1 Y DIABETES GESTACIONAL

Lic. Eduardo Cabrera Rode,¹ Lic. Gisela Molina,² Lic. Oscar Díaz-Horta,² Lic. Alexis Rendón,³ Dr. Pedro Perich,⁴ Dr. Leonel Suárez,⁵ Lic. Claudio Tiberti,⁶ Lic. Humberto Vargas,⁷ Lic. María Teresa Baldor,⁷ Lic. Sandra Piquer,⁸ Dr. Manuel Puig-Domingo,⁹ Dr. Alberto de Leiva,¹⁰ Dr. Umberto DiMario¹¹ y Dr. Manuel E. Licea Puig¹²

RESUMEN

Se estudiaron las características de los sueros con anticuerpos antiislotos pancreáticos (ICA+) títulos, ICA sobre páncreas de ratón (ICA-NR), reactividad

-
- ¹ Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar. Instituto Nacional de Endocrinología.
 - ² Licenciada en Bioquímica. Investigadora Aspirante. Instituto Nacional de Endocrinología.
 - ³ Licenciado en Biología. Investigador Acreditado. Instituto Nacional de Endocrinología.
 - ⁴ Doctor en Medicina. Especialista de II Grado en Endocrinología. Profesor Asistente. Instituto Nacional de Endocrinología.
 - ⁵ Doctor en Medicina. Residente en Endocrinología. Instituto Nacional de Endocrinología.
 - ⁶ Licenciado en Biología. Policlínico Humberto I. Clínica Médica 2, Universidad de Roma «La Sapienza», Roma, Italia.
 - ⁷ Licenciado en Bioquímica. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
 - ⁸ Licenciada en Biología. Servicio de Diabetes, Endocrinología y Nutrición. Hospital de la Santa Creu I Sant Pau. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
 - ⁹ Profesor Asociado en Endocrinología. Servicio de Diabetes, Endocrinología y Nutrición. Hospital de la Santa Creu I Sant Pau. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
 - ¹⁰ Catedrático en Medicina. Director del Servicio de Diabetes, Endocrinología y Nutrición. Hospital de la Santa Creu I Sant Pau. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
 - ¹¹ Profesor Primario en Endocrinología. Policlínico Umberto I, Clínica Médica 2, Universidad de Roma, «La Sapienza», Roma, Italia.
 - ¹² Especialista de II Grado en Endocrinología. Investigador Titular. Profesor Auxiliar. Instituto Nacional de Endocrinología, La Habana.

a extractos glucolipídicos pancreáticos (REGP) y asociación a anticuerpos anti-GAD65) en diferentes grupos de sujetos: diabetes autoinmune del adulto (LADA, n = 20), diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico (DMIDrd, n = 43), familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 (FPG, n = 31) y mujeres con diabetes gestacional (DG, n = 10). Se detectaron ICA e ICA-NR por la técnica de inmunofluorescencia indirecta y los anticuerpos anti-GAD65, por un método RIA de inmunoprecipitación. Se utilizó la fase superior de extractos pancreáticos humanos que contienen glucolípidos para medir REGP de los ICA. Se determinaron las características de los ICA en los diferentes grupos: *LADA*: alta frecuencia en sus títulos (≥ 80 unidades JDF) (80 %), anticuerpos anti-GAD65 (100 %) y baja frecuencia de ICA-NR (15 %) y REGP (15 %); *DMIDrd*: alta frecuencia de anticuerpos anti-GAD65 (72 %), ICA-NR (81 %) y REGP (86 %); *FPG*: alta frecuencia de ICA-NR (93 %) y REGP (87 %); *DG*: Bajos títulos de ICA (< 20 unidades JDF) (60 %) y alta frecuencia de REGP (80 %), aunque la REGP fue generalmente parcial. Se comprobó que en los grupos estudiados, el proceco de pérdida de la tolerancia inmunológica es disímil porque los ICA reconocen a determinantes antigénicos diferentes. Estos resultados son también importantes para seleccionar el marcador inmunológico correcto para la predicción del proceso autoinmune en cada entidad.

Descriptores DeCS: DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDIENTE/ /inmunología; DIABETES GESTACIONAL/inmunología; ANTICUERPOS/ /análisis; ISLOTES DE LANGERHANS/inmunología.

La diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas productoras de insulina.¹

Los anticuerpos antiislotos pancreáticos (ICA) siguen siendo los mejores marcadores de riesgo para el desarrollo de la DMID.² Hasta ahora, ninguno de los otros anticuerpos descritos individualmente han podido desplazar al ICA como el marcador principal de la DMID.³

Los ICA se han encontrado con mayor frecuencia (60-90 %) en pacientes diabéticos insulino-dependientes recién diagnosticados clínicamente (DMIDrd), mientras que esta frecuencia va disminuyendo a medida que aumenta la duración de la enfermedad.^{4,5} Estos anticuerpos también están presentes en el 9 al 24 % de los diabéticos caracterizados inicialmente como tipo II o diabetes autoinmune latente del adulto (LADA o AIDA).⁵⁻⁸ La frecuencia de ICA en familiares no diabéticos de primer grado (padres, hermanos e hijos) de los

diabéticos tipo I (FPG) oscila entre 0,9 y 9,0 %^{4,5} y entre 1,6 - 38 % en la diabetes gestacional (DG).^{5,9} En los individuos sanos sin ninguna historia de diabetes esta prevalencia es sólo de 0 - 1,6 %.^{4,5}

En la actualidad se conoce la naturaleza de algunos de los antígenos presentes en las células de los islotes pancreáticos que están relacionados con la autoinmunidad: la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), el gangliósido GM2-1 y la enzima tirosina fosfatasa (IA2/ICA512).¹⁰⁻¹⁵

Se ha descrito que los ICA son heterogéneos por su diferente: a) patrón de tinción de los islotes pancreáticos humanos, b) reactividad hacia páncreas de ratón y c) reactividad contra algunos determinantes antigénicos de las células de los islotes.

En 1992, 2 grupos de investigadores independientemente reportaron^{16,17} la existencia de 2 tipos de ICA en diabéticos tipo 1 y familiares de primer grado, un subtipo minoritario de ICA que reaccionan con páncreas humanos y de ratas, pero no

reaccionan con páncreas de ratón, mostrando un patrón de tinción restrictivo a las células β (ICA-R), las cuales parecen ser que van directamente contra el GAD.¹⁷ En contraste, hay otro subtipo de ICA+ con patrón no restrictivo (ICA-NR) que reacciona con los páncreas humano, de rata y de ratón, tiñe completamente las células de los islotes y no va dirigido contra el GAD. Este último tiene un alto valor predictivo en el desarrollo de la diabetes tipo I.

El propósito de nuestro trabajo fue conocer las diferencias entre los sueros ICA+ de los sujetos con LADA, DMIDrd, DG y FPG en relación con el título de ICA, tipo de reactividad de los ICA sobre páncreas de ratón (ICA-NR), así como a extractos glucolípidos pancreáticos (REGP) y asociación con la presencia de anticuerpos anti-GAD65.

MÉTODOS

TEJIDOS

Las secciones de páncreas congeladas utilizadas como sustrato para la determinación de ICA por inmunofluorescencia indirecta⁹ fueron obtenidas del páncreas humano de un fallecido de grupo sanguíneo O con tiempo de isquemia (desde la muerte hasta la congelación del tejido) de 50 min.

Las secciones de páncreas de 8 ratones BALB/C de 10 sem de nacidos fueron también usadas para determinar la reactividad de los ICA en páncreas de ratón por el método de inmunofluorescencia indirecta.⁹

SUEROS

Los sueros analizados fueron obtenidos de: 43 pacientes con DMIDrd, 20 pacientes con LADA, 31 FPG y 10 muje-

res con DG previamente identificados todos como ICA positivos (ICA \geq 10 UJDF).

ANTICUERPOS ANTIISLOTES EN PÁNCREAS HUMANO (ICA)

Determinamos los ICA por el método de inmunofluorescencia indirecta con incubación prolongada (18 h) a 4 °C⁹ en presencia de aprotinina (400 UI/mL⁻¹, aprotinina Novo, Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), utilizamos secciones de páncreas humanos sobre láminas previamente gelatinadas. Diluimos las muestras de sueros seriadamente en PBS-aprotinina (PBS-A, pH 7,4). Para el revelado utilizamos anti-IgG humana de cabra marcada con fluoresceína (1:64, Kallestad, Austin, Tx, USA). Expresamos los títulos de ICA en unidades JDF, comparamos la dilución final de cada suero positivo con una curva estándar de dilución de un suero de referencia suministrado por el Taller Internacional de Inmunología de la Diabetes. Consideramos positivos los títulos de ICA iguales o mayores de 10 unidades JDF. Nuestro laboratorio muestra una validez, una sensibilidad y una especificidad del 100 % en los talleres internacionales de mejoramiento del ICA.

ANTICUERPOS ANTIISLOTES EN PÁNCREAS DE RATÓN

Utilizamos secciones de páncreas de ratones BALB/C de 10 sem de nacidos. Para detectar los ICA, utilizamos el mismo método descrito para páncreas humano. Incubamos las secciones pancreáticas de ratones con los sueros humanos diluidos (1:2) con PBS-A, pH 7,4.

EXTRACCIÓN DE GLUCOLÍPIDOS

Los páncreas humanos los obtuvimos de 4 donantes de órganos (grupo sanguíneo

O; con edades entre 30 y 55 años). El tiempo máximo de isquemia fue de 3 h. Congelamos los páncreas en nitrógeno líquido inmediatamente después de su obtención y los mantuvimos a -70 °C hasta su uso en la extracción glucolípídica.

El tejido pancreático lo homogeneizamos con 2 volúmenes de agua fría en una batidora por 2 min, dentro de una cámara fría. Los glucolípidos los extrajimos 2 veces con 20 volúmenes de cloroformo-metanol-agua (C-M-A) por gramo de tejido, en una proporción final de 4:8:3. Los glucolípidos polares los separamos de otros lípidos por partición de fase.¹⁸ La fase superior fue secada, redisuelta en cloroformo-metanol 1:4 y desalada en una columna de sephadex LH-20. La fase superior desalada fue secada y redisuelta en agua para su liofilización.

Separamos la fracción cruda de glucolípidos polares en 3 fracciones (Neutral, 0,01M KAc y 0,1M KAc) sobre una columna Fractogel TSK, DEAE, como se ha descrito anteriormente,¹⁴ con el fin de conocer sus capacidades de inhibición sobre los sueros ICA positivos a las secciones pancreáticas de ratón. La composición de gangliósidos¹⁴ de la fracción glucolípídica cruda es: monosialogangliósidos (0,01M KAc): GM3, GM2, 3'-isoLM1, 3'LM1, GM1, Fuc 3'isoLM1; disialogangliósidos (0,1M KAc): GD3, GD1a, 3'6' isoLD1, GD2, GD1b y oligosialogangliósidos (0,1M): GT1b. Los gangliósidos 3'LM1 y 3'isoLM1 tienen una movilidad en HPTLC entre los gangliósidos patrones GM2 y GM1 de cerebro humano.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LOS ICA

Medimos la habilidad del extracto glucolípídico de páncreas humano, para inhibir la unión de los ICA a las secciones

pancreáticas, mediante la técnica de *Colman* y otros^{12,14} con algunas modificaciones. Utilizamos 200 µL de suero ICA positivo diluido en PBS-A (2 diluciones inferiores al título final para obtener un eficiente efecto de inhibición), adicionamos en duplicado a tubos que contenían el extracto glucolípídico lio-filizado y las fracciones (Neutral, 0,01M KAc, 0,1M KAc, respectivamente), además adicionamos a tubos sin extracto o fracciones como controles. Es decir, la fase superior de los extractos pancreáticos humanos y las fracciones que contenían glucolípidos las utilizamos para preabsorber las muestras de sueros antes de la detección de ICA sobre páncreas humano.

La reactividad total, parcial o nula de la reacción de los ICA a los extractos glucolípídicos pancreáticos (REGP) la definimos como total, parcial o sin pérdida de la actividad fluorescente en presencia del extracto glucolípídico pancreático (EGP) o fracciones, respectivamente.

EVALUACIÓN DE LA FLUORESCENCIA

Dos investigadores evaluaron cada preparación independientemente por lo cual no fueron informados sobre la identidad de la muestra, la dilución, el tipo de incubación (con y sin EGP) y del efecto de REGP del ICA.

Realizamos todos los análisis visuales a ciegas, con muestras analizadas una a continuación de la otra sobre secciones consecutivas congeladas de páncreas humano y de ratón.

ANTICUERPOS ANTI-GAD65

Detectamos los anticuerpos anti-GAD65 por inmunoprecipitación con

GAD65 recombinante, transcrito, traducido y marcado con ³⁵S-metionina.¹⁹ Realizamos todas las muestras por duplicado, incluyendo los sueros estándar positivos y negativos. Informamos los valores para anti-GAD65 utilizando la fórmula:

$$\frac{(\text{media de cpm muestra desconocida}) - (\text{media de cpm control negativo})}{(\text{media de cpm control positivo}) - (\text{media de cpm control negativo})}$$

Las muestras con valores de anticuerpos anti-GAD65 por encima de la media \pm 3 DE de la población control fueron consideradas positivas. No encontramos anticuerpos anti-GAD65 en 100 sujetos no diabéticos y sin antecedentes familiares de diabetes. En el primer programa de mejoramiento del GAD en los Talleres de Inmunología de la Diabetes (Orlando, FL) nuestro ensayo mostró una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 100 %.

Empleamos el *test* exacto de Fisher para comparar diferencias en frecuencias entre los grupos estudiados, el de correlación de rangos de Spearman, para comparar el grado

de correlación entre anticuerpos anti-GAD65, ICA-NR, REGP de los ICA y títulos de ICA. Los valores de p por debajo de 0,05 los consideramos estadísticamente significativos.

RESULTADOS

ANTICUERPOS CONTRA LAS CÉLULAS DE LOS ISLOTES EN PÁNCREAS HUMANO (ICA)

Al analizar los títulos de los ICA en los distintos grupos estudiados, observamos que los altos títulos (ICA \geq 80 UJDF) fueron significativamente más frecuentes en la diabetes autoinmune del adulto (80 %) que en los pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente (39 %), mujeres con diabetes gestacional (10 %) y familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 (32 %) (tabla 1).

Los títulos de ICA $<$ 20 UJDF fueron más frecuentes en la DG (60 %, 6/10) en comparación con los pacientes con DMIDrd (21 % 9/43, p = 0,022) y LADA (10 % 2/20, p = 0,072) (tabla 1).

TABLA 1. Frecuencia de títulos altos y bajos en ICA, ICA sobre páncreas de ratón (ICA-NR), anticuerpos anti-GAD65 y reactividad a extractos glucolipídicos pancreáticos de los ICA (REGP) en diabéticos con autoinmunidad latente del adulto (LADA), tipo 1 (DMID), familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 (FPG) y diabetes gestacional (DG)

	ICA \geq 80JDF N (%)	ICA $<$ 20JDF N (%)	ICA-NR N (%)	AbGAD65 N (%)	REGP T Y P N (%)	REGP TOTAL N (%)
	abc			ghi		
LADA n = 20	16(80)*	2(10)	3(15)	20(100)*	3(15)	2(10)
DMID n = 43	17(39)	9(21)	fg 5(81)*	gi 31(72)*	f 37(86)*	f 25(58)*
FPG n = 31	10(32)	9(29)	fg 29(93)*	12(39)	f 27(87)*	f 19(61)*
DG n = 10	1(10)	de 6(60)*	2(20)	1(10)	k 8(80)*	3(30)

N: Número de casos positivos. n: Número de casos.

* p < 0,05.

**ANTICUERPOS CONTRA
LAS CÉLULAS DE LOS ISLOTES
EN PÁNCREAS DE RATÓN (ICA-NR)**

La reactividad de los ICA sobre páncreas de ratón (ICA-NR) en pacientes con DMID y FPG (81 % y 93 %,

respectivamente) es mayor que en la DG (20 %) y LADA (15 %) (tabla 1).

Hubo correlación entre la reactividad de los ICA al páncreas de ratón y los títulos de ICA en DMID sobre páncreas humano ($r=0,52$, $p<0,001$) (tabla 2).

TABLA 2. Características de los sueros ICA+ en pacientes diabéticos tipo 1 de recién diagnóstico (DMID)

Registro No	.ICA(U JDF)	ICA-NR	ANTI-GAD65	REGP
1	40	+	+	T
2	40	+	+	T
3	80	+	+	P
4	20	-	+	T
5	20	-	-	T
6	20	+	+	T
7	10	-	-	T
8	20	+	+	T
9	40	+	+	P
10	80	+	+	T
11	40	+	+	T
12	40	+	+	P
13	640	+	+	N
14	40	+	+	P
15	10	+	+	T
16	10	-	+	T
17	80	+	+	T
18	10	-	+	T
19	80	+	+	T
20	160	+	+	N
21	320	+	+	N
22	10	-	+	T
23	640	+	+	N
24	10	+	+	T
25	10	+	+	T
26	10	+	+	T
27	80	+	+	P
28	80	+	-	P
29	20	+	-	T
30	80	+	-	P
31	80	+	-	N
32	320	+	+	N
33	10	-	+	T
34	40	+	-	P
35	20	+	-	T
36	80	+	-	P
37	40	+	-	T
38	640	+	-	P
39	640	+	+	T
40	20	+	-	P
41	80	+	+	P
42	40	-	+	T
43	40	+	+	T

ICA: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas humano. ICA-NR: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas de ratón. ANTI-GAD65: Anticuerpos antiácido glutámico descarboxilasa. REGP: Reactividad a extractos glucolipídicos pancreáticos de los ICA. T: Total REGP de los ICA; P: Parcial REGP de los ICA; N: Ninguna REGP de los ICA. +: Positivo. -: Negativo.

ANTICUERPOS ANTI-GAD65

La presencia de anticuerpos anti-GAD65 fue superior en los pacientes con LADA (100 %) y DMIDrd (72 %) al compararlos con la DG (10 %) y FPG (39 %) (tablas 1-5). Se encontró correlación entre los títulos de ICA y los anticuerpos anti-GAD65 en FPG ($r=0,49$, $p=0,004$) (tabla 3).

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LOS ICA CON EL EXTRACTO GLUCOLIPÍDICO PANCREÁTICO

La incubación de los sueros ICA+ con la fase superior del extracto glucolipídico pancreático humano (EGP) y la fracción glucolipídica ácida (0,01M KAc) produce una marcada reducción en la reacción de

TABLA 3. Características de los sueros ICA+ en familiares de primer grado de diabéticos de tipo 1

Registro No.	ICA (U JDF)	ICA-NR	ANTI-GAD65	REGP
44	10	+	-	T
45	160	-	-	T
46	10	+	-	T
47	10	+	+	T
48	80	+	-	T
49	10	+	-	T
50	160	+	+	P
51	40	+	-	T
52	40	+	+	T
53	40	+	-	T
54	40	+	-	P
55	40	+	-	T
56	20	+	-	N
57	20	+	+	N
58	320	+	+	P
59	160	+	+	P
60	10	+	-	T
61	640	+	+	P
62	10	-	-	T
63	10	+	-	T
*64	1280	+	+	N
*65	20	+	-	T
*66	10	+	-	T
*67	20	+	+	N
*68	80	+	+	P
*69	80	+	+	P
*70	20	+	-	T
*71	80	+	-	T
*72	20	+	-	T
*73	40	+	+	P
*74	10	+	-	T

ICA: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas humano. Unidad JDF: Juvenil Diabetes Foundation. ICA-NR: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas de ratón. ANTI-GAD65: Anticuerpos antiácido glutámico descarboxilasa. REGP: Reactividad a extractos glucolipídicos pancreáticos de los ICA. T: Total REGP de los ICA. P: Parcial REGP de los ICA. N: Ninguna REGP de los ICA. +: Positivo. -: Negativo. *Desarrollaron diabetes.

TABLA 4. Características de los sueros ICA+ en pacientes con diabetes gestacional (DG)

Registro No.	ICA (U JDF)	ICA-NR	ANTI-GAD65	REGP
75	80	-	-	P
76	10	-	-	P
77	40	-	+	N
78	10	-	-	P
*79	20	-	-	P
*80	20	-	-	N
81	10	-	-	T
82	10	+	-	T
83	10	+	-	T
84	10	-	-	P

ICA: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas humano. Unidad JDF: Juvenil Diabetes Foundation. ICA-NR: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas de ratón. ANTI-GAD65: Anticuerpos antiácido glutámico descarboxilasa. REGP: Reactividad a extractos glucolipídicos pancreáticos de los ICA. T: Total REGP de los ICA. P: Parcial REGP de los ICA. N: Ninguna REGP de los ICA.
+: Positivo. -: Negativo. *Desarrollaron diabetes.

TABLA 5. Características de los sueros ICA+ en pacientes con diabetes autoinmune latente del adulto (LADA)

Registro No.	ICA (u JDF)	ICA-NR	ANTI-GAD65	REGP
85	10 240	-	+	N
86	640	-	+	N
87	10	-	+	N
88	320	+	+	N
89	1 280	-	+	T
90	1 280	-	+	N
91	10 240	-	+	N
92	10	-	+	N
93	1 280	+	+	N
94	80	+	+	N
95	40	-	+	N
96	10 240	-	+	P
97	2 560	-	+	N
98	80	-	+	N
99	80	-	+	N
100	80	-	+	N
101	160	-	+	N
102	320	-	+	N
103	160	-	+	N
104	40	-	+	T
105	40	-	+	N

ICA: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas humano. Unidad JDF: Juvenil Diabetes Foundation. ICA-NR: Anticuerpos antiislotos pancreáticos sobre páncreas de ratón. ANTI-GAD65: Anticuerpos antiácido glutámico descarboxilasa. REGP: Reactividad a extractos glucolipídicos pancreáticos de los ICA. T: Total REGP de los ICA. P: Parcial REGP de los ICA. N: Ninguna REGP de los ICA.
+: Positivo. -: Negativo.

los ICA a la sección pancreática congelada humana. El efecto bloqueador es dosis dependiente y comienza con 4 mg del EGP y 0,025 mg de la fracción 0,01M KAc

glucolipídica ácida. No observamos ninguna inhibición con la fracción neutral y 0,1M KAc glucolipídica ácida, aun cuando fueron empleadas grandes cantidades (tabla 6).

TABLA 6. Efecto bloqueador sobre el ICA de las fracciones y fase superior de un extracto glucolipídico pancreático humano

Fase superior de lípidos y fracciones	Sueros ICA+ No.	Reactividad del ICA después de la incubación con diferentes concentraciones de fase superior del extracto lipídico y fracciones (mg)					
		0,025	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
FS	1	-	-	-	+p	+	+
	2	-	-	-	+p	+	+
	3	-	-	-	+p	+	+
	4	-	-	-	+p	+	+
Fracción neutra	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
Fracción 0,01M de FS	1	+	+	+	+	NR	NR
	2	+	+	+	+	NR	NR
	3	+	+	+	+	NR	NR
	4	+	+	+	+	NR	NR
Fracción 0,1M de FS	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

+: Bloqueo total del ICA. NR: No realizado. +p: Bloqueo parcial del ICA. FS: Fase superior. -: No bloqueo del ICA.
 1 y 2: Sueros ICA positivos (20 unidades JDF) (en duplicado).
 3 y 4: Sueros ICA positivos (80 unidades JDF) (en duplicado).

La total y parcial REGP de los ICA en los pacientes con DMIDrd, FPG y DG está incrementada con respecto a los LADA (86 %, 87 %, 80 % vs 15 %; $p = 0,001$) (tabla 1). La total REGP fue menor en los pacientes con LADA (10 %) que en los sujetos con DMIDrd y FPG (25/43, 58 % y 19/31, 61 %, respectivamente), pero no en comparación con las mujeres con DG (3/10, 30 %) (tabla 1).

La REGP de los ICA no se correlacionó con los títulos de ICA en páncreas humano y de ratón ni con la presencia anticuerpos anti-GAD65 (tablas 2-5).

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra la importancia del conocimiento de la heterogeneidad de los anticuerpos antiisletos y sus posibles implicaciones en

la predicción de una futura insulino-deficiencia.

La diversidad de la naturaleza química de los antígenos reconocidos por estos anticuerpos pudiera ser la explicación de las diferencias entre los grupos estudiados en cuanto a los títulos de ICA. Los estudios de inhibición de los ICA realizados en este trabajo y descritos por otros investigadores así lo comprueban.^{10-17,20,21} Es bien conocido que la naturaleza e intensidad de la respuesta inmune son influenciadas por la estructura química de los antígenos.

En nuestro estudio, la frecuencia de ICA-NR en los pacientes con DMID fue elevada y en la DG fue baja, lo cual se corresponde con lo reportado en la literatura.²⁰⁻²³ Sin embargo, en los FPG los ICA-NR mostraron mayor frecuencia en comparación con otros estudios.^{16,23} La escasa frecuencia de ICA-NR en los LADA y en mujeres con DG^{22,23} nos sugiere que

estos anticuerpos tienen poco valor como marcador de la futura deficiencia insulínica a desarrollarse en estos pacientes. De hecho, 2 mujeres con DG desarrollaron DMID y eran negativas para ICA sobre páncreas de ratón (tabla 4). Por otro lado, en los LADA, el 50 % de los casos presentaban una insulinodeficiencia (péptido C en ayunas disminuido) y de ellos ninguno presentó ICA-NR (datos no mostrados). Además, estos resultados también nos indican que los antígenos de los ICA en los sujetos con LADA y DG se encuentran fundamentalmente en el páncreas humano y no en ratón.

El hecho de que los FPG estudiados que desarrollaron DMID presentaron ICA-NR (tabla 3) junto con los datos reportados por otros investigadores, donde se plantea que todos los familiares ICA+ que progresaron hacia la DMID poseían ICA-NR,^{16,21} sugiere que estos anticuerpos pudieran utilizarse como marcadores complementarios para incrementar el valor predictivo en los FPG con riesgo a desarrollar la DMID, después de la determinación de ICA sobre páncreas humano.

La frecuencia de anticuerpos anti-GAD65 en FPG-ICA+ prediabéticos (48 %), así como la elevada frecuencia en los DMID (70 %), coincide con lo que otros autores señalan sobre la importancia de este anticuerpo en la presentación clínica de la enfermedad.^{20,24} Analizando los anticuerpos anti-GAD como una subpoblación de los ICA, en períodos tempranos de la destrucción de las células β , cuando aún existen pocos antígenos involucrados en la respuesta inmune contra las células secretoras de insulina, la presencia o no de anticuerpos anti-GAD genera importantes variaciones en el título de ICA. En los períodos tardíos del daño de las células β como resultado de la liberación de varios

antígenos del islote, se activan otros clones de linfocitos lo cual produce diversos anticuerpos y la influencia de los anticuerpos anti-GAD en el título de ICA decrece. Es importante resaltar la correlación existente entre los títulos de ICA y los anticuerpos anti-GAD en los FPG, pero no en los pacientes con DMID recién diagnosticados. Esta correlación confirma que al menos parte de la positividad de estos ICA es debido a la reacción con GAD.^{10,11} Además, en este trabajo encontramos que la presencia de anticuerpos anti-GAD en los pacientes con LADA coincide con los resultados de otros investigadores en los cuales la mayoría de los individuos ICA+ presentan anticuerpos anti-GAD (95 %, 18/19).²⁵

Distintos autores señalan que la presencia de anticuerpos anti-GAD es superior a los ICA en los pacientes con LADA,^{25,26} lo que no sucede para el resto de las entidades estudiadas (DMID, FPG y DG).

La baja frecuencia de REGP de los ICA, la baja reactividad con páncreas de ratón y la alta asociación con anticuerpos anti-GAD en los pacientes con LADA, sugiere que probablemente los ICA fundamentalmente van dirigidos hacia GAD en esta entidad. Sin embargo, recientemente *Seissler* y otros²⁷ encontraron que el ICA de los sujetos LADA no reconocen mayoritariamente a los antígenos GAD65 e IA2, por lo cual sugieren que los antígenos de los ICA en esta entidad deberían ser algunos de los descritos para la diabetes tipo 1 (glucolípidos, ICA69, carboxipeptidasa H y Glioma 38) o sería un nuevo antígeno. El presente trabajo demuestra que los glucolípidos, no son los antígenos mayoritarios de los LADA.

Con respecto a la diabetes gestacional, la baja frecuencia de REGP total de los ICA encontrada, además de la escasa presencia de anticuerpos anti-GAD,^{23,28} sugiere que

además de los glucolípidos existe otro antígeno involucrado en la reacción de los ICA contra las células del islote.

La observación de una alta frecuencia de la REGP de los ICA en los pacientes con DMID y sus familiares de primer grado, confirma que los glucolípidos son los antígenos mayoritarios de los ICA en estas entidades.¹⁴

Otros autores¹⁰ han encontrado bajas frecuencias de inhibición de los ICA con GAD en estos grupos lo cual refuerza nuestros hallazgos.

Las similares altas frecuencias de ICA-NR y REGP de los ICA en los sujetos con DMID y FPG-ICA+ quizás se deban a que la reactividad de los ICA sobre los páncreas humanos y de ratón compartan un antígeno en común de naturaleza glucolipídica. Recientemente, nosotros describimos que los ICA sobre páncreas de ratón (ICA-NR) reaccionan mayoritariamente contra antígenos de naturaleza glucolipídica, y además, otros autores han demostrado que dichos antígenos se expresan en los islotes de ambas especies.^{29,30} Por otro lado, el GAD65 no está expresado en los islotes de ratón.^{20,30}

Atkinson y otros¹⁰ plantean que los FPG-ICA+ que desarrollarán DMID muestran inicialmente ICA con especificidad a GAD y más tarde, esta respuesta es remplazada hacia antígenos glucolipídicos (no-GAD), fundamentalmente cuando están cercano a la presentación clínica de la DMID. Se ha sugerido que los anticuerpos anti-GAD son marcadores de la destrucción temprana de las células β y que los ICA con reactividad a glucolípidos (no-GAD) lo sean de su destrucción más avanzada.

En conclusión, todos los datos anteriores nos indican que, en los grupos estudiados, el proceso de pérdida de la tolerancia inmunológica es disímil porque los ICA reconocen determinantes antigénicos diferentes. El conocimiento de la heterogenicidad de los ICA en cada entidad nos ayudaría a predecir con mayor exactitud el desarrollo de una insulinodeficiencia: en FPG con el análisis de los ICA sobre páncreas humano y de ratón (ICA-NR), en los LADA con la presencia de anticuerpos anti-GAD65 y/o ICA y en las mujeres con DG a través del estudio preferente de los ICA sobre páncreas humano.

SUMMARY

The aim of this paper was to study the characteristics of sera with pancreatic islet cell antibodies (ICA+) (titers, reactivity to mouse pancreas (NR-ICA), reactivity to pancreatic glycolipid extracts (RPGE), and association with anti-GAD65 antibodies) in different groups of subjects: Latent Autoimmune Diabetes of Adults (LADA, n = 20), New Onset Type 1 Diabetic Patients (n.o. IDDM, n = 43), First Degree Relatives of Type 1 Diabetics (FDR, n = 31), and Gestational Diabetic Women (GDX, n = 10). ICAs on human and mouse pancreas were detected by indirect immunofluorescence technique, anti-GAD65 antibodies were measured by an immunoprecipitation RIA method. The higher phase of human pancreatic extracts, which contains glycolipids, was used to measure ICA's RPEG. The characteristics of ICA in the different groups were the following: *LADA*: high frequency in its titers (≥ 80 JDF units) (80 %); anti-GAD65 antibodies (100 %) and low frequency of NR-ICA (15 %) and RPGE (15 %); n.o. *IDDM*:

high frequency of anti-GAD65 antibodies (72 %); NR-ICA (81 %) and RPGE (86 %); *FDR*: high frequency of NR-ICA (93 %) and RPGE (87 %); *GDW*: low ICA titers (< 20 JDF units) (60 %) and high frequency of RPGE (80 %), though the RPEG was generally partial. The results showed that in the studied groups the process of loss of immunological tolerance is different, since ICAs are raised against diverse antigenic determinants. These results are also important for selecting the right marker to predict the autoimmune process in each entity.

Subject headings: DIABETES MELLITUS, INSULIN-DEPENDENT/immunology; DIABETES GESTATIONAL/immunology; ANTIBODIES/analysis; ISLETS OF LANGERHANS/immunology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314:1360-7.
2. Andreani D, Di Mario U, Pozzilli P. Prediction, prevention, and early intervention in insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metabol Rev* 1991;7:61-77.
3. Harrison LC. Multiple islet antigens in IDDM: order out of chaos?. *Int Diabetes Monitor* 1992;4:1-6.
4. Lipton R, Laporte RE. Epidemiology of islet cell antibodies. *Epidemiol Rev* 1989;11:182-203.
5. Cabrera-Rode E, Díaz-Horta O, Rendón A, Molina G, Vera M, Licea M, et al. Prevalence of islet cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus and other diseases in Cubans. *Autoimmunity* 1997;26(1):7-10.
6. Groop L, Bottazzo GF, Doniach D. Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 35-75 at diagnosis. *Diabetes* 1986;35:237-41.
7. Gottsater A, Landin-Olsson M, Fernlund P, Lernmark A, Sundkvist G. β -Cell function in relation to islet cell antibodies during the first 3 yr after clinical diagnosis of diabetes in type II diabetic patients. *Diabetes Care* 1993;16:902-10.
8. Cabrera-Rode E, Licea M, Molina G, Arranz C, Díaz-Horta O, Uriarte A. Inmunogenética y caracterización clínico metabólica en la diabetes mellitus no insulino dependiente de acuerdo a la presencia de anticuerpos antiislete pancreáticos. *Avan Diabetol* 1995;10:101-10.
9. Mauricio D, Corcoy R, Codina M, Morales J, Balsells M, Leiva A. de. Islet cell antibodies and beta-cell function in gestational diabetes women: comparison to first-degree relatives of type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetic Med* 1995;12:1009-14.
10. Atkinson M, Kaufman D, Newman D, Tobin A, Maclaren N. Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1993;91:350-6.
11. Guazzarotti L, Thivolet C, Tardivel I, Chevalier A. European prediabetes study group and Carel JC. Reactivity of islet cell antibodies (ICA) to recombinant glutamic acid decarboxylase (GAD). *J Autoimmun* 1995;8:901-14.
12. Colman PG, Nayak RC, Campbell IL, Eisenbarth GS. Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. *Diabetes* 1988;37:645-52.
13. Cabrera E, Fernández LE, Carr A, Marquina G, Valiente O, Uriarte A, et al. Which glycolipids are the autoantigens of cytoplasmic islet cell antibodies. *Acta Diabetol* 1992;29:70-4.
14. Cabrera-Rode E, Díaz-Horta O, Fernández LE, Carr A, Marquina G, Valiente O, et al. Glycolipids as the major autoantigens of cytoplasmic islet cell antibodies. *Autoimmunity* 1995;20:145-51.
15. Bonifacio E, Lampasone V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40 K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J. Immunol* 1995;155:5419-26.
16. Gianani R, Pugliese A, Bonner-Weir S, Shiffrin AJ, Soeldner JS, Erlich H, et al. Prognostically significant heterogeneity of cytoplasmic islet cell antibodies in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1992;41:347-53.
17. Genovese S, Bonifacio E, McNally JM, Dean BM, Wagner R, Bosi E, et al. Distinct cytoplasmic islet cell antibodies with different risk for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetología* 1992;35:385-8.

18. Svennerholm L, Fredman P. A procedure for quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochem Biophys Acta* 1980;617:97-109.
19. Grubin CE, Daniels T, Toivola B, Landing-Olsson M, Hagopian WA, Li L, et al. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of iso-form specific glutamic acid decarboxylase in a childhood population. *Diabetologia* 1994;37:344-50.
20. Chaillous L, Delamaire M, Martignat L, Maugendre D, Marre M, Marre M, et al. Combined analysis of islet cell antibodies that cross-react with mouse pancreas, antibodies to the Mr 64,000 islet protein, and antibodies to glutamate decarboxylase in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1994;17:1115-23.
21. Dotta F, Anastasi E, Tiberti C, DiMario U. Autoantigens in type 1 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 1994;17:497-508.
22. Corcoy R, Morales J, Puig-Domingo M, Mauricio D, Adelantado JM, Leiva A de. Increased frequency and lack of protection effect of restrictive islet cell autoantibodies in gestational diabetes. *Autoimmunity* 1995;21:73.
23. Mauricio D, Balsells M, Morales J, Corcoy R, Puig-Domingo M, Leiva A de. Islet cell autoimmunity in women with gestational diabetes and risk of progression to insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metabol Rev* 1996;12:275-84.
24. Aizpurua HJ de, Wilson J, Harrison LC. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in preclinical insulin-dependent diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:9841-5.
25. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 1993;42:359-62.
26. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Med* 1994;11:299-303.
27. Seissler J, Sonnaville JJJ de, Morgenthaler NG, Steinbrenner H, Glawe D, Khoo-Moergenthaler UY, et al. Immunological heterogeneity in type 1 diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia* 1998;41:891-7.
28. Dozio N, Beretta A, Belloni C, Castiglioni M, Rosa S, Bosi E, et al. Low prevalence of islet cell autoantibodies in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:81-3.
29. Cabrera-Rode E, Morales J, Díaz-Horta O, Piquer S, Rendón A, Puig-Domingo M, et al. Glycolipid immunoreactivity of non-restricted islet cell antibodies and their relationship with other islet autoantibodies in IDDM. *Avan Diabetol* 1998;14(2):73-9.
30. Dotta F, Peterson LB, Prevetti M, Metzger J, Tiberti C, Anastasi E, et al. Pancreatic islet ganglioside expression in NOD mice comparison with C5BL/10 mice and changes after autoimmune β -cell destruction. *Endocrinology* 1992;130:37-42.

Recibido: 16 de febrero de 1999. Aprobado: 20 de abril de 1999.

Lic. *Eduardo Cabrera Rode*. Instituto Nacional de Endocrinología. Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10400.