

IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE DE PÁNCREAS POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE DIABETES

OPORTO - VELASCO. Amparo; SOSA - TORDOYA Luis Fernando; GARCIA - RODRIGUEZ Carmita; SANCHEZ - GARCIA Lilia.

Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (FCFB), Universidad Mayor de San Andrés.

Correspondencia: - *lise_oporto@yahoo.es*
- *lise_oporto@hotmail.com*

RESUMEN

En el presente trabajo se implementó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta para la identificación de Anticuerpos Contra Islote de Páncreas (ICA's) en pacientes Diabéticos tipo 1 y en sus familiares de primer grado. Para lo cual se utilizó un sustrato convencional (Páncreas de rata) y otro comercial (Páncreas de mono), además de reactivos específicos incluyendo un control positivo primario y un conjugado adsorbido específico. La comparación de resultados fue importante para elegir el sustrato más conveniente además de evaluar sus ventajas y desventajas. Conjuntamente, se correlacionaron los resultados con datos clínicos de los pacientes obtenidos mediante la Historias Clínicas concretas identificando factores de riesgo de Diabetes Mellitus en individuos genéticamente predispuestos.

Implementamos también la técnica de adsorción de anticuerpos antinucleares mediante la previa obtención de núcleos purificados en solución para evitar su acción como interferentes (pre análisis de ICA's), y a la vez una técnica inocua mediante temperatura para la fijación de cortes histológicos a placas portaobjetos.

Utilizando páncreas de mono como sustrato, se obtuvo mayor cantidad de resultados negativos y menor cantidad de resultados positivos con respecto a los resultados obtenidos utilizando páncreas de rata.

Palabras Clave:

Diabetes Mellitus tipo 1, Anticuerpos Contra Islote de Páncreas (ICA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Anticuerpos Antinucleares (ANA).

ABSTRACT

Presently work was implemented the technique of Immunofluorescence Indirect for the identification of Antibodies Against Island of Pancreas (ICA's) in patients Diabetic type 1 and in their relatives of first grade, for that it was used a conventional substrate (rats' pancreas) and other commercial (monkeys' pancreas), it was also used specific reagents, including a primary positive control and a conjugated specific adsorbed. The comparison of the results was important to choose the most substrate convenient and also to evaluate its advantages and disadvantages.

The results were also correlated with the patients' clinical data obtained by means of the concrete clinical Histories identifying factors of risk of Diabetes Mellitus in individuals genetically predisposed.

We also implemented the technique of adsorption of antinuclear antibodies by means of the previous obtained of nuclei purified in solution to avoid their action like interferences ICA's (previous analysis), and at the same time an innocuous technique by means of temperature for the fixation of courts histological to badges. Using monkey's pancreas like substrate, they were obtained bigger quantity of results negative and smaller quantity of positive results with regard to the obtained results using rats pancreas^o.

Key Words

Diabetes Mellitus type 1, Islet Cell Antibody (ICA), Indirect Immunofluorescence (IFI), Antibodies Antinucleus (ANA).

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de la diabetes, la aparición de anticuerpos contra células de los islotes y el subsecuente deterioro progresivo en la liberación de insulina como respuesta a la glucosa, son considerados parámetros importantes para evidenciar e identificar a parientes de primer grado con riesgo de desarrollar diabetes. La finalidad es intervenir previniendo el desarrollo de esta enfermedad.(1-4) Según datos oficiales en Bolivia aproximadamente, 10 de cada 100 personas padecen diabetes de las cuales el 15% a 20% corresponden a pacientes que desarrollan Diabetes Mellitus Tipo 1 y entre el 80% a 85% corresponden a pacientes que llegan a desarrollar Diabetes Mellitus Tipo 2.(5)

En el 80 - 85% de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1 autoinmune), se pueden detectar diferentes marcadores serológicos en forma de autoanticuerpos, entre estos tenemos a los Anticuerpos Contra el Islote Pancreático (ICA), contra la Insulina (anticuerpos antiinsulina o IAA), contra la descarboxilasa del ácido glutámico (anticuerpos anti-GAD) y contra la tirosinofosfatasa (anticuerpos anti-IA-2). (6)

Los Anticuerpos Contra Islote de Páncreas (ICA's) están presentes en el 70% a 80% de los diabéticos diagnosticados recientemente. Varios autores coinciden en que el 65% de las personas con ICA+ tienen el riesgo de desarrollar la DM1 dentro de los 5 años siguientes a su detección. (7, 8, 9)

Este trabajo constituye un estudio previo que pretende contribuir y complementar a investigaciones anteriores realizadas en el Instituto SELADIS(10) y principalmente, aportar una alternativa para la prevención de la diabetes en nuestra sociedad, dado que en nuestro medio no existen pruebas de laboratorio para el diagnóstico preventivo de la DM1, y por consiguiente tampoco se toman en cuenta los posibles interferentes para estas pruebas.

Actualmente sobresale la importancia que ha tomado la presencia y detección de los Anticuerpos contra Islote (ICA's) que deben ser investigados especialmente, en familias donde hay antecedentes diabéticos, en los jóvenes que presenten sintomatología diabética y en los que presenten signos contundentes como por ejemplo una glicemia por encima de 110 mg/dL, hecho común en aproximadamente el 10% de mujeres embarazadas.(11)

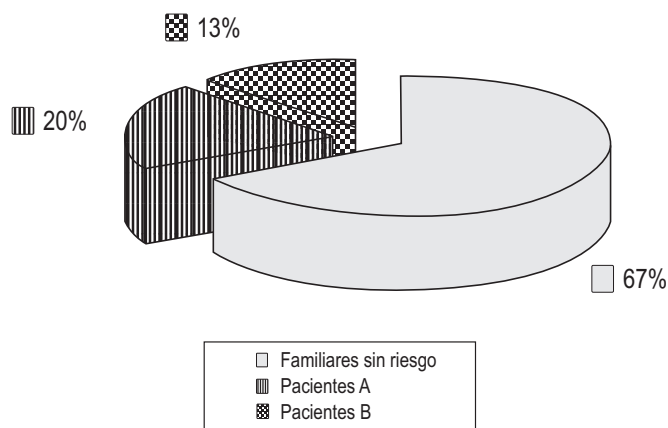


Figura 1. La Evaluación clínica determinada por parámetros, (hiperglicemia, sobrepeso, sedentarismo y antecedentes patológicos bien definidos) indica que los familiares sin riesgo representaron el 67%, los Pacientes A (previamente diagnosticados) el 20% y los Pacientes B (con tres o más factores de riesgo) el 13 % restante.

MÉTODOS

• Población

En cuanto a la población en estudio, participaron pacientes que cursaban Diabetes Mellitus tipo 1 y sus familiares de primer y segundo grado de consanguinidad, 14 familias con un total de 40 personas, quienes asistieron al servicio de Endocrinología del Hospital Obrero N°1 y se les realizó una historia clínica concreta a partir de un examen físico general. Además se les tomó 5 mL de sangre venosa para la realización de las pruebas de laboratorio. Se excluyeron del estudio a pacientes con historia clínica incompleta o cuyos familiares residían en el interior del país y a quienes no se tuvo acceso.

• Identificación de los Factores de Riesgo.

Una vez identificados, los datos que nos ayudan a la correlación de resultados obtenidos con respecto a la identificación de ICA's. en una siguiente etapa. Identificamos los Factores de Riesgo para DM1 mediante la Historia Clínica concreta realizada inicialmente: Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaron Antecedentes Patológicos Familiares de DM1. El grado de actividad física o sedentarismo de cada paciente en su rutina diaria, y la obesidad, que evaluamos mediante el índice de Masa Corporal, son a la vez datos muy relacionados. Otro factor importante es la Glicemia que evaluamos posteriormente gracias a la prueba laboratorial. (Kit enzimático de cuantificación de glucosa TECO).

• Eliminación de ANA's como interferentes:

Realizamos la titulación de Anticuerpos Antinucleares en las muestras mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta utilizando como sustratos células BHK-21 y utilizando controles secundarios y el conjugado previamente titulado 1/400 (Globulina anti IgG humanas marcada con Fluoresceína (cabra) (Bio Mérieux. S. A.) Finalmente la adsorción de ANA's de las muestras de los pacientes se realizó incubando cantidades proporcionales de las muestras con los núcleos en suspensión, obtenidos a partir de tejido

hepático fresco de ternera mediante extracción mecánica con sacarosa y Cloruro de Calcio, a una concentración de 3×10^6 núcleos/mL.

• Identificación de ICA's mediante un sustrato convencional (páncreas de rata):

La obtención de los cortes histológicos de páncreas de rata se realizó mediante un Criostato (SHANDON MINI). Su fijación inocua a las placas portaobjetos se realizó mediante temperatura. La identificación de ICA's se realizó utilizando; el sustrato ya antes descrito, controles

Título Inicial de ANA's	Título Final de ANA's	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Menor a 1/40	Menor a 1/5	15	37	37
1/40	Menor a 1/10	13	33	70
1/80	Menor a 1/20	10	25	95
1/160	Menor a 1/40	2	5	100
	TOTAL	40	100	

Tabla 1. Frecuencia y porcentaje de muestras sometidas a adsorción y el título final alcanzado. El 100% de muestras presentaron un título de ANA's inferior a 1/40 (El 95% de las muestras no presentaron interferencia y el 5% podrían presentar interferencia por su alta reactividad-muestras cuyo título inicial fue de 1/160-).

		ICA's (Rata)		TOTAL
		Negativo	Positivo	
ICA's	Negativo	23 %	30 %	53 %
(Mono)	Positivo	17 %	30 %	47 %
TOTAL		40 %	60 %	100 %

Tabla 2. Comparación porcentual entre los resultados obtenidos con ambos Sustratos, convencional y comercial (Rata Vs. Mono).

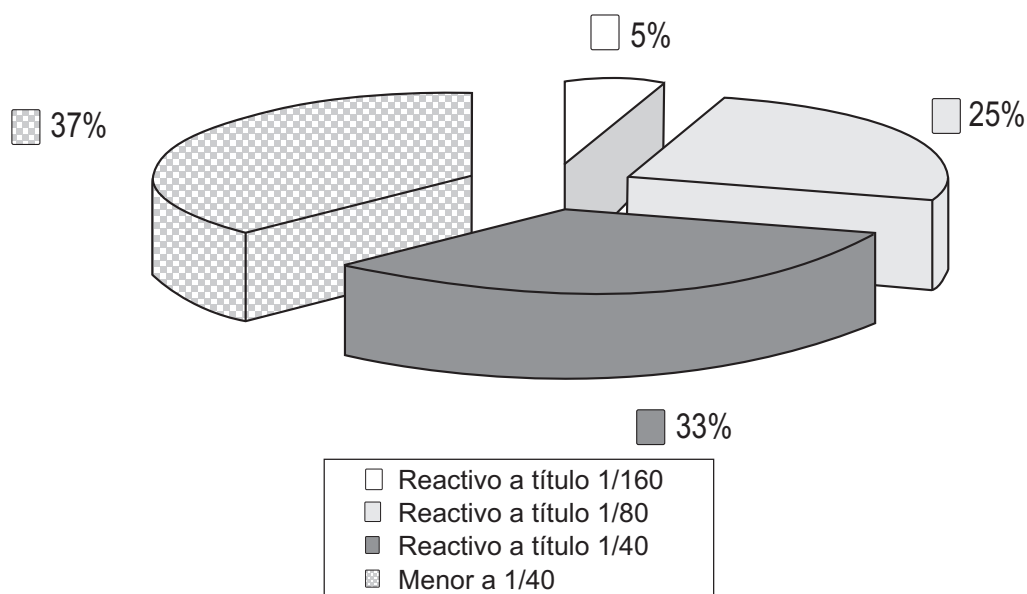


Figura 2. Título Anticuerpos Antinucleares en Pacientes y Familiares relacionados a Diabetes. El 63% de la población presentó reactividad 1/40, 1/80 y 1/160, el 37% restante presentó un título menor a 1/40.

primarios titulados (Autoanticuerpos células islote pancreático Hu Control positivo (Título 1/640) THE BINDING SITE S.A.) y un conjugado titulado previamente y adsorbido (FLUORESCCEIN CONJUGATES Sheep Anti - Human IgG /FITC Monkey Adsorbed THE BINDING SITE S.A.).

• Identificación de ICA's mediante un sustrato comercial (páncreas de mono)

Se realizó utilizando un sustrato comercial (placas comerciales con cortes histológicos fijados de páncreas de mono) y utilizamos los mismos controles primarios y el conjugado, que en la etapa anterior.

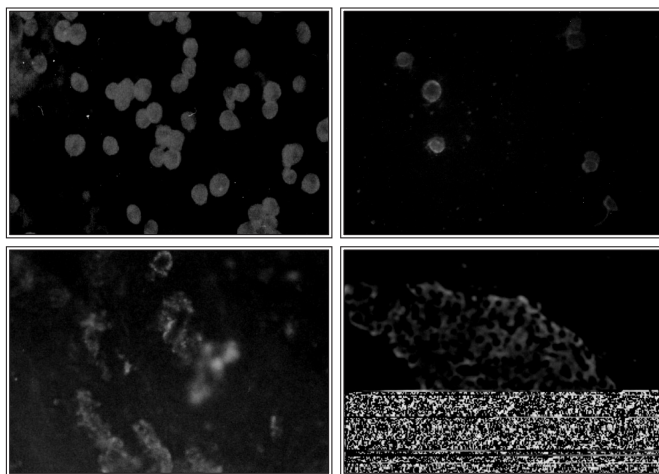


Figura 3. Vistas al Microscopio de L.U.V. a) IFI - Anticuerpos Antinucleares (control negativo) (20X) b) IFI - Anticuerpos Antinucleares (control positivo) (20X). c) IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático en corte de páncreas de rata (control positivo) (20X) d) IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático en corte de páncreas de mono (control positivo) (40X).

RESULTADOS

- Identificación de Factores de Riesgo: El 47 % de los pacientes tienen sobrepeso y en ningún caso obesidad. La actividad física revela una tendencia clara (56%) al sedentarismo. Se observó un 13 % de pacientes con niveles altos de Glicemia Basal en la población de estudio.

La Evaluación clínica determinada por los parámetros ya antes descritos, indica que los familiares sin riesgo representaron el 67%, los previamente diagnosticados el 20% y los pacientes con tres o más factores de riesgo el 13 % restante. Figura 1

- Eliminación de ANA's como interferentes: Mediante la técnica estandarizada se obtuvo aproximadamente 10 mL de núcleos en suspensión en una concentración de 3×10^6 núcleos/mL, por cada 10 a 15 g de tejido hepático empleado.

Los títulos obtenidos de Anticuerpos Antinucleares en los pacientes y sus familiares fueron: el 63% de la población presentó reactividad desde 1/40 hasta 1/160 y el 37% restante presentó un título menor a 1/40. Tabla 1. Figura 2.

- Identificación de ICA's mediante el sustrato convencional (páncreas de rata) y el sustrato comercial (páncreas de mono). Comparación de resultados.
- Para el procesamiento de muestras utilizando páncreas de rata, fue muy importante la inocuidad del método ahora estandarizado mediante temperatura para la fijación de los cortes histológicos a las placas portaobjetos, ya que los fijadores como el metanol o acetona originaban mayor cantidad de falsos negativos. Comparando entre ambos sustratos para la detección de ICA's mediante IFI, obtuvimos mayor cantidad de resultados negativos y menor cantidad de resultados positivos con respecto a los resultados obtenidos utilizando páncreas de rata. Lo que explica y hace referencia a la sensibilidad y especificidad calculada. Tabla 2.

DISCUSIÓN

Los anticuerpos contra los islotes se detectan antes de desarrollar la enfermedad ya que éstos están en mayor concentración 5 a 10 años antes de manifestarse la sintomatología. Lo cual estaría en relación con los resultados ya que en ninguno de los pacientes con DM1 diagnosticados y con tratamiento, se detectó la presencia de ICA's mediante el uso de páncreas de mono (Kit Comercial - Binding site). Si consideramos como título ICA+ (positivo) a partir del título 1/2; un 60 % resultó positivo siendo el 85% de estos pacientes niños familiares de pacientes ya diagnosticados con DM1, lo cual es muy significativo por existir una relación con la aparición temprana de un título alto de ICA's. Es por eso que el desarrollo técnico y teórico del presente trabajo, constituyen un gran avance dentro de los estudios preliminares en cuanto a estudios acerca de Diabetes en lo que a nuestro medio se refiere.

Ambos sustratos sirven para la detección de ICA's, pero la elección del páncreas de mono como sustrato "ideal" se debe a las desventajas que presenta el sustrato convencional; entre las cuales están el tiempo en el desarrollo de la técnica, y además a la presencia de hemaglutininas en las células acinares del páncreas de rata, las cuales también producen fluorescencia inespecífica, por este motivo, distintos autores sugieren utilizar cortes histológicos de páncreas humano o de mono, pero de tipo O, lo cual explicaría el mayor número de falsos positivos al utilizar este sustrato.

La estimación de la Sensibilidad y Especificidad, señala una clara diferencia entre ambos sustratos siendo el sustrato más sensible y específico el de páncreas de mono (Binding Site).

- Sustrato convencional: páncreas de rata $\bar{S}$ = 38,5% E = 29,6 %
- Sustrato comercial: páncreas de mono $\bar{S}$ = 69,2% E = 63,0%

La detección de anticuerpos antinucleares es imprescindible debido a que éstos muestran ser interferentes para la técnica de IFI en la detección de ICA's por dos razones:

1. Los anticuerpos antinucleares se pueden producir en nuestro organismo, debido a procesos infecciosos agudos hasta procesos autoinmunes (autoanticuerpos), pero también son considerados como anticuerpos naturales ya que están en títulos relativamente altos en pacientes sanos (título normal: 1/40). Siendo que a este título es superior al título considerado como significativo para ICA's (1/2), se originaba cerca del 90% falsos positivos en pruebas preliminares.
2. El conjugado utilizado para la detección de anticuerpos contra islote consiste en anticuerpos anti Inmunoglobulina G humana marcados con fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos antinucleares de tipo IgG (existen también de tipo IgM) y dado su alto título en las muestra de pacientes normales, la probabilidad de una reacción cruzada es alta.

Por lo tanto se debe hacer una adsorción previa de Anticuerpos Antinucleares en todas las muestras, siendo una muy buena alternativa la técnica estandarizada y desarrollada en el presente trabajo, mediante núcleos purificados en suspensión obtenidos previamente.

La evaluación física realizada mediante los parámetros descritos para la identificación de factores de riesgo incluyendo a las pruebas de rutina indicadoras de diabetes, estuvieron en relación con la presencia de ICA's tanto en pacientes como en sus familiares genéticamente predispuestos.

El presente trabajo es considerado válido ya que el tamaño de la muestra calculado para una Presición del 5%, un Riesgo correspondiente al 5% y una prevalencia de 0,15% de Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) en nuestro medio, es de 18 pacientes. En nuestro caso incluimos 14 familias con un total de 40 personas todas con un antecedente familiar marcado de DM1.

La importancia clínica en detectar uno o más auto anticuerpos característicos de la DM1, permite identificar con mayor probabilidad a personas con riesgo para diabetes tipo 1, dando opción al paciente de adoptar medidas generales de prevención como la adquisición de hábitos dietéticos y de ejercicios físicos, iniciándose así la educación en salud y eventualmente retardar la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

- ° Dra. MARIA TERESA SALINAS (HOSPITAL OBRERO CNS N°1 - Servicio de Endocrinología).
- ° Dr. EDUARDO CABRERA RODE Jefe del Departamento de Inmunología de la Diabetes (Instituto Nacional de Endocrinología (INE) de Cuba).
- ° Dra. MERY ILLANES MANRIQUE y Dra. VIRGINIA RIVAS (Instituto SELADIS - Laboratorio de Bioquímica Clínica).
- ° Dra. GANINA GISELA GARBAY (Matadero Municipal de Achachicala - La Paz Bolivia).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. European NIDDM Policy Group. Manual para el tratamiento de la Diabetes Mellitus No Insulinodependiente (DMNID). Barcelona España OMS/FID. 1993.
2. Borg H, Gottsäter A, Landin Olsson M, Fernlund P, Sundkvist G. High Levels of Antigen-Specific Islet Antibodies Predict Future b-Cell Failure in Patients with Onset of Diabetes in Adult Age. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2001; 86 (7): 3032 - 3038.
3. Salama Benarroch I, Sánchez G. Factores de riesgo y complicaciones crónicas en el diagnóstico reciente de la Diabetes tipo 2. Revista Cubana- Endocrinología. 2001; 12 (2) 76 - 81.
4. Gross JL, Silverio SP, Camargo JL, Reichelt JA, Azevedo MJ. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia. Federação Brasileira De Sociedades De Endocrinologia E Metabologia. 2004; 46. 4 -24.
5. Federación Boliviana de Diabetes La Paz. Día Mundial de la Diabetes 2004: Combate la Obesidad Prevén la Diabetes. Boletín Informativo Año 1. N° 2. Noviembre 2004.
6. Akihisa I, Toshiaki H, Jun-Hichiro M, Yuji M. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized be a rapid onset and an absence of diabetes-related

antibodies. The New England Journal Of Medicine, 2000; 342(5):301 - 307.

7. Cabrera Rode E, Molina Matos G, Díaz Horta O, Rendón A, Perich P, Suárez Fonseca L. Tiberti C. et al. Características de los anticuerpos Antiislotes del adulto, diabético tipo I de reciente diagnóstico, familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 y diabetes gestacional. Revista Cubana Endocrinología. 1999; 2(10): 85-97.
8. Cabrera Rode E, Perich Amador P, Díaz Horta O, Molina Matos G, Suárez Fonseca L. Tiberti C. et al. Diabetes Autoinmune del adulto en diabéticos tipo 2: frecuencia y características. Revista Cubana Endocrinología. 2001;1:22 - 34.
9. Gülbu I, Sükrü Y, İlhan S, Sema B, İnci K, Temel Y. Comparison of Indirect Immunofluorescence and Peroxidase - Labeled Protein a Methods in Insulin - dependent Diabetes Mellitus. Journal Of Endocrinology And Metabolism. 1999; 12(4): 224 - 229.
10. De La Barra Zeballos Susan, Identificación de anticuerpos anticélulas de los islotes del páncreas (ICAs) en pacientes con diabetes Mellitus tipo 1 y en familiares de primer grado de los mismos por inmunofluorescencia indirecta con sustrato de páncreas de rata, Tesina para optar al título de Licenciatura. UMSA - FCFB. La Paz - Bolivia. 2000.
11. Díaz Horta O, Cabrera Rode E, Díaz Díaz O. Estrategias a seguir en la prevención primaria de Diabetes Mellitus Insulinodependiente. Revista Cubana Endocrinología, 1996;7(1) 12-25.
12. Sánchez-García L, Salinas MT. Un modelo de aplicación de la medicina preventiva: Diabetes Mellitus Insulino Dependiente. SELADIS - FCFB y Hospital Obrero CNS-Medicina Interna y Endocrinología. La Paz - Bolivia. 1997.