

**Anticuerpos anti-islotos pancreáticos en diabéticos tipo 1 y familiares de primer grado**

**Pancreatic anti-islet antibodies in diabetes type 1 and families of first grade**

**Dr. Pedro Pablo Acosta Valdés; Dr. Francisco Varona Rodríguez; Dr. José García Sánchez; Dra. Beatriz Pérez Cruz**

Hospital Pediátrico Docente Provincial Eduardo Agramonte Piña. Camagüey, Cuba.

**RESUMEN**

Se realizó un estudio transversal sobre la presencia de anticuerpos anti-islotos pancreáticos por el método de inmunofluorescencia indirecta con incubación prolongada en familiares de primer grado de niños diabéticos insulino dependientes, de reciente diagnóstico atendidos en el Policlínico de Especialidades Pediátricas de Camagüey, y a un grupo control sin antecedentes de diabetes mellitus realizándole a todos una encuesta previa. Se encontró una alta frecuencia de anticuerpos anti-islotos pancreáticos en los diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico ( $p < 0,001$ ), en relación con los familiares de diabéticos insulino dependientes (FPG) y controles (80 % vs 5,7 % y 0,0 %, respectivamente). Esta frecuencia fue también superior en los FPG en comparación con los controles ( $p = 0,045$ ). No se encontró diferencias al relacionar los ICA con el parentesco, historia familiar de diabetes tipo 1 y 2, la edad y el sexo de los FPG. Nuestros resultados indican que los anticuerpos anti-islotos pancreáticos (ICA) son un buen marcador del proceso de destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas en la diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico y que la presencia de estos en los FPG pudiera identificar a los familiares con una mayor probabilidad a desarrollar una diabetes tipo 1.

**DeCS:** MELLITUS INSULINODEPENDIENTE; ISLOTES DE LANGERHANS.

## **ABSTRACT**

A cross-sectional study about the presence of antibodies anti-islets pancreatic by the indirect immunofluorescent method with prolonged incubation in families of first grade of diabetic children type 1, of diabetic of recent prognosis assisted at pediatric Specialties Polyclinic of Camagüey, and to a control group without antecedentes of diabetes mellitus was performed. They all were carried out at a previous survey. A high frequency of pancreatic anti-islets antibodies in diabetics type 1 of recent prognosis ( $p < 0,001$ ), in relation with parents of diabetics type 1 (FPG) and control (80 % vs 5,7 % and 0,0 % respectively) was found. This frequency was also superior in FPG in comparison to control ( $p = 0,045$ ) there were not differences when relating ICA with the Kindred, family history of diabetes, type 1 and 2, age and sex of FPG. Our results indicate that pancreatic anti-islet antibodies (ICA) is a good marker of the destruction process of pancreatic B cells in diabetes type 1 of recent diagnosis, and the presence of them in FPG may identify families with a higher probability for developing diabetes type 1.

**DeCS:** DIABETES MELLITUS, INSULIN-DEPENDENT; ISLOTES OF LANGERHANS.

## **INTRODUCCIÓN**

La diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o tipo 1, se considera un síndrome complejo, crónico de causa multifactorial que se inicia con la destrucción de las células beta del páncreas, secretoras de insulina.<sup>1</sup>

Según los conocimientos actuales el desarrollo de la DMID puede ser considerado como un proceso en cinco fases: la **fase inicial o silente** donde sólo existe la susceptibilidad genética con la posible intervención de un elemento desencadenante (factores ambientales, infecciosos, dietéticos, tóxicos y estrés) que da origen a la actividad autoinmune contra las células beta,<sup>2</sup> la **segunda fase o fase preclínica** caracterizada por alteraciones de la inmunidad mediada por una respuesta celular y humoral.<sup>3, 4</sup> La tercera fase (insulinopénica) donde todavía no se observan alteraciones clínicas, y que puede ser demostrada por la declinación de la secreción insulínica en respuesta a la administración intravenosa de glucosa. En la **cuarta**

**fase (fase de máxima insulinopenia)** comienzan las manifestaciones clínicas de la enfermedad, aunque existe todavía una producción insulínica residual. Se plantea que en estos momentos están vitales cerca del 10 % de todas las células Beta que se mantienen activas en la producción de insulina. <sup>4</sup> Y la **quinta fase o fase de diabetes mellitus insulino dependiente tardía**, con manifestaciones clínicas asociadas al desarrollo progresivo de lesiones micro y macroangiopáticas, neurológicas y otras, que se caracterizan por la destrucción de la totalidad de las células Beta y el agravamiento del cuadro clínico. <sup>5</sup>

La presencia de autoanticuerpos anti-islotos (ICA) está fuertemente asociada al desarrollo de la DMID y se comienza a manifestar desde la etapa preclínica, donde como parte de las alteraciones inmunitarias se produce aumento de algunas subpoblaciones linfocitarias y la producción de autoanticuerpos contra los antígenos específicos de las células insulares y contra otros antígenos.

En estos momentos existen tres marcadores estudiados, los que presentan un alto valor predictivo para el desarrollo de la enfermedad: altos títulos de ICA, autoanticuerpos anti-insulina (AAI), y la disminución de la primera fase de liberación de insulina en la población normal durante la prueba de tolerancia intravenosa a la glucosa. <sup>3, 6</sup>

Con la combinación de estos marcadores parece ser posible la predicción del desarrollo de una DMID, lo que traería como resultado la implementación de medidas mucho más específicas para la prevención de esta enfermedad. <sup>7</sup>

Teniendo en consideración que en la provincia de Camagüey todos los niños diabéticos están agrupados en consulta decidimos realizar esta investigación con el objetivo de determinar la frecuencia de los ICA en los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 (FPG) para de esta forma identificar a los sujetos con mayor probabilidades de desarrollar una DMID.

## MÉTODO

Se realizó un estudio de casos y controles de tipo transversal sobre la frecuencia de anticuerpos anti-islotos pancreáticos (ICA) en la consulta de diabetes mellitus del Policlínico de Especialidades Pediátricas de Camagüey en el período comprendido entre noviembre de 1998 y abril de 1999 en la que se atendió el total de niños diabéticos de esta provincia que iniciaron la enfermedad durante este período y de familiares de primer grado (FPG) de los niños diabéticos, los que constituyeron el universo de este trabajo.

A los niños diabéticos de reciente diagnóstico se le realizó una encuesta donde se precisan las siguientes variables: edad, sexo, raza, y antecedentes patológicos familiares de diabetes mellitus. A los FPG se les realizó determinación de anticuerpos anti-islotos pancreáticos y glicemia en ayuna, así como una encuesta donde se obtuvieron elementos de interés como edad, grado de parentesco, sexo, raza e historia familiar de diabetes mellitus. Todos ellos conformaron el grupo de casos.

Se tomó además un número de personas como grupo control, a las cuales se les determinó la presencia de ICA.

Las encuestas fueron llenadas por los autores, se realizaron controles periódicos en las mismas para garantizar la calidad del dato primario y una vez llenas se convirtieron en el registro primario y definitivo de los datos.

Los complementarios realizados:

- Glicemia en ayuna por método de glucosa oxidasa a los FPG. <sup>8</sup>
- Anticuerpos contra las células de los islotes en páncreas humano (ICA) por el método de inmunofluorescencia indirecta con incubación prolongada (18 h) a 4° C, en presencia de un inhibidor de proteasas (inhprot 1) utilizándose secciones de páncreas humanos sobre láminas previamente gelatinizadas. <sup>9</sup> Las muestras de sueros fueron diluidas seriadamente en PBS- inhprot 1 (PBS-1, PH 7.4). Para el relevado se utilizó anti-IgG humana (Fab 2) de cabra marcada con fluoresceína a una proporción 1: 64 <sup>10</sup>

Los títulos de ICA se expresaron en unidades JDF comparando 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. Los títulos de ICA iguales o mayores de 10 unidades JDF fueron considerados positivos. <sup>11</sup>

Técnica para la determinación de los ICA:

Se prepararon portaobjetos gelatinizados, para lo cual se calentó la gelatina en un baño a 60 °C, sumergiendo los portaobjetos en la misma durante 7 segundos y secándolo a temperatura ambiente por 24 horas.

El páncreas se cortó en fragmentos de 4 a 5 mm <sup>3</sup> y se guardaron a -70° C. De estos fragmentos se realizaron cortes criostáticos de 5 micras de espesor a -30° C y se colocaron sobre los objetos gelatinizados, esperando 20 min. a temperatura ambiente para luego almacenarlos nuevamente a -70° C hasta su posterior uso.

Las láminas con los cortes de tejidos se secaron durante 15 min a temperatura ambiente y se colocaron en cámara húmeda. A cada corte de tejido pancreático se le añadió 40 µl del suero de los sujetos, así como un suero control positivo y uno negativo, diluidos (1:2) en PBS pH 7.4 con el inhibidor de proteasas, incubándose

durante 18 horas a 4<sup>o</sup> C. Se decantó el exceso de suero y se lavó en buffer fosfato salino (PBS), por 15 min en agitación. Se secaron las portas con papel filtro, se le añadió 40 µl del conjugado anti-IgG humano diluido (1:64) y se incubó durante 30 min en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente. Se decantó y se lavó durante 15 min en PBS. Se secaron los portas y se añadió una gota del glicerol-PBS (9:1) sobre cada corte de tejido, colocándose luego el cubreobjeto.

Se observó como ICA positivo la fluorescencia citoplasmática de los islotes de Langerhans al leerse el tejido en un microscopio de luz ultravioleta a 20x y 40x.

Todas las muestras ICA positivas fueron expresadas en unidades JDF comparando la dilución final de cada suero con una curva estándar de dilución usando el suero internacional de referencia (80 uJDF) del taller internacional de mejoramiento de ICA. Los sueros con ICA  $\geq$  10 uJDF fueron considerados como positivos en este trabajo. Existen autores que toman como referencia valores  $\geq$  20 uJDF.<sup>12</sup>

Los datos fueron procesados de forma computarizada aplicando el sistema MICROSTAT para la determinación de la prueba de ji cuadrado y la prueba exacta de Fisher's para comparar las frecuencias entre los grupos estudiados. Se consideró el resultado estadísticamente significativo cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En este estudio no se encontró presencia de ICA en el grupo control (sin historia familiar previa de diabetes mellitus) para una  $p < 0,0001$ . Un 5,7 % de ICA positivos fue encontrado en los FPG de los niños diabéticos insulino-dependiente y en el 80 % de los niños diabéticos de reciente diagnóstico como aparece reflejado a continuación.

**Tabla 1. Frecuencia de ICA en los casos estudiados**

Sujetos	N	ICA+	%
Controles (a)	100	-	0
FPG	70	4	5,7
Diabetes Tipo I	15	12	80

Fuente: Encuesta

- (N) Número de casos
- (a)  $p < 0,0001$  vs controles
- (b)  $p < 0,0001$  vs FPG
- (c)  $p = 0,045$  vs controles

En tabla 2 se demuestra que a pesar de no existir una diferencia significativa entre la positividad del ICA y la historia familiar de DMID, no insulino-dependiente (DMNID), estos son más frecuentes en personas con un antecedente familiar de DMID que sin antecedentes de ella.

**Tabla 2. Relación entre la frecuencia de ICA y la historia familiar de diabetes mellitus (DMID y/o DMNID) en familiares de primer grado de niños diabéticos**

Características	No Casos	No. De ica	%
<b>DMID</b>			
Simple	59	4	6,9
Múltiple	11	-	0
<b>DMNID</b>			
Simple	16	-	0
Múltiple	3	-	0
Ninguna	51	4	7,7

Fuente: Encuesta

**Simple:** La persona estudiada sólo tiene un familiar diabético.

**Múltiple:** El familiar estudiado tiene más de un diabético en la familia

En este estudio se encontró que los FPG (hermanos) presentaron el 7,7 % de ICA positivo, así como los padres el 5,4 %, no encontrándose relación entre el grado de parentesco y la positividad del ICA.

**Tabla 3. Presencia de ICA en FPG y grado de parentesco**

Parentesco	No.de Casos	ICA	%
Hermanos	13	1	7,7
Padres	20	1	5,0
Madres	37	2	5,4

Fuente: Encuesta

Por otra parte, la presencia de ICA en los FPG puede encontrarse en cualquier edad, como se aprecia en la tabla 4, se presentó en tres pacientes mayores de 30 años (6, 1 %) y en un caso menor de 10 años (5, 5 %).

**Tabla 4. Relación entre la presencia de ICA y la edad del familiar de primer grado de niños diabéticos**

Edad	No. Casos	ICAa	%
< 10	10	1	5,5
10 – 19	3	-	0
20 – 29	12	-	0
≥ 30	45	3	6,1

Fuente: Encuesta

Al evaluar la frecuencia de los ICA con respecto al sexo, la raza y la historia familiar (tabla 5) se comprobó que la misma es baja.

**Tabla 5. Relación entre la presencia de ICA y el sexo del familiar de primer grado de niños diabéticos**

Edad Media ± Ds	Sexo F/M	Raza Blanca N(%)	H. Familiar N (%)	Ica N(%)
9,4 ± 2,9	7/8	12(80)	3(20)	12(80)

Fuente: Encuesta

Este mismo resultado se obtuvo al compararse la frecuencia de anticuerpos en diabéticos de reciente diagnóstico en esta provincia con respecto a un grupo de países desarrollados y Cuba en general, no se encontró diferencia significativa al respecto.

## DISCUSIÓN

Los hallazgos de una ausencia de ICA en el grupo control y el bajo porcentaje de positividad encontrado en los FPG de diabéticos tipo 1 en este estudio coinciden con los resultados que aparecen en la literatura revisada.<sup>4, 12</sup>

El riesgo a desarrollar DMID es 10 veces mayor en los FPG de diabéticos tipo 1 con relación a la población sin antecedentes familiares de diabetes mellitus. Aunque la frecuencia de los autoanticuerpos es detectada en un bajo por ciento de los FPG, el valor predictivo y la posterior intervención para modificar la aparición de la enfermedad hace necesaria la pesquisa en este grupo de pacientes.

Estos marcadores inmunológicos son muy utilizados en la predicción de la DMID, aunque se reconoce que uno de los grandes problemas de esta prevención es, sobre todo, el alto costo, la inconsistente especificidad de los mismos para la pesquisa de futuros diabéticos o ambas.

Los resultados expuestos en la tabla 2 también coinciden con otros autores;<sup>13</sup> aunque encontramos algunos estudios donde la presencia de ICA positivo en los FPG donde existía una historia familiar múltiple de DMID fue mayor.

La predisposición genética a la DMID se basa en su transmisión familiar relativamente elevada, el riesgo de ser diabético es de un 6 % para los hijos, de un 7 % para los hermanos, la correlación de la enfermedad en gemelos es de un 35-40 %.<sup>4, 14</sup> Estos estudios indican que la DMID es una enfermedad poligénica que dentro de su etiología la autoinmunidad juega un papel importante, lo cual es reflejado por la producción de autoanticuerpos anti-islotos pancreáticos (ICA, anti-GAD65 y anti-IA2), células T, transferencia de la enfermedad por células T y sensibilidad del cuadro a la terapia inmunosupresora.

Mella Guerra y García Bruce reportan que el ICA está presente en el 3,3 % de los familiares de primer grado, los estudios realizados en gemelos idénticos y los árboles genealógicos demuestran que la presencia de ICA pueden anticiparse en meses a años a la aparición de los síntomas de DM tipo I.<sup>4</sup>

En nuestro trabajo, no obstante, no se encontró relación entre el grado de parentesco y la positividad del ICA. Tampoco este estudio demostró una relación significativa del ICA con respecto al sexo, pero la raza exhibió un 80 % de predominio en los pacientes blancos, lo que puede deberse a que esta raza es la más frecuente en nuestra provincia.

En cuanto a la historia familiar se observó que el mayor porcentaje de los diabéticos estudiados no tenían antecedentes de la enfermedad en la familia, lo que da al traste con la teoría hereditaria de producción de la enfermedad.



Al analizar la frecuencia de ICA en los familiares de primer grado de niños diabéticos tipo 1 en Cuba, con un 2.8 % y países desarrollados como Alemania, Estados Unidos e Italia que muestran cifras de 3 % aproximadamente, la de Francia, Israel, España, Inglaterra, y la de Finlandia entre un 5 y un 8 %, todos con una frecuencia baja. Camagüey reporta un 5, 7 % con una muestra pequeña, pero con cifras similares a las reportadas en Cuba y en otras naciones.

No obstante, los ICA están presentes en un 80 % de los diabéticos recién diagnosticados, así como en la fase preclínica de la enfermedad. Sperling señala que entre un 80 y 90 % se obtiene ICA en pacientes de reciente diagnóstico, como se conoce estos anticuerpos disminuyen conforme aumenta la duración de la enfermedad.<sup>15</sup>

## CONCLUSIONES

La frecuencia de ICA entre los FPG de pacientes diabéticos tipo 1 en Camagüey es semejante a la observada en Cuba y en otros estudios internacionales, sin estar relacionada con el grado de parentesco, la edad, el sexo ni la historia familiar de la enfermedad. Por ello, la determinación de los mismos, es un buen marcador del proceso de destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas en la diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico y pudiera utilizarse en la identificación de los familiares con una mayor probabilidad a desarrollar una diabetes tipo 1.

La especificidad de la prueba de inmunofluorescencia indirecta en nuestro estudio se debe a la ausencia de ICA en el grupo control sin historia familiar de diabetes mellitus.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Knip M. Prediction and prevention of type 1 diabetes. Acta Paediatr. 1998;(Suppl):425:54-62.
2. Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ. IA-2(islet cell antigen 512) is the primary target of humoral autoimmunity against type 1 diabetes-associated tyrosine phosphatase autoantigens. J Immunol. 1998;161(5):2648-54.
3. Gottlieb PA., Eisenbarth GS. Diagnosis and treatment of pre-insulin dependent diabetes. Annv-Rev Med. 1998;49:391-405.

4. Mella GH, García B. Trastornos del metabolismo de la glucosa. En: J. Meneghello RE, Fanta NE, París M, Puga TF, editores. *Pediatría*. 5 ed. T 2. Buenos Aires: Editorial Medicina Panamericana; 1997. p. 1969-79.
5. Lernmark A. Type 1 diabetes. *Clin Chem*. 1999;45(8 Pt 2):1331-8.
6. Andreani D, Di Mario U, Pozzilli P. Prediction, prevention and early intervention in insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metabolism*. 1991;7:61-77.
7. Dittler J, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG, GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes*. 1998;47(4):592-7.
8. Trinder P. Determination of glucose oxidase with one alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*. 1989;6:24-27.
9. Mauricio D, Corcoy R, Codina M, Morales J, Balsells M, de Leiva A. Islet cell antibodies and beta-cell function in gestacional diabetes women. Comparison to first-degree relatives of type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetic Medicine*. 1995;12:1009-14.
10. Vardi P, Dib SA, Tuttleman M, Connelly JE, Grinbergs M, Rabizadeh A, et al. Competitive insulin autoantibody: Prospective evaluation of subjects at high risk for development of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes*. 1995;36:1286-98.
11. Colman PG, Mc Nair P, Margetts H, Schmidli RS, Werther GA, Alford FP, Ward GM, Tait BD, Honeyman MC, Harrison LC. The Melbourne Pre-Diabetes Study: prediction of type 1 diabetes mellitus using antibody and metabolic testing. *Med J. Aust* 1998;169(2):81-4.
12. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Loppinen T, et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest*. 1998;101(2):327-36.
13. Greenbaum CJ, Sears KL, Kahn SE, Palmer JP. Relationship of beta-cell function and autoantibodies to progression and nonprogression of subclinical type 1 diabetes: follow-up of the Seattle Family Study. *Diabetes* 1999;48(1):170-5.
14. Ziegler AG, Dumont-Herskowitz R, Jackson RA, Soeldner JS, Einsenbarth GS. Predicting type 1 diabetes. *Care*. 1990;13:762-75.
15. Sperling MA. Enfermedades Metabólicas diabetes mellitus. En: Berhrman RE, Vaughan VC, editores. *Nelson Tratado de Pediatría*. España: Editorial Interamericana; 1992. p. 468-87.

Recibido: 11 de mayo de 2001

Aprobado: 13 de abril de 2002

*Dr Pedro Pablo Acosta Valdés.* Especialista de I Grado en Pediatría. Hospital  
Pediátrico Docente Provincial Eduardo Agramonte Piña. Camagüey, Cuba.