



11
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS EN CONTRA
DE LA DESCARBOXILASA DEL ÁCIDO GLUTAMÍNICO (GAD)
EN EL SUERO DE PACIENTES INSULINO
DEPENDIENTES. ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
MINERVA CRESPO RAMÍREZ

ASESOR: DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA
COASESOR: D.F.B. RAMÓN CENDEJAS RAMÍREZ

FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO: DE MEX.

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Determinación de auto-anticuerpos en contra de la descarboxilasa del
ácido Glutámico (GAD) EN el suero de pacientes insulino dependientes.

que presenta la pasante MINERVA CRESPO RAMIREZ
con número de cuenta: 8857302-1 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Febrero de 1995

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez</u>
VOCAL	<u>Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa</u>
SECRETARIO	<u>Dr. Marco Antonio Vega López</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Andres Romero Rojas</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Patricia Campos Peón</u>

[Firma]
[Firma]
[Firma]
[Firma]

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"DETERMINACIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS EN CONTRA
DE LA DESCARBOXILA DEL ÁCIDO GLUTAMICO (GAD)
EN EL SUERO DE PACIENTES INSULINO
DEPENDIENTES."**

T E S I S:
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MINERVA CRESPO RAMÍREZ

**ASESOR: Dr. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA
COASESOR: Q.F.B. RAMÓN CENDEJAS RAMIREZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1995

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"DETERMINACIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS EN CONTRA
DE LA DESCARBOXILA DEL ÁCIDO GLUTAMICO (GAD)
EN EL SUERO DE PACIENTES INSULINO
DEPENDIENTES."**

T E S I S:
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MINERVA CRESPO RAMÍREZ

ASESOR: Dr. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA
COASESOR: Q.F.B. RAMÓN CENDEJAS RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1995

DEDICATORIA:

A DIOS

POR PRESTARME LA VIDA Y HABERME DEJADO
TERMINAR MIS ESTUDIOS PROFESIONALES

A MIS PADRES:

POR SER MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS, POR
BRINDARME SU AMOR Y CONFIANZA Y POR
QUE ME IMPULSAN SIMPRE A REALIZAR MIS
SUEÑOS Y ANHELOS

A MIS HERMANOS:

ROSA, MARGARITA, JOEL POR TENER SU AMOR Y
DARME SU APOYO CUANDO LO NECESITO

A MIS AMIGOS

MARGARITA, JUDITH, LAURA, LILIA, GUSTAVO,
AMALIA, EL VIRA, DADIEL, MIGUEL, BIQUY, SANDRA,
NOÉ, ELIZABETH, JORGE, GUILLERMO, PILAR,
MARIBEL, ROSA, ANA, CONCEPCION POR COMPARTIR
BELLOS Y MALOS MOMENTOS

AGRADECIMIENTOS:

AL DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA
POR TENER SU APOYO, INTERÉS, GULA Y
ENSEÑANZA EN ESTE TRABAJO DE TESIS

AL DR. MIGUEL A. GUILLEN GONZÁLEZ
POR HABERME REGALADO UN POCO DE SU
TIEMPO PARA QUE ESTE TRABAJO FUERA MEJOR

A JESÚS MENDEZ FRANCO
POR SER EL MEJOR AMIGO Y COMPAÑERO EN
EL LABORATORIO.

AL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
POR DARMÉ LA OPORTUNIDAD DE ESTAR HACIENDO MI
TRABAJO DE TESIS EN SUS INSTALACIONES

LISTA DE ABREVIATURAS

AAI	<i>Anticuerpos anti-insulina</i>
AET	<i>Bromuro de 2-amino etil isothiouronium</i>
Anti-64K	<i>anticuerpo 64K conocido ahora como anti-GAD</i>
c.p.m.	<i>cuentas por minuto</i>
DMNID	<i>diabetes mellitus no insulino dependiente</i>
DMID	<i>diabetes mellitus insulino dependiente</i>
DM 2/ as	<i>diabetes mellitus secundaria</i>
EDTA	<i>ác. tetracetil disodico etilenoitrilo.</i>
GABA	<i>ác. γ amino butirico</i>
GAD	<i>descarboxilasa glutamica</i>
GD.	<i>glandula</i>
H20N	<i>Hospital 20 de noviembre ISSSTE</i>
HLA	<i>Complejo mayor de histocompatibilidad</i>
ICA	<i>Antigeno dirigido en contra de los islotes pancreáticos</i>
μCi	<i>mili Curi</i>
PAI.P	<i>fosfato de piridoxal</i>
PBS	<i>solución salina fisiológica bufereada</i>
PHMB	<i>parahidroximercurio fosfato</i>
PMSF	<i>fenil metil sulfonilfluoruro.</i>

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- FIG.1** *Fisiopatología de la deficiencia de insulina*
- FIG.2** *Interacción entre las dos partes del sistema inmune que intervienen en la génesis de la diabetes mellitus tipo 1 y que tiene como consecuencia la destrucción de las células β del páncreas*
- FIG.3** *Biosíntesis del GABA*
- FIG.4** *Oxidación del semialdehído succínico catalizada por la deshidrogenasa del semialdehído succínico.*
- FIG.5** *Dispositivos para la medición de la actividad de la GAD*
- FIG.6** *Patrón electroforético de la GAD purificada*
- FIG.7** *Título de anticuerpos anti-GAD en los sueros de pacientes diabéticos y sujetos control*
- FIG.8** *Título de anticuerpos anti-GAD en las γ -Globulinas de los pacientes diabéticos y sujetos control*
- FIG.9** *Título de anticuerpos anti-GAD en las IgG de pacientes diabéticos y sujetos control*
- FIG.10** *Título de anticuerpos anti-GAD en pacientes con DMID de acuerdo al tiempo de evolución*
-
- TABLA 1** *Prevalencia de la DMID en el mundo*
- TABLA 2** *Concentración de GABA en algunos órganos de la rata*
- TABLA 3** *Purificación de la GAD*
- TABLA 4** *Perfil clínico de los pacientes empleados en este estudio.*
- TABLA 5** *Título de anticuerpos anti-GAD detectado en sujetos no diabéticos mediante el uso de un extracto crudo de GAD*
- TABLA 6** *Título de anticuerpos anti-GAD detectados en pacientes diabéticos insulino dependientes por inmunoprecipitación de un extracto crudo de GAD*

- TABLA 7** *Título de anticuerpos anti-GAD detectados en pacientes diabéticos insulino dependientes (DMID) y con diabetes secundaria por inmunoprecipitación de un extracto crudo de GAD.*
- TABLA 8** *Título de anticuerpos anti-GAD detectados en la fracción IgG de sujetos diabéticos y no diabéticos por inmunoprecipitación de una preparación purificada de GAD- (125I)*
- TABLA 9** *Incidencia de anticuerpos anti-GAD determinada en personas del Hospital 20 de Noviembre.*
- TABLA 10** *Título de anticuerpos anti-GAD detectados en el suero de pacientes con DMID de acuerdo al sexo mediante la inmunoprecipitación de un extracto crudo de GAD*
- TABLA 11** *Concentración de proteínas de las preparaciones de IgG utilizadas pertenecientes a pacientes diabéticos y sujetos normales*

INDICE

	Hoja
1.-RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCION.....	2
2.1.- DIABETES MELLITUS.....	2
2.2.- EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE INSULINA.....	2
2.3.- CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS.....	4
2.4.- DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTE.....	5
2.5.- PREVALENCIA.....	6
2.6.- EDAD DE COMIENZO.....	6
2.7.- SEXO.....	6
2.8.- ESTACIONALIDAD.....	6
2.9.- INFECCIONES (VIRUS).....	6
2.10.- INMUNOGENETICA DE LA DIMID.....	7
2.11.- FISIOPATOLOGIA DE LA DIMID.....	8
2.12.- DESCARBOXILASA GLUTAMICA (GAD).....	10
2.13.- METABOLISMO DEL GABA Y SU REGULACION.....	11
2.14.-DISTRIBUCION DE LA GAD EN EL HOMBRE.....	13
2.15.- GAD Y DIABETES.....	14
3.- OBJETIVOS.....	15
4.- HIPOTESIS.....	16
5.- DIAGRAMA DE FLUJO.....	17
6.- MATERIAL Y METODOS.....	18
6.1.- MATERIAL BIOLOGICO.....	18
6.1.a.- FUENTE DE ANTICUERPOS anti-GAD.....	18
6.1.a.I.- Obtención de γ -globulinas.....	18
6.1.a.II.- Obtención de IgG.....	19
6.1.b.- PREPARACION ENZIMATICA DE GAD.....	20
6.1.b.I.- Obtención de extracto crudo de GAD.....	20
6.1.b.II.- Purificación de la GAD de cerebro de ratón.....	20
6.1.b.III.- Yodación de la GAD.....	23
6.2.- METODOS UTILIZADOS.....	25
6.2.a.- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS anti-GAD Y CUANTIFICACIÓN.....	25
6.2.a.I.- Fundamento.....	25

6.2.a.II.- Inmunoprecipitación de la actividad de la GAD.....	26
6.2.a.III.- Inmunoprecipitación de GAD -(125 I)	27
6.2.b.- PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	27
6.2.b.I.- Medición de la actividad de la GAD (125 I)	27
6.2.b.II.- Medición de proteínas	28
7.- RESULTADOS	30
8.-DISCUSION	47
9.- CONCLUSIONES	57
10.-REFERENCIAS	59

RESUMEN

En los últimos años en el suero de pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) se han podido detectar anticuerpos en contra de diferentes componentes del páncreas, entre los que se encuentran los anticuerpos anti- islotes pancreáticos (ICA), los anticuerpos anti-insulina (AAI), y los anticuerpos anti-64K (Anti-64K) que se cree están involucrados en la etiopatología de la enfermedad.

El fin perseguido en este trabajo fue montar en México una técnica capaz de detectar a los anticuerpos anti-64K, conocidos como anti-GAD (anti - descarboxilasa glutámica), pues se ha visto que estos anticuerpos son los más específicos y que aparecen incluso años antes de manifestarse la DMID.

La metodología propuesta en este trabajo se fundamenta en la precipitación de la enzima descarboxilasa glutámica (GAD) de cerebro de ratón a consecuencia de su reacción con los anticuerpos anti-GAD, seguida de la medición de su actividad enzimática para una variante del método o de la radioactividad emitida por el 125 unido a una preparación de GAD purificada para el otro.

Mediante la aplicación de esta metodología se estudiaron 17 individuos sanos a manera de control y 35 pacientes diabéticos, procedentes del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE con el diagnóstico clínico de DMID (n = 32), diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) (n= 3) y diabetes mellitus secundaria DM 2/as (n=1) encontrándose títulos elevados de anticuerpos anti-GAD, dependiendo del procedimiento utilizado en 75 a 100% de los pacientes con DMID. Pudo observarse así mismo que el título de estos anticuerpos bajó con la evolución del padecimiento y que la presencia y el título de estos anticuerpos no guardaron relación con el sexo de los pacientes. No pudo demostrarse la presencia de anticuerpos anti-GAD en pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente y con diabetes secundaria.

Por su especificidad, bajo costo y simpleza se sugiere la utilización del procedimiento que evalúa la actividad de la GAD inmunoprecipitada como el procedimiento de elección para el diagnóstico inequívoco de la DMID y para la identificación de individuos de alto riesgo susceptibles a contraer dicho padecimiento.

2.- INTRODUCCION

2.1.- DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un síndrome clínico hereditario que resulta de la deficiencia absoluta o relativa de insulina, que con lleva a una serie de complicaciones metabólicas que afectan a la mayor parte de los aparatos y sistemas, y que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia.(2,9)

Se considera que las manifestaciones crónicas de la enfermedad son el resultado del metabolismo anormal tanto de los carbohidratos como de los lípidos y de las proteínas(51).Entre las alteraciones anatomopatológicas destacan las que resultan del daño a los nervios (neuropatías), o a los vasos sanguíneos de pequeño y de gran calibre (angiopatías), (45).

2.2.- EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE INSULINA

El papel central de la insulina en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos puede apreciarse examinando las consecuencias de la deficiencia de insulina en el hombre.

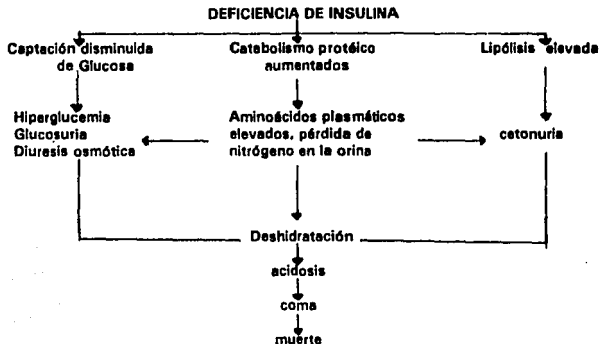
La glucosa plasmática rara vez excede de 120 mg. / dl en individuos humanos normales, pero se encuentran, de manera rutinaria, concentraciones mucho más altas de glucosa en personas con acción deficiente de insulina. Después de que la glucosa plasmática llega a un cierto valor (por lo general > 180 mg. / dl en el hombre), se excede la capacidad máxima de resorción de glucosa en el túbulo renal y ésta es excretada en la orina (glucosuria) (8,53). El volumen de orina aumenta debido a la diuresis osmótica provocada por la alta concentración de glucosa plasmática y a la coincidente pérdida forzosa de agua (poliuria). Esto a su vez conduce a la deshidratación (hiperosmolaridad), al aumento de la sed y a un consumo excesivo de agua (polidipsia) (20). La glucosuria causa una pérdida sustancial de calorías (4.1 Kcal por cada gramo de glucosa excretada). Esta pérdida, cuando se acopla a la pérdida debida a la degradación de parte de las proteínas musculares con fines energéticos y a la disminución del tejido adiposo como consecuencia de la degradación excesiva de lípidos, conduce a una disminución del peso corporal a pesar del aumento del apetito (polifagia) y de la ingestión calorífica aumentada que se observa en estos pacientes.(50)

En ausencia de insulina disminuye la síntesis de proteínas, en parte debido a la reducción de la poza de aminoácidos, que en estas condiciones siguen caminos glucogénicos y/o cetogénicos dando como resultado la aparición de un equilibrio negativo

de nitrógeno. La concentración plasmática de ácidos grasos se eleva como consecuencia de su transporte excesivo del tejido adiposo al hígado en donde serán fundamentalmente oxidados y transformados en cuerpos cetónicos (ácido β metil hidroxibutírico, acetona y ácido acetoacético) (14,20)

Los cuerpos cetónicos son transportados al músculo y a otros órganos para su oxidación pero cuando se excede la capacidad de estos órgano para oxidarlos aparece la cetosis. Inicialmente, el organismo compensa la acumulación de estos ácidos orgánicos incrementando las pérdidas respiratorias de CO_2 , sin embargo, si no se administra insulina oportunamente, sobreviene una acidosis metabólica grave que lleva al paciente al coma y eventualmente a la muerte (18,19,47). Algunos de los efectos metabólicos de la deficiencia de insulina se resumen en la Fig.1

FIG. 1 FISIOPATOLOGIA DE LA DEFICIENCIA DE INSULINA



En este cuadro se resumen los efectos metabólicos observados en la diabetes mellitus insulino dependiente no tratada, así como algunas de las complicaciones que pueden sobrevenir en este tipo de pacientes (33).

La deficiencia de la insulina ocurre cuando esta hormona es biológicamente menos activa. Dicha disminución puede ocurrir tanto por un incremento en su degradación como por la aparición de anticuerpos en contra de ella. Una situación similar ocurre cuando disminuye la concentración del receptor a la insulina o su afinidad por la hormona, o bien cuando disminuye la secreción de insulina a consecuencia de la destrucción de las células β del páncreas (36,47)

2.3.-CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS

Las clasificaciones más ampliamente aceptadas son las del Grupo Nacional de Datos sobre la Diabetes (GNDD) de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, y la del Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (45)

La clasificación usada en el presente trabajo será la del Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud que reconocen tres formas del padecimiento: (6,43)

- 1. DIABETES MELLITUS TIPO I (DEPENDIENTE DE INSULINA)**
- 2. DIABETES MELLITUS TIPO II (NO DEPENDIENTE DE INSULINA)**
tanto en individuos obesos como en no obesos
- 3. DIABETES MELLITUS SECUNDARIA O ASOCIADA CON CIERTAS CONDICIONES O SINDROMES** *(Tanto en individuos obesos como en no obesos)*

2.4.-DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTE

SINONIMOS:

Diabetes juvenil, Diabetes mellitus tipo I, de inicio en la Juventud, con tendencia a la cetosis o inestable.

La diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o Tipo I es un síndrome auto inmune crónico que provoca la destrucción de las células β de los islotes de Langerhans mediante un proceso complejo mediado por linfocitos T y B (16).

La etiología del padecimiento es multifactorial, siendo la resultante de la interacción del paciente con distintos factores ambientales (temperatura, latitud, patología infecciosa prevalente, hábitos nutricionales, etc.) que son aparentes principalmente

durante los meses de otoño e invierno. Con frecuencia el trastorno se relaciona con la existencia de infecciones virales previas ó con diversas condiciones geográficas(4,17).

Así mismo se ha observado también que existe una predisposición genética individual y una mayor predominancia en distintos grupos étnicos.(21)

Como se ha indicado anteriormente la diabetes insulino dependiente se caracteriza clínicamente por la aparición súbita de polidipsia, poliuria y polifagia. La enfermedad en ausencia de tratamiento progresa rápidamente hacia una cetoacidosis diabética y eventualmente hacia la muerte. La enfermedad se acompaña de insulinopenia y en consecuencia de la necesidad de la aplicación de insulina (6,30)

2.5.-PREVALECIÁ

La DMID es de distribución universal y su prevalencia es notoriamente inferior en los hispanos. Tabla 1.

TABLA 1

<i>PREVALECIÁ DE LA DMID EN EL MUNDO</i>			
<i>CATEGORIA</i>	<i>PAIS</i>	<i>EDADES (AÑOS)</i>	<i>PREVALENCIA / 1 000</i>
ALTA	Escandinavia (Finlandia, Suecia)	1 - 14	0.24 - 0.83
	Noruega, Reino Unido, Estados Unidos		0.3 - 2.74
INTERMEDIA	Francia		0.24
	España		0.25
	Alemania		0.41
BAJA	Hispanos	1 - 20	
	Israel	2 - 16	0.16
	Japón		0.049

Tomada de Rull J.A and E. Zorrilla (45)

Como se observa en la Tabla 1 la prevalencia de la DMID varia notablemente según países y grupos étnicos. En Europa la prevalencia varia entre 0.24 y 0.83 / 1000 habitantes mientras que en Estados Unidos de Norteamérica se han comunicado límites muy variados que van desde 0.3 a 2.74 / 1000 habitantes. La diferencias son notables incluso en zonas del mundo de baja prevalencia, como en el continente asiático, con un mínimo en Japón (0.049/ 1000 habitantes menores de 20 años) (21,45).

Numeroso factores, incluidos los de orden metodológicos, demográficos, geográficos, socioeconómico y otros, influyen seguramente en esta diversidad (54).

2.6.-EDAD DE COMIENZO

La DMID puede ocurrir a cualquier edad, en cualquier circunstancia geográfica y en cualquier grupo étnico. Es sin embargo predominante en los grupos de edad que se encuentran entre 0 y 20 años (30).

2.7.-SEXO

Un análisis detenido de los datos disponibles en los registros de incidencia más confiables a nivel mundial, nos permite afirmar que no hay predilección de la DMID por uno o otro sexo. Pues aunque se sugiere una mayor incidencia en varones, en algunos estudios realizados en individuos europeos de raza blanca o caucásica, en otros no se ha encontrado tal predilección.(3)

2.8.-ESTACIONALIDAD

La mayoría de los estudios, recogen un mayor número de casos nuevos durante las estaciones de otoño e invierno; las excepciones a esta regla son raras y son debidas principalmente a la situación geográficas en la que se encuentra el país bajo estudio (temperatura, latitud, patología infecciosa prevalente, hábitos nutricionales, etc) (44).

2.9.-INFECCIONES (VIRUS)

Gamble fue el primero en detectar la importancia del ambiente al señalar la coincidencia entre la mayor incidencia de DMID en otoño e invierno y la de ciertas infecciones provocadas por virus particularmente del tipo Coxsackie B4 y el de la rubeola (31,44)

2.10.-INMUNOGENETICA DE LA DMID

El riesgo de desarrollar DMID está relacionado con ciertos genes de la región del complejo mayor de histocompatibilidad-D (HLA-D), localizados en el cromosoma 6 (4).

La proteína cuya síntesis dirigen estos genes (complejo mayor de histocompatibilidad) es un heterodímero ($2\alpha,\beta$) cuya función es presentar los antígenos a los linfocitos T para activarlos. Estas proteínas se localizan en la membrana de las células β del páncreas en DMID pero no en condiciones normales.

Es necesario señalar al respecto que comunmente los linfocitos T cooperadores son los que específicamente reconocen al antígeno presentado en la superficie de los macrófagos, tras su procesamiento y partición intracelular. El reconocimiento de este complejo por los linfocitos T desencadena su activación y provocan una serie de efectos tales, como: la producción de interleucina I por los macrófagos, a la producción de linfocinas capaces de atraer a otras células como macrófagos y granulocitos que destruyen al antígeno directamente y a demás de la activación de los linfocitos B que inducen la secreción de inmunoglobulinas, que forman parte de un sistema de defensa que protege de ofensores externos pero que no se estimula ante la presencia de antígeno endógeno o auto- antígenos. En la DMID se rompe la tolerancia a lo propio debido a la presencia del complejo mayor de histocompatibilidad que estimula la producción de linfocitos T, dicho mecanismo será responsable de la destrucción de las células β del páncreas y de la consecuente deficiencia de insulina. (44).

En años recientes se ha confirmado que variaciones mínimas en la estructura molecular del HLA, como es la sustitución de un aminoácido por otro, en determinados dominios (por ejemplo en la región de presentación del antígeno, específicamente en la cadena β de la región DQ) de la molécula HLA clase II puede afectar seriamente su función provocando la puesta en marcha de una presentación inapropiada de auto o heteroantígenos en la superficie del macrófago y provocando con ello una inconveniente activación de linfocitos T cooperadores con la consecuente destrucción de las células β del páncreas. (16,30)

Así, se ha demostrado con claridad que la presencia de ácido aspártico (Asp) en la posición 57 de la cadena β de la región DQ es un indicador de protección (no asociado a DMID), mientras que su sustitución por otros aminoácidos menos polares, como valina, o serina, se asocia positivamente con la DMID (1,29).

A partir de esos hallazgos, numerosos estudios realizados en familias, en grupos grandes de individuos, así como en poblaciones diversas de negros, chinos y japoneses, han

investigado el peso de la asociación del carácter No Asp 57 DQ con la predisposición a la DMII) (3,29,36,44)

Diversos autores han demostrado que la influencia del marcador No Asp 57 se incrementa de un modo dramático con el sondeo de la cadena DQ particularmente en el residuo 52, en el que la presencia de arginina (Arg) resulta crítica para esa potenciación. El análisis de ambos marcadores proporciona una fuerte asociación con el riesgo de contraer DMID, y que cuando se considera la combinación DQ Asp negativo en conjunto con DQ Arg 52 positivo, el riesgo absoluto calculado de padecer DMID aumenta notablemente (31,46)

Ciertas infecciones virales se han identificado como probables desencadenantes del proceso autoinmune. Los mecanismos propuestos para ello son la ruptura de las células con exposición de sus proteínas y la modificación del genoma que lleva a la expresión de antígenos anormales. Además los virus inducen la aparición de moléculas HLA-D en la superficie de las células β , lo que aumenta la presentación de antígenos a los linfocitos T. Entre los virus mejor identificados están los Coxsackie B4 y el virus de la rubéola.(55)

2.11.-FISIOPATOLOGIA DE LA DMID

En la fase inicial de este tipo de diabetes se ha podido identificar en algunos pacientes la presencia de anticuerpos anti insulina (IAA, del inglés Insulin Auto Antibodies),(5,6) o bien de antígenos dirigidos en contra de los islotes del páncreas (ICA del inglés Islete Cell Antibodies) (3), en el suero de otros pacientes se ha determinado anticuerpos en contra de la glutámica descarboxilasa pancreática o en contra de un antígeno presente en las células β de los islotes de Langerhans que se conoce como proteína 64 K. Este último antígeno se considera idéntico a la enzima descarboxilasa glutámica (GAD) que se encuentra presente en el cerebro de los mamíferos y en algunos de sus tejidos periféricos entre los que se encuentra el páncreas (25).

Desde el punto de vista epidemiológico la acción de ciertos agentes ambientales sobre un individuo genéticamente susceptible resulta en la aparición de insulinitis y en la modificación antigénica de las células β de los islotes de Langerhans y que reduce la reserva de insulina (Fig.2). Los síntomas clínicos de diabetes aparecen cuando la producción de insulina es insuficiente para mantener el papel homeostático en el organismo. Cuando las células β se pierden por completo debido a la destrucción del páncreas el comportamiento de la DMID se hace más inestable.

La etapa preclínica, que ocurre desde el inicio de la insulinitis hasta la aparición de los primeros síntomas de diabetes, suele durar varios años. La destrucción autoinmune de los islotes de Langerhans no es siempre uniforme y progresiva sino que puede evolucionar con períodos de actividad y de remisión temporal (31,36)

investigado el peso de la asociación del carácter No Asp 57 DQ con la predisposición a la DMID (3,29,36,44)

Diversos autores han demostrado que la influencia del marcador No Asp 57 se incrementa de un modo dramático con el sondeo de la cadena DQ particularmente en el residuo 52, en el que la presencia de arginina (Arg) resulta crítica para esa potenciación. El análisis de ambos marcadores proporciona una fuerte asociación con el riesgo de contraer DMID, y que cuando se considera la combinación DQ Asp negativo en conjunto con DQ Arg 52 positivo, el riesgo absoluto calculado de padecer DMID aumenta notablemente (31,46)

Ciertas infecciones virales se han identificado como probables desencadenantes del proceso autoinmune. Los mecanismos propuestos para ello son la ruptura de las células con exposición de sus proteínas y la modificación del genoma que lleva a la expresión de antígenos anormales. Además los virus inducen la aparición de moléculas HLA-D en la superficie de las células β , lo que aumenta la presentación de antígenos a los linfocitos T. Entre los virus mejor identificados están los Coxackie B4 y el virus de la rubeola.(55)

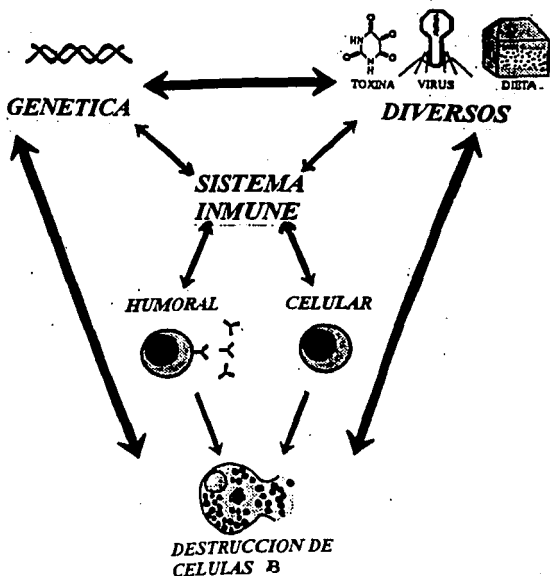
2.11.-FISIOPATOLOGIA DE LA DMID

En la fase inicial de este tipo de diabetes se ha podido identificar en algunos pacientes la presencia de anticuerpos anti insulina (IAA, del inglés Insulin Auto Antibodies),(5,6) o bien de antígenos dirigidos en contra de los islotes del páncreas (ICA del inglés Islete Cell Antibodies) (3). en el suero de otros pacientes se ha determinado anticuerpos en contra de la glutámica descarboxilasa pancreática o en contra de una antígeno presente en las células β de los islotes de Langerhans que se conoce como proteína 64 K. Este último antígeno se considera idéntico a la enzima descarboxilasa glutámica (GAD) que se encuentra presente en el cerebro de los mamíferos y en algunos de sus tejidos periféricos entre los que se encuentra el páncreas (25).

Desde el punto de vista epidemiológico la acción de ciertos agentes ambientales sobre un individuo genéticamente susceptible resulta en la aparición de insulitis y en la modificación antigénica de las células β de los islotes de Langerhans y que reduce la reserva de insulina (Fig.2). Los síntomas clínicos de diabetes aparecen cuando la producción de insulina es insuficiente para mantener el papel homeostático en el organismo. Cuando las células β se pierden por completo debido a la destrucción del páncreas el comportamiento de la DMID se hace más inestable.

La etapa preclínica, que ocurre desde el inicio de la insulitis hasta la aparición de los primeros síntomas de diabetes, suele durar varios años. La destrucción autoinmune de los islotes de Langerhans no es siempre uniforme y progresiva sino que puede evolucionar con periodos de actividad y de remisión temporal (31,36)

Fig. 2 Interacción entre las dos partes del sistema inmune que intervienen en la génesis de la diabetes mellitus tipo I y que tienen como consecuencia la destrucción de las células β del páncreas.



Se ha podido observar en modelos animales y en humanos que presentan DM1D que el sistema inmune es activado por una predisposición genética o por factores ambientales (tóxicos, virus, dieta) dando como resultado la destrucción de las células β del páncreas.

2.12-DESCARBOXILASA GLUTAMICA (GAD)

La descarboxilasa glutámica (GAD) es la enzima responsable de la síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA) (24). Dicha enzima no parece ser una entidad molecular homogénea habiéndose descrito formas moleculares de la enzima que difieren en peso molecular (13) y/o polaridad. Se considera que existen al menos dos formas de la GAD. Ambas tendrían un peso molecular de alrededor de 120,000 daltones y estarían constituidas para algunos por dos polipéptidos iguales con peso moleculares de 59 000 y 67 000 daltones. (18).

La enzima cerebral ha sido purificada y sus propiedades se han estudiado con gran detalle: La GAD tiene un pH óptimo de aproximadamente 6.5 y requiere de fosfato de piridoxal como cofactor. La enzima purificada es inhibida por análogos estructurales del glutamato, agentes que atrapan grupos carbonilos reativos de grupos sulfhidrilo, y aniones como el cloruro. (11,13,18)

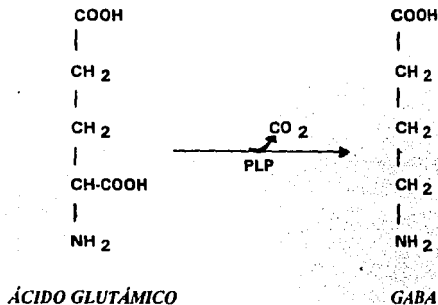
Recientemente, se ha descrito que los dos polipéptidos de GAD encontrados y secuenciados por expresión génica tienen una homología del 60 al 70 % tanto en rata, ratón y humanos y que contienen 593 y 585 aminoácidos con peso de 66.600 y 65.200 por lo que al homodímero constituido por 2 monómeros de 66.600 se le conoce como GAD 67 y al formado por el polipéptido de 65.200 se le distingue como GAD 65.(27,43)

El gene con la información para la síntesis de GAD 67 ha sido localizado en el cromosoma 2 mientras que el correspondiente a la GAD 65 se le ha encontrado en el cromosoma 10.(5,32)

2.13.-METABOLISMO DEL GABA Y SU REGULACION

Como ya se mencionó la enzima responsable de la síntesis del GABA es la GAD. A diferencia de otras vías metabólicas que son multienzimáticas, esta enzima cataliza el único paso, para la síntesis del GABA a partir del glutamato y en consecuencia es el paso limitante de la vía biosintética del GABA, la reacción catalizada por la GAD es la descarboxilación del carboxilo y del ácido glutámico, dando como productos directamente el GABA y al CO_2 (Fig. 3). Esta reacción como todas las de descarboxilación requieren de la participación del fosfato de piridoxal (PALP) (37,49,50)

FIG.3 BIOSINTESIS DEL GABA

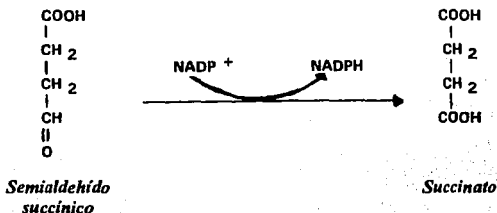


La reacción catalizada por la GAD es la descarboxilación del carboxilo y del ácido glutámico, dando como productos al GABA y CO_2

La degradación metabólica del GABA se lleva a cabo mediante la actividad de la transaminasa del GABA (GABA-T) (24). Esta enzima, que también requiere de fosfato de piridoxal como coenzima, cataliza la transferencia del grupo amino del GABA al ácido α cetoglutarico, dando como productos al semialdehído succínico y al ácido glutámico, el semialdehído succínico, en el que se conserva el esqueleto hidrocarbonado del GABA, es posteriormente oxidado a ácido succínico por la acción de la deshidrogenasa del semialdehído succínico, enzima que requiere de NADP como coenzima. (3,12,27) Fig. 4

FIG.4

OXIDACIÓN DEL SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO CATALIZADA POR LA DESHIDROGENASA DEL SEMIALDEHÍDO SUCCÍNICO.



Paso final por el cual es convertido el semialdehído succínico en succinato por medio del NADP como coenzima.

Desde el punto de vista de la regulación de la GAD el fosfato de piridoxal juega un papel fundamental pues no solamente la enzima es activada notablemente cuando se agrega esta coenzima al medio de incubación "in vitro", sino que además existen numerosas evidencias que la actividad de la GAD depende del fosfato de piridoxal también "in vivo". (8,10,24)

2.14-DISTRIBUCION DE LA GAD EN EL HOMBRE.

Mediante anticuerpos preparados en contra de la GAD ha sido posible localizar por métodos inmunohistoquímicos algunas de las vías GABA-érgicas en el Sistema Nervioso Central (SNC). Dichos estudios han demostrado que las neuronas GABA-érgicas se encuentran distribuidas profusamente dentro del SNC, pudiendo asegurarse que no existe región de este sistema que no posea inervación GABA-érgica (13,23,48,49).

Intracelularmente la GAD está concentrada en la porción soluble de las terminales sinápticas (sinaptoplasma) (22).

Recientemente se ha puesto de manifiesto la existencia de GABA y GAD en órganos periféricos (34), Tabla 2

TABLA 2.

CONCENTRACIÓN DE GABA EN ALGUNOS ORGANOS DE LA RATA	
	$\mu M / Kg$
CEREBRO	2.310 \pm 134
PANCREAS	152 \pm 5
RIÑÓN	77 \pm 14
OVARIOS	71 \pm 55 (Proteínas)
TESTICULOS	43 \pm 16
TIROIDES	27 \pm 4
GD. SALIVARIAS	17 \pm 3

Datos tomados de Okada et al. (34). Las concentraciones de GABA estan exprezadas en μ Moles / Kg de tejidos +/- error estandar del promedio

Así Okada y colegas descubrieron la existencia de GABA en el riñón, hígado, corazón, páncreas y glándulas adrenales (34) (Tabla 2), dichos resultados han sido confirmados por Christien y colegas (12). De la misma manera Erdo ha demostrado la existencia de grandes concentraciones de GABA y GAD en los órganos reproductores femeninos, (1,5)

2.15.-GAD Y DIABETES

Como se mencionó anteriormente la DMID se caracteriza por la presencia de auto-anticuerpos en contra de las células β de los islotes pancreáticos entre los que destacan los anticuerpos producidos en contra de un antígeno de PM 64 000 . La riqueza de la GAD de los islotes pancreáticos (48,49) junto con la observación de que en la rara enfermedad neurológica denominada síndrome del hombre rígido (Stiff-man) coexiste la DMID con la presencia de anticuerpos en contra de la GAD hicieron sospechar a algunos investigadores que el antígeno de PM 64 000 pudiera corresponder a la GAD, que como ya se mencionó está constituida por subunidades con PM cercano a los 64 000. Así en 1990 Baekkeskov y colaboradores presentaron evidencias experimentales inequívocas que identificaban a la GAD con el auto-antígeno 64 000. En sus estudios demostraron que tanto los anticuerpos dirigidos en contra de la GAD de cerebro como los sueros de pacientes del síndrome del hombre rígido eran capaces de inmunoprecipitar al anticuerpo 64K. Más aún en una serie de experimentos inmunohistoquímicos, estos investigadores pudieron poner en evidencia estructuras anatómicas GABA-érgicas mediante el uso de sueros provenientes de pacientes con DMID (5).

A partir de estos estudios, numerosas investigaciones se han llevado a cabo para estudiar las características bioquímicas de la GAD pancreática. De esta manera mediante técnicas de biología molecular ha sido posible poner de manifiesto la existencia de 2 isoformas de GAD pancreática que corresponderían a las formas de GAD cerebrales denominadas GAD 65 y 67 con pesos moleculares correspondientes a 65 200 y 66 000 respectivamente y como en el caso del cerebro son codificadas por dos genes diferentes que se localizan en cromosomas distintos (GAD 65 cromosoma 10, GAD 67 cromosoma 2)(27,43). Por lo que toca a la comparación de la secuencia de las enzimas pancreáticas y cerebrales se ha demostrado una homología superior del 95 % para las formas que corresponden en peso molecular y como ocurre en el cerebro exista una homología de 65% entre la GAD 65 y la GAD 67 de los islotes.

Los estudios de Christgau y colaboradores han señalado que la GAD 67 es hidrofílica y que se encuentra localizada en el citoplasma en tanto que la -GAD 65 es sintetizada como una proteína hidrofílica que se hidroliza como consecuencia de una palmitolación postraduccional y que se una con posterioridad a los fosfolípidos de diversas estructuras membranales. Es posible entonces que los anticuerpos 64 K estén dirigidos en contra de esta última isoforma de la GAD pancreática.(812,15)

3.-OBJETIVOS

Estandarizar una técnica por la cual se puedan detectar y cuantificar auto-anticuerpos en contra de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en el suero de pacientes diabéticos insulino dependientes y que sea susceptible de ser integrada en un laboratorio de análisis clínicos.

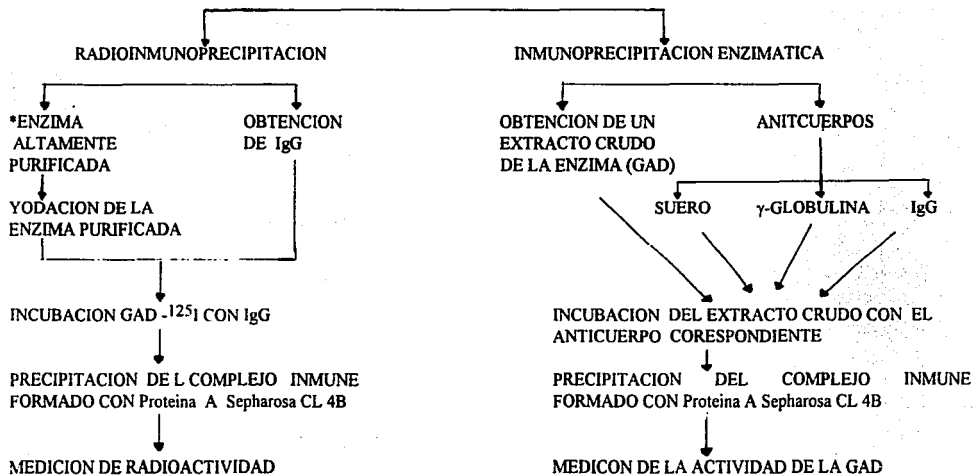
Determinar con que frecuencia se presentan auto-anticuerpos en contra de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en pacientes diabéticos insulino dependientes del Hospital 20 de Noviembre ISSSTE y de que manera se distribuyen de acuerdo a su edad, sexo y tiempo de evolución de la enfermedad.

4.-HIPOTESIS

Si la presencia de anticuerpos anti-GAD es un factor etiológico en la DMID en los sujetos estudiados (sano, diabéticos insulino dependiente, diabéticos no insulino dependiente y diabetes secundaria) la presencia de título elevados de estos anticuerpos se observará exclusivamente en las preparaciones de anticuerpos provenientes de paciente con DMID. Se puede suponer entonces que un incremento en el título de los anticuerpos anti-GAD llevado a cabo mediante la obtención γ -globulinas e IgG favorecerá su detección al incrementar la especificidad y sensibilidad de los procedimientos utilizados.

5.-DIAGRAMA DE FLUJO

DETERMINACION DE ANTICUEROS ANTI-GAD



6.-MATERIAL Y METODOS

6.1.-MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.a FUENTE DE ANTICUERPOS ANTI-GAD

Los anticuerpos anti-GAD utilizados en este estudio fueron obtenidos de 32 pacientes diabéticos insulino dependiente cuyas edades fluctuaban de 13 a 49 años y con un período de enfermedad que osciló entre 1 mes y 42 años. Los pacientes fueron sangrados por venopunción obteniéndose el suero después de la coagulación y centrifugación de la sangre extraída.

Con propósitos de comparación se utilizaron 3 sueros de pacientes diabéticos no insulino dependiente, 17 sueros de sujetos normales y un suero de un paciente con diabetes secundaria debido a una pancreotomía total

Los anticuerpos fueron ensayados en los sueros de estos pacientes así como en algunas preparaciones de γ -globulinas y de IgG obtenidas de los mismos sueros.

6.1.a.I.-OBTENCIÓN DE γ -GLOBULINAS

La fracción de γ -globulinas de algunos sueros fue obtenida por precipitación con sulfato de amonio a una saturación del 40 %. Para dicho efecto a 2 ml de suero se le añadió gota a gota una solución saturada de sulfato de amonio bajo agitación en frío hasta alcanzar la saturación indicada. Durante el procedimiento se tuvo cuidado de mantener un pH de 7.0 añadiendo hidróxido de amonio 1 M (pH 7.0) en los casos que fue necesario.

Después de la precipitación, la fracción de γ -globulina fue separada de los componentes solubles del suero por centrifugación en frío a 13 000 r.p.m. Los

precipitados obtenidos conteniendo las γ -globulinas fueron dializados y resuspendidos con solución amortiguadora de fosfatos 5 mM, pH 7.0. (46)

6.1.a.II.- OBTENCIÓN DE IgG.

Las IgG's fueron obtenidas por el método propuesto por Stanworth et al (46); método que consiste en la absorción de los componentes del suero con excepción de la IgG a esferas de DEAE celulosa equilibrada en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM, pH 6.5.

Para tal objeto los sueros fueron dializados con solución amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 6.5 durante toda la noche con varios cambios de solución amortiguadora; una vez dializados los sueros se pasaron a tubos conteniendo DEAE celulosa (250 mg/ml / pH 6.5), y la mezcla fue agitada recíprocamente por 1 hr a temperatura ambiente. La DEAE celulosa fue eliminada por centrifugación a 5 000 r.p.m. por 15 min./ 4 °C, y los sobrenadantes de esta centrifugación conteniendo las IgG fueron recentrifugados bajo las mismas condiciones para eliminar posibles restos de DEAE celulosa.

En algunos otros casos las IgG's fueron obtenidas de la fracción de γ - globulinas de manera análoga para la descrita para los sueros pero utilizando 250 mg. de DEAE celulosa por ml de suero original.(46)

6.1.b.- PREPARACIÓN ENZIMÁTICA DE GAD

La GAD utilizada como antígeno para la detección de los anticuerpos anti-GAD consistió en la mayoría de los casos de un extracto crudo de cerebro de ratón. Sin embargo para la radioinmunoprecipitación la GAD utilizada provino de una preparación enzimática altamente purificada que fue posteriormente yodada con I^{125} .

6.1.b.I.-OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE GAD.

La preparación del extracto crudo de GAD fue realizado utilizando lotes de 5 cerebros de ratón. Los ratones utilizados fueron de la cepa CD-1 con una edad de 2-3 meses y de sexo masculino fueron sacrificados por dislocación de las vértebras cervicales. Sus cerebros fueron rápidamente extraídos y homogenizados en frío en 5 volúmenes de solución amortiguadora de fosfato de potasio 25 mM pH 7.0 conteniendo fosfato de piridoxal (PALP) 1 mM, y bromuro de 2-aminoetil isothiuronium (AET) 0.05 mM. Los homogenizados fueron centrifugados a 4 °C a 100.000 g por 30 min. en una ultracentrífuga Beckman XL-90 y el sobrenadante obtenido tras ser alícuotado en fracciones de 160 μ l fue guardado en nitrógeno líquido hasta su utilización.(37)

6.1.b.II.- PURIFICACIÓN DE LA GAD DE CEREBRO DE RATÓN

La purificación de la GAD se llevo a cabo a partir de 300 cerebros de ratón de cepa CD-1, con una edad de 2-3 meses y de sexo masculino de acuerdo al método diseñado por Pérez de la Mora y Méndez Franco J.(1995). (40). Para ello los cerebros fueron homogenizados en 5 volúmenes de agua conteniendo PALP (0.2mM), AET(1 mM), fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF 0.1mM), y ácido etilendiamino tetracético (EDTA 2.5 mM). El homogenizado fue fraccionado posteriormente por precipitación ácida, aplicación de calor y precipitación salina. La precipitación ácida se llevo a cabo por la adición gota a gota de ácido acético glacial al 7% hasta llegar a un pH de 5.4. La mezcla obtenida fue calentada en un baño María colocado a 48 °C por 5 min. y tras de ajustar el pH a 7.0 por la adición de 1/20 vol. de solución amortiguadora de fosfatos 1 M pH 7.0 más el volumen necesario de K_2PO_4 1M, para lograr el pH deseado, fue centrifugada a

20.000 g por 20 min. Al sobrenadante obtenido se le adicionó sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una saturación del 40 %; la mezcla fue centrifugada a 100.000 g por 20 min. y el pellet fue resuspendido en un buffer de fosfato de potasio 20 mM, pH 7.0 conteniendo AET 1 mM, y PALP 0.2 mM (solución amortiguadora estándar). Con el objeto de eliminar cualquier material no resuspendido la preparación de GAD fue recentrifugada nuevamente bajo las mismas condiciones. Con excepción de el paso en el cual se utilizó calor todos los procedimientos utilizados en la purificación fueron llevados a cabo a 4°C .

CROMATOGRAFIA EN ULTROGEL AcA-34

32.5 ml de la preparación anterior fueron cromatografiados en una columna de ultrogel AcA-34 (5.0 x 78 cm.) equilibrada en solución amortiguadora estándar. La cromatografía se desarrolló con la misma solución amortiguadora a una velocidad de 85 ml / hr. Se recolectaron fracciones de 11.5 ml. Durante todo este procedimiento cromatográfico así como en los que siguen se monitoreó el afluente de la columna a 280 nm mediante un detector de ultravioleta (Uvicord-LKB). La actividad de la GAD (ver métodos analíticos) fue determinada en las fracciones colectadas y aquellas que contenían la mayor actividad de la enzima fueron reunidas y utilizadas para la siguiente cromatografía. La preparación obtenida mediante esta cromatografía (93 ml) se denominó U-II, se separa 1 ml para la determinación de proteína y de la actividad de la GAD quedando 92 ml que es inmediatamente procesada en la siguiente columna.

CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

Los 92 ml de la preparación anterior (U-II) fueron cromatografiados en una columna de DEAE-CELULOSA (2.5 x 8.2 cm.), equilibrada en solución amortiguadora estándar. La GAD fue cargada a una velocidad de 50 ml / hr, recogándose fracciones de 11.4 ml. La columna fue lavada con 142 ml de un solución amortiguadora de fosfatos 75 mM estándar a 30 ml. hr y eluida a la misma velocidad pero utilizando un solución amortiguadora de fosfatos 150 mM estándar. La recolección de las fracciones se realizó como en los casos anteriores pero obteniendo un volumen de 5.6 ml. La preparación DEAE fue integrada con las primeras cuatro fracciones de la elección en base a su elevada actividad de GAD.

CROMATOGRAFIA DE INTERACCIÓN HIDROFOBICA EN UNA COLUMNA DE FENIL SEFAROSA.

22 ml de la preparación de DEAE fueron introducidos a una columna de fenil-sefarosa (3.5 x 6.9 cm.) equilibrada en solución amortiguadora de fosfatos 150 mM estándar. La cromatografía fue realizada a una velocidad de 35 ml /hr. La columna fue lavada con el mismo solución amortiguadora para eliminar a todas las proteínas no absorbidas y eluida con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM estandar conteniendo 25 % de glicerol, colectándose fracciones de 5.7 ml. Las fracciones fueron seleccionadas en base a su contenido de GAD fueron reunidas en una preparación denominada PS-I la cual fue procesada posteriormente mediante una cromatografía de adsorción en HA- Ultrojel.(40)

CROMATOGRAFIA EN HA-ULTROGEL

Previo a esta cromatografía, a la preparación PS-I se le disminuyó la concentración de fosfatos y de glicerol a 10 mM y a 1.66% respectivamente mediante dilución y concentración en celdas Amicón provistas de una membrana P.M. 30. El volumen final de la preparación PS-I concentrada fue 2.2 ml.

La cromatografía en HA-Ultrojel se realizó utilizando una columna de 1.3 x 5.2 cm. equilibrada en solución amortiguadora estándar 10 mM. La cromatografía fue realizada a 35 ml / hr. Recogiéndose fracciones de 2.6 ml. El cargado se llevo a cabo con 2.0 ml de la preparación PS-I concentrada, el lavado se realizó con solución amortiguadora de fosfatos 30 mM estándar, y la elución fue realizada con solución amortiguadora fosfatos 70 mM estándar.

La GAD eluida fue concentrada y diluida sucesivamente por ultra filtración (ver arriba) hasta conseguir una disminución de la concentración de fosfatos a 10 mM y un volumen de 2.1 ml. La preparación final de GAD fue alicuotada en volúmenes de 200 µl que se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el día de su yodación (40)

6.1.b.III.-YODACION DE LA GAD.

0.84 μg . de GAD fueron yodados con NaI^{125} utilizando esferas de Yodo-BEADS (PIERCE) que contienen un agente oxidante que permite la yodación suave de las tirosinas de péptidos o proteínas. La yodación se llevo a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante: 3 esferas de Yodo BEADS fueron lavadas en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0 y cuidadosamente secadas con papel Whatman No. 52; las esferas se añadieron a la solución de ^{125}I (2 μCi) dejándolas a temperatura ambiente por 5 min. La yodación se inició por la adición de la GAD purificada y terminó 15 min. después por la eliminación de las esferas de Yodo BEADS.

Las proteínas yodadas fueron separadas del ^{125}I libre utilizando minicolumnas de Sepharosa G25 de la manera indicada por Tuszynski.(52). Las minicolumnas fueron preparadas en tubos Ependorff de 1.5 ml de volumen perforados en su fondo. El orificio de salida fue tapado con fibra de vidrio y, las microcolumnas fueron llenadas con Sepharosa G-50 (1.3 ml) en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.0 conteniendo 0.37 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1 mM MgCl. Las minicolumnas fueron introducidas a tubos de plástico desechables y centrifugadas a 200 g por 1 min. para presecarlas. A ellas se añadió 200 μl de la mezcla de reacción y se repitió la centrifugación bajo las condiciones anteriores. La GAD yodada excluida de esta manera de la columna fue recolectada y almacenada en pequeñas alícuotas en nitrógeno líquido hasta su uso.

ESTUDIO ELECTROFORETICO DE LA GAD PURIFICADA

La preparación de GAD purificada fue introducida en dos carriles contiguos de un gel discontinuo de poliacrilamida que contenía una concentración de acrilamida de 4.08 % en el gel concentrador y de 12.5 % en el gel resolvector. El gel fue hecho y corrido bajo condiciones no desnaturalizantes en una unidad para electroforesis vertical LKB 2001 bajo las condiciones descritas en el manual del fabricante (15 $^{\circ}\text{C}$, 25 mA para el gel concentrador y 40 mA para el gel resolvector).

Al final de la electroforesis los dos carriles que contenían a la GAD fueron aislados del gel. El primero de ellos fue teñido con azul de Coomassie 100 mg/ml en ácido acético al 10 % y etanol. Y el segundo carril fue utilizado para la medición de la actividad de la GAD. Para este propósito el gel fue rebanado cada 0.5 cm. en dirección perpendicular al eje del corrimiento y, la actividad de la GAD se midió de manera análoga a la señalada en procedimientos analíticos pero sumergiendo las rebanadas del gel en 250 μ l de mezcla de reacción.

6.2.-MÉTODOS UTILIZADOS

6.2.a.- DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GAD Y SU CUANTIFICACION.

6.2.a.1.- FUNDAMENTO.

El método utilizado para la detección y cuantificación de los anticuerpos anti-GAD utiliza la reacción antígeno-anticuerpo entre los anticuerpos anti-GAD de los pacientes y de alguna de las preparaciones enzimáticas de GAD obtenida del cerebro de ratón utilizada como antígenos. Los complejos antígeno-anticuerpo formados a lo largo de varias horas de incubación a 4°C son removidos de la solución con proteína A inmovilizada a micro esferas de Sepharosa CL-4B, El proceso de remoción es facilitado por una ligera centrifugación que permite el empaquetamiento en forma de precipitados de los complejos antígeno-anticuerpo formados

Así en presencia de un ligero exceso de la GAD sobre los supuestos anticuerpos anti-GAD, la magnitud de la precipitabilidad de dicha enzima está en función directa del título de los anticuerpos presentes en el material biológico de los pacientes y por consiguiente el título de anticuerpos anti-GAD puede cuantificarse midiendo la actividad de la GAD precipitada o evaluando la cantidad de ^{125}I unida a la GAD para aquellos casos en los que se utilizó GAD-(^{125}I) como fuente de antígeno.

6.2.a.II.-INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD.

En estos experimentos 110 μ l de un extracto crudo de GAD obtenido como se indica en métodos y diluido 1:40 fue depositado en tubos Eppendorf de 1.5 ml e incubados durante toda la noche a 4 °C con 25 μ l de alguna de las preparaciones de anticuerpos utilizados. Al final de este proceso de incubación se añadió Proteína A Sepharosa CL 4B (50 μ l de una solución al 50 %) y se continuó la incubación por 2 hr a 4 °C. Los tubos fueron centrifugados en una microfuga Beckman E. El sobrenadante fue cuidadosamente aspirado y depositado en otro tubo. Los precipitados fueron lavados 4 veces con 250 μ l de PBS (NaCl 75 mM KH₂PO₄ 20 mM, PALP 1 mM, AET 0.5 mM, pH 7.0) y finalmente resuspendidos en 323 μ l de solución amortiguadora de fosfatos 25 mM (PALP 1 mM, AET 0.5 mM, pH 7.0)

En virtud de que la actividad de la GAD no se afecta ostensiblemente tras una reacción con los anticuerpos anti-GAD la actividad de la GAD fue medida tanto en los sobrenadantes obtenidos como en los precipitados resuspendidos, utilizando 62 μ l de cada preparación para cada medición.

Tras de corregir por la diferencia de volúmenes entre sobrenadante y precipitado, se considerada como el 100 % de la actividad enzimática utilizada a la suma de la GAD presente en el sobrenadante mas la precipitada. El título de los anticuerpos anti-GAD de la preparación a evaluar se expresa como unidades (U) de GAD precipitadas, donde 1U= 1 μ Mol de GABA producido bajo las condiciones en la relación descrita en el ensayo de la GAD.

6.2.a.III.-INNMUNOPRECIPITACION DE GAD-(¹²⁵I)

En estos experimentos 50 µl de la GAD-(¹²⁵I) (diluida 1:200; 144 200 c.p.m) fueron depositadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml e incubadas durante toda la noche a 4°C con 50 µl de la preparación de IgG. Posteriormente a la mezcla de reacción conteniendo a los complejos inmunes formados se les añadió 50 µl de Proteína A Sepharosa CL 4B al 50 % y se incubaron durante 2 hr mas a 4°C. Los tubos fueron centrifugados como se describió anteriormente y los precipitados de Proteína A Sepharosa CL4B conteniendo los complejos inmunes fueron lavados 4 veces con 1 ml de PBS (NaCl 150mM, KH₂PO₄ 50 mM, PALP 1 mM,) y finalmente resuspendidos en 1 ml de PBS. La radioactividad de la GAD precipitada fue determinada en un contador BECKMAN GAMA 55 000. Para cada determinación el valor de un "blanco" fue obtenido y en el cual los anticuerpos anti-GAD fueron sustituidos por el mismo volumen de PBS. La cuantificación de los anticuerpos anti-GAD se realizó evaluando la cantidad de radioactividad precipitada en los precipitados después de restarle la radioactividad del blanco.

6.2.b.-PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

6.2.b.I.- MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD.

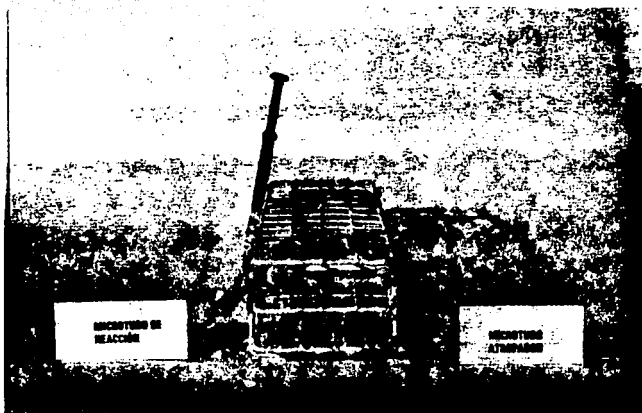
La actividad de la GAD fue medida tanto en los sobrenadantes como en los precipitados evaluando la cantidad de ¹⁴CO₂ desprendida del ácido DL-(1-¹⁴C) glutámico por el método radiométrico de Pérez de la Mora y colaboradores. (37) utilizando un aditamento similar al descrito por Albers y Brady consistente en 2 microtubos de 2.5cm de altura y un diámetro exterior de 6.0 mm. conectados entre si mediante una manguera de látex de 12.0 cm. Fig. 5. Al microtubo de reacción se pipetea 8 µl de una mezcla de reacción que contiene 310 µl de ácido DL-glutámico frío (31 mg/ml), 250 µl de ácido DL glutámico (1-¹⁴C), 440 µl de solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7.0 y 1000 µl PALP 1.0 mM. Al microtubo atrapador se le añadieron 50 µl de hidróxido de benzetonio 1 M (Sigma) y se ligó un extremo de la manguera de látex. La reacción se inició por la adición de 62 µl de sobrenadante o de precipitado resuspendido al mismo tubo de reacción. El microtubo de reacción es inmediatamente conectado al otro extremo de la manguera de látex y junto con el tubo atrapador es introducido a un baño María con

agitación ajustado a 37 °C. La reacción se interrumpió a los 20 min. ó a las 2 hr de incubación por la inyección de 50 µl de H₂SO₄ 3.8 N al tubo de reacción a través de la manguera de látex según que se determinaron el contenido de la GAD en la obtenida durante su purificación o la obtenida inmunoprecipitada por los anticuerpos anti-GAD resuspendidos.. Los dispositivos fueron retirados del baño María y colocados en posición extendida en un horno ajustado a 40 °C durante 2 hr, para facilitar la captura del ¹⁴CO₂ producido en la reacción por el hidróxido de benzetonio. Al final el microtubo atrapador es retirado e introducido en un vial que contiene 8 ml de un mezcla de centelleo y el hidróxido de benzetonio es extraído del microtubo con la ayuda de una varilla de vidrio que a manera de émbolo se introduce y se retira del microtubo atrapador. La radioactividad presente en cada uno de los viales es finalmente contada en un contador Bekman LS 600

6.2.b.II.- MEDICIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas fueron determinadas de acuerdo al método de Bradford. (7), utilizando albumina bovina para la curva de calibración

Fig. 5
DISPOSITIVOS PARA LA MEDICIÓN DE LA
ACTIVIDAD DE LA GAD.



El dispositivo consiste en un microtubo de reacción al que se añade la mezcla de reacción y un microtubo atrapador que contiene hidróxido de benzotriazol que atrapa al CO_2 radioactivo formado en el curso de la reacción, el tubo de látex permite el paso del CO_2 del tubo de reacción al tubo atrapador y la inyección del ácido sulfúrico es para detener la reacción al momento indicado.

7.-RESULTADOS

CARACTERISTICAS DE LA PREPARACION DE LA GAD USADA

Las preparaciones de GAD usadas como antígeno para la detección de anticuerpos anti-GAD fueron un extracto crudo y una preparación de enzima altamente purificada.(40) El extracto crudo tuvo una actividad específica en la mayor parte de los casos cercana a 5.6 nMol / mg. de proteína . Por lo que toca a la preparación de la GAD purificada, en la Tabla 3 se muestran los resultados de la purificación realizada y se puede observar que la actividad específica de la enzima se incrementó de 3.5 nmoles/min/mg. de proteína en el homogenado a 4, 610 nmoles/min/mg. de proteína después de la cromatografía en HA-Ultrogel. El incremento en actividad específica representa una purificación de 1,317 veces, con un rendimiento que es de tan solo 0.5 % de la actividad inicial. Un estudio electroforético de la GAD en un gel discontinuo de poliacrilamida llevado a cabo bajo condiciones no desnaturalizantes mostró la existencia de una banda gruesa y una tenue en la región del gel en donde se detectó la actividad de la GAD.(Fig. 6)

PERFIL CLÍNICO DE LOS PACIENTES EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO

Como se muestra en la Tabla 4 la presencia de anticuerpos anti-GAD fue estudiada en 36 pacientes de los cuales 32 de ellos tenían un diagnóstico clínico de DMID, 3 el de DMNID, y 1 de Diabetes Secundaria a una pancreatectomía total, y en 17 individuos sanos y sin antecedentes diabéticos que fueron utilizados como controles.

La edad de los pacientes con DMID osciló entre 13 y 49 años con una edad promedio de 29.4 años. El periodo de evolución de la enfermedad fue variable siendo ésta desde solo algunos meses hasta 42 años, y con una duración promedio de 9.2 años. Los pacientes se distribuyeron en forma uniforme en cuanto al sexo: 13 masculinos contra 19 femeninos. La edad de los individuos utilizados como control osciló de 17 a 46 años. con una edad promedio de 29.8 años.

PATRON ELECTROFORETICO DE LA GAD PURIFICAD

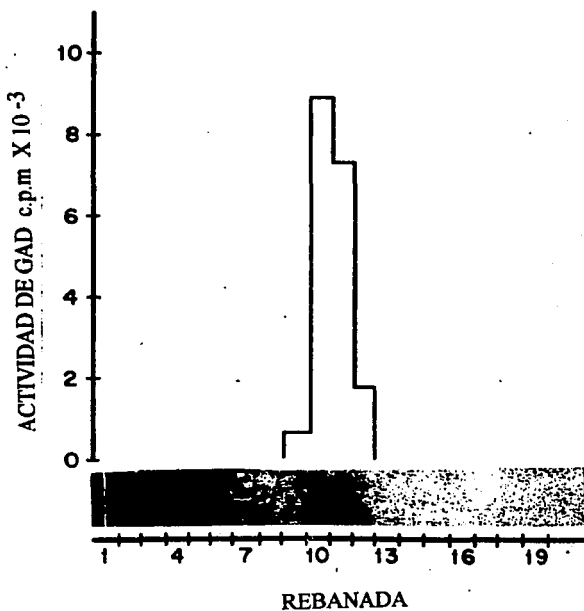


Fig. 6

En la figura se muestra el patrón electroforético de la preparación final de la GAD obtenida después de su purificación (véase tabla 3). sobre el patrón electroforético se indica la actividad de GAD medida en rebanadas del gel obtenidas de un carril paralelo.

Para mas detalles véase material y métodos.

TABLA 3
PURIFICACION DE LA GAD

PREPARACION	GAD (nMoles/min)	% (RENDIMIENTO)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nMoles/min/mg. de proteina)	VECES PURIFICACION
HOMOGENADO	89.460	100	3.5	1.0
EXTRACTO CRUDO	12.360	14	31.2	8.9
ULTROGEL AcA 34	11.213	12	73.2	21
DEAE-CELULOSA	6.615	7.4	125	36
FENIL SEPHAROSA	1.167	1.3	299	85
HA-ULTROGEL	461	0.5	4610	1.317

LA PURIFICACION FUE REALIZADA CON 300 CEREBROS DE RATON SIGUIENDO EL PROTOCOLO QUE SE INDICA EN MATERIAL Y METODOS

TABLA 4
PERFIL CLINICO DE LOS PACIENTES EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO

PACIENTES	EDAD (AÑOS)	EVOLUCION (AÑOS)	SEXO	PACIENTES	EDAD (AÑOS)	EVOLUCION (AÑOS)	SEXO
DMID				DMID			
No.1	45	5	F	No.1	50	10	F
2	48	10	M	2	51	9	F
3	48	42	F	3	68	15	F
4	31	4	F	MEDIA	56.33	11.33	-
5	38	5	F				
6	17	3	M	DIABETES SECUNDARIA			
7	37	8	M	No.1	13	5	F
8	41	3	F				
9	33	5	M	CONTROLES			
10	29	2	F	No.1	27	---	M
11	35	12	M	2	30	---	M
12	40	25	F	3	30	---	M
13	25	12	F	4	28	---	F
14	17	7	M	5	17	---	F
15	33	10	F	6	22	---	F
16	24	2	F	7	46	---	F
17	33	8	M	8	30	---	M
18	21	3	F	9	25	---	F
19	21	6	F	10	27	---	M
20	19	4	F	11	27	---	F
21	20	6	M	12	17	---	F
22	17	5	F	13	29	---	F
23	49	42	M	14	40	---	F
24	21	19	M	15	30	---	F
25	19	<1	M	16	30	---	F
26	22	<1	F	17	25	---	F
27	18	<1	F	18	26	---	M
28	45	<1	F	MEDIA	29.8		
29	24	5	M				
30	13	5	M				
31	25	20	F				
32	29	15	M				
MEDIA	56.33	11.33					

TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD DETECTADOS EN PACIENTES DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS MEDIANTE LA INMUNOPRECIPITACION DE UN EXTRACTO CRUDO DE GAD.

En las Tablas 5-7 se observa el título de anticuerpos anti-GAD en el suero, γ -globulinas e IgG de pacientes diabéticos y sujetos no diabéticos utilizando como fuente de antígeno la preparación cruda de GAD descrita en material y métodos.

1.- SUJETOS CONTROL

Como puede observarse en la Tabla 5 el título de anticuerpos anti-GAD sérico en los sujetos normales fue muy variable pudiéndose detectar estos en únicamente 6 de los 17 pacientes estudiados (35%). El título de los anticuerpos anti-GAD expresado como unidades de GAD precipitadas (U), oscilo entre 220 a 252 en 3 de los 17 pacientes (17.64 %) obteniéndose una media para la población total de 57.2. Cuando los anticuerpos anti-GAD fueron concentrados mediante la purificación de las fracciones de γ -globulinas ó IgG los títulos de los anticuerpos anti-GAD fueron mas elevados permitiendo su detección en la totalidad de las preparaciones estudiadas, bajo estas condiciones la variabilidad en los títulos de anticuerpos anti-GAD encontrados en los sueros fue consideradamente reducida, encontrándose un valor promedio de 238.1 U de GAD precipitada en la fracción de γ -globulinas y de 216.5 U en la preparación de IgG.

TABLA 5

TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD DETECTADO EN SUJETOS NO DIABETICOS MEDIANTE EL USO DE UN EXTRACTO CRUDO DE GAD ^a

PACIENTE	SUERO	FUENTE DE ANTICUERPOS γ-GLOBULINA	IgG
No.1	229	b	b
2	61	292	229
3	0	b	b
4	0	192	240
5	8.8	b	288
6	125	b	285
7	252	360	217
8	77	b	220
9	0	b	43
10	220	b	b
11	0	b	58
12	0	311	292
13	0	b	b
14	0	250	273
15	0	b	b
16	0	b	b
17	0	294	237
media	57.2	238.1	216.5
DS	91.5	57.0	86.6
ERROR ESTANDAR	22.2	23.3	26.1
MEDIA + 2DS	240.2	352.1	389.2

a. El título de anticuerpos anti-GAD se expresa como unidades (U) de GAD precipitada 1U= 1 μMol de GABA producido de acuerdo al ensayo descrito en Métodos.

b. Título de anticuerpos no determinado por suero insuficiente.

2.- PACIENTES CON DMID

En contraste con lo ocurrido en los sujetos control el título de anticuerpos anti-GAD medido en el suero, γ -globulinas e IgG (Tabla 6) de pacientes DMID fue considerablemente mayor que el obtenido en sujetos no diabéticos. Así, en el suero de los pacientes con DMID se detectaron valores mas altos de 252 U (el título mas alto de anticuerpos anti-GAD encontrado en sujetos normales) en 24 de los 32 sueros estudiados (75%), obteniéndose una media de los título de anticuerpos anti-GAD para los sueros diabéticos de 424.5 U que representa un incremento de 741 % con respecto al valor encontrado en sujetos controles. Es interesante señalar que solo en un paciente con 42 años de evolución de la enfermedad obtuvo un título de anticuerpos anti-GAD cercano al valor promedio de los controles.

Una situación similar se observa en los títulos de anticuerpos anti-GAD encontrados en la fracción de γ -globulinas en donde el título promedio fue de 438.2 U en contra de 238.1 U encontrados en los controles, detectándose únicamente dos preparaciones de γ -globulinas con títulos cercanos 360 U (el título mas alto encontrado en sujetos controles) y 9 pacientes (90 %) por arriba de 352.1 U (media mas 2DS para los controles.)

Así mismo los títulos de anticuerpos anti-GAD encontrados en la fracción IgG de los pacientes con DMID fueron considerablemente mayores que los encontrados en los sujetos controles; encontrándose una media de 671.6 U que representa un incremento de 311 % con respecto a la media encontrada para la misma preparación en los sujetos control. Cabe destacar que en este caso ninguno de los títulos de anticuerpos anti-GAD encontrados fue menor a 292 U (el título mas alto encontrado en los sujetos controles) ni de 389.2 U (media mas 2DS del grupo control).

TABLA 6

**TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD DETECTADOS EN PACIENTES
DIABÉTICOS INSULINO DEPENDIENTES POR INMUNOPRECIPITACION
DE UN EXTRACTO CRUDO DE GAD. ^a**

PACIENTE	FUENTE DE ANTICUERPOS		
	SUERO	γ -GLOBULINA	IgG
No.1	182	b	b
2	627	b	b
3	42	b	b
4	235	b	b
5	163	b	b
6	228	b	596
7	249	b	b
8	431	b	b
9	373	b	552
10	283	b	571
11	234	b	b
12	449	b	b
13	449	b	671
14	221	b	b
15	110	b	b
16	453	b	b
17	325	441	743
18	251	b	b
19	332	342	763
20	511	465	770
21	188	362	455
22	455	424	629
23	499	439	673
24	289	b	711
25	878	b	874
26	827	392	b
27	819	447	b
28	760	614	667
29	422	456	372
30	595	b	b
31	1000	b	846
32	704	b	853
MEDIA	424.5	438.2	671.6
DS	243.1	74.1	140.8

a. El título de anticuerpos anti-GAD se expresa como unidades (U) de GAD precipitada 1U = 1 μ Mol de GABA producido de acuerdo al ensayo descrito en métodos

b. Título de anticuerpos no determinado por suero insuficiente.

3.-PACIENTES CON DMNID y DM 2/a.

En contraste a lo sucedido con los paciente DMID, los títulos de anticuerpos anti-GAD séricos encontrados en el suero o en la fracción IgG de los paciente DMNID se encontraron dentro de los valores obtenidos en los sujetos control. Los valores promedios encontrados fueron incluso menores que los obtenidos para el grupo control. Como era de esperarse títulos bajos de anticuerpos anti-GAD fueron detectados en el suero de 1 paciente con diabetes secundaria a una pancreatometomía total. (Tabla 7)

TABLA 7

TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD DETECTADOS EN PACIENTES DIABÉTICOS NO INSULINO DEPENDIENTES (DMNID) Y CON DIABETES SECUNDARIA POR INMUNOPRECIPITACION DE UN EXTRACTO CRUDO DE GAD ^a

PACIENTE	TIPO DE DIABETES	FUENTE DE ANTICUERPOS	
		SUERO	IgG
No. 1	DMNID	0	65
2	DMNID	58	122
3	DMNID	44	153
MEDIA		34	113.3
DS		30.2	44.6
1	DM 2/a ^c	5.31	b

a. El título de anticuerpos anti-GAD se expresa como unidades (U) de GAD precipitada (1U = 1 µMol de GABA producido) de acuerdo al ensayo descrito en métodos

b. Título de anticuerpos no determinado por suero insuficiente.

c. Diabetes secundaria en una pancreatometomía total.

TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD EN PACIENTES DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS EVALUADOS POR INMUNOPRECIPITACION DE UNA PREPARACIÓN PURIFICADA DE GAD-(¹²⁵I)

La yodación de la GAD purificada de la manera descrita en material y métodos nos permitió obtener una preparación de GAD-(¹²⁵I) que contenía 8,708 c.p.m. / ml.

Como se observa en la Tabla 8 la fracción IgG de los sujetos controles fue prácticamente incapaz de inmunoprecipitar a la GAD-(¹²⁵I) usada como antígeno, encontrándose solamente en algunos casos huellas de radioactividad en los precipitado de proteína A Sepharosa CL 4B usada para insolubilizar los posibles complejos inmunes formados. Una situación similar ocurrió con las IgG's de los pacientes DMNID y DM 2/a.

En contraste con lo anterior títulos elevados de anticuerpos anti-GAD fueron detectados en la totalidad de las IgG's de los pacientes con DMID. Mas aún si se comparan los resultados obtenidos en este ensayo con los del ensayo anterior en el cual se utiliza a un extracto crudo de GAD como antígeno se puede observar que existe una clara similitud entre ambos métodos para la determinación de anticuerpos anti-GAD en las IgG de pacientes con DMID. Así dentro de este grupo de pacientes título de anticuerpos anti-GAD más alto y más bajo detectados con ambos métodos corresponden a los mismos pacientes (compárese en la tabla 6 y 8 los títulos de anticuerpos anti-GAD obtenidos en la fracción IgG de los pacientes 29 y 31). Títulos de anticuerpos anti-GAD intermedios fueron detectados en el resto de los pacientes mediante el uso de ambos métodos.

TABLA 8

**TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD DETECTADOS EN LA FRACCIÓN
IgG DE SUJETOS DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS
POR INMUNOPRECIPITACION DE UNA PREPARACION PURIFICADA DE
GAD-(¹²⁵I).^a**

CONTROL	DMID	DMNID	DM 2/a.
15 (2)	308 (6)	0 (1)	0 (1)
0 (4)	303 (9)	0 (2)	
0 (5)	306 (10)	0 (3)	
0 (6)	435 (13)		
0 (7)	485 (17)		
3 (8)	410 (19)		
2 (9)	436 (20)		
14 (11)	214 (21)		
25 (12)	313 (22)		
5 (14)	356 (23)		
0 (17)	340 (24)		
	448 (25)		
	355 (28)		
	115 (29)		
	770 (31)		
	537 (32)		
MEDIA 5.8	383.18	0	0
DS 8.4	146	0	0

a. El título de anticuerpos anti-GAD se expresa en c.p.m. medidas en la GAD (¹²⁵I) inmunoprecipitada de la manera descrita en métodos. Entre paréntesis se señala el No. del paciente estudiado

INCIDENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-GAD

Como puede observarse en la Tabla 9 la inmensa mayoría de los sujetos con títulos de anticuerpos anti-GAD elevados (tomando la media de el grupos controles + 2DS según el caso) correspondió a aquellos pacientes clínicamente diagnosticados como DMID. Así mediante la precipitación de la actividad de extracto crudo de GAD o de la radioactividad incorporada a la GAD-(^{125}I) un 93.75 % y 100 % de los pacientes dentro de este grupo mostraron respectivamente título de anticuerpos anti-GAD significativos. Mientras que en los sujetos control únicamente 5.8 % mostraron títulos elevados de anticuerpos anti-GAD. Ninguno de los pacientes con DMNID y con DM 2/a mostró niveles elevados de estos anticuerpos.

TABLA 9

INCIDENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-GAD DETERMINADOS EN PACIENTES DMID, DMNID, D 2/a Y CONTROL

	CONTROL	DMID	DMNID	DM 2/a
SUERO	1/17 5.88%	24/32 75%	0/3 0%	0/1 0%
γ- GLOBULINAS	0/7 0%	9/10 90%	a	a
IgG	0/11 0%	15/16 93.75%	0/3 0%	0/1 0%

a. No determinados por suero insuficiente

TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI-GAD EN PACIENTES CON DMID DE ACUERDO AL SEXO

Con objeto de estudiar si la presencia de anticuerpos anti-GAD guardaba alguna relación con respecto al sexo de los pacientes los títulos de anticuerpos anti-GAD del grupo de pacientes con DMID fueron segregadas de acuerdo al sexo y promediados. Como se puede ver en la Tabla 10 no existe una preferencia por algún sexo en relación a la cantidad de anticuerpos anti-GAD presente en los pacientes DMID empleados en este estudio

CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LAS PREPARACIONES DE IgG UTILIZADAS

Con el objeto de descartar la posibilidad de que los títulos elevados de anticuerpos anti-GAD encontrados en las preparaciones de IgG obtenidos del suero de los pacientes con DMID se debiera a la presencia de una concentración alta de IgG en ellas el contenido de proteínas en todas las fracciones de IgG utilizadas en este estudio se determinó. Como puede observarse en la Tabla 11 no existe ninguna diferencia significativa en la concentración proteica de las fracciones de IgG correspondiente a cada uno de los grupos estudiados.

TABLA 10**TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD DETECTADOS EN EL SÚERO DE PACIENTES CON DMID DE ACUERDO AL SEXO MEDIANTE LA INMUNOPRECIPITACION DE UN EXTRACTO CRUDO DE GAD ^a**

MASCULINO		FEMENINO	
PACIENTE	TÍTULO DE ANTICUERPO ANTI-GAD	PACIENTE	TÍTULO DE ANTICUERPO ANTI-GAD
No.2	627	No.1	182
6	228	3	42
7	249	4	235
9	373	5	163
11	234	8	431
14	221	10	283
18	251	12	449
22	455	13	449
24	289	15	110
25	878	16	453
26	827	17	325
30	595	19	332
31	1000	20	511
		21	188
		23	499
		27	819
		28	760
		29	422
		32	704
MEDIA	479		387
DS	278		216

a. El título de anticuerpos anti-GAD se expresa como unidades (U) de GAD precipitada 1U = 1 μ Mol de GABA producido de acuerdo al ensayo descrito en los métodos.

TABLA 11

CONCENTRACION DE PROTEÍNAS DE LAS PREPARACIONES DE I₂G UTILIZADAS PERTENECIENTES A PACIENTES DIABÉTICOS Y SUJETOS NORMALES^a

PACIENTE	PROTEINA (mg./dl)
DMID	
No 6	1.5
9	1.7
10	1.4
13	1.4
17	1.6
18	1.5
19	1.0
20	1.6
21	1.3
22	1.4
23	1.4
24	1.9
25	1.7
28	1.8
29	1.9
31	1.5
32	1.4
DMNID	
No.1	1.4
2	1.2
3	1.2
DIABETES 2/a	1.3
NO DIABÉTICOS	
No.2	1.4
4	1.0
5	2.3
6	3.1
7	1.3
8	1.8
9	1.7
11	1.6
12	1.0
14	1.0
17	1.5

a. Las proteínas se determinaron de acuerdo con el método de Bradford (7)

8.-DISCUSION

Como se señaló en la Introducción se considera que en la patogénesis de la DMID la presencia de auto-anticuerpos en contra de componentes de las células β de los islotes pancreáticos juega un papel fundamental. Así, anticuerpos anti- 64K, ICA y AAI han sido detectados selectivamente en el suero de pacientes con DMID. (5)

De los anticuerpos detectados, los anti-64K son los que aparecen primero, incluso años antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente, y son los que mejor se correlacionan con la DMID (1). Por otro lado, estudios recientes han identificado al antígeno 64K como la GAD y han mostrado que desde el punto de vista estructural e inmunológico la GAD pancreática y la cerebral son prácticamente indistinguibles.(11,12,41)

El presente trabajo se pretende estandarizar una metodología simple, sensible y específica que permita la detección de anticuerpos anti-GAD en pacientes con DMID. Para tal fin se utilizó una población del Hospital 20 de Noviembre que comprende sujetos sanos (usados como control), pacientes diabéticos: insulino dependientes, no insulino dependientes y con diabetes 2/a.

ASPECTOS METODOLOGICOS

En virtud de que el antígeno 64K corresponde a la GAD, la metodología utilizada para la detección de los anticuerpos anti-64K, llamados ahora anti-GAD, en el suero, γ -globulinas ó IgG de pacientes diabéticos se basa en la identificación de la GAD en los inmunoprecipitados producidos a consecuencia de la reacción antígeno-anticuerpo entre los anticuerpos anti-GAD y la enzima. Por otro lado aprovechando que la GAD pancreática y la GAD presente en el sistema nervioso son indistinguibles desde el punto de vista inmunológico es posible utilizar a la GAD cerebral como antígeno para la identificación de anticuerpos anti-GAD, pues en este órgano la enzima está sumamente concentrada y es fácil de ser extraída.

En el presente trabajo, la GAD inmunoprecipitada fue identificada utilizando dos enfoques distintos

a) Mediante la medición de su la actividad enzimática, en inmunoprecipitados producidos al reaccionar los anticuerpos anti-GAD con un extracto crudo de la enzima.

b) Mediante la determinación de la radioactividad inmunoprecipitada a consecuencia de la reacción antígeno-anticuerpo entre una preparación purificada de GAD-(¹²⁵I) con los supuestos anticuerpos anti-GAD.

Mediante el uso de ambos enfoques fue posible la detección de anticuerpos anti-GAD en pacientes con DMID y como se mencionó en la sección de Resultados se observó una clara correlación entre ambos métodos pues los títulos de anticuerpos anti-GAD más altos ó más bajos en el grupo de enfermos detectados con cada técnica correspondieron a los mismos pacientes.

La sensibilidad y especificidad de cada método estandarizado fue obtenida mediante la aplicación de las fórmulas:

$$\text{sensibilidad} = \frac{\text{No. de enfermos positivos a la prueba}}{\text{No. de enfermos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{No. de controles negativos a la prueba}}{\text{Total de controles sin la enfermedad}} \times 100$$

Así el enfoque radioactivo resultó más específico (100%) y sensible (100%) que el método en el cual se mide la actividad de la GAD inmunoprecipitada (sensibilidad que varia desde 75% a 94 %, y especificidad que va desde 83.% a 100 % según anticuerpos utilizado). Esto se puede observar comparando las Tablas 5 al 8

La utilización de uno u otro procedimiento para la detección de la GAD inmunoprecipitada por los anticuerpos anti-GAD ofrece ventajas y desventajas. Es claro que la sensibilidad del procedimiento que evalúa la radioactividad precipitada (100%) es superior al que cuantifica la actividad enzimática de la GAD inmunoprecipitada. El procedimiento es sin embargo poco práctico pues requiere de la disponibilidad de una preparación de GAD purificada que es inexistente en el mercado. La purificación de la GAD como puede observarse en la Tabla 3 es una tarea difícil y costosa que debido a su inestabilidad y bajo rendimiento (0.5 %) requiere de un número elevado de cerebros de

ratón. Mas aún, preparaciones de GAD purificadas por arriba de las 800 veces han sido obtenidas únicamente en unos pocos laboratorios adicionales (1,26,15,43). Su yodación posterior es también problemática pues el ^{125}I utilizado tiene una vida media de tan solo 60 días.

En contraste, la evaluación de la actividad enzimática de la GAD inmunoprecipitada aunque ligeramente menos sensible y específica resulta mas fácil, práctica y económica pues utiliza un extracto crudo de cerebro de ratón que puede ser obtenido con facilidad y congelado en nitrógeno líquido en pequeñas alícuotas susceptibles de ser utilizadas en un gran número de ensayos, incluso muchos meses después de su obtención (38).

Como lo demuestra el hecho de que la actividad de la GAD no se afectó cuando un extracto crudo de GAD fue incubado bajo condiciones similares a las empleadas con anticuerpos anti-GAD obtenidas tras la inmunización de conejos con una preparación de GAD purificada de cerebro de ratón. La medición de la actividad de la GAD inmunoprecipitada es posible debido a que la actividad de la enzima no se pierde substancialmente al reaccionar los anticuerpos anti-GAD en contra de ella.(40)

En virtud de que el título de anticuerpos anti-GAD presente en el suero de los pacientes con DMID es relativamente bajo, la detección de la GAD inmunoprecipitada requiere, en ambos enfoques, el uso de una preparación enzimática muy diluida para ser evaluada con sensibilidad en la que la cantidad de GAD inmunoprecipitada constituya un porcentaje sustancial del total de la GAD utilizada en el ensayo.

Para asegurarse de que la reacción antígeno-anticuerpo había llegado a su fin, a los anticuerpos anti-GAD se les permitió reaccionar con la GAD por un periodo mínimo de 18 hrs.a 4 °C, pues resultados de nuestro laboratorio no mostrados en esta tesis señalaron que la inmunoprecipitabilidad de la GAD era máxima a este tiempo. Por otro lado la precipitabilidad de los complejos inmune dependen de la existencia de una "equivalencia" entre el antígeno y el anticuerpo (35) en la metodología utilizada en este trabajo, para eliminar este problema se utilizó a la proteína A, que tiene una gran afinidad por las IgG (28), unida a esferas insolubles de Sepharosa CL 4B como un medio para insolubilizar a todos los posibles complejos inmunes formados. La cantidad de proteína A Sepharosa CL 4B utilizada fue escogida considerando que de acuerdo a la capacidad de unión a las IgG reportada por el productor, la cantidad usada aseguraba un exceso capaz de

precipitar a todas las IgG presentes en la mezcla de reacción. Mas aún, estudios de nuestro laboratorio, utilizando un suero con un alto título de anticuerpos anti-GAD, mostraron que la cantidad de proteína A Sepharosa CL 4B utilizada era la óptima pues ninguna insolubilización adicional de los complejos inmunes se dio mediante el uso de una mayor cantidad de proteína A Sepharosa CL 4B.

Experimentos control señalaron que la actividad máxima de la GAD a la concentración usada se alcanzaba entre 1 y 2 hrs de incubación. Las concentraciones de sustrato, cofactor, así como del pH utilizados fueron los reportados para la medición óptima de la actividad de la GAD en el cerebro (39)

La detección de la GAD- (^{125}I) inmunoprecipitada requiere a su vez de someter los precipitados de Sepharosa CL 4B a un buen número de lavados eliminando a toda la GAD (^{125}I) no unida a los complejos inmunes inmovilizados con la proteína A Sepharosa CL 4B.

PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS

Aunque es posible detectar anticuerpos anti-GAD en el suero de los pacientes con DMID su detección es mas confiable si se utilizan preparaciones mas purificadas y concentradas de anticuerpos tales como la fracción de γ -globulinas ó incluso las IgG's, purificadas ya que al precipitar un mayor porcentaje de la GAD utilizada da lugar a una mayor actividad de GAD o de radioactividad inmunoprecipitada en los precipitados de proteína A Sepharosa CL 4B. El uso de preparaciones purificadas de anticuerpos, al carecer de la mayor parte de los componentes del suero, minimiza la posibilidad de interferir con la medición de la actividad de la GAD ó de precipitar algunas impurezas yodadas de la preparación de GAD- (^{125}I). De hecho como puede observarse en las Figs. 7-9 la posibilidad de tener falsos positivos es mayor cuando los títulos de anti-GAD fueron evaluados utilizando sueros.

TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD EN LOS SUEROS DE PACIENTES DIABÉTICOS Y SUJETOS CONTROL

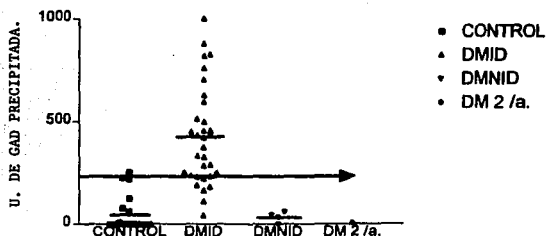


Fig. 7

Los sueros utilizados fueron obtenidos por venopunción tanto de pacientes Diabéticos Insulino Dependiente (DMID), Diabéticos No Insulino Dependientes (DMNID) así como de pacientes no diabéticos (controles) y de un paciente afectado por una Diabetes secundaria a una pancreatoclectomía total. El título de anticuerpos se evaluó en los sueros por la inmunoprecipitación de un extracto crudo de GAD de la manera como se describe en Métodos. El título de anticuerpos se expresa como unidades (U) de GAD precipitada 1 U = 1 μ Mol de GABA producido bajo las condiciones observadas en Métodos. Las líneas dentro de cada grupo de pacientes indican la media del título de anticuerpos anti-GAD correspondientes. La barra horizontal señala el valor correspondiente a la media + 2 DS de los controles y el título de anticuerpos anti-GAD mínimo para considerar a un sujeto como Diabético Insulino Dependiente.

TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD EN LAS γ -GLOBULINAS DE LOS PACIENTES DIAETICOS Y SUJETOS CONTROL

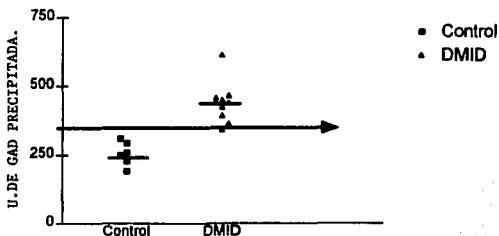


Fig. 8

Las γ -globulinas fueron obtenidas del suero de los pacientes Diabéticos Insulino Dependientes (DMID) así como de los pacientes controles de la manera descrita en Material y Métodos.

El título de anticuerpos se evaluó por inmunoprecipitación de un extracto crudo de GAD de la manera descrita en Métodos. El título de anticuerpos se expresa como unidades (U) de GAD precipitada $1U = 1\mu\text{Mol}$ de GABA producido bajo las condiciones observadas en métodos. La línea dentro de cada grupo de pacientes indican la media del título de anticuerpos anti-GAD correspondiente. La barra horizontal señala el valor correspondiente a la media $+2DS$ de los controles y el título de anticuerpos anti-GAD mínimo para considerar a un sujeto como Diabético Insulino Dependiente.

TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD EN LAS IgG DE PACIENTES DIABÉTICOS Y SUJETOS CONTROL

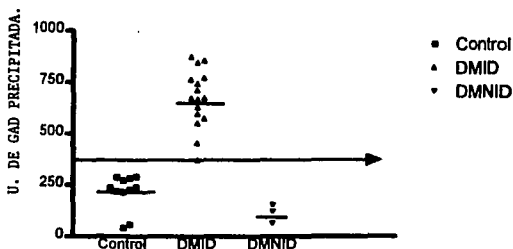


Fig. 9
 las IgG fueron obtenidas de los sueros de los pacientes diabéticos Insulino Dependientes (DMID) no Insulino Dependientes (DMNID) así como de pacientes controles de la manera descrita en Material y Métodos.

El título de anticuerpos se evaluó por inmunoprecipitación de un extracto crudo de GAD de la manera como se describe en Métodos. El título de anticuerpos se expresa como unidades (U) de GAD precipitada 1 U= 1 μ Mol de GABA producido bajo las condiciones observadas en Métodos. La línea dentro de cada grupo de pacientes indican la media del título de anticuerpos anti-GAD correspondientes. La barra horizontal señala el valor correspondiente a la media +2DS de los controles y el título de anticuerpos anti-GAD mínimo para considerar a un sujeto como Diabético insulino Dependiente .

TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI-GAD EN SUJETOS NO DIABÉTICOS

El establecimiento de cualquier procedimiento de laboratorio clínico requiere de una cuidadosa estandarización que permita distinguir entre sujetos normales y sujetos enfermos. Dicha estandarización requiere, en primer lugar, de unidades apropiadas que expresen con claridad los cambios en el parámetro medido y en segundo lugar del establecimiento de valores de anticuerpos anti-GAD que puedan ser considerados como normales.

Por lo que toca al primer punto los títulos de anticuerpos anti-GAD han sido cuantificados en otros trabajos como el porciento de la GAD inmunoprecipitada con respecto a un estándar: un suero con un alto título de anticuerpos anti-GAD ó una mezcla de sueros obtenidos de sujetos control (12,43). En el enfoque que detecta la GAD inmunoprecipitada, los títulos se expresan como unidades (U) de GAD inmunoprecipitada en donde 1 U es definida como 1 μ Mol de GABA producido bajo las condiciones del ensayo. A nuestro juicio está forma de expresar los títulos de anticuerpos anti-GAD resulta mas adecuada que la utilizada por los otros autores pues la forma absoluta la actividad de la GAD inmunoprecipitada permite comparar los títulos de anticuerpos anti-GAD obtenidos con los de otros laboratorios con mayor exactitud, pues los resultados no estan sujetos a la capacidad de inmunoprecipitar dada por un suero en particular o a la de una mezcla de sueros cuyo título puede variar de un laboratorio a otro. Por otro lado, aunque es conveniente determinar en el mismo ensayo el título de anticuerpos de alguno suero control para asegurarse de que el procedimiento se lleva a cabo correctamente su uso no es esencial, en tanto que se haya estandarizado el extracto de GAD y se use siempre la misma cantidad de la enzima

Por lo que toca al segundo punto, dado que tanto en éste como en otros laboratorios se ha encontrado que los sueros de sujetos normales son capaces de inmunoprecipitar a la actividad de la GAD , (42,43) se ha considerado de acuerdo con otros laboratorios que un buen criterio para establecer los títulos normales de anticuerpos anti-GAD, es considerar como pacientes DMID a todo aquel individuo cuyo título de anticuerpos anti-GAD se encuentre por arriba del valor dado por la media del grupo control más 2 DS.

De acuerdo con estos criterios y como se muestra en la Tabla 5 el límite permisible de anticuerpos anti-GAD es de 240.2 en suero, de 352.1 en γ -globulinas y de

389.2 en IgG. La validés de este criterio se muestra en las Fig. 7-9 en donde se muestra gráficamente una clara distinción entre los sujetos normales y los pacientes con DMID

TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD EN SUJETOS DIABÉTICOS

De acuerdo con lo reportado por otros laboratorios títulos elevados de anticuerpos anti-GAD fueron encontrados en el grupo de pacientes con DMID Tablas 5-8. Figs. 7-9

Dentro de éste grupo el porcentaje de pacientes con títulos altos de anticuerpos anti-GAD varió ligeramente dependiendo de la preparación de anticuerpos analizada y del método utilizado. Así mediante el análisis de la actividad de GAD inmunoprecipitada se encontró que un 75% de los sueros y un 90% de las γ -globulinas correspondientes a los pacientes de este grupo contenían títulos de anticuerpos anti-GAD por arriba de la media + 2 DS de los títulos encontrados en los controles. Sin embargo cuando las IgG de estos pacientes fueron analizadas el porcentaje de pacientes con DMID aumentó a 94%. Cuando las IgG's fueron evaluadas cuantificando la GAD-(^{125}I) inmunoprecipitada se detectaron títulos altos de anticuerpos anti-GAD en el 100% de los pacientes de este grupo.

Las diferencias encontradas pueden atribuirse tanto a la sensibilidad del método utilizado como a las preparaciones de anticuerpos anti-GAD empleadas (suero, γ -globulinas e IgG). Es de suponerse que al encontrarse los anticuerpos anti-GAD más concentrados en la preparación de IgG's la sensibilidad y especificidad del método que mide la actividad de la GAD inmunoprecipitada se haya incrementado permitiendo de esta manera detectar con mayor claridad algunos pacientes diabéticos insulino dependientes con títulos de anticuerpos anti-GAD cercanos al título considerado como control. Por otro lado, la virtual ausencia de GAD-(^{125}I) inmunoprecipitada en el grupo control permite detectar sin ambigüedad la presencia de los anticuerpos anti-GAD en pacientes con DMID (Tabla 8).

El porcentaje de sueros, con títulos elevados de anticuerpos anti-GAD pertenecientes a los pacientes con DMID, encontrado en otros estudios fue similar al reportado por nosotros en la misma preparación de anticuerpos, pero menor al obtenido en las de las IgG de nuestros pacientes. Así, el porcentaje de pacientes diabéticos insulino dependientes con anticuerpos anti-GAD varió de un 69 a un 82% (1,15,42)

cuando los anticuerpos anti-GAD fueron ensayados mediante la inmunoprecipitación de la actividad de la GAD y de un 59 a un 82% cuando los sueros fueron analizados por inmunoprecipitación de la GAD- (125 I). La diferencias entre los estudios reportados y los nuestros particularmente en el caso de la detección de los anticuerpos anti-GAD por la inmunoprecipitación de GAD- (125I) como en nuestro propio caso muy probablemente reflejan el tipo de preparación de utilizada para detectar los anticuerpos anti-GAD, pues en todos los casos reportados en la literatura los anticuerpos anti-GAD fueron ensayados directamente en el suero de los pacientes en tanto que en nuestros estudios la serie con mayor porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-GAD correspondió a aquella en la que las IgG's de estos pacientes fueron analizados (Tabla 6)

Dado que en el mundo no se ha encontrado si existe una preferencia por uno o otro sexo para la DMID, en nuestro estudio es importante hacer énfasis en que ni la presencia, ni el título de anticuerpos anti-GAD en pacientes con DMID parece guardar alguna relación con respecto al sexo pues tanto el porciento de pacientes con anticuerpos anti-GAD como el título de estos anticuerpos fueron similares en ambos grupos de pacientes.

Cuando los títulos de anticuerpos se agruparon de acuerdo con el tiempo de evolución de los pacientes, pudo observarse que los título de anticuerpos anti-GAD disminuyen en forma importante en los grupos de pacientes que presentan una evolución de 1-5 años y de 5- 10 años (fig. 10) una tendencia similar se observó en los otros grupos de pacientes, particularmente en aquellos con mas de 30 años de evolución. Desafortunadamente la gran variabilidad y sobre todo el pequeño número de pacientes asignados a los grupos de mas larga evolución nos impide explicar con certeza si los título de anticuerpos anti-GAD disminuyen aún más conforme el padecimiento se torna más viejo. Nuestros resultados sin embargo, están acordes con los de Kawasaki y colaboradores (1994) y - Rowley y colaboradores (1993) (26,43). quien encuentra una franca disminución en los títulos de anticuerpos anti-GAD conforme el tiempo de evolución de la DMID se hacia más larga. La razón de esto, aunque no es conocida, muy probablemente refleja una disminución de la estimulación antigénica consecutiva a una mas prolongada destrucción de los islotes con la consiguiente disminución de la liberación de la GAD pancreática. Desde un punto de vista clínico el hallazgo es importante pues señala que la utilidad diagnostica de la prueba es solo útil en pacientes con DMID de recién evolución.

**TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-GAD
EN PACIENTES CON DMID DE
ACUERDO AL TIEMPO DE
EVOLUCIÓN**

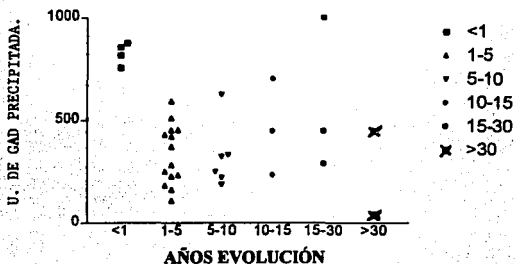


Fig. 10

El título de anticuerpos anti-GAD fue evaluado en el suero de pacientes con DMID por inmunoprecipitación de la actividad de un extracto crudo de GAD de acuerdo a lo descrito en la sección de Métodos. Para más detalles véase Tabla 6

De acuerdo con lo esperado, en este trabajo la búsqueda de anticuerpos anti-GAD tanto en el suero como en las IgG por los dos enfoques metodológicos utilizados fue negativo en la totalidad de los pacientes con DMNID estudiados y en el paciente con diabetes secundaria a una pancreatoclectomía total (Tablas 7-8 Fig. 7,9).La presencia de anticuerpos anti-GAD en uno de 58 pacientes en el estudio de Christie y colaboradores al (12) muy probablemente corresponde a un paciente incorrectamente diagnosticado ó a un error en el análisis de los anticuerpos anti-GAD.

9.-CONONCLUSIONES

La sensibilidad y especificidad de las procedimientos utilizados fueron obtenidos mediante la aplicación de las fórmulas $\text{sensibilidad} = \frac{\text{al No. de enfermos positivos a la prueba}}{\text{los enfermos por 100}}$ y $\text{la especificidad} = \frac{\text{al No. de controles negativos a, la prueba}}{\text{el total de controles sin la enfermedad por 100}}$.

Los valores obtenidos indican que la sensibilidad del procedimiento basada en la inmunoprecipitación de la GAD se incrementa conforme los anticuerpos anti-GAD se concentran pudiéndose detectar títulos elevados de anticuerpos en el 75 % de los sueros, en el 90 % de las γ -globulinas y en el 94 % de las IgG de pacientes DMID.

La sensibilidad de la inmunoprecipitación de la GAD (^{125}I) fue de 100 %. Por lo que toca a la especificidad esta fue del 100 % cuando la actividad de la GAD ó la GAD- (^{125}I) se inmunoprecipitan con IgG de pacientes con DMID y de 94 y 83 % cuando la actividad de la GAD fue inmunoprecipitada con suero y γ -globulinas de estos pacientes respectivamente.

En vista de lo anterior, de los dos métodos descritos para la detección de anticuerpos anti-GAD, el método basado en la inmunoprecipitación de la GAD- (^{125}I) tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, sin embargo los problemas inherentes a la obtención de una preparación de GAD purificada no existente comercialmente y a su yodación posterior limita considerablemente su uso. A pesar de ello, la detección de anticuerpos anti-GAD en preparaciones de IgG por inmunoprecipitación de la actividad de la GAD resulta suficientemente específico sensible y apropiado para el diagnóstico de este tipo de enfermos. Por otro lado su sensibilidad, especificidad y costo lo hacen una prueba ideal, para la detección de anticuerpos anti-GAD en grandes poblaciones de pacientes.

Aunque hubiera sido deseable haber estudiado a una población más grande y diversa, mediante la aplicación de esta última técnica fue posible detectar en forma específica la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-GAD en un 90% de los pacientes con DMID del Hospital 20 de Noviembre. Igualmente se demostró una falta

de correlación entre la presencia de anticuerpos anti-GAD y el sexo de los pacientes, así como una posible caída en el título de los anticuerpos anti-GAD conforme la duración del padecimiento se torna mas larga.

Consideramos que el uso rutinario de este procedimiento en la clínica es invaluable para la identificación de la DMID de difícil o dudosa clasificación. Más aún en virtud del reporte de que los anticuerpos anti-GAD aparecen presentes incluso años antes del diagnóstico clínico de la DMID su oportuna detección a través de estudios epidemiológicos a gran escala mediante la aplicación de esta técnica permitiría el manejo de estos pacientes con medidas profilácticas a base de inmunosupresores que alargarán o suprimieran la aparición clínica del padecimiento.

REFERENCIAS

- 1.-ATKINSON M.A, KAUFMAN D.L. CAMPRELL L, GIBBS K.A. SHAN A.C. BUDF E.M.G.: Response of peripheral blood mononuclear cells to Glutamate Descarboxylase in Insulin Dependent Diabetes: *Lancet* 1992;339:458-59
- 2.-ATKINSON M.A, MACKAREN N.K.; SCHARP D.W, LACY P.E, RILEY W.J: 64.000 Mr. Auto-antibodies as predictors of insulin dependent diabetes; *Lancet* 1990;335:1357-60.
- 3.-AN-CHUAN THAIN. and EISENBARH G.S.: Natural history of IDDM: *Diabetes rev.* 1993(1):1-11
- 4.-ANIMESH A. S, LOPEZ M.T, McDEVITT H.O: Autoimmune diseases the failure of self tolerance: *Diabetes* 1990;248:1380-86
- 5.-BAEKESKOV S, AANSTOOT H.J,CHRISTGAU S, REETZ A, SOLIMENA M.S.: Identification of the 64K autoantigen in Insulin Dependent Diabetes as the GABA synthesizing enzyme glutamic acid descarboxylase: *Nature* 1990;347:151-56
- 5.-BEINBORN M, LEE Y.M, McBRODIE E.W, QUINN S.M.: Causas y patogénesis de la diabetes sacarina; *Diabetes* 1979;28:1030-57
- 7.-BRADFORD M.M.; A rapid an sensitive Method for the quantitation of microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding; *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
- 8.-BOTRE C, BOTRE F, GALLI M; LORENTI G, MAZZEI F, PORCELLI F: Determination of glutamic acid descarboxilase activity and inhibition by an H₂O₂ - sensing glutamic acid oxidase biosensor; *Anal-Biochem* 1992;201(2):227-32
- 9.-BOTTAZZO G.F,CRISTENSE A.F, DONICHA A.: Islet cell antibodies in Diabetes Mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.; *Lancet* 1974:1279-82
- 10.-CAHILL G.F, McDEEVITT H.O; Insulin Dependent Diabetes Mellitus tha initial lesion: *Nengls J.Med.* 1990:153:499-502
- 11.-CHRISTGAU S,AANSTOOT H.J, SCHIERBECK H, BEGLEY K, TULLIN S, HEJNAES K., and BAEKESKOV S: Membrane anchoring of the auto antigen GAD 65 to micro vesicles in pancreatic β - cells by palmitoylation in the NH₂ terminal domain ; *J.Cell Biolgy* 1992;118;2;309-320

- 12.-CHRISTIE M.R, TUN R.Y, LOSIMON S.S, CASSIDY D, BROEN T.J, HOLLANDS J, SHATTUCK M, BOTTAZZO G.F. AND G.LESLIE D: Antibodies to GAD of islet 64k antigen as distinct markers for development of IDDM; Diabetes 1992;41:782-87
- 13.-COOPER J,BLOOM F.E: La bases bioquímicas de neurofarmacología: El manual moderno S.A. de C.V. 1984;200-207
- 14.-CRYER P.E: Regulation of glucose metabolism in man; J.of Internal Medic 1991;229;(2):31-39
- 15.-DEAIZPURA H.J, HARRISON L.C. and CRAM D.S: An ELISA for antibodies to recombinant Glutamic Acid Descarboxylase in IDDM;Diabetes 1992;41:118-87
- 16.-DIAZ J.H.,WAYS J, HAMMONDS P; Lymphocyte T line specific for Glutamic Acid Descarboxylase (GAD) the 64K β -cell antigen of IDDM;Diabetes 1992;41(1):118-21
- 17.-EISENBARH G.S.;Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease;N.Engl J Med. 1986;314:1360-68
- 18.-ERLANDER M.G AND TOBIN A.J; The structural and functional heterogeneity of Glutamic Acid Descarboxylase; Neurochemical rev. 1991;16(3):215-226
- 19.-ESPINAL J. Mechanism of insulin action ;Endocrinology 1992;31:1456-76
- 20.-FLATT P.R; Reflexly regulated insulin secretion ;Nature;1991: 23:25-26
- 21.-GOMES M.B,VIERRA L.M, MARQUES E.P. SARNO E.M. CHACRA A.R: Analysis of various epidemiological parameters in patients with diabetes mellitus type I in the city of Rio De Janeiro Brazil; Amb.rev. Ass.Med.Bras.1990:36(2):91-6
- 22.-GORIN F,BALDWIN B,TAIT R, PATHAK R, SEYAL M,MUGNAINI E. Stiff-man Syndrome: A GABAergic 563IC autoimmune disorder with autoantigenic heterogeneity; Ann Nerol 1990:28:711-714
- 23.-GUYTON A.M; Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso; NEUROCIENCIA BASICA;Panamericana 1987:167-168
- 24.-HAGOPIAN W.A, KARLSEN A.L,PETERSEN J.S; Regulation of Glutamic Acid Descarboxylase diabetes autoantigen expression in highly purified isolated islets from macaca nemestrina; Endocrinology 1993:132(6):2674-81
- 25.-HARRISON L. C, HOMEYMAN M.C. DEAIZUPURA H.J,SCHMIDL R.S, COLMAN P.G, TAIT B.D, CRAM D.S: Inverse relation between humoral and

cellular immunity to Glutamic Acid Decarboxylase in subjects at risk of insulin depended Diabetes: *Lancet* 1993;341(8857):1365-9

- 26.- KAWASAKI E, TAKILO H, YANO M, UOTANI S, MATSUMOTO K; Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase in patients with IDDM and autoimmune thyroid disease; *Diabetes*, 1994;43:80-86
- 27.- KASANICHI M, A, PHD-PAUL F, PILCH W; Regulation of glucose transporter function; *Diabetes Care* 1990;13:219-27
- 28.- LANGONE J.J; Use of labeled protein A in quantitative immunochemical analysis of antigens and antibodies; *J. Immunological Methods*; 1982:51:3-22
- 29.- LERMAK A, BÄRMEIER H, DUBE S, HAGOPIAN W, KARLSEN A.E, MARKHOST, EILSON C: Molecular analysis of the pathogenesis of β -Cell destruction in Insulin Dependent Diabetes Mellitus: *West J. Med.* 1990:153:499-502
- 30.- MACCUISH A.C, BARNES E.W, IRVINE W.J; Antibodies to pancreatic islet cells Insulin Dependent Diabetics with coexistent autoimmune disease; *Lancet* 1974;1529-33
- 31.- MACLAREN N; Immunology of Diabetes Mellitus; *Ann Allergy* 1992;68(1);5-9
- 32.- MAUCH-LICH, ABNEY C.C, LIEDVOGER L.B; Characterization of an linear epitope within the human pancreatic 64 kD Glutamic acid decarboxylase and its autoimmune recognition by sera from Insulin Dependent Diabetes Mellitus patients; *J. Bioch.* 1993;212 (2):597-603
- 33.- MURRAY R. K, MAYES P.A, GRANNER D. K, RODWELL V.W; *Bioquímica de HARPER*; El manual moderno S.A. 1988:11a;554
- 34.- OKODA Y, TAMOGICJO H. and BABA SIGEAKI; High concentration of GABA in the pancreatic islet with special emphasis of β - cells; *Diabetes* 1993;42(4):631-6
- 35.- OUDIN J; Immunochemical analysis by antigen-antibody precipitation in gels: *Methods in zymology* ; 1980:70:166-198
- 36.- PALMER J, PASHCOBIE M; Predicting IDDM; *Diabetes rev.* 1993;1:104-114
- 37.- PEREZ DE LA MORA M, POSAANI M, TAPIA R, TERAN R, PALACIOS R, FUXE K; Demonstration of central γ -Aminobutyrate constraining nerve terminal by means of antibodies against Glutamate Decarboxylase; *Neuroscience* 1991;6:787-895

- 38.-PEREZ DE LA MORA M, ALVAREZ T.M., CANO U, and MENDEZ .F J; Stability of brain L-Glutamic acid Descarboxylase under different storage conditions; Neuroscience year; 1991: 1:59-63
- 39-PEREZ DE LA MORA M, RIZO SILVA A.B, and MENDEZ F J; Is there a high molecular weight Glutamic acid Descarboxylase?; Neurochemical research: 1992:17 (4):339-343
- 40-PEREZ DE LA MORA M.and MENDEZ FRANCO J.;Purification and characterization of two different forms Glutamic acid Descarboxylase from mouse Brair, en preparation ;1995
- 41.-REETZ A, SOLIMENA M, MATTEOLI M, FRANCO F,TAKEI K, and PIETTO DE CAMILLI; GABA and pancreatic β -cell collocation of Glutamic Acid Descarboxylase (GAD) an GABA with synaptic like micro vesicles suggests their role in GABA storage an secretion; The Embo J. 1991:5:1275-84
- 42.-ROLL U,CHRISTIE M.R.,STANDL E., ZIEGLER A.G; Associations of anti-GAD antibodies with islet cell antibodies an insulin auto antibodies in first-degree relatives of type I diabetic patients;Diabetes 1944; 43:154-160
- 43.-ROWLEY M. J, MACKAY I.R, QUIAO-YI CH, KNOWLES WJ and ZIMMET P.Z; Antibodies to Glutamic Acid Descarboxylase discriminates mayor types of Diabetes Mellitus; Diabetes rev. 1993:41:548-51
- 44.-ROSSINI A, DALE L, GREINER P, FRIEDMAN P; Immunopathogenesis of Diabetes Mellitus; Diabetes rev. 1993;1(1):43-64
- 45.-RULL J.A, ZORRILLA E.M, JADZINSKI J, VENEGAS S; Diabetes Mellitus complicación cronicas; Interamericana, McGraw-Hill 1992:1/a Edicion.Capitulo 1.
- 46.-STANWORH; Production of reagent antibodies; Nature 1960;188:156
- 47.-SALTIEL A. R. Second messengers of insulin action; Diabetes Care 1990;13(3):244-255
- 48.-SOLIMENA M, FOLLIN F, DEAIZUPURA H, DONINI D.S, COMI G.C, POZZA G and VICARI A.M; Autoantibodies to Glutamic Acid Descarboxylase in patient with STIFF-MAN syndrome, epileptic and Type I Diabetes Mellitus; N.Engl J. Med. 1988;318:1012-1020
- 49.-TANIGUCHI H, MURAKAMI LI, YOSHIOKA M, EJIRI K, ISHIHARA K, BABA S and OKADA Y; GABA and Insulin in pancreatic islets;Diabetes 1993;42(10):1506-13

- 50.-TAPIA R, PASANTES H, ARECHIGA H; Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas; Biblioteca de Ciencias U.N.A.M. 1983:57-70
- 51.-THORES N B, MAURREN J, CHARRON R, LODISH H.F; Molecular physiology of glucose transporters; Diabetes Care 1990;13(3):87-9
- 52.-TUSZYNSKI G.P, KNIGHT L, PIPERNO J.R, WALS P.N; A rapid method for removal of (125 I) Iodide following Iodination of protein solutions; Analytical Biochemistry 1980;106:118-122
- 53.-ZIEGLER A , DUMONT HERSKOWITZ R, JACKSON R.A, SOELDNER J.S, and EISENBARTH G.S; Predicting type I Diabetes; Diabetes Care 1990;13:762-75
- 54.-ZIMMET P.Z, ROWLEY M.J, MACKAY I.R, KNOWLES W.J, CHEN Q.Y, CHAPMAN L.H, and SERJEANTSON S. W; The ethnic distribution of antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase presence and levels of Insulin dependent Diabetes Mellitus in European and Asian subjects; J. Diabetes Complications 1993;7(1):1-7
- 55.-ZLOBINA E.N, ZARATE A, DUBINKIN IV, MERKUSHOV A.V, and VOLYNKAYA N.A; Pancreatic antigenic complex 64 involve man in regulation of insulin secretion and relation to Glutamic Acid Decarboxylase; Immun Lett 1992; 31(3):289-96