

Tesis de Licenciatura

Desarrollo de estrategias optimizadas para la detección precoz de la Diabetes autoinmune basadas en la inmunoprecipitación de inmunobiológicos recombinantes

Labovsky, Vivian

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Labovsky, Vivian. (). Desarrollo de estrategias optimizadas para la detección precoz de la Diabetes autoinmune basadas en la inmunoprecipitación de inmunobiológicos recombinantes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000662_Labovsky

Cita tipo Chicago:

Labovsky, Vivian. "Desarrollo de estrategias optimizadas para la detección precoz de la Diabetes autoinmune basadas en la inmunoprecipitación de inmunobiológicos recombinantes". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000662_Labovsky

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y
NATURALES

DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLOGICAS



“Desarrollo de estrategias optimizadas para la detección precoz de la Diabetes autoinmune basadas en la inmunoprecipitación de inmunobiológicos recombinantes”

Labovsky Vivian

Tesis de Licenciatura

Director: Dr. Edgardo Poskus

Lugar de Trabajo: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Microbiología y Biotecnología, Cátedra de Inmunología-IDEHU-CONICET. UBA.

Fecha de entrega: diciembre de 1998

Nº 0662

*A Rafy por intentar comprender mi estado
de ánimo ante cada parcial y por luchar
incondicionalmente para que estemos juntos.*

*A mi padre y mi madre que gracias a su apoyo
ilimitado hicieron posible la llegada de este momento,
y quiero agradecerles la oportunidad que me brindaron
para llevar a cabo este proyecto, que fue posible gracias
al amor que supieron darme.*

*A mi hermana Vanesa por su carácter y
gracias por brindarme la posibilidad de
compartir momentos inolvidables que
hicieron posible que saliera adelante.*

*A mi hermana Cinthia porque la quiero
aunque no estemos comunicadas.*

*Quiero dedicarle esta frase a todas las personas
que estuvieron presentes cuando las necesité y supieron
brindarme una mano en el transitar de este sendero.*

*“Un ser integral conoce sin viajar, ve sin mirar, y
realiza sin hacer”.*

-LAO-TSE

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edgardo Poskus por brindarme la posibilidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia y dedicación a lo largo de este proyecto, por su magnitud científica y humildad personal y por los consejos invaluable que supo brindarme que hicieron posible la finalización del trabajo.

A Verónica dos Santos Ferreira por haber hecho más gratas las largas horas de cursada que compartimos, gracias a su apoyo ilimitado, su comprensión sin palabras, su energía día tras día y su amistad que comenzó en un día lejano como un simple ladrillo y hoy es un edificio.

A Silvina Valdez quien me enseñó los primeros pasos en el laboratorio, con quien compartí cafés, largas horas de trabajo y charlas en el verano. Gracias por darme una mano en todo momento, por su amistad, comprensión y por mostrarme la vida dentro del campo científico.

A Mauricio Sica por preocuparse por mis corridas con el trabajo, por brindarme su apoyo en este desarrollo y por hacer más gratas las horas de trabajo compartidas.

A Ruben Iacono por darme fuerzas para seguir adelante, por romper la pared entre dos compañeros y permitir la amistad logrando que las tareas rutinarias se vuelvan divertidas. Gracias por ser transparente.

A Edgardo, Silvina, Mauricio, Ruben, Alejandro y Anabel por hacer posible una convivencia humana que permite el crecimiento diario, siendo verdaderamente difícil la combinación de tantas energías en un mismo área de trabajo.

A Eliana Munarris por estar presente en todo momento y brindarme una mano cuando la necesité.

A la Dra. Gabriela Krochick y a la Dra. Carmen Mazza, Hospital de Niños Juan P. Garrahan, por la provisión de sueros de pacientes diabéticos debutantes, y gracias a ello descubrí que tengo una prima.

Al Dr. Norberto Cédola responsable de la convocatoria y extracción de suero de pacientes adultos diabéticos.

Por último, quiero agradecer a todas las personas que en algún momento contribuyeron en el camino de mi formación y hicieron posible que llegará este gran día.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CP	Célula plasmática
CPA	Célula presentadora de antígeno
DM	Diabetes Mellitus
DM tipo1/DMID	Diabetes Mellitus insulino dependiente
DM tipo2/DMNID	Diabetes Mellitus no insulino dependiente
DM1	Pacientes que requirieron insulina antes de los dos años del diagnóstico
DM2I	Pacientes que requirieron insulina luego de más de diez años de su diagnóstico
DM2	Pacientes clínicamente controlados
ELISA	Enzimoinmunoensayo (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
GAD	Glutamato decarboxilasa
GADA	Autoanticuerpos anti glutamato decarboxilasa
HGO	Hipoglucemiantes orales
HLA	Antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad humanos
IA	Anticuerpos anti insulina
IAA	Autoanticuerpos anti insulina
IA-2	Tirosina fosfatasa
ICA512	Fragmento intracelular de la tirosina fosfatasa
ICA	Autoanticuerpos anti células de los islotes
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Interferón- γ
Igs	Inmunoglobulinas
IL-	Interleuquinas

IP	Inmunoprecipitación
KDa	Kilodaltons
LADA	Diabetes autoinmune latente del adulto
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LTc	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T colaboradores
NK	Células agresoras naturales
pb	Pares de bases
PAA	Autoanticuerpos anti proinsulina
PLP	Fosfato de pyridoxal
PTP	Dominio catalítico de fosforilación
PTPasa	Proteína tirosina fosfatasa
PS	Péptido señal
r	Coeficiente de correlación lineal de Speadman
RB	Receptor antigénico del linfocito B
RBA	Ensayo de unión da radioligando
RT	Receptor antigénico del linfocito T
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TM	Dominio transmembrana
TNF	Factor de necrosis tumoral
RBA	Ensayo de unión de radioligando

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	5
2.1. Generalidades sobre Diabetes Mellitus.....	5
2.2. Características clínicas de las distintas formas de DM	6
2.3. Etiopatogenia de la DM tipo 1	7
2.4. Detección precoz de la prediabetes y apoyo diagnóstico de la DM autoinmune	8
2.5. Tratamientos preventivos de la DM tipo 1	9
2.6. Factores genéticos y ambientales asociados a la DM tipo 1	9
2.7. Reseña de los aspectos básicos de la inmunidad.....	13
2.8. Diabetes e Inmunidad	17
2.8.1. Inmunidad natural o específica	20
2.8.1.a. Inmunidad celular en la DM tipo 1	22
2.8.2.b. Respuesta inmune humoral en la DM tipo 1	24
2.9. Características generales de los sistemas antigénicos correspondientes a los marcadores anti-GAD y anti-ICA512	31
2.9.1. glutamato decarboxilasa	31
2.9.2 proteína tirosina fosfatasa	34
2.10. Importancia de la utilización de ensayos adecuados para la detección de marcadores serológicos de autoinmunidad	39

2.10.1. Principios metodológicos del RBA	39
2.11. Factores que influncian el valor predictivo de un marcador	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Diabetes Mellitus tipo 1	43
3.1.1. Verificar si el ensayo de IP combinada en un único ensayo, exhibe o no la <i>performace</i> de los dos métodos ejecutados individualmente	43
3.1.2. Probar si el ensayo de IP combinada en un único test resulta más eficaz que el test de ICA utilizado actualmente	43
3.2. Diabetes Mellitus mediada por autoinmunidad en el adulto	45
3.2.1. Evaluar la posibilidad de extender el ensayo de IP combinada en el diagnóstico de diferentes formas de Diabetes.....	45
4. MATERIALES Y METODOS	47
4.1. Pacientes. Obtención de sueros	47
4.2. Determinación de autoanticuerpos anti-células de los islotes (ICA) por la técnica de IFI	48
4.3. Determinación de los autoanticuerpos anti-insulina (IAA) por RBA empleando ¹²⁵I-Insulina	48
4.4. Determinación de autoanticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (anti-GAD) por RBA empleando ³⁵S-GAD65 humana recombinante producida <i>in vitro</i>	49
4.5. Determinación de autoanticuerpos anti-ICA512 por RBA empleando ³⁵S-ICA512 humana recombinante producida <i>in vitro</i>	53

4.6. Determinación combinada de autoanticuerpos anti-GAD y anti-ICA512 por RBA empleando conjuntamente ³⁵S-GAD65 y ³⁵S-ICA512 recombinantes producidas <i>in vitro</i>	54
4.7. Estadística	55
5. RESULTADOS	56
5.1. Diabetes Mellitus tipo 1	56
5.1.1. “En busca del diamante”: Implementación y especificaciones de aplicación del ensayo de inmunoprecipitación combinada GADA/ICA512 como herramienta predictiva de la DM tipo 1	56
5.1.2. Análisis de la aparición de marcadores de inmunidad humoral según el sexo	60
5.1.3. Detección complementaria de marcadores de autoinmunidad en pacientes debutantes con DM tipo 1	60
5.1.4. Evaluación de la performance del test de IP combinada frente al test de ICA	63
5.1.5. Análisis sobre la incorporación del marcador IAA en la detección de la DM tipo 1	65
5.2. Diabetes Mellitus mediada por autoinmunidad en el adulto	68
5.2.1. Evaluación del ensayo de IP combinada en el apoyo diagnóstico de Diabetes Mellitus mediada por autoinmunidad en los adultos	68
5.2.2. Utilización de dos marcadores o más, para mejorar el apoyo diagnóstico en las diferentes formas de Diabetes	70
6. DISCUSION	73

6.1. Diabetes Mellitus tipo 1	74
6.1.1. Implementación de una técnica analítica alternativa y ventajosa para la determinación sistematizada de los marcadores serológicos de autoinmunidad, aplicable a la detección precoz de la DM tipo 1	74
6.1.1.1. Detección de marcadores serológicos de autoinmunidad mediante el ensayo de IP combinada.....	74
6.1.1.2. Marcadores de inmunidad humoral según el sexo.....	75
6.1.1.3. Detección complementaria de marcadores de autoinmunidad en pacientes debutantes con DM tipo 1.....	76
6.1.2. Análisis del ensayo de IP combinada en un único test para reemplazar al ensayo de ICA y la incorporación del marcador IAA en el apoyo diagnóstico de la DM tipo 1	76
6.1.2.1. Evaluación de la <i>performance</i> del test de IP combinada frente al test de ICA.....	76
6.1.2.2. Análisis sobre la incorporación del marcador IAA en la detección de la DM tipo 1	78
6.2. Diabetes Mellitus mediada por autoinmunidad en el adulto	80
6.2.1. Valoración de la utilidad del ensayo de IP combinada en el apoyo diagnóstico de diferentes formas de Diabetes en el adulto.....	80
6.2.1.1. Evaluación del ensayo de IP combinada	80
6.2.1.2. Utilización de dos marcadores o más para mejorar el apoyo diagnóstico en las diferentes formas de Diabetes	81
6.3. Conclusiones	83
 7. BIBLIOGRAFIA.....	 84

RESUMEN

1. RESUMEN

La DM tipo 1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción masiva de las células β pancreáticas. Durante la fase prodrómica se detectan autoanticuerpos (marcadores) dirigidos contra una variedad de antígenos de las células de los islotes (ICA). Estos autoanticuerpos, probablemente irrelevantes para el desarrollo de la patogenia, han sido aislados constituyendo valiosas herramientas para el diagnóstico precoz de la enfermedad. Si bien la lista de éstos marcadores parece ser extensa, en la actualidad los trabajos en epidemiología y predicción de la DM tipo 1 incluyen: los autoanticuerpos anti-células del islote (ICA), anti-insulina (IAA), anti-glutamato decarboxilasa (GAD) y anti-proteína tirosina fosfatasa (IA-2 o ICA512).

Algunos estudios determinan la existencia de dos marcadores, anti-GAD y anti-ICA512, como los componentes mayoritarios que definen los ICA y en asociación cubren la mayor parte de la reactividad detectada en el test de IFI. Además, éste último resulta difícil de implementar en programas de predicción y prevención a gran escala debido a las complicaciones que presenta.

Dada la reciente descripción de esta estrategia, aún no se ha investigado exhaustivamente su posible utilidad en los programas prospectivos de la prediabetes tipo 1 y tampoco ha sido explorada su aplicación en la detección de la Diabetes mediada por autoinmunidad de los adultos.

Basados en esos datos se planteó la posibilidad de implementar una variante de inmunoprecipitación combinada de dos antígenos recombinantes: ^{35}S -GAD y ^{35}S -ICA512 en un único test, con el fin de evaluar las especificaciones de su aplicación y verificar las reales ventajas económicas y logísticas de su implementación a gran escala.

Esto se llevó a cabo de manera sistematizada para verificar si la detección combinada de ambos marcadores serológicos de autoinmunidad en un único ensayo exhibe o no la performance de los métodos ejecutados individualmente.

Para ello se realizó la detección individual y combinada de autoanticuerpos anti-GAD y anti-ICA512 mediante la técnica de radioinmunoprecipitación de las respectivas proteínas humanas recombinantes, expresadas en un sistema de transcripción y traducción *in vitro* (reticulocitos de conejo). Los resultados obtenidos de un grupo de 71 sueros de pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1 y 28 controles provenientes de sueros de individuos sanos sin antecedentes familiares de autoinmunidad fueron:

<i>Ensayo</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Prevalencia</i>
	Normales (n=28) (100%-%positividad)	DM tipo1 (n=71) (% de positividad)
IP anti-GAD	100	74.7
IP anti-ICA512	100	66.2
IP combinada anti-GAD/ICA512	100	88.7

Otro estudio demostró que la combinación matemática de la prevalencia de los marcadores (anti-GAD y anti-ICA512) es idéntica al valor de prevalencia obtenida en el ensayo experimental combinando ambos marcadores en un único test.

Como conclusión de estos ensayos se puede decir que la variante implementada de IP combinada sería una herramienta económicamente ventajosa además de consumir menor tiempo, material y trabajo. Esto se debe a la ventaja de incluir dos marcadores altamente sensibles a un costo menor que el de las técnicas de radioinmunoprecipitación convencionales ejecutadas individualmente, resultando una alternativa analítica sensible, específica y reproducible, factible de utilizar como método de *screening* en

proyectos a gran escala de predicción y prevención para individuos con alto riesgo de desarrollar DM tipo 1.

Estos estudios fueron complementados con el ensayo de ICA por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre secciones frescas de páncreas humano, grupo 0, con el objeto de evaluar si el ensayo de inmunoprecipitación (IP) combinada puede prescindir del test de ICA. De los 71 sueros de pacientes analizados, el test de ICA detectó 65%, mientras que el ensayo de IP combinada presentó 88.7%; un 7% resultó positivo exclusivamente por el test de ICA. Estos resultados sugieren que no se justifica utilizar el test de ICA en programas de prevención a gran escala, debido a las desventajas operativas de éste último y por presentar una prevalencia menor que el ensayo de IP combinada.

Además, se incorporó la determinación de IAA por la técnica de unión a ligando (RBA) y se estudió la complementación de éste al ensayo de IP combinada y de ICA, con el fin de aumentar la prevalencia en el apoyo diagnóstico de estos pacientes. Los resultados mostraron que el valor de prevalencia del ensayo de IP combinada (88.7%) sólo aumenta a 90.1% con la inclusión del IAA.

Con el fin de evaluar la posibilidad de extender el ensayo de IP combinada en el apoyo diagnóstico de otras formas de Diabetes, se estudiaron casos de Diabetes en adultos, los cuales fueron preclasificados según los siguientes criterios clínicos: a) 42 pacientes que requirieron insulina antes de los dos años de diagnóstico (DM1), homologables en principio a pacientes con LADA, b) 30 pacientes con DM tipo 2 que requirieron tratamiento con insulina luego de más de diez años de su diagnóstico (DM2I), homologables a fracaso secundario, y c) 64 pacientes con DM tipo 2 (DM2), clínicamente controlados. En estos pacientes se determinó la presencia de autoanticuerpos anti-insulina, anti-GAD y anti-ICA512, según técnicas antes mencionadas, en muestras de sangre antes de iniciar el tratamiento insulínico. El porcentaje de respuesta inmune humoral en los distintos grupos fue: DM1 (IAA 28.6%,

anti-GAD 38.1% y anti-ICA512 7.1%); DM2I (IAA 10%, anti-GAD 10%, anti-ICA512 0%) y DM2 (IAA 6.3%, anti-GAD 9.4%, anti-ICA512 0%).

Los resultados muestran que el marcador con mayor prevalencia es anti-GAD y el marcador anti-ICA512 presenta baja o nula prevalencia en estos pacientes.

Por lo tanto, no es conveniente la utilización de la estrategia planteada (IP combinada) en programas a gran escala de predicción y prevención de la DM en la población de adultos, pero sí en los niños y adolescentes.

INTRODUCCION

2. INTRODUCCION

2.1. Generalidades sobre Diabetes Mellitus

En la actualidad, se describe como Diabetes Mellitus (DM) a un síndrome clínico generalizado, caracterizado por una profunda alteración en el metabolismo intermedio que afecta a proteínas, lípidos y carbohidratos (Bottazzo *et al.*, 1986; Cook *et al.*, 1990). A los fines de una presentación simplificada, se describe a la DM como un grupo heterogéneo de enfermedades relacionadas entre sí, que está representada principalmente por dos tipos: la DM tipo 1 y la DM tipo 2. Ambos, en sus formas típicas, resultan de una susceptibilidad genética individual o familiar y de factores ambientales para el desarrollo de la enfermedad (Martí M.L., 1994).

La primera, es una enfermedad causada por autoinmunidad órgano-específica asociada a una base genética predisponente. Habitualmente aparece en la infancia o juventud y por requerir terapia insulínica para su control se la ha denominado Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente (DMID o DM tipo 1). Aunque menos frecuente, la DM tipo 1 puede aparecer en cualquier edad, siendo denominada entre los 20 - 40 años Diabetes tardía o latente (LADA) y en casos más aislados puede manifestarse luego de los 40 años. La DM tipo 2, aparece típicamente en el adulto y se la denomina Diabetes Mellitus No Insulino-Dependiente (DMNID o DM tipo 2), en general sin relación con la autoinmunidad. Sin embargo, existen casos en los cuales los pacientes fracasan al tratamiento con hipoglucemiantes orales (HGO) y dieta, tornándose insulinorequiriente. Este subtipo se distingue de la DM tipo 2 verdadera, por la presencia de marcadores inmunológicos (componente autoinmune) y por un patrón de HLA diferente al de la DM tipo 1. (Groop *et al.*, 1986; Zavala *et al.*, 1992).

2.2. Características clínicas de las distintas formas de DM

Las diferentes formas de DM pueden presentar complicaciones clínicas de mediano y largo plazo. Las afecciones más frecuentes que presentan los pacientes diabéticos son: una tasa de ceguera 25 veces mayor a la determinada en individuos normales, de enfermedad renal 17 veces, de gangrena 5 veces y el doble de enfermedades cardíacas (Martí M.L., 1994). Éstas causan daño, tanto a los pacientes a nivel personal, como a la estructura económica-social (ausentismo laboral, seguro de salud, etc.) y llegan a reducir la expectativa de vida hasta un tercio.

La magnitud de este problema depende en gran medida de la falta de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad en la población, en especial en los sectores de bajos recursos económicos.

La DM tipo 1, representa aproximadamente el 10% de todos los casos de DM. Normalmente, aparece antes de los 20 años. Desafortunadamente, en la mayoría de los pacientes, los síntomas clínicos se evidencian luego de la destrucción selectiva de la mayor parte de las células β , proceso que puede llevar varios años, con la aparición de hiperglucemia y cetosis. Aunque, la terapia con insulina permite a los estos pacientes llevar una vida activa, revirtiendo la sintomatología clínica, no reestablece la homeostasis metabólica normal, debido a que no es posible la eliminación de la patología (Traverso M. y Ruiz M., 1994).

Los síntomas clínicos surgen en general en forma abrupta, entre los cuales se observan: polidipsia (sed muy marcada), poliuria (orina abundante), polifagia (elevado apetito) y adelgazamiento (Castaño y Eisenbarth, 1990; Atkinson y Maclares, 1994; Stephanson y Fuller, 1994). En la gran mayoría de los casos no presentan antecedentes familiares. Sin embargo, existen evidencias en las cuales dos o más miembros de una misma familia presentan ese tipo de Diabetes (Traverso M. y Ruiz M., 1994).

En cambio, la DM tipo 2 es la de mayor prevalencia, representando más del 90% de todos los casos. Frecuentemente aparece en personas mayores de 40 años, con sobrepeso y antecedentes familiares de la enfermedad. La probabilidad de volverse diabético se duplica con cada década y con cada 20% de exceso de peso corporal (Traverso M. y Ruiz M., 1994).

Los síntomas clínicos, a diferencia de la DM tipo 1, suelen ser moderados y para evitar, o al menos disminuir los efectos dañinos a largo plazo, los pacientes en general se deben controlar principalmente con una dieta adecuada. Sin embargo, algunos pacientes requieren tratamientos con drogas (HGO). Cuando estos pacientes dejan de responder a dichas drogas, se tornan insulino requirientes como los de tipo 1, pero a pesar de eso no se los denomina de esta manera (Groop *et al.*, 1986; Zavala *et al.*, 1992).

2.3. Etiopatogenia de la DM tipo 1

La DM asociada a autoinmunidad, como se mencionó anteriormente, es una enfermedad órgano-específica que comienza con un período asintomático (fase prodrómica) en la cual se genera un infiltrado inflamatorio crónico de los islotes de Langerhans, denominado *insulitis*, con la consecuente destrucción en forma específica y permanente de las células β pancreáticas. Este proceso genera la exposición de autoantígenos, en una primera etapa confinados en compartimentos inaccesibles al sistema inmunológico, generando como consecuencia de la respuesta inmune, una serie de marcadores humorales en circulación (Poskus E., 1994).

Siendo desconocido el agente causal que produce la pérdida del balance de la tolerancia y de la autorreactividad, se especula que podrían estar involucradas regiones de moléculas propias, como la glutamato decarboxilasa (GAD) u otras, miméticas a su vez de estructuras virales, presentes en las células β de los islotes de Langerhans y de ese

modo comenzaría a desarrollarse una autoagresión activa en aquellos individuos genéticamente susceptibles (Maclaren *et al.*, 1989).

Si bien hoy en día, el o los agentes desencadenantes de la DM tipo 1 son desconocidos, se sabe que existe un componente genético. Por ejemplo, los individuos que poseen por herencia ciertos alelos HLA de Clase II (moléculas presentadoras de antígenos), constituyen un grupo de riesgo para dicha enfermedad. Si además, existe concomitantemente exposición a determinados factores ambientales (como infecciones virales de la niñez-adolescencia), se incrementa significativamente la probabilidad de perder la tolerancia a algunos antígenos propios de las células β (Bottazzo *et al.*, 1986).

2.4. Detección precoz de la prediabetes y apoyo diagnóstico de la DM autoinmune

Inicialmente los tests inmunológicos con fines de investigación y apoyo diagnóstico de la enfermedad, se realizaban por técnicas de inmunofluorescencia indirecta sobre secciones frescas de páncreas humano (Bottazzo *et al.*, 1974). Los anticuerpos así detectados en los pacientes se denominaron ICA (Islet Cell Antibodies), sin embargo se vio que estos anticuerpos no eran capaces de determinar si un individuo susceptible desarrollaría inexorablemente la enfermedad.

Posteriormente, se vio que la detección de anticuerpos contra antígenos pancreáticos específicos, junto con las pruebas funcionales y los factores genéticos para identificar los individuos con riesgo de adquirir la enfermedad, servirían para mejorar el diagnóstico precoz de la misma (Hagopian *et al.*, 1993; Verge *et al.*, 1996).

2.5. Tratamientos preventivos de la DM tipo 1

La mayoría de los pacientes con DM tipo 1 requiere insulina, la excepción ocurre temporariamente durante el período de remisión después del debut, y la disponibilidad de insulina humana puede permitir una mejor terapia para aquellos pacientes que presentan anticuerpos contra la insulina no humana (Poskus E., 1994; Hernandez R.E., 1994). El trasplante de segmentos pancreáticos o de células de los islotes, puede ofrecer una forma más fisiológica de insulina, sin embargo estos recursos aún no superan las fases experimentales.

Hoy en día existen algunos programas de prueba sobre terapias inmunosupresoras que intentan revertir el fenómeno autoinmune causante de la destrucción de los islotes (*Trials* basados en insulina inyectable u oral). Otros programas se basan en la administración de terapias antioxidantes (nicotinamida) (Vague *et al.*, 1987; Mendola *et al.*, 1989). Si bien todos estos recursos se hallan en etapa de investigación clínica, se vislumbra que la demanda de análisis para la predicción de la DM autoinmune aumentará como etapa necesaria a cualquier intervención que se instale.

2.6. Factores genéticos y ambientales asociados a la DM tipo 1

Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, se han descripto factores genéticos y ambientales involucrados en la patogénesis de la DM tipo 1. Como se explicó anteriormente, dentro de los factores genéticos, varias regiones cromosómicas muestran asociación con esta enfermedad. Los genes codificantes para las moléculas del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) que en humanos corresponde al sistema *HLA*, se localizan en el brazo corto del cromosoma 6p21 y constituyen el ligamiento genético más importante asociado a la patología (Erlich *et al.*, 1994). Además, el polimorfismo

resultante de un número variable de repeticiones en tandem en la región 5' del gen de la insulina (cromosoma 11p15) contribuye a la susceptibilidad genética de la enfermedad (Bell *et al.*, 1984; Spielman *et al.*, 1993). Recientemente se han detectado 18 regiones cromosómicas diferentes con evidencia positiva de ligamiento a la enfermedad (Davies *et al.*, 1994).

Por lo tanto, la herencia de la DM tipo 1 sería poligénica, siendo el locus principal el correspondiente al CMH. Sin embargo, no todos los individuos están bajo riesgo de adquirir la enfermedad, sino aquellos con ciertas variantes heredadas que están involucradas en la regulación de la inmunidad.

Los productos del sistema HLA son los responsables de la síntesis de moléculas específicas con funciones de control y modulación de la respuesta inmune. Éstos se han agrupado en tres clases según su estructura, función y origen genético: las moléculas de Clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) reguladores de la función de los LTc; las de Clase II (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP) que están involucradas fundamentalmente en la función presentadora de antígenos por los macrófagos y las de Clase III que no pertenecen al sistema de HLA propiamente dicho. La asociación preferencial de ciertos alelos del HLA con la enfermedad podría deberse a la capacidad de presentación del antígeno diabetogénico (Puchulu *et al.*, 1994).

La primera demostración de una asociación del HLA con la DM tipo 1, fue con los alelos codificantes para moléculas de Clase I: HLA-B15 y luego B8. Posteriormente, se demostró que estas asociaciones se debían al desequilibrio de ligamiento con los alelos HLA de Clase II, DR4 y DR3, comparado con el 50% de los controles sanos. Sin embargo, los haplotipos DR2, rara vez son detectados en estos pacientes, sugiriendo que sus alelos brindarían protección a la enfermedad (Todd *et al.*, 1987; Erlich *et al.*, 1990; Baisch *et al.*, 1990; Carcassi *et al.*, 1991).

Finalmente se implicó al locus DQ y se propuso que la presencia de un único aminoácido, el ácido aspártico en la posición 57 de la secuencia de la cadena β del heterodímero, codificada por el gen DQB1, controlaría la susceptibilidad o la protección de la DM tipo 1. La presencia de Asp 57 (sobre todo en homocigosis), confiere protección (no asociado a DM tipo 1), mientras que la presencia de residuos como serina, valina o alanina en esa posición confiere susceptibilidad para la enfermedad, indicando riesgo o desprotección (Todd *et al.*, 1987). Además, la presencia de arginina (Arg) en la posición 52 de la cadena α , codificada por el gen DQA, confiere susceptibilidad en razas caucásicas (Khalil *et al.*, 1990). En términos moleculares, la presencia de β 57 Asp⁻ y α 52 Arg⁺ confieren susceptibilidad, expresable en riesgo relativo de desarrollar DM tipo 1. Se ha propuesto como hipótesis, que las posiciones espaciales que ocupan los residuos DQ β 57 y DQ α 52 en el heterodímero DQ presentador de fragmentos antigénicos, se encuentran en los bordes de la hendidura de la molécula de Clase II, lo cual sugiere que la ausencia de ácido aspártico en la primera posición y además la presencia de arginina en la segunda, permite mejorar el contacto de un autoantígeno (aún desconocido) de las células β de los islotes con los LTh, facilitando de ese modo su estimulación o deprimiendo la respuesta de las células supresoras (Todd *et al.*, 1987).

También se ha postulado que la carga y posición en las cadenas β 57 Asp⁻ y α 52 Arg⁺ en la cavidad del heterodímero DQ podría ser crucial para conferir predisposición, resistencia o neutralidad para la DM tipo 1.

Las nuevas técnicas de genotipificación de ADN, involucraron cambios en la nomenclatura de las moléculas de Clase II, en particular en los haplotipos HLA-DR. En consecuencia, para los genes DQ, los alelos que se denominaron DQB1*0201 (asociado a DR3; Asp⁻) y DQB1*0302 (asociado a DR4; Asp⁻), respectivamente, son los asociados a la DM tipo 1. Por otra parte, el alelo de protección ligado al haplotipo DR2, en el locus DQB1, pasó a denominarse DQB1*0602.

La presencia del alelo *DQB1*0602* (Asp 57⁺), representaría una protección dominante sobre la susceptibilidad codificada por los alelos *DQB1* de riesgo, aún en heterocigosis y aunque el paciente presente marcadores humorales como los ICA, para la población caucásica (Pugliese *et al.*, 1995; Auwera *et al.*, 1995). Además existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que la condición homocigota de los genes *DQB1* (Asp 57⁺) y la presencia de arginina (Arg52⁺) codificado por el gen *DQA*, confiere susceptibilidad (asociada a DM tipo 1) en razas caucásicas (Khalil *et al.*, 1990). Actualmente, se ha demostrado que la condición, antes mencionada, homocigota de los genes *DQB1* (Asp 57⁺) (haplotipos HLA-DQ2, DQ8, o ambos), es necesaria, pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad en el 90-95% de los individuos con DM tipo 1 en razas caucásicas (Ronningen *et al.*, 1989).

Debido a numerosas experiencias experimentales, es preciso destacar que la presencia de alelos de riesgo, no indica *per se* que un individuo adquiera la condición de diabético, sino que otros genes (más de 10, localizados fuera de la región del CMH) contribuyen para conferir un grado de susceptibilidad. Se cree que la influencia del HLA para antígenos de Clase II, aporta el 50% de la susceptibilidad heredada total en el riesgo de adquirir DM tipo 1. El riesgo para parecer la DM tipo 1 recibe un aporte que proviene de la sumatoria de los genes externos al CMH, algunos de ellos polimórficos, los cuales influenciarían en la susceptibilidad de la enfermedad. Entre los *loci* HLA Clase I y Clase II se encuentran numerosos genes, que funcionan de mediadores y amplificadores de las respuestas inmunológicas según ocurre, por ejemplo, para el TNF con polimorfismos asociados a haplotipos particulares de susceptibilidad (Badenhoop *et al.*, 1989). Además, el riesgo de desarrollar la DM tipo 1, depende del grupo étnico y finalmente de la acción gatillo de los factores ambientales.

Por otra parte, estudios en gemelos monocigotas muestran una concordancia para la DM tipo 1 menor al 40%, lo que indicaría por un lado que los factores ambientales juegan un rol importante en la patogénesis. Debe tenerse en cuenta que la condición de gemelos homocigotas no implica necesariamente la identidad del repertorio de

anticuerpos y receptores T implicados en el reconocimiento de los antígenos. En efecto, el reordenamiento aleatorio de los genes que codifican para las regiones variables de los receptores T de los linfocitos y de los anticuerpos (hecho que ocurre luego del nacimiento), podría ser otra de las causas invocadas para explicar la discordancia entre gemelos homocigotas.

Se ha demostrado que hay correlación estacional con la aparición de nuevos casos de DM tipo 1 (picos en otoño e invierno), que las edades de máxima incidencia coinciden con las etapas escolares y la exposición a las infecciones virales y que los grupos étnicos de baja predisposición aumentan la incidencia al emigrar a países con mayor prevalencia (Notkins *et al.*, 1979).

Por lo expuesto, queda claro que la DM tipo 1 es una enfermedad multigénica, pero la misma no puede ser solamente atribuida al componente genético, ni ambiental. Actualmente se considera conjuntamente al valor predictivo de los factores genéticos y ambientales, la existencia de marcadores inmunológicos humorales, para poder de ese modo construir un perfil de riesgo potencial.

2.7. Reseña de los aspectos básicos de la inmunidad

Antes de profundizar en el tema sobre el análisis de los marcadores serológicos de autoinmunidad relacionados con la DM mediada por autoinmunidad, es necesario realizar una breve reseña del funcionamiento del sistema Inmune normal y las alteraciones en la autoinmunidad (estos temas pueden ser consultados en textos de Inmunología General como: Roitt y Margni, Editorial Panamericana; Inmunología Celular y Molecular, Abbas *et al.*, Editorial Interamericana-McGraw-Hill; etc).

El sistema inmune está constituido por órganos y tejidos distribuidos ampliamente en todo el organismo que presentan diversas estructuras y funciones. Por un lado, los órganos linfoides primarios tienen como función principal la maduración de los linfocitos. Por otra parte, los órganos linfoides secundarios se ocupan principalmente de captar los antígenos que se encuentran en tejidos o espacios vasculares y otorgarles un ambiente adecuado para que la interacción de los linfocitos maduros con dichos antígenos sea efectiva. Los vasos sanguíneos y el sistema linfático interconectan estos órganos a los fines de constituir una estructura funcional integrada.

Las células del sistema inmune se encuentran distribuidas en estos órganos y circulan a través de la sangre y los fluidos linfáticos. La célula principal del sistema inmune es el *linfocito*, constituyendo el 25% de las células blancas. De una gran variedad de células blancas que participan en la respuesta inmune, sólo los linfocitos poseen atributos de diversidad, especificidad, memoria y reconocimiento de lo propio y lo no propio. El resto de estas células tienen como función contribuir a la activación linfocitaria e incrementar la eficiencia en la depuración antigénica, ya sea por fagocitosis o mediante la secreción de diversos factores (citoquinas).

Para que toda respuesta inmune sea efectiva, es necesario la participación de dos tipos de células: los linfocitos y las *células presentadoras de antígeno* (CPA). El esquema de la **Figura 1**, representa el mecanismo múltiple para el reconocimiento de los antígenos, el cual se puede resumir de la siguiente manera:

Los fragmentos antigénicos luego de su internalización y procesamiento, son presentados por las células CPA (monocitos/macrófagos, linfocitos B, etc.) a los linfocitos T colaboradores o *helper* (LTh o CD4), en el contexto de moléculas del CMH de clase II. Los LTh reconocen al antígeno específico a través de su receptor (RT) y otras moléculas favorecen la adhesión y colaboración intercelular.

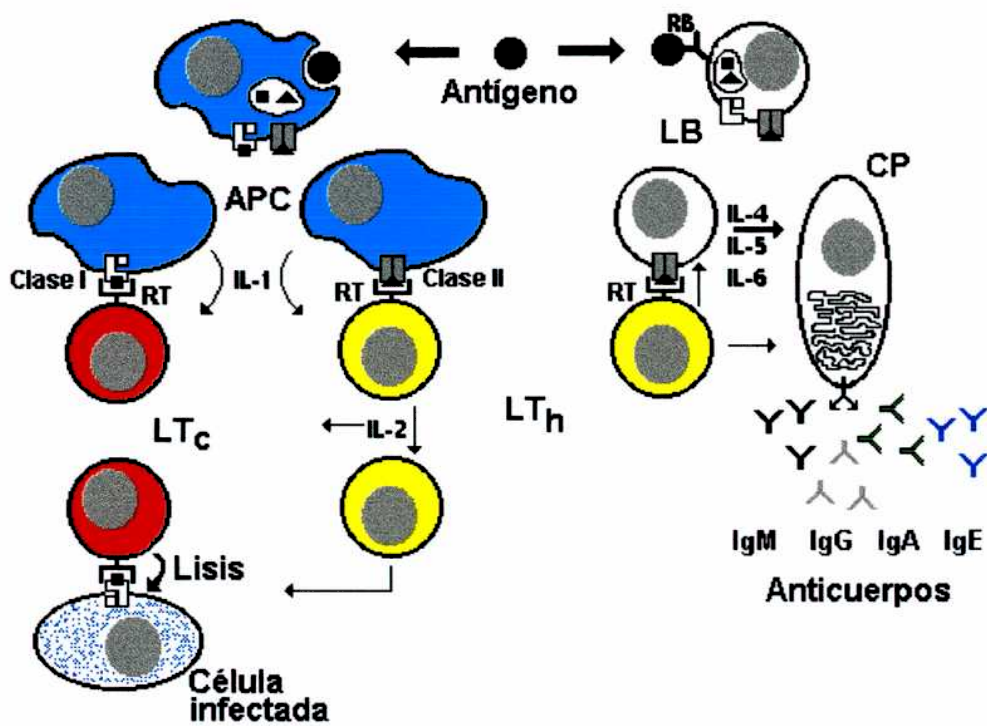


Figura 1

El esquema muestra los componentes celulares y humorales más importantes del sistema inmune, principalmente los elementos involucrados en su regulación.

Las CPA producen la interleuquina 1 (IL-1) durante la presentación antigénica, cuya función es estimular a los LTh que interactúan con dicha célula. A su vez, los LTh activados secretan IL-2, la cual provoca la expansión clonal de su linaje celular, así como también la de otros linfocitos. Esta vía es la que habitualmente participa en el reconocimiento y eliminación de los antígenos extraños.

Cuando se trata de antígenos propios y virales que se introducen en la maquinaria biosintética celular, éstos son procesados y presentados por las CPA a los linfocitos T citotóxicos (LTc o CD8). Esta presentación se realiza en el contexto de moléculas del CMH de Clase I, el cual interactúa con el LTc a través de sus receptores específicos (RT). Si posteriormente, los linfocitos activados interaccionan con las células infectadas (que exhiben antígenos virales asociados a moléculas de Clase I en su superficie) con el mismo virus, se produce la lisis de estas células a través de linfoquinas del tipo de las perforinas y de mecanismos de apoptosis. En condiciones normales, la vía descrita no es agresiva para los antígenos propios y ello depende de varios factores regulatorios celulares y humorales que configuran el tema central de la tolerancia inmunológica. Sin embargo, muchos de los componentes de este complejo sistema aún no han sido caracterizados y son motivo de intensas investigaciones.

Además, los linfocitos B (LB) pueden reconocer al antígeno en forma directa por medio de receptores específicos en su membrana que son inmunoglobulinas (RB) de superficie. Estas moléculas tienen la capacidad de reconocer a los antígenos intactos, sin ningún procesamiento. Cada antígeno puede estimular una o varias líneas de LB independientes, pero cada LB presenta especificidad en las inmunoglobulinas (Igs) de superficie y en los anticuerpos que secretará, luego de diferenciarse a célula plasmática (CP). La estimulación para la expansión clonal de LB, se efectúa a través de factores de crecimiento y de diferenciación antes designados como BCGF y BCDF y hoy reconocidos como IL-4, IL-5 e IL-6.

Un complejo mecanismo que incluye la recombinación de genes y el corte y empalme del ARNm alternativo, logra que pocos genes codifiquen para numerosas variantes de diferentes anticuerpos. Además, mediante la acción de ciertas citoquinas puede producirse el cambio de isotipo de la inmunoglobulina secretada (IgG, IgA, etc.) sin alterar su especificidad.

En resumen, las moléculas responsables del reconocimiento antigénico por parte de las células del sistema inmune son: la Ig de superficie como receptor (RB) del LB, el receptor del LT (RT) y las moléculas del CMH de clases I y II.

2.8. Diabetes e Inmunidad

El sistema inmunitario normalmente se encarga de vigilar la agresión de los agentes patógenos externos y de controlar la identidad del organismo, este proceso recibe el nombre de *autotolerancia*. En circunstancias particulares, las funciones del sistema inmune se ven alteradas y en consecuencia se instala un fenómeno de *autoagresión* hacia ciertos componentes del organismo, mecanismo que recibe el nombre de *autoinmunidad*.

Para comprender el funcionamiento de la autotolerancia, se deben tener en cuenta los siguientes conceptos:

- 1) La tolerancia frente a los antígenos propios es un proceso que se adquiere de forma activa, o se aprende (no es una propiedad heredada), en la cual los linfocitos potencialmente auto-reactivos adquieren la capacidad de no responder a los antígenos propios, o se inactivan después de encontrarse con ellos.
- 2) Durante su maduración, todos los linfocitos pasan a través de estadios en los que el encuentro con el antígeno provoca tolerancia en lugar de activación.

- 3) Los principales mecanismos de tolerancia en los clones de linfocitos específicos para el antígeno son la *eliminación clonal*, por un proceso de muerte celular que es dependiente de su activación, y la *anergia clonal*.
- 4) Los antígenos propios que no dependen de la célula T, como los polisacáridos y los glucolípidos, deben inducir directamente la tolerancia de la célula B.

El proceso de agresión autoinmune, constituye un ejemplo de un fenómeno de autoagresión, tal vez desencadenado por determinados factores ambientales, además de la coparticipación de una constitución genética individual predisponente. En la autoinmunidad conducente a DM tipo 1, varios mecanismos pueden contribuir a la destrucción de la célula β , incluida la lisis mediada por el LTc, la producción local de citoquinas (IFN- γ , TNF e IL-1) y los autoanticuerpos contra antígenos presentes en las células de los islotes, resultando una destrucción progresiva y selectiva de las células productoras de insulina **Figura 2**. Cuando esta producción es insuficiente para mantener el papel homeostático de la hormona, aparecen los síntomas clínicos y luego de transcurrido cierto período, las células β se pierden por completo. Ante la carencia de esta hormona vital, se instala la DM tipo 1, la cual afecta al 0.2-0.5% de la población mundial.

Hoy en día, quedan muchos interrogantes acerca de los mecanismos que causan la DM tipo 1 en el humano, sin embargo, se han mencionado una serie de factores implicados en la destrucción de la célula β de los islotes pancreáticos, sin saber con claridad cuál o cuáles de ellos tienen una implicancia real en la etiopatogenia. Estos factores potenciales incluyen:

- 1) Dentro de las infecciones virales se han implicado a algunos virus β -citotrópicos, como el de la rubeóla, el virus de la encefalomiocarditis y principalmente el virus Cocksackie B4 (Atkinson *et al.*, 1994), los cuales guardan una relación estrecha con cierta variación estacional observada en el surgimiento de la enfermedad (Durruty *et al.*, 1979).

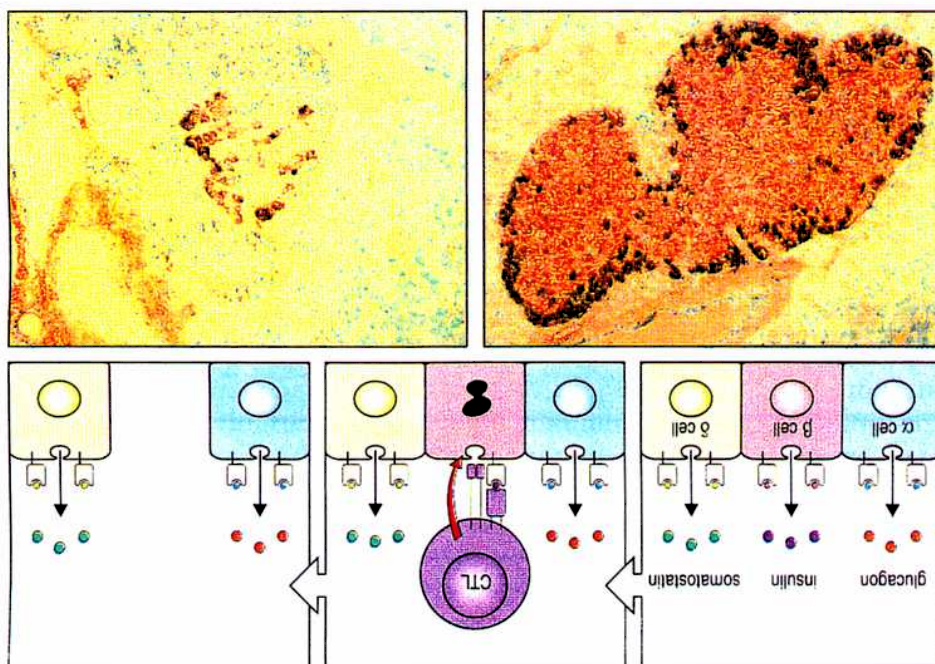


Figura 2

Destrucción selectiva de las células β pancreáticas en la DM mediada por autoinmunidad (Tomado del Janeway, 1994).

En general parecería que las infecciones virales actúan más bien para precipitar la enfermedad que como iniciadoras del daño celular (Bottazo *et al.*, 1986).

2) El estrés

3) Influencias ambientales, lo cual modularía una predisposición general dando lugar a un gradiente de incidencia, que si bien no es constante, es frecuente (La Porte *et al.*, 1985)

4) Las reacciones inmunitarias específicas mediadas por células que se detectan en sangre periférica y autoanticuerpos dirigidos contra componentes de las células del islote, según se mencionó.

A pesar de todos los posibles potenciales agentes causales, poco ha sido el avance en la identificación de los virus u otros factores como agentes etiológicos de la DM tipo 1 hasta el momento.

2.8.1. Inmunidad natural o específica

Los individuos sanos, se protegen a sí mismos contra los microorganismos por medio de diferentes mecanismos, estos incluyen las barreras físicas (piel, mucosas), las células fagocíticas y los eosinófilos de la sangre y de los tejidos, un tipo de linfocitos llamados células agresoras naturales (NK), y varias moléculas transportadoras de la sangre.

Todos estos mecanismos de defensa están presentes antes de la exposición a microorganismos infecciosos u otras macromoléculas extrañas, no aumentan por tales exposiciones y no discriminan entre la mayor parte de las sustancias extrañas. Estos son los componentes de la *inmunidad natural*. Otros mecanismos constituyen la denominada *inmunidad específica* (**Tabla 1**). El sistema inmunitario específico ha retenido muchos de los mecanismos de la inmunidad natural, y ha adquirido dos propiedades importantes que son: a) el sistema inmunitario específico recuerda cada encuentro con un micro-

	NATURAL	ESPECIFICA
BARRERAS FISICOQUIMICAS	Piel, mucosas	Sistemas inmunitarios cutáneos y mucosos; anticuerpos en las secreciones mucosas
MOLECULAS CIRCULANTES	Complemento	Anticuerpos
CELULAS	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos) células agresoras naturales	Linfocitos
MEDIADORES SOLUBLES ACTIVOS EN OTRAS CELULAS	Citokinas derivadas de macrófagos, es decir, interferones α y β, factor de necrosis tumoral	Citokinas derivadas de linfocitos, como el interferón γ

Tabla 1

Características de la inmunidad natural y específica (adquirida).

organismo o antígeno extraño, de forma que encuentros posteriores estimulan mecanismos de defensa cada vez más eficientes y b) la respuesta inmunitaria específica amplifica los mecanismos protectores de la inmunidad natural, dirige o centra estos mecanismos a los lugares de entrada del antígeno, y de esa forma los capacita mejor para eliminar los antígenos extraños.

Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos tipos: inmunidad celular e inmunidad humoral, en función de los componentes del sistema inmunitario que medien las respuestas.

Según se ha planteado, la DM tipo 1 produce por un lado una respuesta celular autoagresiva dirigida a las células β pancreáticas, y por otro lado, una respuesta inmune humoral específica, dirigida contra distintos antígenos localizados en el citoplasma de dicha célula.

2.8.1.a. Inmunidad celular en la DM tipo 1

El componente específico del sistema inmunitario, está mediado por células llamadas linfocitos T. Al estudiar los procesos inmunes mediados por estas células, involucrados en la destrucción autoinmune de la células β , se vio que existe una variedad de comportamientos de difícil integración y muchos de los resultados divulgados han sido contradictorios. Entre los resultados más relevantes, se puede enunciar que en la DM tipo 1 existe una reducción de los linfocitos Th circulantes del orden del 2-20% (Jackson P., 1982). Esto no ocurre con los linajes celulares de linfocitos citotóxicos (LTc), al menos es lo que se demuestra en ciertos estudios (De Berardinis *et al.*, 1988). Se demostró que los antígenos pancreáticos producen sensibilización de las células en el test de inhibición de la migración leucocitaria (LMIT) y se comprobó *in*

vitro el fenómeno de citotoxicidad hacia las células β de los islotes pancreáticos (Irvine W.J., 1980).

En algunos casos, donde se han podido examinar las lesiones pancreáticas en los primeros estadios de la enfermedad, se ha detectado la presencia mayoritariamente de linfocitos T en los islotes (Bottazzo *et al.*, 1985; Roep y De Vries, 1992; Huang *et al.*, 1995). En cuanto al subgrupo de células T presentes, las células predominantes observadas en los infiltrados de células mononucleares fueron LT CD8+ y macrófagos, seguidas de LT CD4+ y LB.

También se observó una hiperexpresión de moléculas del CMH de Clase I, lo cual sugiere que los LT CD8+ podrían reconocer autoantígenos asociados a estas moléculas hiperexpresadas. Sin embargo, estos hechos podrían ser secundarios y no reflejar los eventos más tempranos desencadenantes de la enfermedad (Itoh *et al.*, 1993). En otro estudio, se demostró que clones de células T CD4+ aislados de sangre periférica de pacientes con DM tipo 1, lisaron específicamente a macrófagos presentadores de antígenos de las células β (Roep *et al.*, 1992).

Otro conocimiento citable de la inmunología general, es que existen dos fenotipos de LTh: los Th1 (secretan interleukina 1 e interferón γ , y están principalmente asociados a la inmunidad celular) y los Th2 (secretan interleukinas 4, 5, 6 y 10, que están principalmente involucrados en la inmunidad humoral). Algunos inmunólogos sugieren que las células efectoras en la DM tipo 1 son los LT de fenotipo Th1, basados en que dichas células son suficientes para transmitir la enfermedad a receptores permisivos. Estas células liberarían citoquinas citotóxicas como el interferón γ , interleukina 1, factor de necrosis tumoral α y además reclutarían otras células, como los macrófagos, para producir daño tisular. Las CD8+ sólo cumplirían funciones accesorias, como promover la actividad citotóxica asociada (Peterson y Haskin., 1996). Actualmente existe consenso en aceptar que la DM tipo 1 podría ser consecuencia de un desbalance entre las células auxiliares Th1 y Th2 (Carnaud C., 1994). Además, la interleukina 4 parece ser esencial

en la protección de los islotes, influyendo en el balance del sistema inmune hacia un aumento de la función Th2 (Gladstone y Nepom, 1995).

A pesar de los esfuerzos realizados en el tema, no se ha aclarado el rol de los diferentes fenotipos Th en la patogénesis de la DM tipo 1 en humanos.

Otros tipos de células también pueden estar involucradas en el proceso de insulinitis. Por ejemplo, los linfocitos CD4⁺ CD8⁻ son más abundantes en ratas BB que en ratas no susceptibles a la enfermedad (Hosszufalusi *et al.*, 1992), así como macrófagos que podrían actuar tempranamente en la presentación antigénica a las células T y luego en el proceso de destrucción de las células β pancreáticas.

2.8.2.b. Respuesta inmune humoral en la DM tipo 1

La respuesta inmune humoral está mediada por moléculas de anticuerpos que se encuentran en circulación, las cuales son responsables del reconocimiento específico y de la eliminación de antígenos o autoantígenos.

La respuesta inmune humoral, involucrada en el proceso de destrucción de las células β , produce durante el período de autoagresión, autoanticuerpos específicos para diversos antígenos. Se generan así, una serie de marcadores humorales en circulación como son los autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de las células de los islotes (ICA), los autoanticuerpos anti-insulina (IAA), los autoanticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (GAD), los autoanticuerpos anti-tirosina fosfatasa (IA-2 o ICA512), etc., los cuales pueden persistir después de desencadenarse la enfermedad (Bottazzo *et al.*, 1974; Palmer *et al.*, 1984; Bækkeskov *et al.*, 1982; Bækkeskov *et al.*, 1990). En la **Figura 3** se resumen esquemáticamente los principales sucesos de origen autoinmune que conducen a la lisis de la célula β , y a la producción de ciertos autoanticuerpos, que

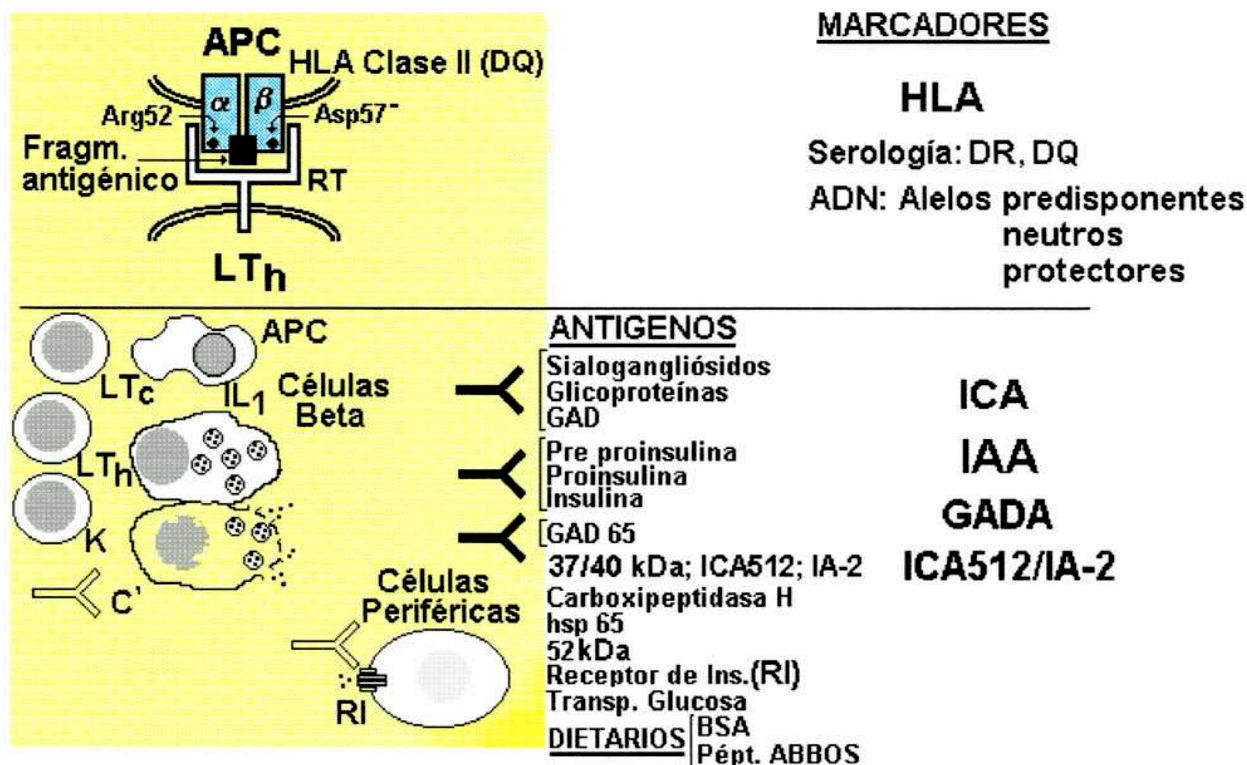


Figura 3

Panel superior izquierdo: esquema ampliado de la adhesión celular CPA/LTh, mostrando las posiciones DQ α 52 y DQ β 57, críticas para conferir predisposición o resistencia a la DM tipo 1. En el panel inferior izquierdo, se esquematizan los principales componentes celulares y humorales del Sistema Inmune, que participan en el cuadro de insulinitis. En el centro se presentan los autoantígenos más destacados, participantes de la autoagresión o más frecuentes, como inductores secundarios de los autoanticuerpos marcadores de la DM tipo 1. A la derecha se presentan los correspondientes marcadores que se determinan actualmente.

podrían estar involucrados en la agresión o ser consecuencia de un epifenómeno de la misma.

Como resultado de la respuesta inmune humoral, en la cual se producen distintos autoanticuerpos, es importante destacar el valor de los mismos para la predicción de la enfermedad, debido a la existencia de una relación entre la cantidad de individuos de una determinada población que presentan el marcador (autoanticuerpo) positivo y la cantidad de ellos que desarrollan la enfermedad en un momento determinado.

Estos autoanticuerpos, probablemente irrelevantes para el desarrollo de la patogenia de la diabetes, son valiosas herramientas para el diagnóstico precoz de la enfermedad, dado que son los testigos del proceso autoinmune silencioso que precede a la sintomatología clínica con muchos años de antelación (Bingley *et al.*, 1997; Verge *et al.*, 1996). Si bien la lista de estos marcadores parece ser extensa, en la actualidad los trabajos en epidemiología y predicción incluyen un número restringido de los mismos para la predicción de la DM:

1) Autoanticuerpos anti citoplasma de la célula del islote pancreático o ICA.

Este marcador ha sido descrito por primera vez por Bottazzo *et al* (1974), y aún hoy es muy usado como marcador serológico clásico para el diagnóstico y predicción de DM tipo 1 humana. Preceden en años a la aparición de los síntomas clínicos y desaparecen paulatinamente una vez instalada la enfermedad. Se determinan por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre secciones de páncreas humano fresco (Bingley *et al.*, 1996). Esta metodología fue empleada, antes de haberse identificado los antígenos hacia los cuales están dirigidos los ICA, encontrándose presentes en aproximadamente el 80% de los sueros de pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1. Se puede observar en la **Figura 4**, el patrón de inmunofluorescencia que presentan aquellos pacientes que resultaron positivos para este ensayo.

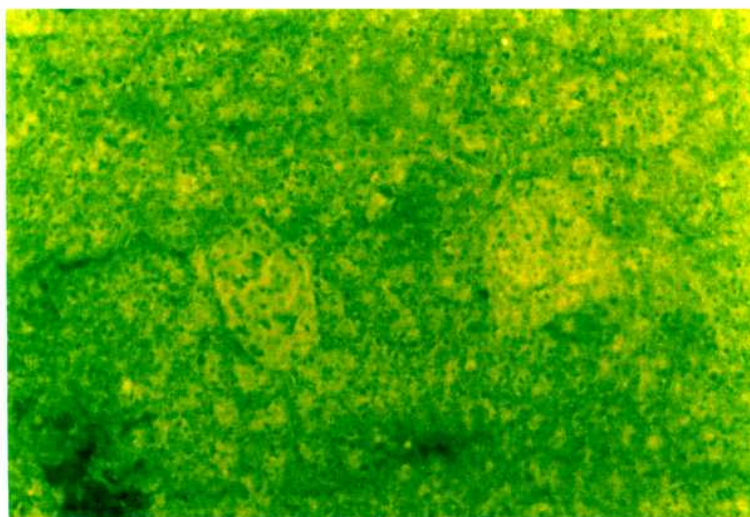


Figura 4

Se presenta el patrón de inmunofluorescencia obtenido de individuos que resultan positivos para el test de ICA.

A pesar de los esfuerzos realizados para mejorar la estandarización y cuantificación de esta técnica, no fue posible evitar los problemas inherentes a los tests histoquímicos (Bonifacio *et al.*, 1990; Lernmark *et al.*, 1991). Así, este ensayo resulta poco preciso y reproducible, con sensibilidad variable entre diferentes laboratorios y con límite de detección que oscila en varios órdenes de magnitud, dependiendo del tejido pancreático utilizado. Además, el ensayo posee una limitante que es la disponibilidad de páncreas humano de individuos del grupo sanguíneo 0 en buen estado y los resultados dependen de la subjetividad del operador, el cual debe estar entrenado para la interpretación de los mismos (Marner *et al.*, 1986; Landin-Olsson *et al.*, 1986). Debido a los inconvenientes planteados y a lo laborioso de la técnica, su aplicación se hace dificultosa en programas que involucren grandes poblaciones de pacientes. Asimismo, el desarrollo de ensayos definidos y cuantitativos para ICA se ve dificultado por la composición heterogénea de los antígenos reconocidos por estos marcadores en los islotes (Atkinson *et al.*, 1993; Bingley *et al.*, 1990). Los principales componentes constitutivos de este sistema antigénico son la GAD65 (Richter *et al.*, 1993; Bingley *et al.*, 1990), el Glicolípido GT3 (Riley *et al.*, 1990), el ICA512 (Baëkkeskov *et al.*, 1990), la Carboxypeptidasa H (Bingley *et al.*, 1997), etc. Algunos estudios determinan la existencia de 2 marcadores que representan mayoritariamente los resultados obtenidos por IFI en las secciones de páncreas humanos (ICA): anti-GAD65 y anti-IA2 (IA2/ICA512) (Bottazzo *et al.* 1974; Richter *et al.* 1992).

A pesar de las dificultades técnicas mencionadas anteriormente con la detección de los ICA, la mayoría de los modelos corrientes para evaluar el riesgo de desarrollar la DM tipo 1 se basan en este método. Se ha descrito que la prevalencia del mismo en pacientes con diagnóstico reciente de la enfermedad es del 75% (Riley *et al.*, 1990). Estudios en grupos de familiares de pacientes, muestran que la mayoría de los casos futuros de Diabetes están concentrados en los subgrupos de individuos que presentan ICA (Bingley *et al.*, 1997).

2) Autoanticuerpos específicos hacia la insulina (IAA) o hacia su precursor, proinsulina (PAA). La presencia de IAA fue descripta inicialmente en aproximadamente el 20% de los pacientes diabéticos recientemente diagnosticados (Palmer *et al.*, 1984). Estos marcadores se producen en respuesta a la insulina, que es la proteína cuantitativamente mayoritaria en el páncreas (Palmer *et al.*, 1984) y hacia sus precursores prepro- y proinsulina, los cuales inducirían una inmunización secundaria. Con respecto a los autoanticuerpos anti-proinsulina (PAA), cuyo antígeno específico corresponde al precursor inmediato de la insulina, se ha indicado que estarían más asociados a la DM tipo 1 que los IAA (Bohmer *et al.*, 1991), dado que la proinsulina sería el inmunógeno inductor de los autoanticuerpos definibles como PAA e IAA. Ambos forman parte de los marcadores para la predicción de la enfermedad, aumentando (junto con otros marcadores), el poder predictivo. A partir de ellos, se pudo detectar entre el 70% y el 90% de los casos evolutivos a DMID con varios años de antelación (Groop *et al.*, 1988). Estos marcadores se detectan por el ensayo de radioligando (RBA), aplicando trazadores homogéneos de insulina de alta estabilidad (A-14), expresándose los resultados en % de unión (B%). Debido a que los IAA son indistinguibles de los autoanticuerpos inducidos por la insulina inyectada (IA), es importante para la aplicación del test de IAA que el paciente no haya recibido insulina terapéuticamente.

3) Autoanticuerpos dirigidos hacia la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) del sistema GABAérgico. Estos autoanticuerpos, denominados GADA, están dirigidos principalmente contra una de las isoformas de la enzima que cataliza la síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA), presente en los islotes (Baëkkeskov *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1994). Inicialmente se evidenció la presencia de estos autoanticuerpos en el suero de pacientes con DM tipo 1 ya que inmunoprecipitaban una proteína de 64KDa proveniente de un lisado de células de islotes. La mayoría de los pacientes DM tipo 1 presentan en el suero anticuerpos contra esa proteína de 64Kda, hoy reconocidos universalmente como GADA. Los GADA aparecen con varios años de antelación a la sintomatología clínica,

siendo el marcador predictivo más confiable y temprano de la DM tipo 1 en humanos (Baëkkeskov *et al.*, 1982; Christie *et al.*, 1990).

Este marcador puede ser detectado hasta diez años antes de la aparición de los síntomas clínicos y puede persistir varios años después de haberse desencadenado la enfermedad, brindando una herramienta aún más poderosa que el test de ICA. (Kawasaki *et al.*, 1994; Zanone *et al.*, 1994).

4) Autoanticuerpos dirigidos hacia la proteína tirosina fosfatasa (IA-2 o su fragmento ICA512). Esta macromolécula fue identificada en 1992 como una proteína de membrana (IA-2), expresada en células de los islotes. En trabajos posteriores se la identificó como un antígeno a partir de un inmunoprecipitado de fragmentos tripticos del islote y el marcador se designó como anti 37/40KDa. Finalmente se encontró una relación entre los fragmentos de 37/40KDa y el fragmento de ICA512 con la proteína tirosina fosfatasa IA-2 (Christie *et al.*, 1990; Passini *et al.*, 1995; Payron *et al.*, 1995). Se ha descrito la presencia de ARNm codificante para ICA512 tanto en cerebro como en páncreas. Entre los pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1 sólo el 40-50% presenta autoanticuerpos, pero sólo en el 9% de estos pacientes con más de un mes de diagnóstico y son altamente predictivos del desarrollo de la Diabetes en los grupos de parientes de riesgo (Cristie *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1995).

Algunos estudios determinan la existencia de dos marcadores anti-GAD y anti-ICA512, como los componentes mayoritarios que definen los ICA y en combinación cubren la mayor parte de la reactividad detectada en el test de IFI (Myers *et al.*, 1995; Bottazzo *et al.* 1974; Richter *et al.* 1992). Recientemente, se han efectuado estudios validando la elección de esos marcadores (Verge *et al.*, 1996). Actualmente se acepta que la detección conjunta de los marcadores anti-GAD y anti-ICA512, sería adecuada para reemplazar al test histoquímico de ICA (Bingley *et al.*, 1997; Bonifacio *et al.*, 1995). Dada la reciente descripción de esta estrategia, aún no se ha investigado exhaustivamente su posible utilidad en los programas prospectivos de la prediabetes tipo

l y tampoco ha sido explorada su aplicación en la detección de la Diabetes mediada por autoinmunidad de los adultos. Lo que sí se sabe, es que esas variantes de DM en adultos cursan con un patrón inmunológico y genético diferente (Zavala *et al.*, 1992; Lohmann *et al.*, 1997).

2.9. Características generales de los sistemas antigénicos correspondientes a los marcadores anti-GAD y anti-ICA512

2.9.1. GLUTAMATO DECARBOXILASA

Según se mencionó, la glutamato decarboxilasa o GAD, es la enzima que sintetiza el neurotransmisor GABA en neuronas y en células β pancreáticas a partir del ácido L-glutámico. Esta enzima presenta dos isoformas: GAD65 y GAD67, con masas moleculares de 65 y 67 KDa, respectivamente (Karlsen *et al.*, 1991). Ambas proteínas, han sido clonadas de diferentes mamíferos y al comparar sus secuencias, se evidenció una gran conservación de la GAD. Por ejemplo, la GAD65 humana presenta más del 95% de homología con la secuencia GAD65 porcina, y de rata (Suzuki *et al.*, 1995). Por otro lado, se observa un 70% de homología al comparar las secuencias de GAD65 y GAD67 humanas. La mayor diferencia entre las dos isoformas, se encuentra en los primeros 100 residuos de la región N-terminal, donde sólo comparten 20 aminoácidos. El resto de la secuencia aminoacídica es muy similar, presentando sólo un 22% de cambios entre ambas. Esto podría explicar por qué a pesar de que los GADA son considerados marcadores inmunológicos de elevado valor predictivo para la enfermedad, éstos están principalmente dirigidos hacia la isoforma de la GAD65 pancreática (Hagopian *et al.*, 1993; Baëkkeskov *et al.*, 1982; Baëkkeskov *et al.*, 1990).

Es importante recordar, que estas isoformas presentan secuencias de gran similitud con el virus Coxsackie B4 y podrían jugar un rol en un proceso de mimetismo molecular en la patogenia de DM tipo 1.

Las proteínas GAD65 y GAD67, están codificadas por genes localizados en diferentes cromosomas. En el humano, GAD65 se encuentra codificada en la región p11.2-p12 del cromosoma 10, mientras y que la isoforma GAD67 se localiza en la región q31 del cromosoma 2 (Bu *et al.*, 1992; Edelhoff *et al.*, 1993). La GAD65 se expresa como un transcripto de 5,7 kb, mientras que la GAD67 lo hace como un transcripto de 3,7 kb. Un caso particular se evidenció en ciertos tejidos celulares del cerebro en desarrollo de rata, donde el ARNm de la isoforma GAD67 sufre un corte y empalme del ARNm alternativo, originando un ARNm bicistrónico a partir del cual se expresan dos proteínas: la GAD25 (inactiva) y la GAD44 (Szabo *et al.*, 1994). Estudios posteriores, demostraron que el evento de corte y empalme descrito, está restringido a embriones y no está presente en cerebros de adultos.

La GAD65 y GAD67, difieren en sus propiedades bioquímicas y en su localización intracelular. Ambas isoformas contienen un sitio de unión para el fosfato de piridoxal (PLP), cofactor necesario para la actividad enzimática, localizado en la región C-terminal cuya secuencia consenso presenta: Asn-Pro-His-Lys (en la GAD65, esta secuencia se localiza entre los aminoácidos 390-403). Si bien la GAD67 se encuentra fuertemente asociada a la coenzima PLP como holoenzima, una fracción importante de la GAD65 se encuentra como apoenzima y su actividad puede ser inducida por adición de PLP. Esto sugiere, que las isoformas serían reguladas *in vivo* en forma diferente. Se ha sugerido, que ambas isoformas forman un sistema dual para la regulación de la síntesis de GABA en las terminales nerviosas. La GAD67 sería la responsable de la producción constitutiva de GABA, mientras que la GAD65 puede ser regulada de acuerdo a los niveles de PLP presentes y sería la responsable de generar GABA en aquellas situaciones donde se demande un imprevisto aumento de GABA (Martin *et al.*, 1991).

Además de la regulación mediada por el cofactor PLP, la actividad enzimática de GAD, se ve afectada por la fosforilación en presencia de ATP. Hay evidencias de que la proteína kinasa A y la calcineurina (principal proteína dependiente de calcio en cerebro) serían las responsables de la fosforilación y desfosforilación de la GAD, respectivamente (Bao *et al.*, 1995).

Localización tisular, celular y subcelular: la GAD se localiza principalmente en el sistema nervioso y páncreas (y en menor medida en testículo y ovario).

a) sistema nervioso: la GAD65 predomina en el sistema nervioso central, mientras que la GAD67 se encuentra en los nervios periféricos. Ambas isoformas están presentes en las neuronas GABAérgicas del cerebro y se almacenan en pequeñas vesículas sinápticas.

b) páncreas: en los islotes humanos, se observa la expresión sólo de la isoforma GAD65. Sin embargo, se ha detectado la presencia de ARNm de GAD67 (no de proteína) y a su vez en proporción 200 veces menor que el ARNm de GAD65 (Cram *et al.*, 1995). La GAD65 se expresa principalmente en células β , aunque en menor medida también en algunas células α y δ del islote pancreático (Vives-Pi *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1993).

Tanto en páncreas como en sistema nervioso, ambas isoformas de la GAD son sintetizadas en el citoplasma como moléculas hidrofílicas y solubles. Sin embargo, mientras que la GAD67 permanece en esas condiciones, aproximadamente el 60% de la GAD65 es modificada post-traduccionalmente y en consecuencia se encuentra anclada a la membrana de pequeñas microvellosidades de las vesículas (Christgau *et al.*, 1991 y 1992). Se vio que la modificación post-traducciona l que sufre esta proteína es un proceso que consta de dos etapas: la primera, la convierte en una molécula hidrofóbica que permanece en el citosol (proceso irreversible) y la segunda etapa, da como resultado el anclaje de la proteína a la membrana (proceso reversible) (Christgau *et al.*, 1991).

Dentro de los 95 aa de la región N-terminal, en que se diferencian ambas proteínas, existe un sitio de palmitoilación presente sólo en la isoforma GAD65, sugiriendo que este ácido graso está involucrado en su posible anclaje a membrana (Christgau *et al.*, 1992). Estudios posteriores confirmaron que en el dominio N-terminal de la proteína (cisteínas 30 y 45), ocurre la modificación lipídica de la GAD65 (Christgau *et al.*, 1992). Posteriormente, numerosos ensayos demostraron la presencia de GAD65 anclada a membrana, aún en los casos donde los aminoácidos de las cisteínas eran sustituidos por alaninas, confirmando que la palmitoilación no posee el rol principal en el anclaje. Sin embargo, se encontró una secuencia adyacente a este sitio, la cual comprende los residuos aminoacídicos 24 al 31, siendo éstos esenciales para que ocurra el anclaje de la GAD65 a la membrana.

Los GADA son dirigidos principalmente contra epitopes conformacionales y no son reactivos frente a la GAD65 desnaturalizada (Ritcher *et al.*, 1993; Tuomi *et al.*, 1994; Daw *et al.*, 1995; Falorni *et al.*, 1996 y Papouchado *et al.*, 1996). Por eso es conveniente recordar que la integridad conformacional de esta molécula es esencial para la detección de los GADA. El ensayo que brinda datos más confiables es el de inmunoprecipitación o ensayo de radioligando (RBA). La GAD recombinante utilizada en los ensayos se obtiene *in vitro* a partir de un sistema de expresión eucarionte (Grubin *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1994b; Falorni *et al.*, 1995).

2.9.2 PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA

Como se mencionó anteriormente, del estudio de inmunoprecipitados de extractos de islotes con sueros de pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1, se han identificado principalmente tres fragmentos trípticos de masas relativas de 50, 40 y 37 KDa. Los pacientes diabéticos que poseen autoanticuerpos hacia el fragmento de 50

KDa, también inmunoprecipitan la GAD. Sin embargo, no reaccionan contra los otros dos fragmentos (Christie *et al.*, 1993).

Recientemente, se han identificado a los fragmentos tripticos de 40 KDa como parte de una proteína transmembrana relacionada con la tirosina fosfatasa de las células T(CD45). Este fragmento fue posteriormente denominado ICA512 (Passini *et al.*, 1995; Payton *et al.*, 1995; Lan *et al.*, 1994; Rabin *et al.*, 1994). Por otra parte, los fragmentos tripticos de 37 KDa constituyen el dominio intracelular de una proteína que presenta homología estructural con IA-2 (**Figura 5**). Esta proteína se denomina fogrina y posee relación con las proteínas tirosina fosfatasa, aislada de gránulos secretores de insulina. Los fragmentos de 37/40KDa presentan una homología del 88% en su secuencia aminoacídica (Kawasaki *et al.*, 1996).

Del *screening* de una biblioteca de insulinoma humano, se obtuvo el cADN correspondiente a la proteína tirosina fosfatasa (IA-2) (Goto *et al.*, 1992). La secuencia del cADN, presentó un tamaño de 3,613 pb, con 73 pb en la región 5' no codificante y 600 pb en la 3' no codificante, incluyendo a la señal de poliadenilación en la posición 3584 (Lan *et al.*, 1994).

El ARNm presenta diferentes sitios de iniciación de la traducción, pero el codón de iniciación (ATG) localizado en la posición 74 es el dominante. La proteína IA-2 se expresa como un transcrito de 2,937 pb (979aa) con una masa molecular de 106 KDa (Lan *et al.*, 1994).

El estudio de hidrofobicidad permitió evidenciar que dicha secuencia aminoacídica posee tres dominios hidrofóbicos principales (Kyte and Doolittle., 1982; Klein *et al.*, 1985). Estos son descritos en la **Figura 6**. Además, en esta figura se representa esquemáticamente la proteína IA-2 e ICA512, la cual fue inicialmente descrita por Rabin *et al.*, (1994) como una proteína incluida dentro de la secuencia ya descrita para la molécula de IA-2 por Lan *et al.*, (1994).

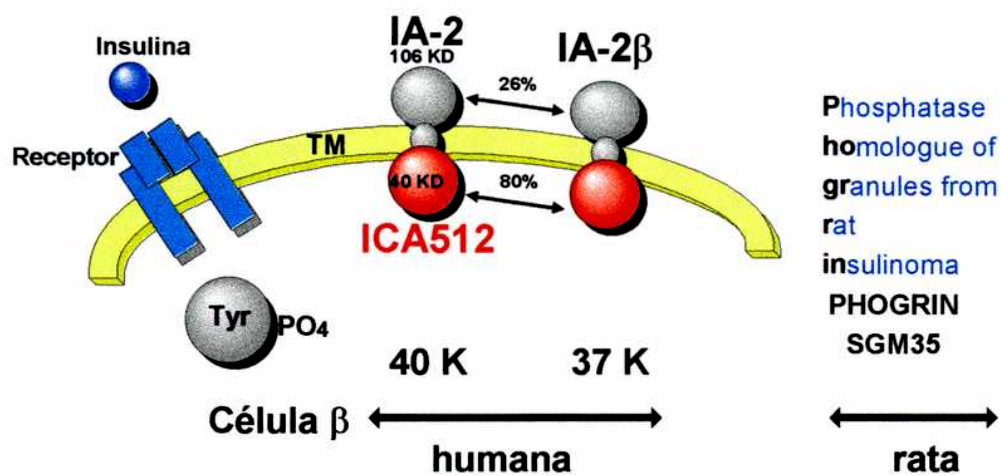


Figura 5

El esquema muestra la localización celular de la proteína tirosina fosfatasa (IA-2) y de la fgrina, destacando la región intracelular correspondiente a los fragmentos de 40 y 30KDa respectivamente.

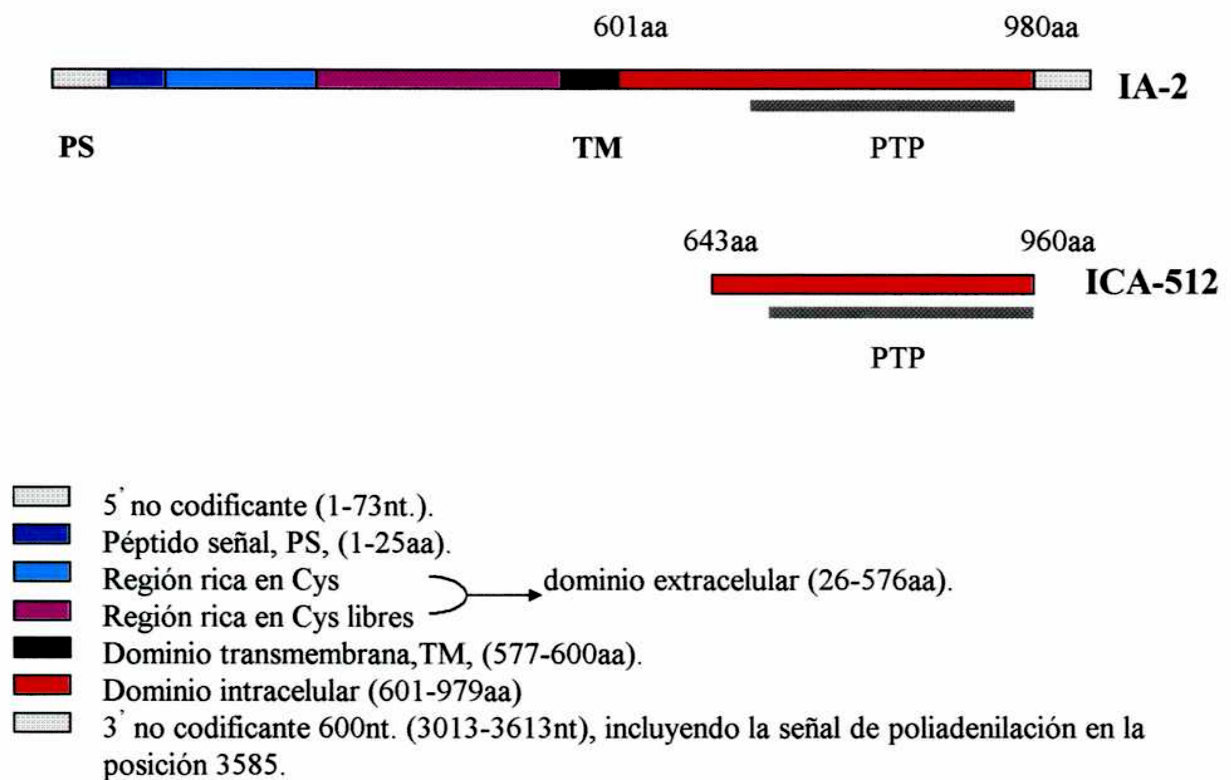


Figura 6

Secuencia de la tirosina fosfatasa (IA-2), indicando la localización del péptido señal (PS), el dominio transmembrana (TM) y la región de homología con la familia de proteínas tirosina fosfatasa. Además, se representa la secuencia de ICA512, la cual posee sitios de unión para autoanticuerpos.

En el esquema de la **Figura 6**, se puede observar dentro del dominio intracelular (601-979aa), una región altamente conservada, la cual presenta homología con el dominio catalítico encontrado en los miembros de la familia de proteínas tirosina fosfatasa (PTP) (Solimena *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 1994; Charbonneau *et al.*, 1989 y Payton *et al.* 1995) y en particular con CD45. Además, el patrón de expresión, sugiere que dicha proteína tendría un papel en la modulación de la señal endócrina.

Localización tisular, celular y subcelular: Basado en datos de secuenciación y expresión de dicha proteína, ésta parece ser un nuevo miembro de la familia de receptores de tirosina fosfatasa expresada en todas las células del linaje neuroendócrino (páncreas y cerebro) (Myers *et al.*, 1995; Lan *et al.*, 1994).

Otros estudios demostraron que es una proteína intrínseca de membrana de gránulos secretores, expresada en células β pancreáticas productoras de insulina, así como también en otras células endócrinas secretoras de péptidos y en neuronas neuroendócrinas, todas ellas conteniendo gránulos neurosecretores (Lan *et al.*, 1994). Estos autores sugieren que un subconjunto de autoanticuerpos presentes en pacientes con DM tipo 1, está dirigido contra el dominio intracelular de dicha proteína.

Finalmente, Kawasaki *et al.*, (1996), implementando una construcción que incluía el dominio intracelular de la proteína, que denominó ICA512bdc demostró la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra la enzima IA-2. Estos autoanticuerpos también tienen la capacidad de reconocer a la proteína ICA512bdc, confirmando lo antes mencionado.

Otros estudios han demostrado que el fragmento ICA512 conserva el dominio enzimático de PTPasa. Se vio que la fosforilación del mismo co-localiza con los gránulos secretores. Esto sugiere que ICA512 probablemente juegue un rol importante en el ciclo de vida de estos gránulos (Lan *et al.*, 1994). En un estudio posterior se demostró que el dominio PTPasa de esta enzima contiene un residuo aminoacídico de Asp en lugar de Ala

en la posición 911, dicho cambio inhibe la actividad de PTPasa (Zhang *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994; Lan *et al.*, 1994 c). Por lo tanto, todavía queda por resolver si la IA-2 es inactiva como tirosina fosfatasa, debido a este cambio, o si posee un sustrato estrictamente específico aún desconocido. (Payton *et al.*, 1995)

El fragmento ICA512 recombinante utilizado en los ensayos se obtiene *in vitro* a partir de un sistema de expresión eucarionte (Grubin *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1994; Falorni *et al.*, 1995).

2.10. Importancia de la utilización de ensayos adecuados para la detección de marcadores serológicos de autoinmunidad

Para la detección de los marcadores serológicos descritos en la sección 1.8.2.b. (menos para el ensayo de ICA), se pueden emplear, al menos en teoría, diferentes principios inmunoanalíticos. Es así que estos marcadores pueden detectarse tanto por un ensayo en fase líquida llamado *radiobinding assay* RBA (Kurtz *et al.*, 1988) o mediante un ensayo en fase sólida como el *enzyme linked immunosorbent assay* ELISA (Wilkin *et al.*, 1985; Nell *et al.*, 1985 y Koch *et al.*, 1986). A continuación se analizará en especial el RBA, debido a que este ensayo se utiliza en el presente trabajo.

2.10.1. Principios metodológicos del RBA

Influencia de la afinidad en los anticuerpos a detectar

Si se utiliza el RBA como herramienta de detección, se emplea como trazador insulina marcada con ^{125}I o GAD65 y ICA512 marcadas con ^{35}S -metionina

respectivamente (Palmer *et al.*, 1984). Dicho ensayo está regido por la ley de acción de masas, por lo cual la concentración del ligando marcado al ser pequeña, determina que la cantidad de éste unido al anticuerpo dependa fuertemente de la constante de afinidad y de la concentración. Es por ello que los anticuerpos detectados eficientemente en este tipo de ensayos son los de alta afinidad. Por otra parte, esta metodología permite la exposición libre de los epitopes del trazador en solución, posibilitando de esta manera el acceso de los mismos para la unión adecuada con sus anticuerpos específicos.

2.11. Factores que influyen el valor predictivo de un marcador

Debido a que cada laboratorio posee sus propios índices de *especificidad* y *sensibilidad*, el *valor de poder predictivo* del marcador se verá afectado. Estas fluctuaciones pueden explicar las discrepancias encontradas en estudios de prevalencia.

En diversos trabajos, para analizar el *valor predictivo* de cada uno de los autoanticuerpos por separado o en su conjunto, se ha empleado una fórmula derivada del Teorema de Bayes sobre probabilidades condicionales. En éste se relaciona el *valor predictivo*, la cantidad de individuos de una determinada población que presentan el marcador positivo y que desarrollan diabetes en un momento determinado, con la sensibilidad y la especificidad del marcador empleado y con la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. Es importante destacar que dicha prevalencia varía según el grupo etario, étnico y según la región. Por otra parte, los parámetros de sensibilidad (los resultados positivos en los pacientes enfermos) y la especificidad (100 menos resultados negativos en individuos sanos), varían de acuerdo a un conjunto de factores como: la incidencia real de ese marcador en la población de enfermos y sanos, la performance del método empleado, y el título de corte o *cut-off* establecido para dicho ensayo. El *cut-off*, indica a partir de qué valores de unidades una muestra será considerada como positiva, éste se determina como el resultado de la media más dos o

tres desvíos estándar de una población normal. Probablemente se establezca un valor mayor de nivel de corte si el interés es tener una alta especificidad en el método de detección que se emplea, evitando así los falsos positivos, con la consecuente disminución de la sensibilidad y, por ende, un incremento de falsos negativos (Stumpo *et al.*, 1994).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Dada la alta prevalencia de la DM a nivel mundial (5%) y el alto impacto social y económico de sus complicaciones, se están efectuando importantes esfuerzos en diversas áreas, como las del diagnóstico y del seguimiento de control. Para las variantes de DM autoinmune en particular, los principales objetivos perseguidos son los de predicción y prevención. Los avances logrados en predicción se basan principalmente en la detección de múltiples autoanticuerpos (marcadores), lo cual implica complejidad operativa y altos costos. Actualmente se considera la capacidad predictiva de esos marcadores de daño inmunológico, junto con otros marcadores accesorios, con los factores genéticos (genotipificación HLA) y con las pruebas funcionales pancreáticas, para identificar individuos con riesgo de padecer DM tipo 1 y prevenir en ellos el desarrollo de la enfermedad. En los programas de predicción y prevención de la DM tipo 1 se tiene como propósito la detección precoz de la etapa prodrómica en individuos susceptibles, a través de marcadores serológicos de autoinmunidad, y de esa manera brindar apoyo racional para que los tratamientos preventivos logren su efectividad y sean aplicados antes del agotamiento total de las células β pancreáticas. Por lo tanto, es necesario contar con metodologías económicamente ventajosas, simples y de baja complejidad, que permita la detección de los marcadores serológicos de alto valor predictivo y además es deseable que esos test sean aplicables en laboratorios de bioquímica clínica general (mediana complejidad).

Con las miras anteriormente expuestas, el objetivo general del presente trabajo de Tesis de Licenciatura consistió en la implementación de una técnica analítica alternativa y ventajosa para la determinación sistematizada de los marcadores serológicos de autoinmunidad anti-GAD y anti-ICA512, aplicable a la detección precoz de la DM tipo 1 y de la DM mediada por autoinmunidad en los adultos.

Siguiendo esos principios, se encaró un programa de trabajo con las siguientes etapas (objetivos específicos):

3.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

3.1.1. Verificar si el ensayo de IP combinada en un único ensayo, exhibe o no la *performance* de los dos métodos ejecutados individualmente

Para este ensayo se realizó la implementación de una técnica radiométrica basada en la inmunoprecipitación combinada de inmunobiológicos recombinantes obtenidos por transcripción y traducción *in vitro* en un sistema de células eucariotas lisadas. Los trazadores obtenidos por esta vía son: ^{35}S -GAD y ^{35}S -ICA512. Con esos trazadores se implementó la técnica de inmunoprecipitación individual y combinada de dos autoanticuerpos: anti-glutamato decarboxilasa (GADA) y anti-ICA512. La elección de estos marcadores, se basó en estudios previos de otros laboratorios y confirmados por nuestro grupo de investigación, indicativos que la enzima GAD65 y la proteína tirosina fosfatasa IA2/ICA512 constituyen el par óptimo de antígenos para predecir la autoinmunidad específica en la DM tipo 1. Esto se llevó a cabo de manera sistematizada para verificar si la detección combinada de ambos marcadores serológicos de autoinmunidad en un ensayo único, exhibe o no la *performance* de los métodos ejecutados individualmente. Con los resultados obtenidos a partir de la seroteca de pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1, verificar si la variante combinada es en efecto económicamente ventajosa, además de consumir menos tiempo, material y trabajo.

3.1.2. Probar si el ensayo de IP combinada en un único test resulta más eficaz que el test de ICA utilizado actualmente

Como se mencionó en la introducción, la detección de los ICA ha sido el método de elección, en todos los programas epidemiológicos y predictivos de la DM tipo 1.

Dados los inconvenientes que presenta esta determinación, se evaluó la posibilidad de reemplazar este ensayo por el de IP combinada, considerando especialmente su aplicación en la prospección de la DM tipo 1.

Además de la determinación de los ICA, el trabajo se complementó con ensayos de otros marcadores serológicos de autoinmunidad, como son los autoanticuerpos anti-insulina (IAA). De este modo se espera reforzar las pruebas sobre la existencia de la respuesta inmune humoral anti-islole y, de acuerdo a los resultados, ver si el estudio de la variante combinada puede reemplazar el test convencional de ICA.

3.2. DIABETES MELLITUS MEDIADA POR AUTOINMUNIDAD EN EL ADULTO

3.2.1. Evaluar la posibilidad de extender el ensayo de IP combinada en el diagnóstico de diferentes formas de Diabetes

Evaluar la posibilidad de extender dicha metodología en el apoyo diagnóstico de diferentes formas de Diabetes: Además de pacientes con DM tipo 1 (niños) (según los objetivos 1 y 2), se estudiaron casos de LADA, pacientes con fracaso secundario a los HGO y pacientes con DM tipo 2 (adultos).

Como el reclutamiento de individuos representativos de casos variantes no es idealmente viable, se realizó un estudio de sueros provenientes de individuos preclasificados según los siguientes criterios clínicos: a) pacientes que requirieron insulina antes de los dos años del diagnóstico (DM1), homologables a pacientes con LADA, b) pacientes con DM tipo 2 que requirieron tratamiento con insulina luego de más de diez años de su diagnóstico (DM2I), homologables a fracaso secundario, y c) pacientes con DM tipo 2 (DM2), clínicamente controlados.

Por último, se planteó el procesamiento e interpretación de los resultados obtenidos en diferentes subgrupos etarios de un grupo étnico representativo de Argentina con el fin de proponer las estrategias analíticas apropiadas para la predicción de la DM autoinmune en sus distintas variantes, para su consideración médica y para la eventual intervención terapéutica de los individuos evolutivos a diabetes clínica. Esta última propuesta representa un enfoque original, hasta donde nos consta no implementado en programas o "*trials*" a nivel internacional. Este trabajo servirá de base para la participación formal del Laboratorio de Inmunoendocrinología (LIE) FFyB, UBA, donde se ejecutará este plan, en un programa multiprofesional de *Predicción y Prevención* de la DM tipo 1 avalado por la Sociedad Argentina de Diabetes (SADAC).

Además, un subsidio bianual acordado especialmente para este programa por la ANPCYT dará soporte financiero al proyecto.

La perspectiva de efectuar un aporte tecnológico, económicamente factible, para cubrir ese plan significará un ensayo piloto para explorar el impacto de estos análisis en la Medicina Diabetológica actual y futura.

MATERIALES Y METODOS

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Pacientes. Obtención de sueros

Para los análisis inmunológicos se utilizaron sueros provenientes de la seroteca establecida en el LIE juntamente con el Servicio de Nutrición del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Argentina. Dicha seroteca incluye muestras de pacientes debutantes con DM tipo 1 y de los grupos familiares bajo riesgo seleccionados por las Dras: Andrea Krochik y Carmen Mazza (Directora de la sección Diabetes). Los diagnósticos fueron hechos en el Hospital de Niños Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina, de acuerdo al criterio del National Diabetes Data Group (1979). Las muestras se recolectaron hasta dos días después del diagnóstico de DM tipo 1.

Se analizaron 71 sueros de dicha seroteca (divididos equitativamente en sexo y en un rango de edad de 1-17 años). Los controles normales incluyeron sueros de 30 individuos sanos (dentro del mismo patrón de sexo y rango de edades), sin historia familiar de DM tipo 1, libres de enfermedades autoinmunes, ninguno de los cuales poseía antecedentes de insulino terapia o experimentado episodios de hiperglucemia.

También se incluyeron en el estudio sueros provenientes de individuos adultos preclasificados según los siguientes criterios clínicos: a) 42 pacientes que requirieron insulina antes de los dos años del diagnóstico (DM1), b) 30 pacientes con DM Tipo 2 que requirieron tratamiento con insulina luego de más de diez años del diagnóstico (DM2I) y c) 64 pacientes con DM tipo 2 (DM2); también para estos grupos se utilizaron sueros de control como se describió anteriormente. Los sueros de los pacientes de los subgrupos a, b y c, provinieron del Centro de Endocrinología Experimental Aplicada (CENEXA, UALP-CONICET) a través de una vinculación establecida con el Dr. Norberto Cédola, responsable de la convocatoria de pacientes adultos para este

programa. También se utilizaron sueros de control como se describió anteriormente, pero salvaguardando las condiciones de sexo y edad para esos ensayo.

4.2. Determinación de autoanticuerpos anti-células de los islotes (ICA) por la técnica de IFI

Para el ensayo, se aplicó la técnica convencional de inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre cortes de páncreas humano proveniente de un donante normal del grupo sanguíneo 0.

Esta técnica fue aplicada tal como fue desarrollada inicialmente por Bottazzo *et al.* (1974) en su variante cualitativa y con la actualización de la variante denominada cuantitativa. La variante cuantitativa se aplicó sobre aquellas muestras que resultaron positivas en el *screening* y sus resultados se expresaron en unidades JDF (de Juvenile Diabetes Foundation, entidad proveedora de los sueros patrones) (Bonifacio *et al.*, 1990; Bonifacio *et al.*, 1990 b).

4.3. Determinación de los autoanticuerpos anti-insulina (IAA) por RBA empleando ¹²⁵I-Insulina

Obtención del trazador. El marcador IAA se determinó mediante la técnica de Unión de Radioligando (RBA), con un trazador monoiododerivado de insulina humana marcada con ¹²⁵I. La insulina humana monoiodada homogéneamente (¹²⁵I-Insulina), se obtuvo a partir de la preparación semisintética libre de excipientes (Laboratorios Beta). Las técnicas de incorporación y purificación se realizaron según lo descrito por Linde *et al.*, (1981) y Jørgensen y Larsen (1980), respectivamente.

Procedimiento del RBA. El ensayo de RBA se llevó a cabo según lo descrito por Kurtz *et al.* (1988), de la siguiente manera: se incubaron alícuotas de suero normal y problema, por duplicado, con el trazador (^{125}I -A₁₄-Insulina). Para cada muestra de suero se preparó una serie adicional de tubos por duplicado con exceso de insulina humana no marcada para evaluar la unión inespecífica. Luego de la incubación, la fracción de insulina unida fue precipitada y separada utilizando polietilenglicol. La fracción recolectada de cada tubo, fue leída en un contador gamma. Los resultados se expresaron como porcentajes de unión específica (Be %) de insulina ($\text{Be \%} = \text{B \%}_{\text{preincubado sólo con el trazador}} - \text{B \%}_{\text{preincubado con exceso de insulina fría}}$). Los resultados obtenidos con los sueros normales se utilizaron para calcular el límite de inespecificidad/positividad (*cut off*) del ensayo, expresado como la media más tres desvíos estándar. Aquellos valores de las muestras problemas situados por encima del *cut off* se consideraron positivos (Stumpo *et al.*, 1994).

4.4. Determinación de autoanticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (anti-GAD) por RBA empleando ^{35}S -GAD65 humana recombinante producida *in vitro*

Obtención del trazador. El marcador anti-GAD se determinó según el método RBA de referencia descrito por Grubin *et al.* (1994) (**Figura 7**). La ^{35}S -GAD65 humana recombinante fue producida en un sistema eucariota de expresión de proteínas recombinantes, con alto grado de pureza. Para ello, 1 μg del cADN codificante para la GAD65 humana (cedido gentilmente por el Dr. A. Lernmark y clonado en el vector pEX9), fue transcrito y traducido *in vitro* empleando 25 μl de un sistema de lisado de reticulocitos de conejo (Promega, Madison, WI, USA) en presencia de 40 μCi de [^{35}S]-metionina (actividad específica 1175 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA) durante 2 hs a 30°C (**Figura 8**). Los productos de traducción se diluyeron en buffer RBA (Tris-HCL 20 mM, NaCL 0.15 M, Tween 20 0.15%, aprotinina 0.1%, BSA 0.1%, pH 7.4) y se sembraron en una columna PD10 (Sephadex G25, Pharmacia-LKB

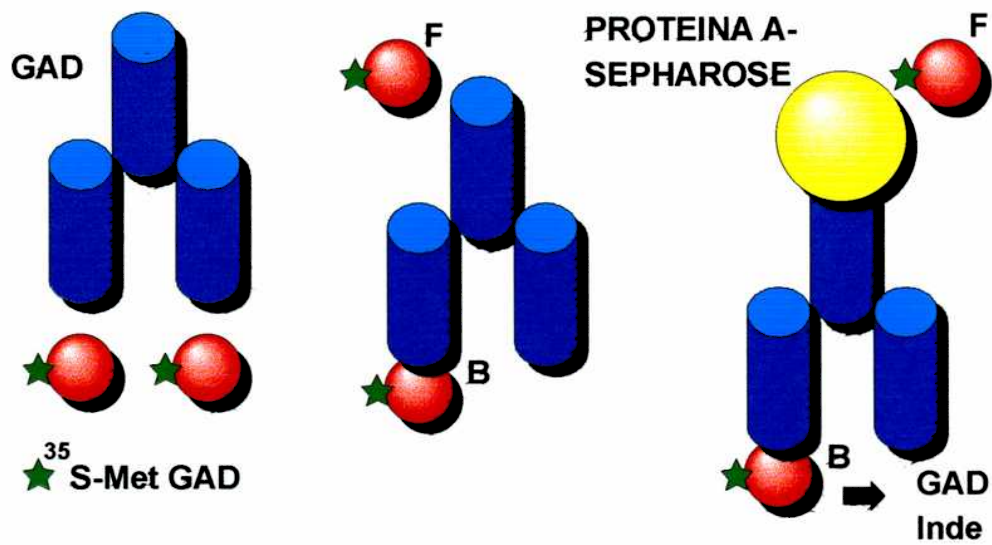


Figura 7

En el esquema se representa el test de referencia para anti-GAD. Un test similar se utiliza para la detección del marcador anti-ICA512.

Biosíntesis de ^{35}S -Met-GAD (trazador para el test de antiGAD)

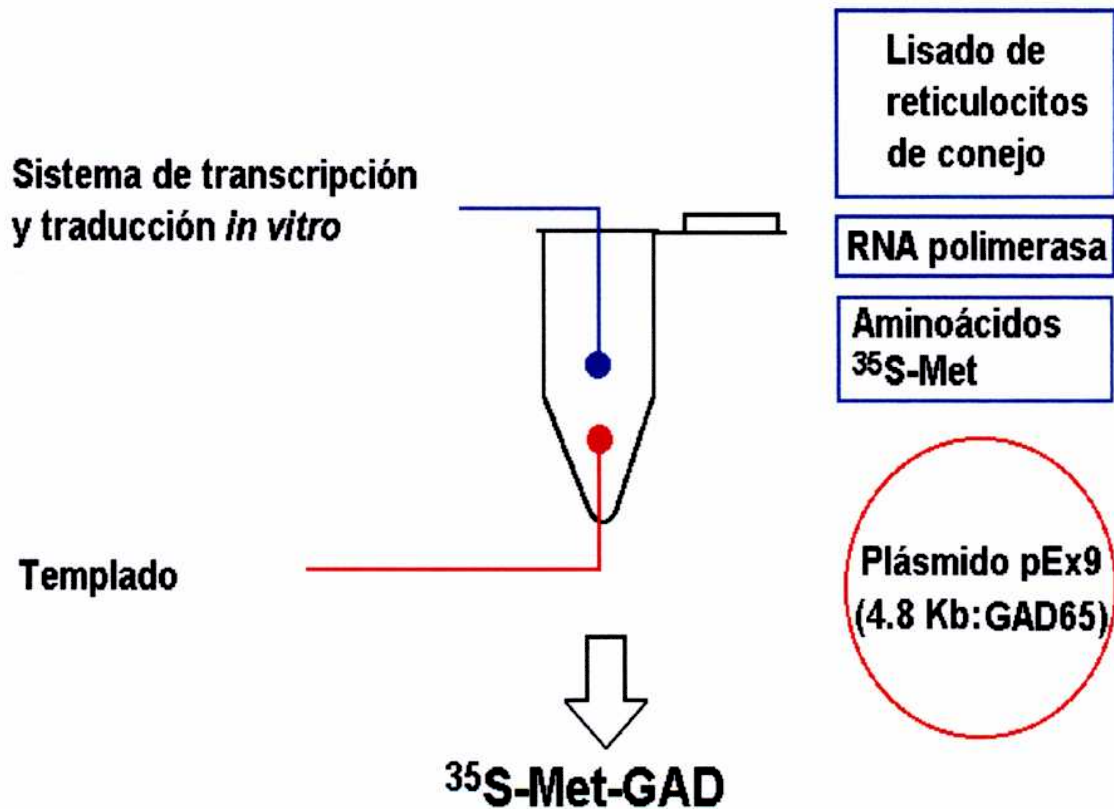


Figura 8

El esquema muestra la biosíntesis *in vitro* del antígeno recombinante GAD marcado. El fragmento de la proteína tirosina fosfatasa, ICA512 se obtuvo de forma similar a partir del vector respectivo.

Biotechnology INC., Uppsala, Suecia) de exclusión molecular, previamente equilibrada en buffer RBA para remover [³⁵S]-metionina libre.

Procedimiento del RBA. Las proteína marcadas radiactivamente (³⁵S-GAD65) fueron utilizadas para la formación de los inmunocomplejos con los autoanticuerpos específicos presentes en los sueros. Aproximadamente 20000 cpm del trazador se incubaron con alícuotas de 2.5 µl de sueros humanos (en un volumen final de 60 µl en buffer RBA) durante toda la noche a 4 °C. A continuación, a cada muestra se le agregó 50 µl de proteína A-Sepharose 4B FF 50 % (Sigma, St. Luis, MO, USA) equilibrada en buffer RBA y las mezclas se incubaron durante 2 hs. con agitación a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas y los precipitados conteniendo los inmunocomplejos se lavaron dos veces con 400 µl de buffer RBA y un tercer lavado con buffer RBA conteniendo NaCl 0.35 M. Luego, los precipitados se resuspendieron en 100 µl de SDS 1 %, tras agitación en vortex, se dejaron el tiempo necesario (unos minutos) para que la proteína A-Sepharose precipitara. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales para ser contados en un contador automático de centelleo líquido (Liquid Scintillation Analyzer Model 1600TR, Packard, Canberra, Australia). Los resultados se expresaron como *GAD index* (Grubin et al., 1994), utilizando como patrón un suero estándar internacional con *GAD index* igual a uno. Simultáneamente, fueron procesados 28 sueros normales para calcular el *cut off* como la media más tres desvíos estándar.

$$\text{GAD index} = \frac{\text{cpm de suero analizado} - \text{cpm media de los controles negativos}}{\text{cpm de suero de referencia} - \text{cpm media de los controles negativos}}$$

Cabe mencionar, que con esa metodología en el LIE ya se evaluaron, a ciegas, los sueros (n=24) provistos por el *Tercer GADA65 Proficiency Test* (Chairman: Dr. N. Maclaren, IDW, University of Florida, USA, 1997), obteniéndose los siguientes resultados: 100% de sensibilidad, 100% de especificidad, 100% de consistencia y 100%

de validez. A diferencia de la definición habitual, en este caso particular el término sensibilidad se refiere a la concordancia porcentual de los datos positivos del LIE con los sueros positivos de referencia/número total de sueros de referencia positivos.

$$\text{especificidad} = \frac{\text{número de sueros negativos de referencia}}{\text{número total de muestras por duplicado}}$$

$$\text{validez} = \frac{\text{número de resultados correctos}}{\text{número de resultados posibles}}$$

4.5. Determinación de autoanticuerpos anti-ICA512 por RBA empleando ³⁵S-ICA512 humana recombinante producida *in vitro*

Obtención del trazador. La determinación se realizó a través de un ensayo de inmunoprecipitación RBA (descrito en el punto 4.4.), pero utilizando como trazador ³⁵S-ICA512, generado de la misma forma. El vector utilizado en este caso, fue gentilmente cedido por el Dr. George S. Eisenbarth, Barbara Davis Center for Childhood Diabetes. University of Colorado. Health Sciences Center 4200 E 9th Av. Denver. Luego de la purificación (pasado por columna PD10) de ³⁵S-ICA512 para eliminar la [³⁵S]-metionina libre, el trazador se hizo reaccionar con los autoanticuerpos específicos presente en los sueros de los pacientes.

Procedimiento del RBA. La formación de los inmunocomplejos, aislados con proteína A-Sepharose, también fue determinada por centelleo líquido (de la misma manera que en el punto anterior). Los resultados se expresaron como porcentajes de unión con respecto a las cuentas totales agregadas en el ensayo. Se procesaron simultáneamente 28 sueros normales para calcular el *cut off* como la media más tres desvíos estándar.

Con esta metodología previamente fueron evaluados (como mencionamos anteriormente), a ciegas, los sueros (n=24) provistos por el *Segundo IA2 Proficiency*

Test (Chairman: Dr. N. Maclaren, IDW, University of Florida, USA, 1997), obteniéndose los siguientes resultados: 86% de sensibilidad, 100% de especificidad, 100% de consistencia y 92% de validez.

4.6. Determinación combinada de autoanticuerpos anti-GAD y anti-ICA512 por RBA empleando conjuntamente ^{35}S -GAD65 y ^{35}S -ICA512 recombinantes producidas *in vitro*

Obtención del trazador. Los trazadores recombinantes empleados (^{35}S -GAD65 y ^{35}S -ICA512) fueron producidos y purificados según lo descripto anteriormente.

Procedimiento del RBA. Ambos trazadores obtenidos se utilizaron en forma conjunta para la formación de los inmunocomplejos con los autoanticuerpos específicos presentes en los sueros según se describió anteriormente, con la única modificación en la cantidad de cuentas aportadas por cada marcador. Se colocaron 10000 cpm del trazador ^{35}S -GAD65 y 25000cpm de ^{35}S -ICA512 conjuntamente (actividades que se ajustaron según un test de optimización previo) y luego se incubaron con 2.5 μl de sueros humanos (en un volumen final de 60 μl en buffer RBA) según la descripción del punto 4.4. Los inmunocomplejos formados, fueron aislados con proteína A-Sepharose y se determinaron por conteo en centelleo líquido. Los resultados se expresaron como porcentajes de unión con respecto a las cuentas totales agregadas en el ensayo. Se procesaron simultáneamente 28 sueros normales para calcular el *cut off* como la media más tres desvíos estándar.

4.7. Estadística

Para obtener los niveles de corte de los RBA (ver ensayos 4.3-4.6), primero se evaluó la distribución de los datos correspondientes a los individuos normales (controles). Para ello, se realizó el Test de la Normalidad de Martinez e Iglewicz empleando el programa de computación SOLO v2.0 (BMDP Statical Software, Inc. Versión 2.0 8/88). El análisis de la normalidad de los datos fue gentilmente realizado por la Dra. D. Garrido, Cátedra de Bioestadística, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires y la Dra. A. Pérez, Cátedra de Biometría, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El criterio elegido para calcular el *cutoff* fue el valor de la media + 3 DE de los sueros de pacientes controles.

Para analizar la existencia de correlación de marcadores serológicos de autoinmunidad en función del sexo, se determinó el coeficiente r de correlación y su p de significancia mediante el Test de Gauss para diferencias de proporciones (Sokal y Rohlf, 1981). La comparación entre diferentes valores de prevalencia para cada marcador entre sexos, fue realizado con la aplicación del programa de computación *Statitica* (EXCEL 97), el cual se utilizó con la colaboración de la Dra. A. Pérez, Cátedra de Biometría, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

5.1.1. “En busca del diamante”: Implementación y especificaciones de aplicación del ensayo de inmunoprecipitación combinada GADA/ICA512 como herramienta predictiva de la DM tipo 1

Debido a los inconvenientes planteados para la implementación a gran escala de la técnica de IFI para el ensayo de ICA y dado que hoy en día se acepta la existencia de dos marcadores principales, anti-GAD (o GADA) y anti-ICA512, sustitutivos del ensayo de ICA, se planteó una estrategia analítica optimizada para la predicción de la DM tipo 1 y de otras formas de Diabetes autoinmune en adultos.

Se analizaron los resultados de ensayos de inmunoprecipitación (IP) individual y combinada, en un grupo de 71 sueros de pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1, con el fin de evaluar la *performance* relativa de esas variantes.

La **Tabla 2**, muestra los resultados obtenidos con las técnicas de IP individual, implementada para la detección de autoanticuerpos anti-GAD y anti-ICA512 en determinaciones separadas y la IP combinada de ambos marcadores en un único ensayo.

Para analizar la expresión de los falsos positivos en el ensayo, se calculó la *especificidad*, definida como 100% menos el porcentaje de resultados positivos obtenidos en 28 sueros provenientes de individuos normales. El valor de especificidad obtenida (100%), evidencia la ausencia de resultados falsos positivos para las tres metodologías empleadas.

<i>Ensayo</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Prevalencia</i>
	Normales (n=28) (100%-%positividad)	DM tipo1 (n=71) (% de positividad)
IP anti-GAD	100	74.7
IP anti-ICA512	100	66.2
IP combinada anti-GAD/ICA512	100	88.7

Tabla 2

Especificidad y prevalencia obtenidas para las determinaciones de autoanticuerpos anti-GAD e ICA512, en forma individual y mediante IP combinada.

La *sensibilidad* (prevalencia), se calculó según el porcentaje de pacientes diabéticos detectados como positivos. Sobre un total de 71 sueros de pacientes analizados, 53 (74.7%) resultaron positivos para el marcador anti-GAD, 47 (66.2%) para anti-ICA512 y 63 para (88.7%) el ensayo de IP combinada. En la **Tabla 2**, se integran los datos de especificidad y prevalencia, con el fin de facilitar las comparaciones entre los tres tests.

La primera observación de esos datos, permite confirmar lo hallado en la literatura respecto del beneficio de analizar dos marcadores, en lugar de uno sólo (anti-GAD o anti-ICA512).

Con el intento de evaluar si el ensayo de IP combinada en un mismo test puede reemplazar a los ensayos de IP individuales con su expresión combinatoria, en la **Figura 9** se representó en el recuadro superior la combinatoria de las determinaciones individuales y en el recuadro inferior se graficaron directamente los datos positivos del ensayo de IP combinada (anti-GAD + ICA512) y los correspondientes negativos.

Se observa que los valores de prevalencia $14.1\%+52.1\%+22.5\%=88.7$, obtenidos en los ensayos individuales (recuadro superior), se correlacionan con el valor de prevalencia 88.7%, resultante del ensayo de IP combinada.

De los datos de la **Tabla 2** y el **Figura 9**, se deduce que la utilización de la técnica de IP combinada en un mismo ensayo, mantiene la *performance* de los métodos ejecutados individualmente. Se logra por lo tanto, un ensayo que sin disminuir la especificidad ni la sensibilidad combinada, mejora notablemente la operatividad y los costos de ejecución.

En otras palabras, la combinatoria matemática o experimental rindieron idénticos resultados, siendo más ventajosa esta última, al menos para la Diabetes tipo 1.

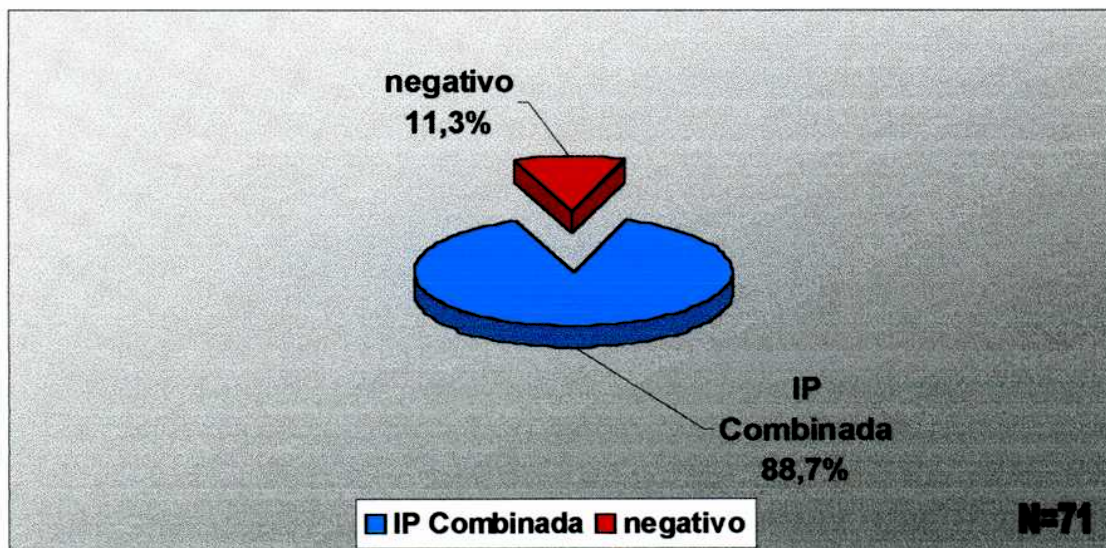
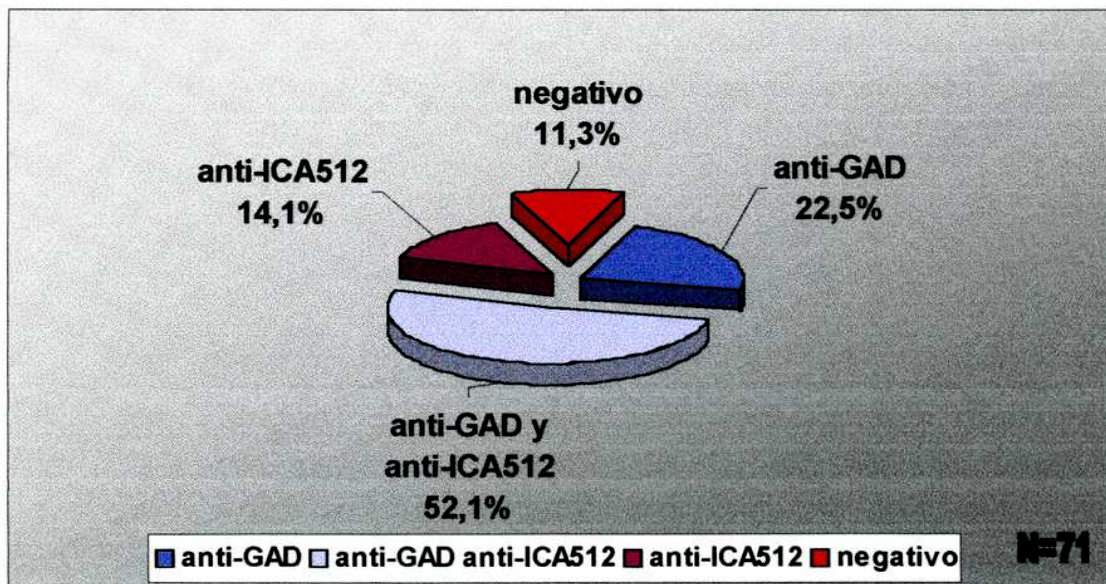


Figura 9

Comparación de la prevalencia entre ensayos de IP individuales y combinado en un único test, aplicados a sueros de pacientes debutantes con DM tipo 1.

5.1.2. Análisis de la aparición de marcadores de inmunidad humoral según el sexo

Como un estudio complementario, se decidió evaluar si existía o no correlación entre los marcadores serológicos de autoinmunidad y el sexo de los pacientes.

En la **Tabla 3**, se representan para los 71 pacientes (34 femeninos y 37 masculinos) con DM tipo 1, las prevalencias para cada marcador según el sexo.

Se aplicó el Test de Gauss para diferencias de proporciones, el cual permitió confirmar la ausencia de diferencias significativas de marcadores entre sexos.

5.1.3. Detección complementaria de marcadores de autoinmunidad en pacientes debutantes con DM tipo 1

Se realizó paralelamente un estudio complementario, en el cual se incorporaron las determinaciones de otros marcadores de autoinmunidad, ICA e IAA, con el fin de hallar las mejores herramientas de *screening* en la población de riesgo y sobre todo para tener una referencia propia sobre la máxima sensibilidad combinada posible a partir de ensayos individuales con cuatro marcadores específicos de DM tipo 1.

La **Figura 10** esquematiza, los datos de prevalencia (calculados de la misma forma que en la **Tabla 3**) obtenidos con diversos marcadores serológicos de autoinmunidad: ICA, IAA, anti-GAD y anti-ICA512 e IP combinada. Sobre los mismos 71 sueros de pacientes diabéticos analizados, 46 (64.8%) resultaron positivos para ICA y 26 (36.6%) para IAA (los datos de los marcadores para anti-GAD, anti-ICA512 y el test combinado corresponden a los análisis ya informados, los cuales vuelven a representarse aquí a los fines comparativos).

		Marcadores				
Sexo	NºPacientes	anti-GAD	anti-ICA512	IP combinada	ICA	IAA
Femenino	34	79.4 %	67.6 %	91.2 %	67.6 %	26.5%
Masculino	37	70.3 %	64.9 %	86.5 %	62.3 %	46 %

Tabla 3

Prevalencia de diferentes marcadores según el sexo.

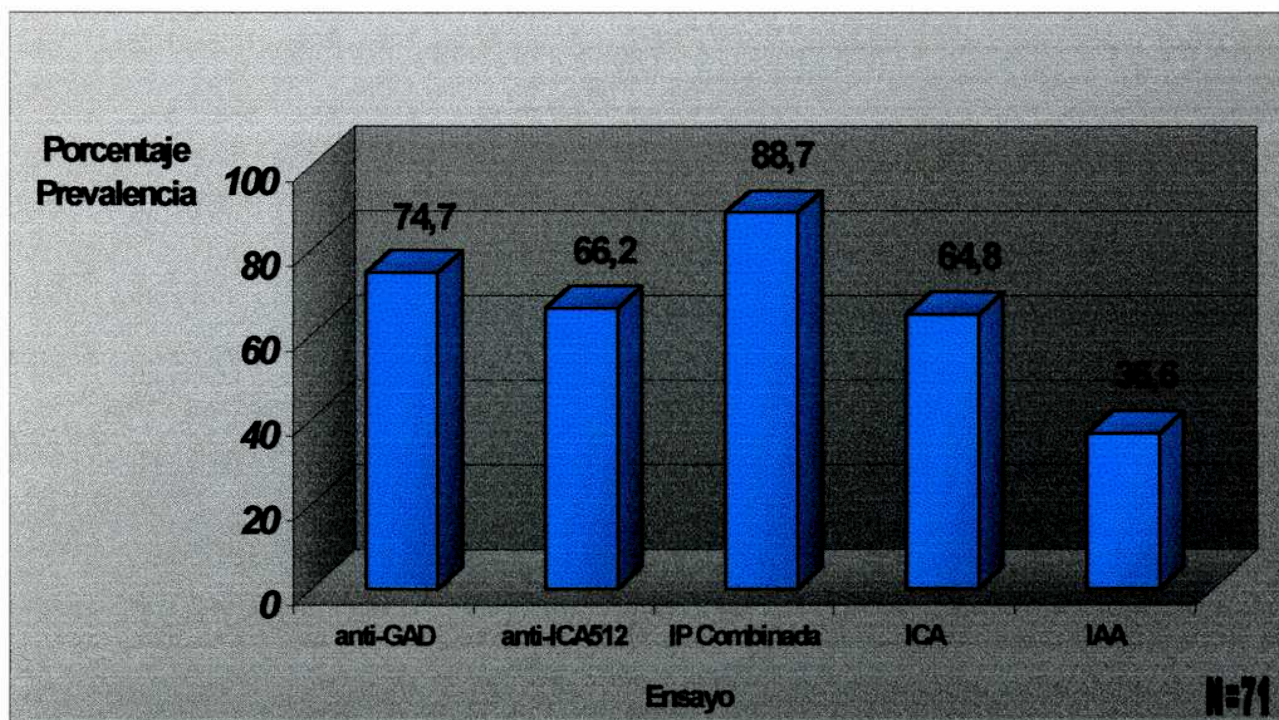


Figura 10

Se presenta el porcentaje de prevalencia para diferentes marcadores serológicos de autoinmunidad ensayados sobre sueros de pacientes debutantes con DM tipo 1.

Los resultados obtenidos, indican que si hay que optar por una estrategia basada en un único test, el ensayo de IP combinada presenta el mayor porcentaje de prevalencia dentro del grupo de pacientes con DM tipo 1. Esto sugiere, *a priori*, la posible utilización de la IP combinada como método único de *screening*, para evaluar el riesgo de padecer la enfermedad, debido a que constituye un ensayo con alta prevalencia y alta especificidad. Además, al compararla con los demás ensayos, demuestra ser una alternativa potencialmente ventajosa, eficiente y relativamente económica.

5.1.4. Evaluación de la performance del test de IP combinada frente al test de ICA

Como se comentó anteriormente, la detección de los ICA es difícil de estandarizar y muchos laboratorios no pueden detectar bajos niveles de éstos en forma reproducible. Además, el análisis de ICA a gran escala requiere del uso de corte de páncreas humano conservado en congelador, lo cual se asocia inevitablemente con variaciones en la sensibilidad, y complicando la estandarización del mismo.

Debido a los inconvenientes planteados para el test de ICA, se planteó la posibilidad de que dicho test (utilizado sistemáticamente en todos los *trials*) se reemplazara por el ensayo de IP combinada, al menos para el *screening* de grandes programas epidemiológicos y/o de predicción-prevención que se apliquen en el futuro.

Con el propósito de evaluar si el ensayo de IP combinada puede prescindir del test complementario de ICA, como estrategia para mejorar la predicción de la DM tipo 1, se analizó la prevalencia detectada en forma individual y complementaria para ambos ensayos. En la **Figura 11**, se muestran los resultados de prevalencia obtenidos para ICA (IFI) y para el ensayo de IP combinada. Sobre el grupo de 71 sueros de pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1, 5 (7%) resultaron positivos sólo para el test de ICA (negativos para el ensayo de IP combinado anti-GAD e anti-ICA512), 22 (31%) fueron

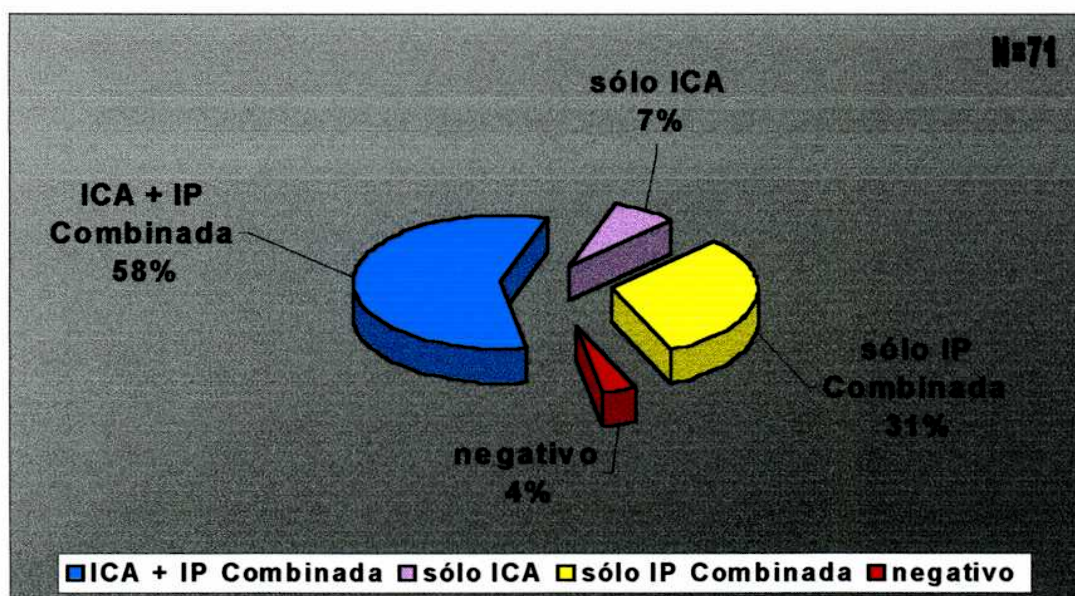


Figura 11

Prevalencia obtenida con las determinaciones de ICA e IP combinada.

positivos sólo para el ensayo de IP combinada (ICA), 41 (58%) fueron positivos para ambos ensayos y 3 (4%) resultaron negativos (para los marcadores considerados).

Los valores de prevalencia detectados en ambos ensayos, revelan que al aplicarse únicamente el test de ICA se detecta $58\%+7\%=65\%$ de pacientes con DM tipo 1, perdiéndose la detección del 31% aportada por el ensayo de IP combinada. Por otra parte, si se aplicara solamente el ensayo de IP combinada se detectaría aproximadamente un 89% de pacientes con DM tipo 1, quedando sólo un 7% sin detectar y aportado por el test de ICA. Esto sugiere que el ensayo de IP combinada podría sustituir el test de ICA con poca pérdida en la sensibilidad de la detección.

5.1.5. Análisis sobre la incorporación del marcador IAA en la detección de la DM tipo 1

En esta etapa se planteó la posibilidad de incrementar la prevalencia con la incorporación del marcador IAA, complementado con el test de IP combinada o con el ICA; esta alternativa ya había sido propuesta por Hagopian *et al.* (1995).

En la **Figura 12**, se representa la prevalencia detectada para cada marcador, en forma individual y conjunta. Del análisis de los 71 sueros de pacientes diabéticos estudiados, se observa en el primer recuadro, que el $88.7\%+1.4\%=90.1\%$ son detectados por el ensayo de IP combinada conjuntamente con el IAA. En el segundo recuadro se observa que el $64.8\%+5.6\%=70.4\%$ de los pacientes diabéticos se detectan por el test de ICA conjuntamente con el IAA. La utilización de éste último par deja 21 pacientes (29.6%) sin detectar, contra 7 (9.9%) del ensayo conjunto de IAA e IP combinada.

Al comparar ambos recuadros, se concluye que el par IP combinada/IAA reemplaza ventajosamente el par ICA/IAA. Este último presenta una prevalencia conjunta del 70.4% contra el 90.1% detectado por el ensayo de IP combinada e IAA.

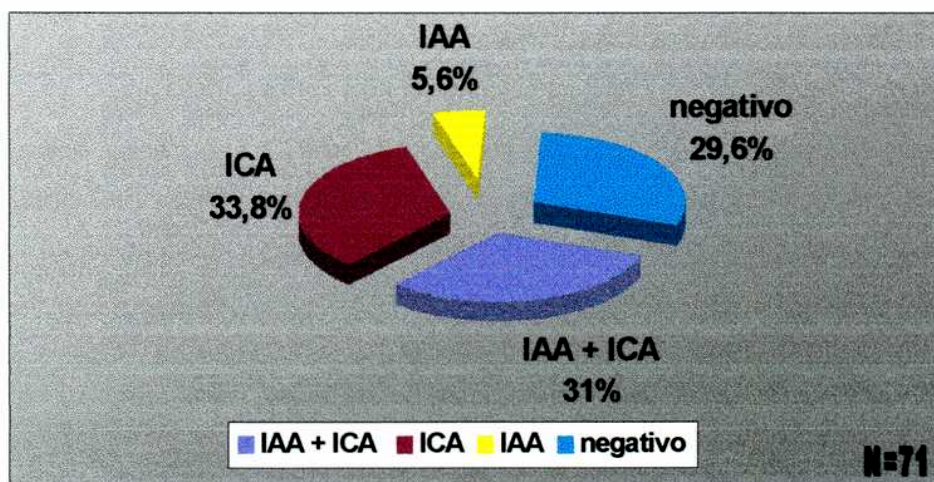
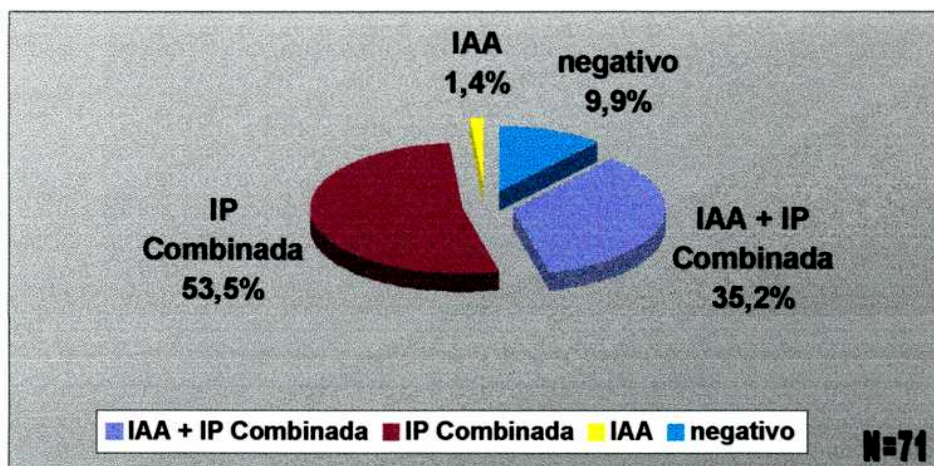


Figura 12

Prevalencia de marcadores incorporando los IAA: en el primer recuadro se representan los IAA e IP combinada y el segundo recuadro se representan los marcadores IAA e ICA.

Además, en el primer recuadro se observa que el incremento aportado por el ensayo de IAA al valor de prevalencia conjunta resulta ser insignificante. Estos resultados indican que la prevalencia lograda con el ensayo único de IP combinada no puede ser superada por la utilización de dos marcadores (IAA e ICA) y que tampoco se eleva apreciablemente el valor de prevalencia al incorporar el marcador complementario de IAA.

5.2. DIABETES MELLITUS MEDIADA POR AUTOINMUNIDAD EN EL ADULTO

5.2.1. Evaluación del ensayo de IP combinada en el apoyo diagnóstico de Diabetes Mellitus mediada por autoinmunidad en los adultos

Debido a los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1, nos preguntamos si era factible aplicar el ensayo de IP combinada como estrategia de *screening* también en la población de adultos (pacientes con Diabetes tardía -LADA-, pacientes con DM tipo 2, que evolucionan con fracaso secundario a los HGO y, en general, pacientes con DM presuntivamente tipo 2).

Para ello, primero fue necesario analizar la aparición de los diferentes marcadores serológicos de autoinmunidad en forma individual en grupos representativos de esas variantes, como se realizó con la DM tipo 1.

Se realizó un análisis de prevalencia sobre sueros provenientes de 136 individuos, los cuales fueron preclasificados según los siguientes criterios clínicos (tiempo de evolución en el requerimiento de insulina): a) 42 pacientes adultos que requirieron insulina antes de los dos años de haberse diagnosticado su Diabetes (DM1), homologable a pacientes LADA, b) 30 pacientes con DM Tipo 2 que requirieron tratamiento con insulina luego de más de diez años de producido el diagnóstico (DM2I), homologables a pacientes con DM tipo 2 que evolucionaron con fracaso secundario a los HGO y c) 64 pacientes con DM tipo 2 (DM2).

En la **Figura 13** se representan, en forma comparativa, los resultados de prevalencia obtenidos con una serie de marcadores serológicos de autoinmunidad. Sobre 42 pacientes DM1 estudiados, 16 (38.1%) resultaron positivos para el marcador

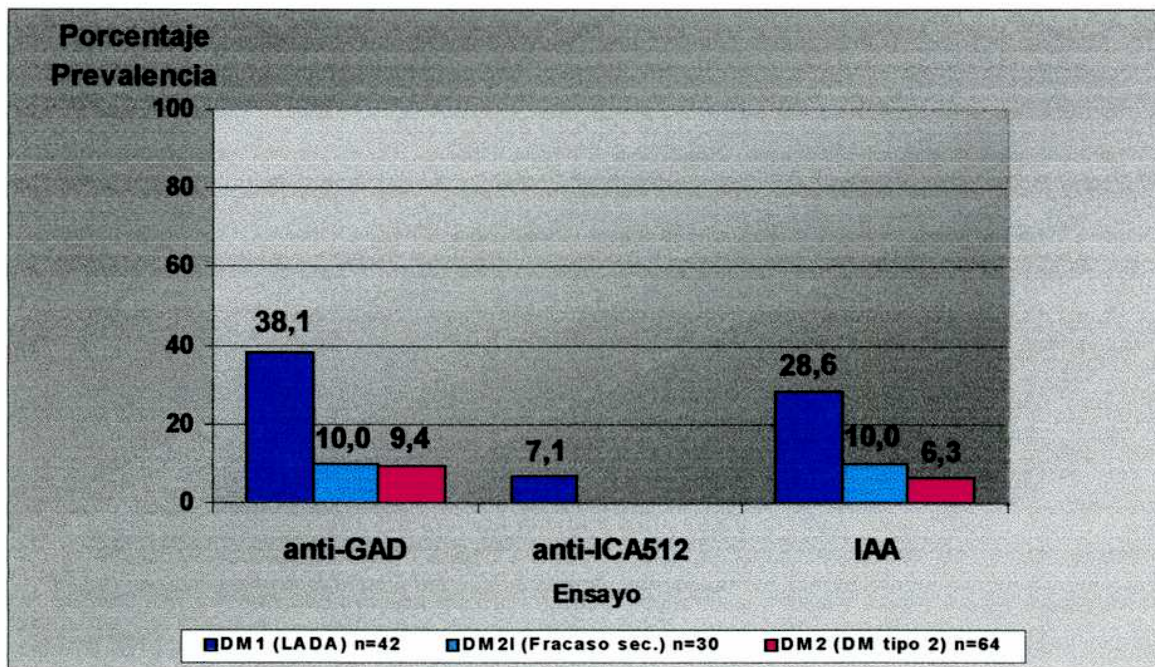


Figura 13

Prevalencia de diferentes marcadores serológicos de autoinmunidad en distintas formas de Diabetes.

anti-GAD, 3 (7.1%) para anti-ICA512 y 12 (28.6%) para IAA, resultando negativos 20 (47.1%). De los 30 pacientes clasificados DM2I, 3 (10%) resultaron positivos para el marcador anti-GAD, no se detectaron casos positivos para el marcador anti-ICA512 y 3 (10%) fueron positivos para IAA. En este grupo se observaron un 27 (90%) pacientes negativos. De los 64 pacientes que no presentaron requerimiento de insulina hasta su reclutamiento (DM2), 6 (9.4%) resultaron positivos para el marcador anti-GAD, tampoco se detectó anti-ICA512 y 4 (6.3%) resultaron positivos para IAA. En este grupo 55 (86.6%) pacientes fueron negativos para estos marcadores.

Los valores de prevalencia obtenidos para estos marcadores demuestran que no se justifica utilizar el ensayo de IP combinada en estos grupos de pacientes, debido a la negatividad del marcador anti-ICA512 en esta población. Además, el ensayo IP individual sirve para ver que en general los adultos no presentan anticuerpos anti-ICA512 y sí son positivos para anti-GAD.

Los resultados muestran, en general para los tres grupos, que el marcador anti-GAD presenta la mayor prevalencia.

5.2.2. Utilización de dos marcadores o más, para mejorar el apoyo diagnóstico en las diferentes formas de Diabetes

Los resultados anteriores nos condujeron a efectuar un análisis integrativo de todas las posibilidades, escalonando la presentación de uno, dos y tres marcadores, preservando en todas ellas el ensayo de mayor prevalencia (anti-GAD) e incorporando los ensayos anti-ICA512 e IAA.

La **Figura 14**, muestra en tres ejes los valores de prevalencia obtenidos para el marcador anti-GAD, con la incorporación progresiva de los marcadores anti-ICA512 e IAA. El grupo de 42 pacientes DM1 (LADA), presentó una prevalencia de 38.1% para

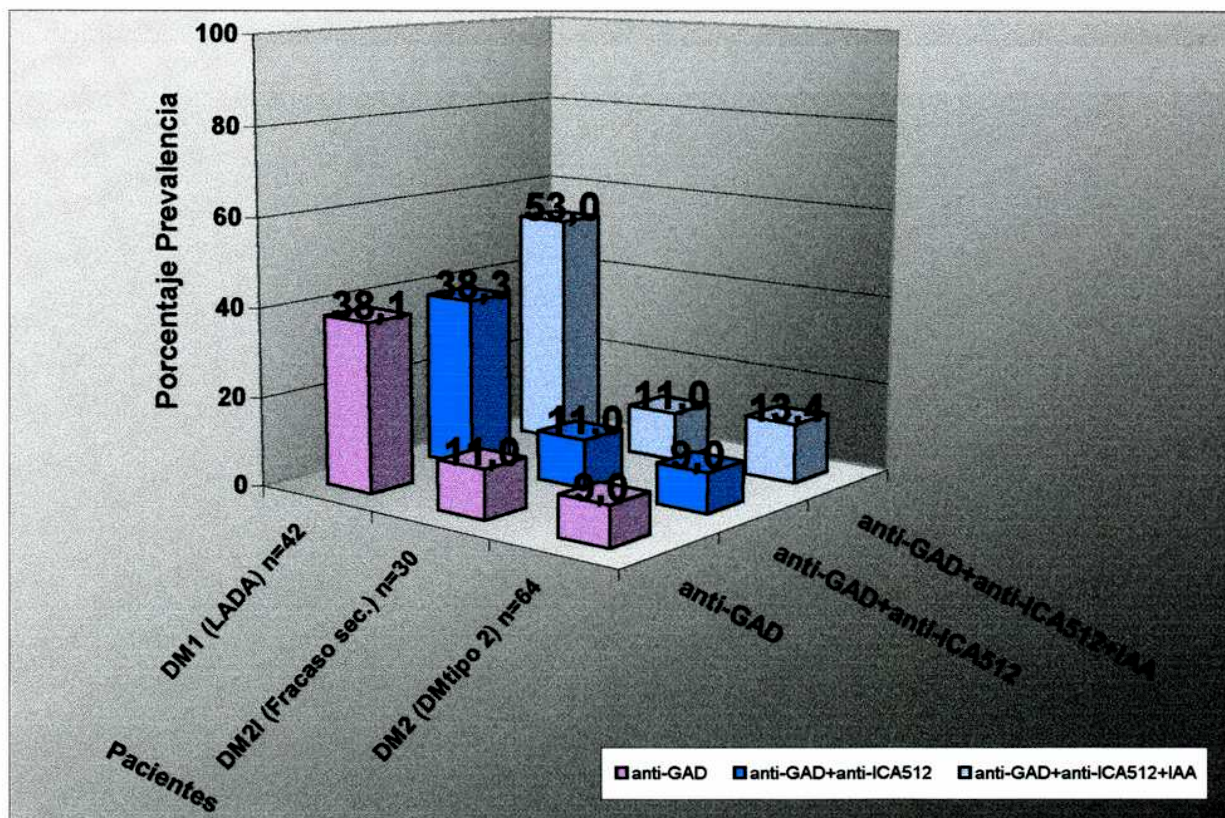


Figura 14

Prevalencia de uno, dos y tres marcadores serológicos de autoinmunidad en pacientes con diferentes formas de diabetes.

el marcador anti-GAD, detectándose sólo un aporte del 0.2% por el marcador anti-ICA512 y elevando la prevalencia al 53% con la incorporación de IAA. Para el grupo de pacientes DM2I (con fracaso secundario), el valor de prevalencia aportado por el marcador anti-GAD 11%, no se vio afectado por la incorporación del marcador anti-ICA512, ni por IAA.

Algo similar ocurrió con el grupo de pacientes DM2, donde la prevalencia para el marcador anti-GAD del 9%, no varió con la incorporación del ensayo de ICA512. La incorporación del test IAA logró aumentar un poco la prevalencia, llevándola al valor del 13.4%.

En la **Figura 14** se ve claramente que los sueros provenientes de los pacientes DM2I y DM2, no presentaron variación de la prevalencia con la complementación de más marcadores al test de anti-GAD. En cambio en los pacientes con DM1 la incorporación del marcador IAA incrementa casi al 40% el valor predictivo.

DISCUSSION

6. DISCUSION

La DM, en especial la DM tipo 1 que es la principal forma de Diabetes mediada por autoinmunidad, es una enfermedad considerada como uno de los desórdenes metabólicos más serios y comunes por producir importantes consecuencias físicas, psicológicas y sociales negativas. Hasta hace poco tiempo, la detección de la misma por especialistas, se evidenciaba a través de la sintomatología y por algunos tests de bioquímica clínica. Desde hace varias décadas, los pacientes con DM tipo 1 reciben tratamiento con insulina, aunque el proceso autoinmune de destrucción de las células β del páncreas puede no revertirse, se logra mantener un control metabólico adecuado del paciente.

Sin embargo, gracias a los avances en la investigación sobre diagnóstico y seguimiento de control, se pudo mejorar el panorama de esta enfermedad: 1) los marcadores serológicos de autoinmunidad, producto de la destrucción selectiva de las células del islote, son elementos valiosos que permiten predecir la DM tipo 1, debido a que preceden la sintomatología clínica con muchos años de antelación (Bingley *et al.*, 1997; Verge *et al.*, 1996), 2) los factores genéticos permiten identificar los familiares en primer grado de pacientes con DM tipo 1 con mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad y 3) los programas con terapias aplicadas en modelos animales y humanos para prevenir o retardar el comienzo de la enfermedad, son cada vez más alentadores. Por lo tanto, existe por primera vez, la esperanza de detectar a los individuos bajo riesgo de contraer la enfermedad y mediante la aplicación de terapias preventivas, protegerlos o al menos disminuir los efectos contraproducentes de la DM tipo 1.

En los programas de predicción y prevención de la DM tipo 1 se tiene como propósito la detección precoz de la etapa prodrómica en individuos susceptibles, mediante la detección de marcadores serológicos de autoinmunidad. De esa manera se brinda apoyo racional para que los tratamientos preventivos logren su efectividad y sean aplicados antes del agotamiento total de las células β pancreáticas.

Por lo tanto, es necesario contar con metodologías económicamente ventajosas, sensibles y de baja complejidad, que permitan la detección de los marcadores serológicos de alto valor predictivo y además que sean aplicables en laboratorios clínicos y accesibles a toda la población.

6.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

6.1.1. Implementación de una técnica analítica alternativa y ventajosa para la determinación sistematizada de los marcadores serológicos de autoinmunidad, aplicable a la detección precoz de la DM tipo 1

6.1.1.1. Detección de marcadores serológicos de autoinmunidad mediante el ensayo de IP combinada

Ante la necesidad de contar con un ensayo económicamente ventajoso para ser aplicado a programas a gran escala de predicción y prevención, se implementó la variante analítica de inmunoprecipitación combinada para la detección conjunta en un único ensayo, de los marcadores serológicos de autoinmunidad: anti-GAD y anti-ICA512.

Con el fin de verificar si la detección combinada de ambos marcadores exhibe o no la *performance* de los dos métodos ejecutados individualmente, se llevó a cabo el análisis mediante ensayos de inmunoprecipitación individuales y combinada en un único test, para evaluar las reales ventajas económicas y logísticas de su implementación.

Los resultados obtenidos de la **Tabla 2** y **Gráfico 9**, evidencian que el ensayo de IP combinada con una prevalencia de 88.7%, posee una total correlación con los métodos ejecutados individualmente, obteniéndose resultado positivo cuando uno o ambos marcadores resultaron positivos por las técnicas individuales, y resultado negativo cuando ambos resultaron negativos por dichas metodologías.

La interpretación de estos resultados, sugiere que la utilización del método de IP combinada, además de mantener la *performance* de los métodos ejecutados individualmente, sería una herramienta económicamente ventajosa además de consumir menor tiempo, material y trabajo. Por lo tanto, resultaría de gran importancia su inclusión como método de *screening* en proyectos de *predicción* y *prevención* como apoyo diagnóstico para individuos con alto riesgo de desarrollar DM tipo 1.

6.1.1.2. Marcadores de inmunidad humoral según el sexo

El estudio complementario, donde se evaluó la existencia o no de correlación de los marcadores de autoinmunidad dependiendo del sexo en un grupo de individuos con reciente diagnóstico de DM tipo 1 representativo de Argentina, confirmó los resultados descriptos en otros trabajos con grupos étnicos diferentes, los cuales describen la ausencia de dependencia de los mismos en función del sexo (Verge *et al.*, 1996).

Este resultado sugiere que el grupo en estudio se comportaría similarmente a los diferentes grupos étnicos, respecto de la aparición de marcadores con el sexo. Como consecuencia de estos resultados los sucesivos ensayos se llevaron a cabo independientemente del sexo de los pacientes.

6.1.1.3. Detección complementaria de marcadores de autoinmunidad en pacientes debutantes con DM tipo 1

Con el fin de tener una referencia propia sobre la máxima prevalencia detectada por cada marcador individual y el ensayo combinado, se comparó esta variante con la detección de otros marcadores serológicos de autoinmunidad. Los resultados dejan ver que la metodología de IP combinada implementada, presenta el mayor porcentaje de prevalencia (88.7%) entre el grupo de pacientes diabéticos evaluados.

Este resultado sugiere *a priori*, la posible utilización del ensayo de IP combinada como único método de *screening*, para evaluar el riesgo de desarrollar la enfermedad. Además, comparado con los otros ensayos, resulta ser una alternativa potencialmente ventajosa, sensible y relativamente económica.

Para fundamentar su posible utilización como método de *screening*, se comparó el valor de prevalencia obtenido para el ensayo de IP combinada frente al valor de los otros marcadores serológicos de autoinmunidad con los resultados obtenidos por Dittler *et al.*, (1997) y Bonifacio *et al.*, (1995). Estos autores presentan al ensayo de IP combinada con el mayor valor de prevalencia, en comparación con los test individuales.

6.1.2. Análisis del ensayo de IP combinada en un único test para reemplazar al ensayo de ICA y la incorporación del marcador IAA en el apoyo diagnóstico de la DM tipo 1

6.1.2.1. Evaluación de la *performance* del test de IP combinada frente al test de ICA

La mayoría de los programas epidemiológicos y predictivos para evaluar el riesgo de desarrollar DM tipo 1 se basan en la detección de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de las células de los islotes pancreáticos por el método de IFI, dado el importante valor diagnóstico/pronóstico que posee.

Esta metodología fue empleada antes de haberse identificado los antígenos hacia los cuales están dirigidos los ICA. A pesar de los esfuerzos realizados para mejorar la estandarización y cuantificación de esta técnica, no fue posible evitar los problemas inherentes a los test histoquímicos (Bonifacio *et al.*, 1990; Lernmark *et al.*, 1991). Existe consenso respecto de que el test de ICA resulta poco preciso y reproducible, con sensibilidad variable entre laboratorios y con la limitación de disponibilidad de páncreas humano fresco de individuos con grupo sanguíneo 0.

Estudios posteriores caracterizaron a los componentes de este sistema antigénico, determinando la existencia de dos marcadores: anti-GAD y anti-ICA512, que son los componentes mayoritarios que definen los ICA y en combinación cubren la mayor parte de la reactividad detectada en el test de IFI (Myers *et al.*, 1995). Estos marcadores se evalúan a través de técnicas de inmunoprecipitación, las cuales resultan ser más precisas, reproducibles y fácilmente cuantificables. Además, actualmente se acepta que la detección conjunta de estos marcadores en un único test, sería adecuada para reemplazar al test histoquímico de ICA (Bingley *et al.*, 1997).

Se ha descrito que la prevalencia del test de ICA en pacientes con reciente diagnóstico de la enfermedad es del 75% (Riley *et al.*, 1990). Estudios en grupos familiares de pacientes muestran que la mayoría de los casos futuros de Diabetes están concentrados en los subgrupos de individuos que presentan ICA (Bingley *et al.*, 1997).

Los datos antes citados muestran un valor de prevalencia elevado para el test de ICA y además la existencia de correlación entre este marcador y los pacientes que desarrollan Diabetes, por lo cual se hace difícil la sustitución del ensayo.

Los resultados de nuestro estudio mostraron que el ensayo de IP combinada en un único test con una prevalencia del 88.7%, incrementa su valor a $88.7\%+7\%=95.7\%$ con la complementación del test de ICA. Estos resultados fueron comparados con el ensayo de IP combinada obtenidos por Seissler *et al* (1996), mostrando una prevalencia del 87.9% y un incremento del 12.1% aportado por el test de ICA. Otro estudio muestra que el valor de prevalencia 91% detectado por el ensayo de IP combinada, es aumentado a 93% con la incorporación del test de ICA (Wiest-Ladernburger *et al.*, 1996).

Estos resultados indican que el ensayo de IP combinada podría sustituir al test de ICA, ofreciendo un mejor método de *screening* para evaluar el riesgo de padecer la enfermedad en individuos de primer grado, de los cuales sólo el 5% de estos resultan positivos. Esto plantea que no es justificable la utilización del test de ICA para la detección de prediabetes en esta población, debido a las desventajas mencionadas anteriormente y en especial por su relativa complejidad. Por lo tanto, se deduce que el ensayo de IP combinada promete ser la mejor estrategia de *screening* a ser aplicada como apoyo diagnóstico en programas a gran escala para individuos con alto riesgo de desarrollar DM tipo 1.

6.1.2.2. Análisis sobre la incorporación del marcador IAA en la detección de la DM tipo 1

Con el objeto de analizar si la incorporación del marcador IAA (alternativa ya propuesta por Hagopian *et al.*, 1995 en ensayos individuales) puede incrementar la prevalencia obtenida por los ensayos de ICA y el ensayo de IP combinada, se analizó su prevalencia formando pares con cada uno de estos marcadores.

Al comparar los resultados de cada par de marcadores (IAA/ICA e IAA/IP combinada), se concluye que el último par con una prevalencia del 90.1% reemplaza

ventajosamente al par IAA/ICA, el cual presenta una prevalencia del 70.4%. Además, se observa que el incremento aportado por el ensayo de IAA al valor de prevalencia conjunta con ICA e IP combinada resulta ser insignificante.

Estos datos indican que la prevalencia lograda con el ensayo único de IP combinada no puede ser superada por la utilización de los dos marcadores IAA e ICA y además, el valor de prevalencia no se eleva apreciablemente al incorporar el marcador complementario de IAA.

Los resultados hasta ahora analizados muestran que la variante por nosotros estudiada, constituye el método más sensible, específico, reproducible, económicamente ventajoso, y además factible de implementar como herramienta de *screening* en programas a gran escala de predicción y prevención de la DM tipo 1.

Nuestros resultados son similares a los valores de prevalencia obtenidos por Dittler *et al.*, (1997) 92% y al valor de prevalencia de 88% detectada por el grupo de Bonifacio *et al.*, (1995).

6.2. DIABETES MELLITUS MEDIADA POR AUTOINMUNIDAD EN EL ADULTO

6.2.1. Valoración de la utilidad del ensayo de IP combinada en el apoyo diagnóstico de diferentes formas de Diabetes en el adulto

6.2.1.1. Evaluación del ensayo de IP combinada

La DM tipo 2 es la de mayor prevalencia representando el 90% de todos los casos; aparece típicamente en el adulto y en general sin relación con la autoinmunidad. Sin embargo, existen casos donde los pacientes evolucionan con fracaso secundario a los HGO y se tornan insulino requirientes (con perfil autoinmne). La DM tipo 1, aunque en casos aislados, puede manifestarse a cualquier edad, denominándose entre los 20-40 años, LADA y siendo su aparición menos frecuente después de los 40 años.

Frente a la existencia de diferentes formas de Diabetes, se decidió evaluar la posibilidad de implementar también el ensayo de IP combinada como estrategia de *screening* para la población de adultos.

El estudio de la aparición de los diferentes marcadores serológicos de autoinmunidad en ensayos realizados individualmente, demostró que en todos los grupos de pacientes analizados, el marcador de mayor prevalencia era el anti-GAD. Estos resultados concuerdan con los ya descritos por Hatziagelaki *et al* (1996) y por Kasuka *et al* (1996). Estos autores plantean la utilización de este marcador como herramienta de *screening* en la población de adultos.

Por otra parte, el estudio de aparición del marcador anti-ICA512, mostró una detección selectiva en aquellos individuos DM1 (homologables en principio a los LADA) y resultó nula en los demás pacientes.

Los resultados demuestran que para la población de adultos no sería conveniente asociar los marcadores anti-GAD y anti-ICA512 en un mismo ensayo primero, porque el valor de prevalencia aportado por este último en los pacientes DM1 es bajo con relación al aportado por el marcador anti-GAD y segundo, porque la evidencia de resultados negativos para el marcador anti-ICA512 apoya la inclusión de estos pacientes en el grupo de DM2I/DM2.

Por lo tanto, los resultados sugirieron que la implementación del ensayo de IP combinada, no estaría indicado como herramienta de *screening* de autoinmunidad en la población de diabéticos adultos.

6.2.1.2. Utilización de dos marcadores o más para mejorar el apoyo diagnóstico en las diferentes formas de Diabetes

Con motivo de incrementar el valor de prevalencia, el marcador anti-GAD se analizó conjuntamente con otros marcadores serológicos de autoinmunidad.

El valor de prevalencia en el grupo de pacientes DM1 no se incrementó apreciablemente con la incorporación del marcador anti-ICA512 (38.1% para anti-GAD y 38.3% para anti-GAD más anti-ICA512). Por el contrario al incorporar el marcador IAA, la prevalencia se elevó al 53%.

En los otros dos grupos de pacientes estudiados (DM2I y DM2), ni la incorporación del marcador anti-ICA512 ni la del marcador IAA, pudieron modificar significativamente la prevalencia obtenida con el marcador anti-GAD.

Estos resultados confirman lo antes mencionado, donde la incorporación del marcador anti-ICA512 al marcador anti-GAD, no mejoraría la sensibilidad conjunta. Además, el aumento en el valor de prevalencia al utilizar anti-GAD conjuntamente con IAA, reforzaría las evidencias a favor de complicaciones autoinmunes más importantes en el grupo de pacientes DM1 que en el resto de los pacientes. Esto sugiere que el análisis conjunto de estos marcadores podría ser utilizado en la práctica como apoyo diagnóstico para identificar pacientes con aparente DM2 que a corto plazo requerirán insulina y de ese modo obtener un adecuado control clínico-metabólico de su enfermedad.

Como apreciación final podemos sugerir que la aplicación del marcador anti-GAD como herramienta de *screening* en la población de individuos adultos con diferentes formas de Diabetes, la cual debería estar acompañada del ensayo anti-ICA512 en forma individual y de ser posible con el ensayo de un marcador más, en especial IAA, para diferenciar aquellos pacientes que requerirán insulina a corto plazo. Para un mejor apoyo diagnóstico, el panel de test bioquímicos además deberá estar sustentado genéticamente con la tipificación de alelos HLA y por las pruebas funcionales sobre reserva pancreática.

6.3. Conclusiones

El ensayo de IP combinada como estrategia analítica de *screening*, resulta apropiado para evaluar la predicción y prevención de la DM tipo 1 en el grupo de riesgo, no siendo conveniente su utilización en el estudio de la DM en la población de individuos adultos.

Esta última propuesta se halla en consideración dentro de un programa local de Predicción y Prevención de la DM tipo 1. La metodología combinada será implementada por primera vez en forma sistemática dentro de un "*trial*" y, hasta donde nos consta, no tiene precedentes a nivel internacional. Este trabajo servirá de base para la participación formal del Laboratorio de Inmunoendocrinología (LIE) FFyB, UBA, en dicho programa el cual se encuentra avalado por la Sociedad Argentina de Diabetes (SADAC).

La implementación de la técnica de IP combinada para la determinación sistemática del marcador anti-GAD y/o anti-ICA512, sumada a los otros análisis ya incorporados por nuestro grupo, se proyecta entonces como una contribución científico-tecnológica palpable. Las proyecciones de este estudio al factibilizar la implementación sistemática de tests prospectivos con menores costos, tendrán seguramente un apreciable impacto en la Medicina Diabetológica futura.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

Atkinson M.A., and Maclaren N.K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** **331**, 1428-1436, 1994.

Atkinson M.A., Kaufman D.L., Campbell L., Tobin A.J., and Maclaren N.K. Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.** **91**, 350-356, 1993.

Auwerda B.V., Van waeyenberge C., Schuit F., Heimberg H., Vandewalle C., Gorus F., Flament J., and the Belgian Diabetes Registry. DRB1-0403 protects against IDDM in caucasians with the high-risk heterozygous DQA1*0301-DQB1*0302/DQA1*0501-DQB1*0201 genotype. **Diabetes** **44**, 527-530, 1995.

Badenhoop K., Schwarz G., Trowsdale J., Lewis V., Usadel K.H., Gale E.A.M., and Bottazzo G.F. TNF a gene polymorphisms in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia** **32**, 445-448, 1989.

Baëkkeskov S., Jan-Aanstoot H., Christgau S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., and De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature** **347**, 151-156, 1990.

Baëkkeskov S., Nielsen J., Marner B., Bilde J., Ludvigsson, and Lernmark A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. **Nature** **298**, 167-169, 1982.

Baisch J.M., Weeks T., Giles R., Hoover M., Stastny P., and Capra J.D. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** **322**, 1986-1991, 1990.

Bao J., Cheung W.Y., and Wu J-Y. Brain L-glutamate decarboxylase. **J. Biol. Chem.**, **270**, 6464-6467, 1995.

Bell G.I., Horita S., and Karam J.H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes** **33**, 176-183, 1984.

Bingley P.J. Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA relatives: the ICARUS data set. Islet Cell Antibody Register Users Study. **Diabetes** **45**, 1720-1728, 1996.

Bingley P.J., Bonifacio E., and Gale E.A. Can we really predict IDDM?. **Diabetes** **42**, 213-220, 1990.

Bingley P.J., Bonifacio E., Williams A.J., Genovese S., Bottazzo G.F., and Gale E.A. Prediction of IDDM in the general population. Strategies based on combinations of autoantibody markers. **Diabetes** **46**, 1701-1710, 1997.

Bohmer K., Keilacker H., Kuglin B., Hubinger A., Bertrams J., Gries F., and Kolb H. Proinsulin autoantibodies are more closely associated with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus than insulin autoantibodies. **Diabetologia** **34**, 830-834, 1991.

Bonifacio E., Bingley P.J., Shattock M.A., Dean B.M., Dunger D., Gale E.A.M., and Botazo G.F. Cuantification of islet-cell antibodies an prediction of insulin-dependent diabetes. **Lancet** **335**, 147-149, 1990 b.

Bonifacio E., Boitard C., Gleichmann H., Shattock M.A., Molenaar J.L., and Botazo G.F. Assessment of precision, concordance, specificity and sensitivity of islet cell antibody measurement in 41 assays. **Diabetologia** **33**, 731-736, 1990.

Bonifacio E., Lampasona V., Genovese S., Ferrari M., and Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA-2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40k autoantigen and a target of islet-cell antibodies. **J. Immunol.** **155**, 5419-5426, 1995.

Bottazzo G.F., Dean B.M., Mc Nally J.M., Mackay E.H., Swift P.G.F., and Gamble D.R. In situ characterisation of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. **New Engl. J. Med.** **313**, 353-360, 1985.

Bottazzo G. F. Death of a beta cell: homicide or suicide? **Diabetes Med.** **3**, 111-130, 1986.

Bottazzo G., Florin-Christensen A., and Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiency. **Lancet ii**, 1279-1283, 1974.

Bu D., Erlander M., Hitz B., Tillakaratne N., Kaufman D., Wagner-McPherson C., Evans G., and Tobin A. Two human glutamate decarboxylases, 65-KDa GAD and 67KDa GAD, are each encoded by single gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**, 2115-2119, 1992.

Carcassi C., Trucco G., Trucco M., and Contu L. A new HLA-DR2 extended haplotype is involved in insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility. **Hum. Immunol.** **31**, 159-164, 1991.

Carnaud C. Euroconference in Autoimmune Diseases, Instituto Pasteur, 1994.

Castaño L., and Eisenbarth G. S. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. **Annu. Rev. Immunol.** **8**, 647-679, 1990.

Charbonneau H., Tonks N.K., Kumar S., Diltz C.D., Harrylock M., Cool D.E., Krebs E.G., Fischer E.H., and Walsh K.A. Human placenta protein-tyrosin-phosphatase: Amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**, 5252-5256, 1989.

Christgau S., Aanstoot H., Schierbeck H., Begley K., Tullin S., Hejnaes K., and Baëkkeskov S. Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic β -cells by palmitoylation in the NH₂-terminal domain. **J. Cell. Biol.** **118**, 309-320, 1992.

Christgau S., Schierbeck H., Aanstoot H.J., Aagard L., Begley K., Kofod H., Hejnaes K., and Baëkkeskov S. Pancreatic β -cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65KDa hydrophilic form and a 64KDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. **J. Biol.Chem.** **266**, 21257-21264, 1991.

Christie M.R., Genovese S., Cassidy D., Bosi E., Brown T., Lai M., Bonifacio E., and Bottazzo G.F. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. **Diabetes** **43**, 1254-1259, 1994.

Christie M.R., Hollands J.A., Brown T.J., Michelsen B.K., and Delovitch T.L. Detection of pancreatic islet 64,000 Mr autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. **J. Clin. Invest.** **92**, 240-248, 1993.

Christie M.R., Pipeleers D.G., Lernmark A., and Baekkeskov S. Cellular and subcellular localization of a *M_r* 64000 protein autoantigen in insulin-dependent diabetes. **J. Biol. Chem.** **265**, 376-381, 1990.

Christie M.R., Vohra G., Champagne P., Daneman D., and Delovitch T.L. Distinct antibody specificities to a 64-kD islet cell antigen in type 1 diabetes as revealed by trypsin treatment. **J. Exp. Med.** **172**-789, 1990.

Cook A. An overview on possible mechanisms of destruction of the insulin-producing beta cell. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **164**, 125-142, 1990.

Cram D., Faulkner-Jones B., Kun J., and Harrison L.C. Glutamic acid decarboxylase-67 (GAD67): expression relative to GAD65 in human islet and mapping of autoantibody epitopes. **Endocrinology** **136**, 1111-1119, 1995.

Davies J.L., Kawaguchi Y., Bennett S.T., Copeman J.B., Cordell H.J., Pritchard L.E., Reed P.W., Gough S.C.L., Jenkins S.C., Palmer S.M., Balfour K.M., Rowe B.R., Farrall M., Barnett A.H., Bain S.C., and Todd J.A. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. **Nature** **371**, 130-136, 1994.

Daw, K., and Powers, A.C. Two distinct glutamic acid decarboxylase autoantibodies specificities in IDDM target different epitopes. **Diabetes** **44**, 216-220, 1995.

De Bernardinis P., Londei M., James R.F.L., Lake S.P., Wise P.H., and Feldmann M. Do CD4-positive cytotoxic T cell damage islet in type I diabetes? **Lancet** **ii**, 823-824, 1988.

Durruty P., Ruiz F., and Garcia de los Rios M. Age at diagnosis and seasonal variation in the onset of insulin-dependent diabetes in Chile. **Diabetologia** **17**, 357-360, 1979.

Edelhoff S., Grubin C.E., Karlsen A.E., Adler D.A., Foster D., Distech C.M., and Lernmark A. Mapping of glutamic acid decarboxylase (GAD) genes. **Genomics** **17**, 93-97, 1993.

Erlich H.A., Bugawan T.L., Scharf S., Nepom G.T., Tait B., and Griffith R.L. HLA-DQB sequence polymorphism and genetic susceptibility to IDDM. **Diabetes** **39**, 96-103, 1990.

Falorni A., Ackefors, M., Carlberg, C., Daniels, T., Persson, B., Robertson, J., and Lernmark, A. Diagnostic sensitivity of immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase (GAD65) autoantibodies in childhood IDDM. **Diabetes** **39**, 1091-1098, 1996.

Falorni A., Ortqvist E., Persson B., and Lernmark A. Radioimmunoassays for glutamic acid decarboxylase (GAD65) and GAD65 autoantibodies using ^{35}S or ^3H recombinant human ligands. **J. Immunol. Methods** **186**, 89-99, 1995.

Gladstone P., and Nepom G.T. The prevention of IDDM. Injecting insulin into the cytokine network. **Diabetes** **44**, 859-862, 1995.

Goto Y., De Silva M.G., Toscani A., Prabhakar B.S., Notkins A.L., and Lan M.S. A novel human insulinoma-associated cDNA, IA-1, encodes a protein with "zinc-finger" DNA-binding motifs. **J. Biol. Chem.** **267**, 15252-15257, 1992.

Groop L., Miettinen A., Groop P-H., Meri S., Koskimies S., and Bottazzo G. Organ-specific autoimmunity and HLA-DR antigens as markers for beta-cell destruction in patients with type II diabetes. **Diabetes** **37**, 99-103, 1988.

Groop L., Pelkonen R., Roakimie S., Bottazzo G., and Doniach D. Secondary failure to treatment with oral anti-diabetic agents in non-insulin dependent diabetes. **Diabetes Care** **9**, 129-132, 1986.

Grubin C.E., Daniels T., Toivola B., Landin-Olsson M., Hagopian W.A., Li L., Karlsen A.E., Boel E., Michelsen B., and Lernmark A. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. **Diabetologia** **37**, 344-350, 1994.

Hagopian W., Michelsen B., Karlsen A., Larsen F., Moody A., Grubin C., Rowe R., Petersen J., Mcevoy R., and Lernmark A. Autoantibodies in IDDM primarily recognize

the 65,000-Mr rather than the 67,000-Mr isoform of glutamic acid decarboxylase. **Diabetes** **42**, 631-636, 1993.

Hatziagelaki E., Jaeger C., Maeser E., Bretzel R.G., and Federlin K. GAD 65 antibody but not ICA positivity in adult-onset diabetic patients is associated with early progression to clinical insulin dependency. **Acta Diabetol.** **33**, 291-294, 1996.

Hernandez R.E. Trasplante de islotes de Langerhans. Ruiz M. Diabetes Mellitus. (segunda edición). **Editorial Akadia** 706-712, 1994.

Hosszufalusi N., Chan E., Granger G., and Charles M.A. Quantitative analyses comparing all major spleen-cell phenotypes in BB and normal rats-autoimmune imbalance and double-negative T-cell associated with resistant, prone and diabetic animals. **J. Autoimmun.** **5**, 305-318, 1992.

Huang X., Yuan J., Goddard A., Foulis A., James R.F.L., Lernmark A., Pujol-Borrell R., Rabinovitch A., Somoza N., and Stewart T.A. Interferon expression in the pancreas of patients with type 1 diabetes. **Diabetes** **44**, 658-664, 1995.

Irvine W.J. Immunological aspects of diabetes mellitus: a review. In: **Immunology of Diabetes** pp 1-53. Teviot Scient. Pub., Edinburgh, 1986.

Itoh N., Hanafusa T., Miyazaki A., Miyagawa J., Yamagata K., Yamamoto K., Waguri M., Imagawa A., Tamura S., Inada M., Kawata S., Tarui S., Kono N., and Matsuzawa Y. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. **J. Clin. Invest.** **92**, 2313-2322, 1993.

Jackson P. The analysis of fluorophore-labeled glycans by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis. **Annu. Rev. Biochem.** **216**, 143-252, 1994.

Jørgensen K.H. and Larsen U.D. Homogeneous Mono ^{125}I -Insulins. Preparation and characterization of mono ^{125}I -(Tyr A₁₄) and mono ^{125}I -(Tyr A₁₉)-Insulin. **Diabetologia** **19**, 546-554, 1980.

Karlsen A.E., Hagopian W.A., Grubin C.E., Dube S., Disteché C.M., Adler D.A., Bärmeier H., Mathewes S., Grant F.J., Foster D., and Lernmark A. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. **Proc. Natl. Acad. Scid. USA** **88**, 8337-8341, 1991.

Kasuga A., Maruyama T., Ozawa Y., Takei I., Falorni A., Lernmark A., and Saruta T. Antibody to the Mr 65,000 isoform of glutamic acid decarboxylase are detected in non-insulin-dependent diabetes in japanese. **J. Autoimm.** **Vol 9**, 105-111, 1996.

Kawasaki E., Hutton J.C., and Eisenbarth G.S. Molecular cloning and characterization of the human transmembrane protein tyrosine phosphatase homologue, Phogrin, an autoantigen of type I diabetes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **227**, 24817-24823, 1996.

Kawasaki E., Yu L., Rewers M.J., Hutton J.C., and Eisenbarth G.S. Definition of multiple ICA512/Phogrin Autoantibody Epitopes and Detection of Intramolecular Epitopes Spreading in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes. **Diabetes** **47**, 733-742, 1998.

Kawasaki E., Takino H., Yano M., Uotani S., Matsumoto K., takao Y., Yamaguchi Y., Akazawa S., and Nagataki S. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with IDDM and autoimmune thyroid disease. **Diabetes** **43**, 80-86, 1994.

Khalil I., d'Auriol L., Gobet M., Morin L., Lepage V., Deschamps I., Park M.S., Degos L., Galibert F., and Hors J. A combination of HLA-DQ β Asp57 negative and HLA-DQ α Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.** **85**, 1315-1319, 1990.

Kim J., Namchuk M., Bugawan T., Fu Q., Jaffe M., Shi Y., Aanstoot H.J., Turck C.W., Erlich H., Lennon V., and Baekkeskov S. Higher autoantibody levels and recognition of a linear NH2-terminal epitope in the autoantigen GAD65, distinguish stiff-man-syndrome from insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Exp. Med.** **180**, 595-606, 1994.

Klein P., Kaneshia M., and De Lisi C. The detection and classification of membrane-spanning proteins. **Biochem. Biophys. Acta** **815**, 468-476, 1985.

Koch M., Francois-Gerard C., Sodoyez-Goffaux F., and Sodoyez J.C. Semiquantitative assessment of anti insulin total IgG and IgG subclasses in insulin immunised patients using a highly sensitive immunochemical micromethod. **Diabetologia** **29**, 720-726, 1986.

Kurtz A.B., De Silvio L., and Bosi E. The determination of detection limits for insulin antibody assays. **Diabetologia** **31**, 395-399, 1988.

Kyte J., and Doolittle R.F. A simple method for displaying the hidropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.** **157**, 105-132.

Lan M.S., Lu J., Goto Y., and Notkins A.L. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. **DNA Cell. Biol.** **13**, 505-514, 1994.

Landin-Olsson M. Precision of the islet-cell antibody assays depends on the pancreas. **J. Clin. Lab. Anal.** **4**, 282-294, 1986.

La Porte R.E., Tajima N., and Akerblom H.K. Geographic differences in the risk of IDDM: the importance of registries. **Diabetes Care** **8 (suppl 1)**, 101-107, 1985.

Lernmark A., Molenaar J.L., Yamaguchi Y., Nagataki S., Ludvigsson J., and Maclaren N.K. The Fourth International Serum Exchange Workshop to standarize cytoplasmic

islet cell antibodies: the Immunology and Diabetes Workshops and Participating Laboratories. **Diabetologia** **34**, 534-535, 1991.

Linde S., Hansen B., Sonne O., Holst J.J., and Gliemann J. Tyrosine A₁₄ [¹²⁵I] monoiodoinsulin preparation, biologic properties, and long term stability. **Diabetes** **30**, 1-8, 1981.

Lohmann T., Sessler J., Verlohren H.J., Schröder S., Rötger J., Dähn K., Mogenthaler N., and Scherbaum W.A. Distinc genetic and immunological features in patiens with onset of IDDM before and after age 40. **Diabetes Care** **20**, 4, 524-529, 1997.

Lu J.A., Notkins A.L., and Lan M.S. Isolation, sequence and expression of a novel mouse brain cDNA, mIA-2, and its relatedness to members of the protein tyrosine phosphatase family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **204**, 930-936, 1994.

Maclaren N., Scharzt D., Drash A., and Grave G. The initial pathogenic events in insuli-dependent diabetes. **Diabetes** **38**, 534-538, 1989.

Marner B., Lernmark A., Nerup J., Molenaar J.L., Tuk C.W., and Bruining G.J. Analysis of islet cell antibodies on frozen sections of human pancreas. **Diabetologia** **25**, 93-96, 1986.

Martí M.L. Historia de la Diabetes en Diabetes Mellitus. Ruiz M. Diabetes Mellitus. (segunda edición). **Editorial Akadia** 1-6, 1994.

Martin D.L., Martin S.B., Wu S.J., and Espina N. Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. **J. Neurosci.** **11**, 2725-2731, 1991.

Mendola G., Casamitjana R., and Gomis R. Effect of nicotinamide therapy upon B-cell function in newly-diagnosed Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. **Diabetologia** **32**, 160-162, 1989.

Myers M. A., Rabin D.U., and Rowley M.J. Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase. **Diabetes** **44**, 1290-1295, 1995.

Nell L.J., Virta V.J., and Thomas J.W. Application of a rapid enzyme linked immunosorbent microassay (ELISA) to study human anti-insulin antibody. **Diabetes** **34**, 60-66, 1985.

Notkins A.L. The causes of Diabetes. **Sci. Amer.** Vol **241**, N° **5**, 56-67, 1979.

Palmer J., Asplin C., Clemons P., Lyen K., Tappati O., Raghu P., and Pauquette T. Insulin autoantibodies in insulin dependent diabetes before insulin treatment. **Science** **222**, 1337-1338, 1984.

Papouchado, M.L., Ermácola M.R., and Poskus E. Detection of glutamic acid decarboxylase (GAD) autoantibodies by indirect immunofluorescence using CHO cells expressing recombinant human GAD65. **J. Autoimm.** **9**, 689-697, 1996.

Passini N., Larigan J.D., Genovese S., Appella E., Sinigaglia F., and Rogge L. The 37/40-kilodalton autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus is the putative tyrosine phosphatase IA-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **92**, 9412-9416, 1995.

Payton M.A., Hawkes C.J., and Christie M.R. Relationship os the 37,000 and 40,000 MR tryptic fragments of islet antigens in IDDM to the protein tyrosine phosphatase like molecule IA-2 (ICA512). **J. Clin. Invest.** **96**, 1506-1511, 1995.

Petersen J.S., Hejnaes K.R., Moody A., Karlsen A.E., Marshall M.O., Høier-Madsen M., Boel E., Michelsen B.K., and Dyrberg T. Detection of GAD 65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. **Diabetes** **43**, 459-467, 1994 b.

Petersen J.S., Russel S., Marshall M.O., Kofod H., Buschard K., Cambon N., Karlsen A.E., Boel E., Hagopian W.A., Hejnaes K., Moody A., Dyrbert T., Lernmark A., Madsen O.D., and Michelsen D.K. Differential expression of glutamic acid decarboxylase in rat and human islets. **Diabetes** **42**, 484-495, 1993.

Peterson J.D., and Haskins K. Transfer of diabetes in the NOD-*scid* mouse by CD4 T-cell clones. Differential requirement for CD8 T-cell. **Diabetes** **45**, 328-336, 1996.

Poskus E. Inmunidad y Diabetes. Generalidades. Ruiz M. Diabetes Mellitus. (segunda edición). **Editorial Akadia** 88-107, 1994.

Puchulu F.E., Ruiz M., y Ruiz Morosini M.L. Etiología y Patogenia. Etiología de la diabetes insulino dependiente. Ruiz M. Diabetes Mellitus. (segunda edición). **Editorial Akadia** 188-202, 1994.

Pugliese A., Gianani R., Moromisato R., Awdeh Z.L., Alper C.A., Erlich H.A., Jackson R.A., and Eisenbarth G.S. HLA-DQB1* 0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. **Diabetes** **44**, 608-613, 1995.

Rabin D.U., Pleasic S.M., Shapiro J.A., Yoo-Warren H., Oles J., Hicks J.M., Goldstein D.E., and Rae P.M.M. Islet cell antigen 512 is a diabetes specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. **J. Immunol.** **152**, 3183-3188, 1994.

Richter W., Endl J., Eiermann T.H., Brandt M., Kientsch-Engel R., Triviolet C., Jungfer H., and Scherbaum W.A. Human monoclonal islet cell antibodies from a patient with

insulin-dependent diabetes mellitus reveal glutamate decarboxylase as the target antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**, 8467-8471, 1992.

Ritcher, W., Shi, Y., and Baekkeskov, S. Autoreactive epitopes defined by diabetes-associated human monoclonal antibodies are localized in the middle and C-terminal domains of the smaller form of glutamate decarboxylase. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA** **90**, 2832, 1993.

Riley W.J., Maclaren N.K., Krischer J., Spillar R.P., Silverstein J.H., Schatz D.A., Schwartz S., Malone J., Shah S., Vadheim C., and Rotter J.I. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. **N. Engl. J. Med.** **323**, 1167-1172, 1990.

Roep B.O., and De Vries R.R.P. T-lymphocytes and the pathogenesis of type-1 (insulin-dependent) diabetes-mellitus. **Eur. J. Clin. Invest.** **22**, 697-711, 1992.

Roep B.O., Kallan A.A., and De Vries R.R.P. β -cell antigen specific lysis of macrophages by CD4 T-cell clones from newly diagnosed IDDM patient, a putative mechanism of T-cell mediates autoimmune islet cell destruction. **Diabetes** **41**, 1380-1384, 1992.

Ronningen K.S., Iwe T., Halstensen T.S., Spurkland A., and Thorsby E. The amino acid at position 57 of the HLA-DQ β chain and susceptibility to develop insulin-dependent diabetes mellitus. **Hum. Immunol.** **26**, 215-225, 1989.

Sokal R.R., and Rohlf F.J. Biometry, Seconde Ed., Freeman, New York, 1981.

Solimena M., Dirkx Jr R., Hermel J.M., Pleasic-Williams S., Shapiro J.A., Caron L., and Rabin D.U. ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neuro secretory granules. **The EMBO Journal** Vol 15, N° 9, pp 2102-2114, 1996.

Spielman R.S., McGinnis R.E., and Ewens W.J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region an insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). **Am. J. Hum. Genet.** **52**, 506-516, 1993.

Stephanson J., and Fuller J.H. Microvascular and acute complications of IDDM patients: the EURODIAB IDDM complications study. **Diabetologia** **37**, 278-285, 1994.

Stumpo R., Llera A. S., Cardoso A. I., and Poskus E. Solid vesus liquid phase assays in detection of insulin antibodies. Influence of iodination site on labelled insulin binding. **J. Immunol. Methods** **169**, 241-249, 1994.

Suzuki R., Asami N., Amann E., and Wagatsuma M. Sequences of two porcine glutamic acid decarboxylases (65- and 67-KDa GAD). **Gene** **152**, 257-360, 1995.

Szabo G., Katarova Z., and Greenspan R. Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development. **Mol. Cell. Biol.** **14**, 7535-7545, 1994.

Todd J.A., Bell J.I., and Mc Devitt H.O. HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature** **329**, 599-604, 1987.

Traverso M. y Ruiz M. Clasificación y diagnóstico. Ruiz M. Diabetes Mellitus. (segunda edición). **Editorial Akadia** 136-141, 1994.

Tuomi T., Rowley M.J., Knowles W.J., Chen Q., McAnally T., Zimmet P.Z., and Mackay I.R. Autoantigenic properties of native and denatured glutamatic acid decarboxylase: evidence for a conformational epitope. **Clin. Immunol. Immunopathol.** **71**, 53-59, 1994.

Vague P., Vialettes B., Lassman-Vague V., and Vallo J.J. Nicotinamide may extend remission phase in insulin-dependent diabetes. **Lancet ii**: 619-620, 1987.

Verge C.F., Gianani R., Kawasaki E., Yu L., Pietropaolo M., Jackson R.A., Chase H.P., and Eisenbarth G.S. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. **Diabetes** **45**, 926-933, 1996.

Vives-Pi M., Somoza N., Vargas F., Armengol Y., Sarri Y., Wu J., and Pujol-Borrell R. Expression of glutamic acid decarboxylase (GAD) in the α , β and δ cells of normal and diabetic pancreas: implications for the pathogenesis of type I diabetes. **Clin. Exp. Immunol.** **92**, 391-396, 1993.

Wilkin T.J., Nicholson S., and Casey C. A micro enzyme linked immunosorbent assay for insulin antibodies in serum. **J. Immunol. Methods** **76**, 185-194, 1985.

Zanone M., Petersen J., Peakman M., Mathias C., Watkins P., Dyrberg T., and Vergani D. High prevalence of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in long-standing IDDM is not a marker of symptomatic autonomic neuropathy. **Diabetes** **43**, 1146-1151, 1994.

Zavala A.V., Fabiano de Bruno L.E., Cardoso A.I., Mota A.H., Capucchio M., Poskus E., Fainboim L., and Basabe J.C. Cellular and humoral autoimmunity markers in type 2 (no-insulin-dependent) diabetic patients with secondary drug failure. **Diabetologia** **35**, 1159-1164, 1992.

Zhang Z.H., Davidson L., Eisenbarth G., and Weiner H.L. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**, 10252-10256, 1991.