

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
MENCIÓN INMUNOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE DE
PÁNCREAS (ICA'S) EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1 Y EN SUS
FAMILIARES MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA,
COMPARANDO ENTRE UN SUSTRATO CACERO Y OTRO
COMERCIAL (KIT COMERCIAL), EN EL PERIODO 2003 – 2004
EN EL INSTITUTO SELADIS**

ELABORADO POR:

Univ. Lise Amparo Oporto Velasco.

INFORME DE TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA

La Paz - Bolivia

2006

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
MENCIÓN INMUNOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE DE PÁNCREAS
(ICA's) EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1 Y EN SUS FAMILIARES
MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA, COMPARANDO
ENTRE UN SUSTRATO CACERO Y OTRO COMERCIAL (KIT
COMERCIAL), EN EL PERIODO 2003 – 2004
EN EL INSTITUTO SELADIS**

ELABORADO POR:

Univ. Lise Amparo Oporto Velasco.

ASESORA:

Dra. Lilia Sánchez García

CO ASESORES:

Dra. Carmiña Heidy García

Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya

INFORME DE TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA

La Paz - Bolivia

2006

DEDICATORIA

Al cariño, esfuerzo, comprensión y apoyo estimulante de mis amados padres Prudencio Mallku Montero e Inés Oporto Velasco.

A mi siempre recordado abuelito Lucio Oporto Arancibia (Q.E.P.D) por ser un ejemplo de integridad y templanza.

A mí amada familia; Mami Deterlina, Lui, Néstor, Oti y Lilian por permanecer a mi lado a cada momento.

Y una dedicación especial a mi mentora y guía la Dra. Lilia Sánchez por todo su apoyo, cariño, paciencia, dedicación y por ser un ejemplo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. MARIA TERESA SALINAS endocrinóloga en el HOSPITAL OBRERO CNS N°1, quien aportó con su conocimiento y experiencia a lo largo de la elaboración de este trabajo.

A la Dra. HEYDI GARCÍA y al Dr. FERNANDO SOSA por haberme guiado y apoyado con sus consejos.

Al Dr. EDUARDO CABRERA RODE quien como Jefe del Departamento de Inmunología de la Diabetes del Instituto Nacional de Endocrinología (INE) en Cuba respaldó excepcionalmente y de forma desinteresada con su conocimiento y experiencia.

A la Dra. MERY ILLANES MANRIQUE y a la Dra VIRGINIA RIVAS quienes como Responsables del Laboratorio de bioquímica clínica del instituto SELADIS apoyaron la parte práctica del presente trabajo.

A la Dra. GANINA GISELA GARBAY quien como responsable Veterinaria del MATADERO MUNICIPAL DE ACHACHICALA facilitó la parte práctica con su predisposición, accesibilidad y amistad.

A mis amigos Ronald, Olga, Magui, Sonia, Raquel y Sarita, por su amistad, estímulo y apoyo.

Y un agradecimiento especial al Instituto SELADIS por haber permitido reforzar mi formación académica.

“IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE DE PÁNCREAS (ICA's) EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1 Y EN SUS FAMILIARES MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA, COMPARANDO ENTRE UN SUSTRATO CACERO Y OTRO COMERCIAL EN EL PERIODO 2003 – 2004 EN EL INSTITUTO SELADIS”

RESUMEN.

El presente trabajo se realizó con el fin de optar a la prevención antes que el tratamiento de Diabetes Mellitus (DM) y constituye un estudio previo para contribuir y complementar investigaciones anteriores realizadas en el Instituto SELADIS.

Nos propusimos identificar Anticuerpos Contra Islote de Páncreas (ICA's) en pacientes diabéticos tipo 1 y en sus familiares mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), comparando entre un sustrato preparado en el laboratorio y otro preparado comercialmente (Kit comercial). Para esto, realizamos la detección de anticuerpos antinucleares (ANA) para evitar que estos actúen como interferentes, estandarizando la técnica de adsorción de sueros que presentaron ANA+ mediante la previa obtención de núcleos purificados en solución.

Además preparamos cortes a congelación en tejido glandular de páncreas de rata para utilizarlo como sustrato “cacero” para la detección de ICA's mediante IFI y determinar la glicemia basal y la detección de ICA's mediante IFI utilizando ambos sustratos y correlacionar los resultados con la evaluación física de los pacientes.

Finalmente se logró identificar ICA's en pacientes con Diabetes Mellitus y en sus familiares de 1er. y 2do. grado, mediante IFI, comparando entre un sustrato preparado en el laboratorio y otro preparado comercialmente, técnica útil como “Prueba de Tamizaje”. Se determinó el título de ANA's en todas las muestras, ya que todas mostraron un título mínimo de 1/40. Mediante nuestra técnica estandarizada de obtención de núcleos purificados en suspensión, se obtienen 10 mL de núcleos en suspensión en una concentración de 3×10^6 núcleos/mL, por cada 10 a 15 g de tejido empleado. Se estandarizó la técnica de adsorción de sueros que presenten anticuerpos antinucleares positivos (ANA+) mediante los núcleos purificados en solución. Se obtuvieron buenos cortes a congelación en tejido glandular de páncreas de rata para utilizarlo como sustrato “cacero” para la detección de ICA's mediante IFI. La glicemia basal en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 y en sus familiares. La evaluación física para la identificación de factores de riesgo, estuvieron en relación con la presencia de ICA's tanto en pacientes como en sus familiares genéticamente predispuestos. Los valores de glucosa basal tiene un valor determinante en el presente trabajo, ya que sirve como indicador del metabolismo de los hidratos de Carbono. La detección de ANA's fue imprescindible e importante debido a que éstos mostraron ser interferentes para la técnica de IFI en la detección de ICA's, por lo tanto es necesaria una adsorción previa, siendo una muy buena alternativa la técnica estandarizada y desarrollada en el presente trabajo. En cuanto las ventajas y desventajas de la utilización del páncreas de rata y de mono como sustrato, una desventaja innegable de la utilización de páncreas de rata, recae sobre el tiempo que toma la técnica completa, siendo que para la técnica del kit comercial se nos facilitó toda ésta etapa previa. Se consideran sujetos ICA+ a familiares de 1er. grado de diabéticos cuando en dos ocasiones consecutivas dos sueros distintos de la misma persona los ICA's persisten, por lo tanto, los resultados de IFI en páncreas de mono del presente trabajo no son, definitivos.

La importancia clínica en detectar uno o más auto anticuerpos característicos de la DM1, permite identificar con mayor probabilidad a personas con riesgo para DM1, dando opción al paciente de adoptar medidas preventivas.

TABLA DE CONTENIDO

	<i>Página</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	7
A. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL PÁNCREAS	9
1. HISTOLOGÍA	11
2. TEJIDO PANCREÁTICO	12
a. PORCIÓN EXÓCRINA	12
1. Acinos o alveolos	12
2. Conductos	13
b. PORCIÓN ENDÓCRINA	13
1. Islotes de Langerhans	13
3. PRODUCCIÓN DE INSULINA ENDÓGENA	16
4. FUNCIÓN DE LA INSULINA SOBRE LA GLUCOSA	18
5. TIPOS CELULARES QUE UTILIZAN GLUCOSA	20
a. ADIPOCITOS	20
b. CÉLULAS MUSCULARES	20
c. HEPATOCITOS	21
6. ALMACENAMIENTO DE INSULINA POR LA CÉLULA BETA	22
7. ALTERACIONES PROVOCADAS POR FALTA DE INSULINA	23
B. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS (DM)	25
1. TIPO I (DM1)	27
2. TIPO 2 (DM2)	28
3. OTROS TIPOS DE DIABETES	28
4. TIPO 4 (DM4)	28
C. HISTOPATOLOGÍA Y MECANISMOS DE LA DM1	30
D. MECANISMO PATOGENICO	32
1. ALELOS DE SUCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA	32
2. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS	33
a. ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD CELULAR	34
b. PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS	35
3. FACTORES AMBIENTALES	40
a. VIRUS	40
b. NITRITOS Y NITRATOS	40
c. INGESTIÓN DE LECHE DE VACA	41

E. CRITERIOS PAR EL DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS	41
1. PRUEBAS DE LABORATORIO QUE INDICAN DIABETES	46
2. PRUEBAS DE LABORATORIO QUE INDICAN ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA	46
3. VALORES DE LABORATORIO QUE INDICAN AUSENCIA DE DIABETES	48
4. MARCADORES INMUNOLÓGICOS	48
III. JUSTIFICACIÓN	51
IV. OBJETIVOS	54
V. MATERIAL Y MÉTODOS	55
A. POBLACIÓN	55
B. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA	55
1. GRUPO N°1. PACIENTES CON DIBETES MELLITUS TIPO 1	56
2. GRUPO N°2. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2	56
C. EVALUACIÓN MEDIANTE HISTORIAS CLÍNICAS	56
1. EDAD	57
2. PESO Y TALLA	57
3. ACTIVIDAD FÍSICA	58
D. DETERMINACIÓN DE LA GLICEMIA BASAL UTILIZANDO EL MÉTODO ENZIMÁTICO	59
1. PRINCIPIO	59
2. MATERIAL	59
3. EQUIPO	60
4. REACTIVOS	60
5. PROCEDIMIENTO	60
E. OBTENCIÓN DE CÉLULAS BHK-21 COMO SUSTRATO PARA LA DETECCIÓN DE ANA's (CITOSPINES)	61
1. PRINCIPIO	61
2. MATERIAL	62
3. EQUIPOS	62
4. REACTIVOS	63
5. PROCEDIMIENTO	63
F. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES Y TÍTULO EN LAS MUESTRAS PRE ANÁLISIS DE ICA's.	64

1. PRINCIPIO	64
2. MATERIAL	65
3. EQUIPOS	65
4. REACTIVOS	65
5. PROCEDIMIENTO	66
G. OBTENCIÓN DE NÚCLEOS PARA LA ADSORCIÓN	67
1. PRINCIPIO	67
2. MATERIAL	68
3. EQUIPOS	68
4. REACTIVOS	69
5. PROCEDIMIENTO	69
H. ADSORCIÓN DE LOS SUEROS POSITIVOS PARA ANTINUCLEARES	70
1. PRINCIPIO	71
2. MATERIAL	71
3. EQUIPOS	71
4. REACTIVOS	71
5. PROCEDIMIENTO	72
I. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE RATA	72
1. PRINCIPIO	72
2. MATERIAL	73
3. EQUIPOS	73
4. REACTIVOS	73
5. PROCEDIMIENTO	73
J. IDENTIFICACIÓN DE ICA's POR EL MÉTODO DE IFI UTILIZANDO CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE RATA	75
1. PRINCIPIO	75
2. MATERIAL	75
3. EQUIPOS	76
4. REACTIVOS	76
5. PROCEDIMIENTO	77
K. IDENTIFICACIÓN DE ICA's POR EL MÉTODO DE IFI UTILIZANDO CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE MONO	78
1. PRINCIPIO	78
2. MATERIAL	78
3. EQUIPOS	79
4. REACTIVOS	79
5. PROCEDIMIENTO	80
L. CRITERIOS DE LECTURA	81

M. ANÁLISIS Y EVALUACIÓN ESTADÍSTICA	82
VI. RESULTADOS	83
A. ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO	83
1. OBESIDAD	83
2. ACTIVIDAD FÍSICA	83
3. DETERMINACIÓN DE LA GLICEMIA BASAL UTILIZANDO EL MÉTODO ENZIMÁTICO	84
B. CLASIFICACIÓN DE PACIENTES EN RIESGO ENTRE LOS FAMILIARES	85
C. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES Y TÍTULO DE ANTICUERPOS EN LAS MUESTRAS, PRE ANÁLISIS ICA's	86
D. ADSORCIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES DE LOS SUEROS PRE TITULADOS	88
E. IDENTIFICACIÓN DE ICA's POR EL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA UTILIZANDO CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE RATA	89
1. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y FAMILIARES	89
2. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y FAMILIARES	90
F. IDENTIFICACIÓN DE ICA's POR EL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA UTILIZANDO CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE MONO	91
1. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y FAMILIARES	91
2. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y FAMILIARES	92
G. COMPARACIÓN ENTRE SUSTRATOS: RATA / MONO	93
VII. DISCUSIONES	95
VIII. CONCLUSIONES	104
IX. BIBLIOGRAFÍA	107
X. ANEXOS	116

ANEXO 1. CLASIFICACIÓN DETALLADA DE LOS PACIENTES	116
ANEXO 2. FORMATO DE HISTORIA CLÍNICA	118
ANEXO 3. TABLAS DE INDICE DE MASA CORPORAL	119
ANEXO 4. METODOLOGÍA GENERAL	121
ANEXO 5. CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO ENZIMÁTICO PARA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA	122
ANEXO 6. MÉTODO ALTERNATIVO PARA DETERMINACIÓN DE PESO CORPORAL IDEAL	126
ANEXO 7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	128
ANEXO 8. RESULTADOS GENERALES	131
ANEXO 9. CRITERIOS DE EVALUACIÓN EN CUANTO A SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.	136
ANEXO 10. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	139
ANEXO 11. VISTAS AL MICROSCOPIO	140

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. <i>Ubicación anatómica del páncreas (IV)</i>	10
Figura 2. <i>Descripción anatómica del páncreas (I)</i>	10
Figura 3. <i>10 X Corte histológico de páncreas con tinción Universal (H yE) (V)</i>	12
Figura 4. <i>400X Vista de un Islote mostrando los tipos celulares principales. (VIII)</i>	14
Figura 5. <i>Estructura de la prionsulina humana. Las moléculas de insulina y del péptido C (conector) están conectadas en dos sitios por enlaces dipeptídicos. Una escisión inicial por una enzima análoga a tripsina, seguida por particiones por una enzima semejante a carboxipeptidasa conduce a la producción de la molécula heterodimérica (AB) de insulina y el péptido. (16)</i>	17
Figura 6. <i>Molécula de insulina, compuesta de cadenas tipo A y B.(16)</i>	17
Figura 7. <i>Nivelación de los valores de glucosa en sangre.(XXIV)</i>	19
Figura 8. <i>Esquema de la interacción de la molécula de insulina sobre las células (XXII)</i>	39
Figura 9. <i>Historia Natural de la Diabetes Mellitus tipo I</i>	59
Figura 10. <i>Esquema de progresión clínica a Diabetes</i>	70
Figura 11. <i>Ejemplo de la Adsorción de Anticuerpos Antinucleares</i>	83
Figura 12. <i>Evaluación de obesidad mediante IMC, cálculo que indica que el 47 % de los pacientes tienen sobrepeso y en ningún caso obesidad.</i>	83
Figura 13. <i>Actividad física de los familiares relacionados a los 3 tipos de diabetes, figura que marca la tendencia al sedentarismo.</i>	83
Figura 14. <i>Evaluación clínica determinada por parámetros, (hiperglicemia, sobrepeso, sedentarismo y antecedentes patológicos bien definidos) indica que los familiares sin riesgo representaron el 67%, los Pacientes A (previamente diagnosticados) el 20% y los Pacientes B (con tres o más factores de riesgo) el 13 % restante.</i>	85

	<i>Página</i>
Figura 15. <i>Título Anticuerpos Antinucleares en Pacientes y Familiares relacionados a Diabetes. 63% de la población presentó reactividad desde 1/40 hasta 1/160, el 37% restante presentó un título menor a 1/40.</i>	87
Figura 16. <i>Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de rata, en pacientes con DM1 y sus familiares. Figura que refleja que un 60% son ICA+.</i>	89
Figura 17. <i>Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de rata, de pacientes con DM2 y sus familiares.</i>	90
Figura 18. <i>Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de mono, de pacientes con DM1 y sus familiares. El 50% de las muestras resultaron positivas para ICA's</i>	91
Figura 19. <i>Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de mono, de pacientes con DM2 y sus familiares</i>	92
Figura 20. <i>Comparación entre sustratos para la detección de ICA's mediante IFI. Utilizando páncreas de mono como sustrato, se obtuvo mayor cantidad de resultados Negativos y menor cantidad de resultados Positivos con respecto a los resultados obtenidos utilizando páncreas de rata.</i>	94
Figura 21. <i>Cálculo de la Sensibilidad y Especificidad de la técnica .de IFI para la identificación de ICA's sustrato: páncreas de rata).</i>	137
Figura 22. <i>Cálculo de la Sensibilidad y Especificidad de la técnica. de IFI para la identificación de ICA's (sustrato: páncreas de mono).</i>	138
Figura 23. <i>IFI - Anticuerpos Antinucleares (control negativo) (20X)</i>	140
Figura 24. <i>IFI - Anticuerpos Antinucleares (control positivo) (20X)</i>	141
Figura 25. <i>IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático en corte de páncreas de rata (control negativo) (20X)</i>	142
Figura 26. <i>IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático en corte de páncreas de rata (control positivo) (20X)</i>	143
Figura 27. <i>IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático en corte de páncreas de mono (control negativo) (20X)</i>	144

	<i>Página</i>
Figura 28. IFI - <i>Anticuerpos Contra Islote pancreático en corte de páncreas de mono (control positivo) (40X).</i>	145
Figura 29. <i>Inmunofluorescencia inespecífica en páncreas de mono (20X)</i>	146
Figura 30. <i>Interferencia en identificación de Anticuerpos contra Islote en páncreas de mono con sueros sin previa adsorción de Anticuerpos Antinucleares.</i>	147

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. <i>Valores normales de sustancias producidas por los Islotes de Langerhans en suero.</i>	23
Tabla 2. <i>Clasificación etiológica simplificada de la Diabetes hasta el año 2004 .Propuesta por la ADA aceptada por la OMS. (XXVII)</i>	27
Tabla 3. <i>Principales características diferenciales entre DM1 y DM2 (XXVII)</i>	29
Tabla 4. <i>Autoanticuerpos característicos producidos en la DM1</i>	38
Tabla 5. <i>Pruebas y valores indicadoras de DM1 (III) La prueba preferida de estas tres es la prueba de glucosa en ayuna o glicemia basal.</i>	46
Tabla 6. <i>Valores que indican un metabolismo de glucosa que no es óptimo</i>	47
Tabla 7. <i>Valores de pacientes sin DM. (III)</i>	48
Tabla 8. <i>Marcadores utilizados para identificar individuos con riesgo a desarrollar DM1. (38)</i>	50
Tabla 9. <i>Frecuencia de la población clasificada según el Tipo de Diabetes actualmente predominante en cada familia. (APF, Antecedentes Patológicos Familiares)</i>	56
Tabla 10. <i>Frecuencia y porcentaje de los resultados globales de Glicemia Basal en la población en estudio.</i>	84
Tabla 11. <i>Glicemia basal en Pacientes y Familiares relacionados a Diabetes.</i>	84
Tabla 12. <i>Frecuencia y porcentaje del Título Anticuerpos Antinucleares en Pacientes y Familiares relacionados a Diabetes</i>	86
Tabla 13. <i>Frecuencia y porcentaje de muestras sometidas a adsorción y el título final alcanzado. El 100% de muestras presentaron un título de ANA's inferior a 1/40 (El 95% de las muestras no presentaron interferente y el 5% podrían presentar interferencia por su alta reactividad -muestras cuyo título inicial fue de 1/160-).</i>	88
Tabla 14. <i>Comparación porcentual entre los resultados obtenidos con ambos sustratos (Rata Vs. Mono).</i>	93

	<i>Página</i>
Tabla 15. <i>Comparación entre ambos sustratos en cuanto a sensibilidad y especificidad.</i>	103
Tabla 16. <i>Clasificación de resultados en una prueba diagnóstica.</i>	136
Tabla 17. <i>Relación entre la evaluación clínica final y los resultados de la detección de ICA's (Sustrato: páncreas de rata).</i>	137
Tabla 18. <i>Relación entre la evaluación clínica final y los resultados de la detección de ICA's (Sustrato: páncreas de mono).</i>	138

I. INTRODUCCIÓN

En Bolivia las enfermedades antiguamente llamadas crónicas, actualmente clasificadas como Enfermedades No Transmisibles (ENT), constituyen magnos problemas de Salud Pública que responden a etiologías multifactoriales y con largos períodos de evolución.

Estas patologías se clasifican en 4 subgrupos:

- Subgrupo 1: Enfermedades cardiovasculares, cerebro vasculares, cáncer, accidentes y violencias.
- Subgrupo 2: Enfermedad bronquial obstructiva crónica y cirrosis hepática.
- Subgrupo 3: Obesidad, diabetes mellitus e hipertensión arterial.
- Subgrupo 4: Enfermedades mentales, osteoporosis y enfermedades músculo esqueléticas.

Por lo expuesto anteriormente, la diabetes está considerada como un problema de Salud Pública que reclama el concurso y la participación de todas y cada una de las entidades involucradas en la prevención y control de la Diabetes, ya que de acuerdo a la última investigación realizada por el Ministerio de Salud y Deportes y la OPS/OMS, en 1999 se llegó a determinar una prevalencia de 7.2% en la población boliviana, Sin embargo, ahora se estima que el porcentaje ha aumentado a un 10%, lo que significaría que de cada 100 personas en Bolivia, 10 podrían tener diabetes. . Se espera que esta cifra aumente en los próximos años por los estilos de vida adoptados con la modernidad, en los que predominan el sedentarismo y el consumo de alimentos con alto contenido en carbohidratos y grasas de origen animal. (14)

Datos más recientes indican que en el año 2003, la Federación Internacional de Diabetes calculó que había 194 millones de personas con diabetes en todo el mundo.

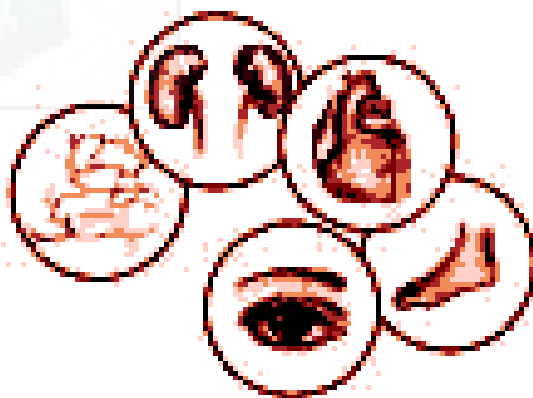
Se calcula que para el año 2025 esta cifra aumentará hasta alcanzar los 333 millones, lo cual significa que el 63% de la población del mundo vivirá con diabetes. La diabetes es hoy en día, la cuarta causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados.

De acuerdo a datos oficiales, en Bolivia aproximadamente, 10 de cada 100 personas padecen diabetes de las cuales el 15% a 20% corresponden a pacientes que desarrollan Diabetes Mellitus Tipo 1 y . entre 80% a 85% corresponden a pacientes que llegan a desarrollar Diabetes Mellitus Tipo 2 (40).

En concreto, la Diabetes es considerada como una afección crónica que surge cuando el páncreas no produce suficiente cantidad de insulina o cuando el organismo no puede utilizar la insulina que produce, de manera eficaz. Esto genera un aumento de los niveles de glucosa en la sangre. Pero, el concepto debe también incluir más implicaciones debido a que no se trata de una afección única, sino un síndrome dentro del cual deben individualizarse diferentes entidades patológicas. El nexo común de todas ellas es la hiperglicemia y sus consecuencias, es decir, las complicaciones específicas, que son comunes a todas las formas de diabetes.

La diabetes es un trastorno crónico de base genética, caracterizado por tres tipos de manifestaciones:

- a) Síndrome metabólico; que consiste en hiperglicemia, glucosuria, polifagia, polidipsia, poliuria y alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de las proteínas como consecuencia de un



déficit absoluto o relativo en la acción

de la insulina.

- b) Síndrome vascular; que puede ser macroangiopático y microangiopático, y que afecta todos los órganos pero especialmente el corazón, la circulación cerebral y periférica, los riñones y la retina.
- c) Síndrome neuropático que puede ser a su vez autónomo y periférico. (5)

La Diabetes Mellitus se ha asociado a una multiplicidad de condiciones como por ejemplo factores genéticos, las condiciones ambientales y la edad, como las más importantes. Por lo tanto, la herencia es importante por su rol en el desarrollo de la autoinmunidad y, aunque los patrones hereditarios de éstas enfermedades son complejos, las bases genéticas de la autoinmunidad están enfocadas en los genes de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, HLA en humanos) siendo que algunos alelos de HLA aparecen con mayor frecuencia en estos pacientes, que en la población en general; haciendo así posible la determinación del riesgo relativo a desarrollar una enfermedad en individuos portadores de varios alelos.

Recientemente la investigación en enfermedades autoinmunes se ha enfocado fundamentalmente hacia los loci polimórficos de HLA DR y HLA DQ (Moléculas Clase II) debido a la participación de éstas en la selección y activación de las células TCD4+, y su función de regulación sobre las respuestas humorales como celulares a antígenos proteicos.

(17). La concordancia para la enfermedad es del 6% en hermanos genéticamente diferentes, del 15% al 25% en hermanos HLA idénticos y del 35 al 50% en gemelos monocigóticos; lo que indica claramente que también hay contribución de factores exógenos y que la interacción de los genes con factores ambientales como virus conocidos (paperas,

rubéola, coxsackie, virus *Epstein Barr*, etc), toxinas y medicamentos, posiblemente actúan en forma sinérgica para desencadenar el padecimiento en el sujeto susceptible. Existe otro subgrupo (10%) conformado por pacientes mujeres, generalmente ancianas que presentan el síndrome poliendócrino autoinmune. (59)

La mayor correlación entre autoanticuerpos y HLA predisponentes para diabetes tipo 1 se observa con Anticuerpos Contra Islotes (ICA). Por otro lado, las personas con HLA DQB1 0602/0603 presentan con menor frecuencia títulos positivos de autoanticuerpos, funcionando de alguna manera como alelos protectores. (42)

La diabetes mellitus (DM) es una de las causas importantes de insuficiencia renal terminal. Aún cuando se la considera una enfermedad de la niñez, más del 40 % de los pacientes la inician en la etapa de post pubertad.

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

La ausencia de los mismos en alrededor del 10-15% de los pacientes no descarta el diagnóstico de la enfermedad. En los enfermos con DM1 Autoinmune puede detectarse la presencia de autoinmunidad frente a otros tejidos, destacando la presencia de anticuerpos antitiroideos en un 25% de los pacientes. (47)

Los Anticuerpos Contra Islote de Páncreas (ICA's) llamados también anticuerpos anti-células de los Islotes, fueron descritos por primera vez en 1970 en pacientes con Diabetes

Mellitus tipo 1 (DM1 Autoimmune), subsecuentemente muchos investigadores demostraron que los ICA's están presentes en el 70% a 80% de los diabéticos diagnosticados recientemente. Otro aspecto relevante es la demostración de que los mismos son predictivos en el desarrollo clínico de la DM1 tanto en parientes de pacientes como en población en general. (31)

Varios autores coinciden en que el 65% de las personas con ICA+ tiene el riesgo a desarrollar la DM1 dentro de los 5 años siguientes a su detección. (20)

En pacientes sanos y sin predisposición genética a Diabetes Mellitus, los Anticuerpos Contra Islotes pancreáticos (ICA's), a diferencia de otros anticuerpos como los anticuerpos antinucleares por ejemplo, no se encuentran en ninguna concentración a nivel sérico, aunque estos se pueden generar transitoriamente luego de infecciones de virus insulíntrópicos.

Los ICA's son una mezcla heterogénea de autoanticuerpos IgG, y los autoantígenos involucrados ya han sido caracterizados e incluyen a la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₅) y dos miembros de la familia de las protein tirosina fosfatasas (IA-2 y IA-2β). Los autoanticuerpos producidos contra estas moléculas parecen ser los principales anticuerpos involucrados en la reactividad de los ICA. (20)

Existen investigaciones previas dirigidas a pacientes con el Síndrome de persona rígida, por medio de la identificación de anticuerpos anti-descarboxilasa del ácido glutámico (GADA), investigaciones en las que a la vez se destacó el hecho de que los GADA estaban también presentes en pacientes con antecedentes genéticos o que cursaban Diabetes mellitus, dándonos más pautas acerca de su utilidad como marcadores específicos de la enfermedad. (28)

Los anticuerpos anti-insulina (IAA's) también han sido reconocidos como marcadores para la predicción de DM1, especialmente en sujetos jóvenes, pero no se consideran como parte de la reactividad de los ICA's cuando se usan métodos inmunohistoquímicos para su detección, aunque se han detectado en más del 50% de pacientes con DM1 de reciente inicio antes de la administración de insulina. (20)

Recientemente se ha visto incrementado el número de Diabetes Autoinmune del adulto en diabéticos tipo 2 (Diabetes Intermedia), caracterizada por el viraje paulatino o no de una Diabetes mellitus tipo 2 a una de tipo 1 en la cual la presencia de los autoanticuerpos es evidente, aunque la presencia de los ICA's sea transitoria. (33)

En el período preclínico de la enfermedad, los ICA e IAA son los anticuerpos más frecuentemente positivos, mientras que al manifestarse la enfermedad, los anticuerpos anti-GAD y anti IA-2 se positivizan y se mantienen así aun cuando el título de ICA hayan descendido. (32)

La asociación ICA positivo (ICA+) con cualquier otro autoanticuerpo tiene mayor valor predictivo que las diferentes combinaciones de GADA, IAA e IA-2 entre sí. El riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 es de 61% cuando tres o cuatro anticuerpos resultan positivos, comparado con 7% y 0.8% cuando ocurre con uno o ningún anticuerpo, respectivamente. (42), mientras que la ausencia de ICA's en Diabéticos tipo 1, podría explicarse como que su aparición es muy variable dependiendo del tipo y estadio de la patología y también de acuerdo a las características de cada paciente.

II. ANTECEDENTES.

La primera mención histórica de la Diabetes Mellitus se da en el Papiro de EBERS (550 a de C), aunque el término “diabetes” se atribuye a DEMETRIUS DE APAMAIA (Siglo II a de C). La palabra deriva del griego *diabeinen* (que significa algo así como “pasar a través”). La primera descripción exhaustiva de los síntomas corresponde a ARETAEUS DE CAPADOCIA (81-131 a de C): “misteriosa... rara enfermedad en humanos... en la cual las carnes se funden por la orina... los pacientes no paran de beber... su vida es corta y dolorosa... padecen náuseas, inquietud y sed ardiente y no tardan mucho tiempo para expirar”.

GALENO consideraba la diabetes como una enfermedad renal, idea que generalmente perduró hasta hace pocos centenares de años.

AVICENA (980-1037) introdujo el conocimiento de algunas complicaciones como la gangrena. Por lo que la medicina árabe dio notable importancia a la diabetes.

ABS AL-LATĪF AL-BAGDADI publicó un auténtico tratado de terapéutica, recogiendo entre otras recomendaciones de RHAZES (850 – 930) en el sentido de la necesidad de ejercicio físico, incluida la actividad sexual.

PARACELSO (1493-1541) destacó el carácter sistémico de la enfermedad e inició el estudio de la química de la orina de los diabéticos.

THOMAS WILLIS (1621-1675) en 1674 describió la orina “como si estuviera impregnada de miel o de azúcar”, propiedad que en aquel tiempo sólo pudo comprobarse mediante su propio paladar.

MATHEW DOBSON (1745-1784) en 1776 aporta a la comprobación química de que la orina contenía azúcar; este hallazgo permitió plantear el tratamiento dietético de la enfermedad con carácter científico.

CLAUDE BERNARD (1813-1878) gracias a quién la glucosa en sangre fue determinada por primera vez en 1859, quien con su famosa *piqûre diabétique* mostró la conexión entre el SNC y la diabetes.

PAUL LANGERHANS (1847-1888) en 1869 describió los islotes pancreáticos que posteriormente recibieron su nombre (5), pero no sospechó que fueran pequeños órganos de secreción interna; creía que se trataba de un tipo especial de terminaciones nerviosas en el órgano.

KUHNE y LEA, años después indicaron que los islotes eran muy ricos en capilares; por ello, otros investigadores sospecharon la función endocrina de la estructura. (8)

Aunque CONLEY, médico inglés, un siglo antes ya había supuesto cierta relación entre la diabetes y el páncreas, ésta sólo se estableció de manera firme por el año de 1889 cuando JOSEF VON MERING y OSKAR MINKOWSKI extirparon el páncreas de una serie de animales de experimentación y comprobaron que éstos eliminaban volúmenes crecientes de orina rica en azúcar. Su experimento demostraba que el páncreas era capaz de producir una sustancia cuya carencia era responsable de la diabetes.

La hipotética sustancia, inicialmente denominada isletina, pudo ser aislada en el año 1921 por FREDERICK BANTING (1891-1941) y CHARLES BEST (1899-1978) en Toronto y utilizada en clínica humana en el inicio de 1922. (5)

Actualmente se celebra el Día Mundial de la Diabetes cada año el 14 de noviembre, habiendo escogido esta fecha debido al aniversario de FREDERICK BANTING quien, junto con CHARLES BEST, concibió la idea que les conduciría al descubrimiento de la insulina en octubre de 1921. (40)

El siguiente hito en la historia de la insulina fué la dilucidación de su estructura, proeza realizada en 1954 por FREDERICK SANGER y sus colaboradores de la Universidad de Cambridge. Se necesitaron 12 años más para descubrir que la insulina se excreta y se almacena como proinsulina, inactiva, que se escinde a insulina activa con sus cadenas y a un resto llamado péptido C y hasta la década de los 70 no se conoció con exactitud su estructura tridimensional. (5)

Simultáneamente a los avances obtenidos en la dilucidación de la estructura 3D de la insulina y de su biosíntesis en los mamíferos, los biólogos moleculares aislaban los genes responsables de la producción del proinsulina (VILLA-KOMAROFF, L. y col., 1978) y pronto la industria farmacéutica vislumbró la posibilidad de obtener insulina humana por clonación de genes en bacterias.(8)

A. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL PÁNCREAS

El páncreas es una glándula lobulada importante de gran volumen con forma de hoja, de aproximadamente trece centímetros de longitud.

Está situado en el abdomen superior, algo a la izquierda de la línea media, detrás del estómago entre el bazo y el duodeno. La cabeza, enclavada en el asa duodenal, es la única

parte fija del órgano. Su dirección es horizontal en su mitad derecha y oblicua hacia arriba y atrás de su mitad izquierda. Es ligeramente curvo y su concavidad mira hacia la columna vertebral. Su peso medio es de 70 gramos. Su coloración es de un blanco gris.

Anatómicamente se distinguen cuatro partes en el páncreas: cabeza, istmo o cuello, cuerpo y cola. (23)

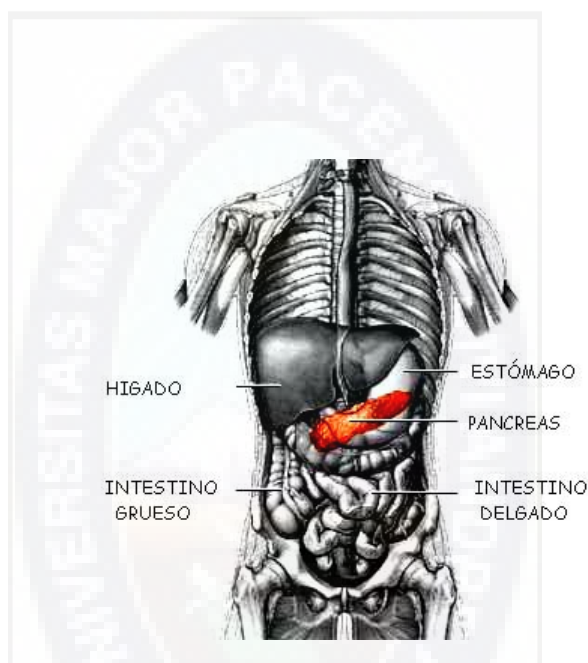


Figura 1. *Ubicación anatómica del páncreas (IV)*

Está constituido por dos conductos: el conducto principal (conducto de Wirsung) que se extiende de una a otra extremidad del órgano que a nivel de la cabeza se conecta con el conducto colédoco y luego al duodeno por la carúncula mayor de Santorini.; y el conducto accesorio que desemboca en el duodeno por la carúncula menor de Santorini. (23)

Páncreas

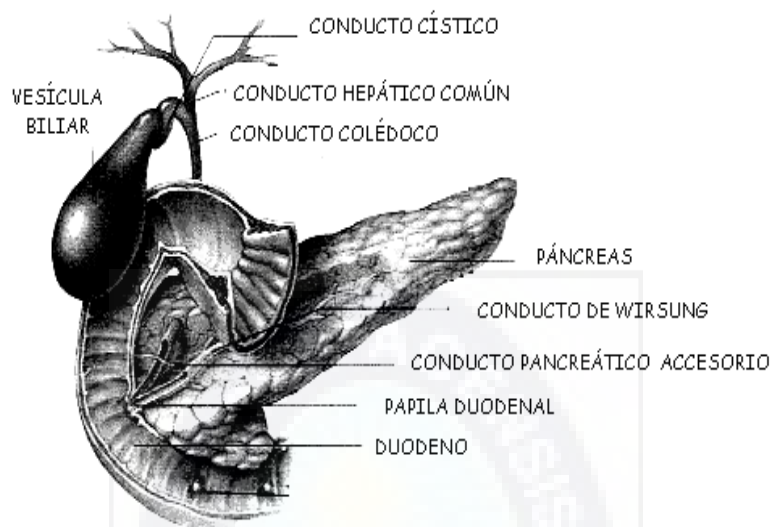


Figura 2. Descripción anatómica del páncreas (I)

Tiene dos funciones principales: la secreción al duodeno de enzimas digestivas (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa, la lipasa pancreática y la amilasa pancreática) las células que secretan estas enzimas se encuentran dispuestas en unidades llamadas acinos y los islotes de Langerhans que secretan las hormonas insulina y glucagón que regulan la concentración de glucosa en la sangre. (3)

1. HISTOLOGÍA

La función endócrina del páncreas es producida por pequeños acúmulos de células, muy ricos en capilares, que se hallan distribuidos por toda la sustancia del órgano, rodeados de tejido glandular exócrino por eso estas pequeñas unidades endocrinas se denominan islotes de

Langerhans, según el nombre de quien los descubrió. Siendo la insulina la primera hormona que se descubrió que éstas células producían y posteriormente el glucagón. (8)

En 1908, LANE, trabajando bajo la dirección de BENSLEY, gracias al empleo de métodos histoquímicos demostró no sólo que los gránulos de las células de los islotes tenían propiedades histoquímicas diferentes de los gránulos de cimógeno (y, por lo tanto, que las células de los islotes eran fundamentalmente diferentes de las células acinosas), sino también comprobó que algunos fijadores alcohólicos disolvían los gránulos citoplásmicos de la mayor parte de las células de los islotes, pero dejaban intactos los gránulos de unas pocas. Inversamente, fijadores similares preparados con agua en lugar de alcohol conservaban los gránulos de la mayor parte de células y sólo disolvían los de un número reducido de ellas. El gran número de células que poseen gránulos solubles en alcohol recibieron el nombre de células beta. Las pocas células con gránulos resistentes al alcohol e hidrosolubles, el nombre de células alfa. Esto hizo que se crearan gran número de técnicas de tinción para colorear de manera selectiva las células alfa y las células beta. (8)

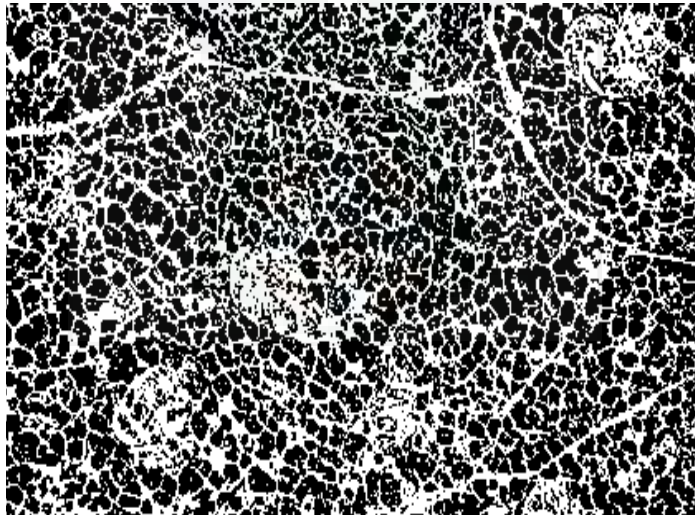


Figura 3. 10 X. Corte histológico de páncreas con tinción Universal (H y E) (V)

2. TEJIDO PANCREÁTICO.

Dentro de su estructura microscópica se observa una cápsula de tejido conectivo que separa el tejido pancreático de las estructuras vecinas, es muy delgada; por lo cual no está bien protegido.

Los tabiques de tejido conectivo se extienden penetrando en el órgano desde la cápsula para dividirlo en lobulillos los cuales están separados por fisuras muy finas.

a. PORCIÓN EXÓCRINA.

1) Acinos o alvéolos: constituyen la mayor parte de la sustancia de los lobulillos los cuales están reunidos en forma irregular con tejido reticular. Entre los acinos hay tejido conectivo delicado que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios y conductos excretores.

El núcleo de una célula acinar es esférico y contiene abundante cromatina y de uno a tres nucleolos, el citoplasma basal es basófilo y contiene mitocondrias y el citoplasma apical contiene gránulos de secreción acidófila (cimógena) muy refringentes. Las enzimas digestivas del páncreas son sintetizadas en la región basal del citoplasma y se acumulan en el retículo endoplásmico; de aquí pasan a la región de Golgi, donde quedan separadas en vesículas rodeadas de membrana para concentrarse en las típicas gotitas de cimógeno, que después van a la superficie celular y son expulsadas por exocitosis proceso regulado a nivel neuronal y hormonal.

2) Conductos: Están cubiertos por tejido epitelial cilíndrico y dependiendo de la luz de éstos también de tejido epitelial cuboide aplanado. Se describen tres regiones, siendo las células muy semejantes, estas son:

- Las células centrales de los acinos o de los conductillos que inician la alcalinización del jugo pancreático y solubilizan los gránulos de cimógeno.
- Los conductillos intercalados o intercalares y
- Las células de los conductos intralobulillares o los interlobulillares y de éstos a los conductos principales o accesorios. (9)

b. PORCIÓN ENDÓCRINA.

1) Islotes de Langerhans: están formados por cordones y acúmulos irregulares de células y capilares, es muy importante a la vez recalcar que no están encapsulados y sólo se separan del tejido acinoso por una capa muy delgada de tejido reticular. No se observan gránulos en las preparaciones ordinarias con hematoxilina y eosina (H y E) ya que los gránulos son solubles en alcohol y se eliminan con el lavado. (8)

Los islotes de Langerhans del ser humano contienen tres tipos principales de células: las células A (α), B (β) y D (δ) con algunas células C (claras) sin gránulos que son distinguibles entre sí por su estructura química y características histológicas. Todas son células poligonales irregulares con núcleos esféricos centrales, mitocondrias pequeñas en forma de bastoncillos y un pequeño aparato de Golgi; los gránulos citoplasmáticos son abundantes en las células beta (representan alrededor del 70% de la población celular del islote) y se encuentran al centro, en tanto que las células alfa y delta son menos abundantes (20% y 5% respectivamente) y se encuentran en la periferie.

El contenido celular de los islotes varía según la región del páncreas, por ejemplo, los de la cabeza contienen menos células beta y delta, y con frecuencia pocas células alfa pero abundan células que producen polipéptido pancreático (PP). (9)

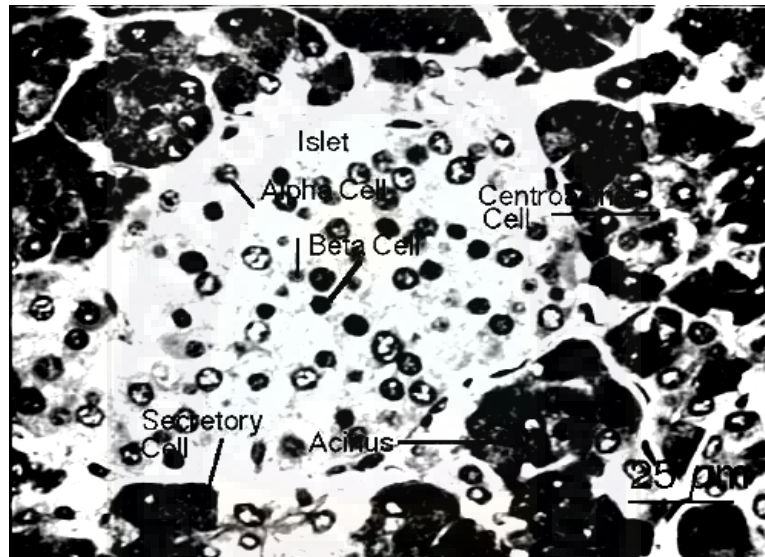


Figura 4. 400X Vista de un Islote mostrando los tipos celulares principales.(VIII)

- Las células β contienen muchos gránulos de 300 nm aproximadamente, caracterizados por un centro cristalinoide de forma romboidea o poligonal (insulina), las mitocondrias, pequeñas y esféricas, son abundantes.
Las células β producen insulina, que actúa sobre las membranas celulares para facilitar el transporte de glucosa hacia adentro de las células, con la consiguiente disminución de la concentración de ella en sangre.
- Las células α son células secretoras de 250 nm con núcleo denso, y a menudo el núcleo presenta contorno irregular. Las células α producen glucagón, cuya liberación es estimulada por los valores bajos de azúcar en sangre.

El glucagón hace que se libere glucosa (sobre todo en el hígado) con glucogenólisis, elevando así la concentración de azúcar en sangre. Hay pruebas de que las células α también liberan otros péptidos activos que incluye la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y endorfina, o el precursor común de ambas.

- Las células δ , suelen estar adyacentes a las células α , son un poco más grandes que éstas y contienen vesículas secretorias cuyo tamaño varía de 300 a 350 nm con un contenido granuloso homogéneo con densidad de baja a media. Las células δ liberan somatostatina, que puede inhibir la secreción tanto de insulina como de glucagón y de polipéptido pancreático. Una variante, la célula D_1 , contiene pequeñas vesículas granulosas homogéneas de 150 a 250 nm. Esta secreta péptido intestinal vasoactivo que a semejanza del glucagón produce glucogenólisis, pero también afecta la motilidad y la actividad secretoria del intestino al inhibir la secreción del ácido en el estómago. También estimula la secreción de electrolitos y agua por la mucosa del intestino y provoca la dilatación de los vasos sanguíneos.
- La célula PP se identifica por sus pequeñas vesículas granulosas homogéneas de sólo 140 a 200 nm de diámetro, este tipo celular puede estar fuera de los islotes entre las células acinares y dentro del epitelio de los conductos pancreáticos. El polipéptido pancreático producido por la célula PP estimula la secreción de enzimas por el estómago.
- La célula C tienen coloración pálida, por lo general carecen de gránulos y se localizan entre las células B. Se desconoce su función específica pero pueden ser de reserva o una célula en reposo. (9)

3. PRODUCCIÓN DE INSULINA ENDÓGENA.

La insulina se sintetiza como una preprohormona siendo el prototipo de péptidos que son procesados a partir de moléculas precursoras más grandes. La secuencia hidrófoba de 23 aminoácidos pre- o secuencia líder, dirige a la molécula hacia el interior de las cisternas del retículo endopásmico y entonces es eliminada, lo que produce la molécula de proinsulina conformada por 81 aminoácidos, que proporciona la conformación necesaria para formar enlaces disulfuro. (16)

Las células β del páncreas procesan la proinsulina convirtiéndola en insulina por la sustracción enzimática del péptido C, que es una estructura de 35 aminoácidos que conecta las cadenas A y B (de 21 y 30 aminoácidos respectivamente). (XX)

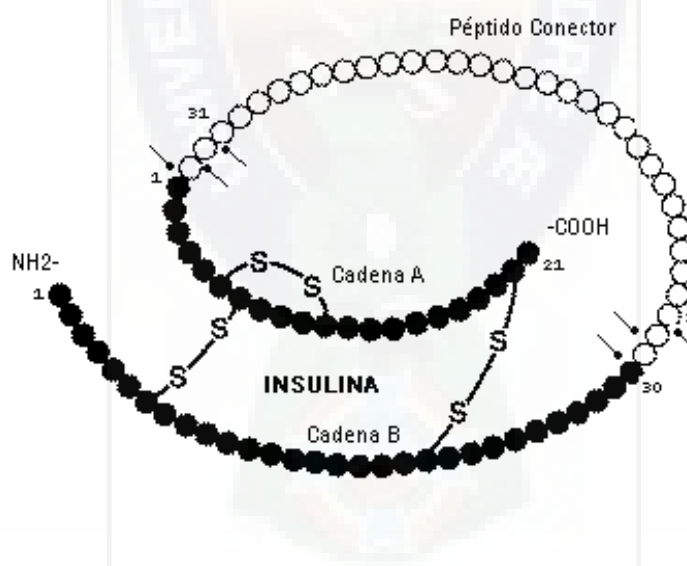


Figura 5. Estructura de la proinsulina humana. Las moléculas de insulina y del péptido C (conector) están conectadas en dos sitios por enlaces dipeptídicos. Una escisión inicial por una enzima análoga a tripsina, seguida por particiones por una enzima semejante a carboxipeptidasa conduce a la producción de la molécula heterodimérica (AB) de insulina y el péptido. (16)

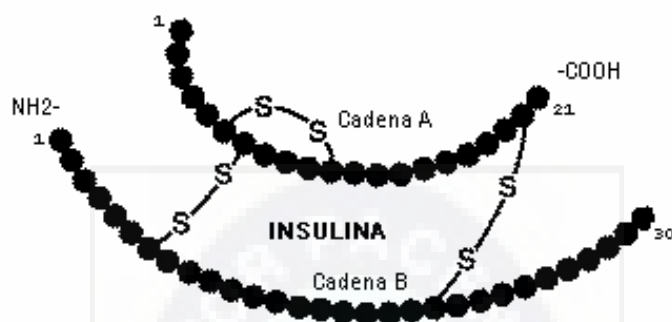


Figura 6. Molécula de insulina, compuesta de cadenas tipo A y B.(16)

El péptido C no tiene ninguna función conocida. Sin embargo, se segrega en las mismas cantidades que la insulina y, de hecho, circula en la sangre más tiempo que la insulina, por lo que es un preciso marcador cuantitativo del funcionamiento de las células β . Así, unos niveles normales de péptidos C indican una secreción relativamente normal del páncreas. (XX)

La insulina se almacena en las células β en gránulos secretorios, que se preparan para liberarla en la circulación sanguínea, en respuesta al estímulo de una concentración creciente de glucosa en sangre. Un páncreas funcionando normalmente puede fabricar y liberar diariamente de 40 a 50 unidades de insulina. Además, tiene varios cientos de unidades almacenadas y disponibles para ser segregadas cuando se necesitan. (XXII)

4. LA FUNCIÓN DE LA INSULINA SOBRE LA GLUCOSA

La glucosa es el combustible primario para todos los tejidos de cuerpo. El cerebro usa en torno al 25% de la glucosa total de cuerpo. Sin embargo, debido a que el cerebro almacena muy poca glucosa, siempre tiene que haber un abastecimiento constante y controlado de glucosa disponible en la corriente sanguínea.

El objetivo es mantener al cerebro funcionando adecuadamente. En este sentido, es de vital importancia que el nivel de glucosa en sangre se mantenga en un rango de 70 a 110 mg/dL, con el fin de prevenir una falta de suministro al sistema nervioso. (XI)



Figura 7. Nivelación de los valores de glucosa en sangre.(XXIV)

La insulina es la principal hormona que regula los niveles de glucosa en sangre. Su función es controlar la velocidad a la que la glucosa se consume en las células del músculo, tejido graso e hígado. (XIX)

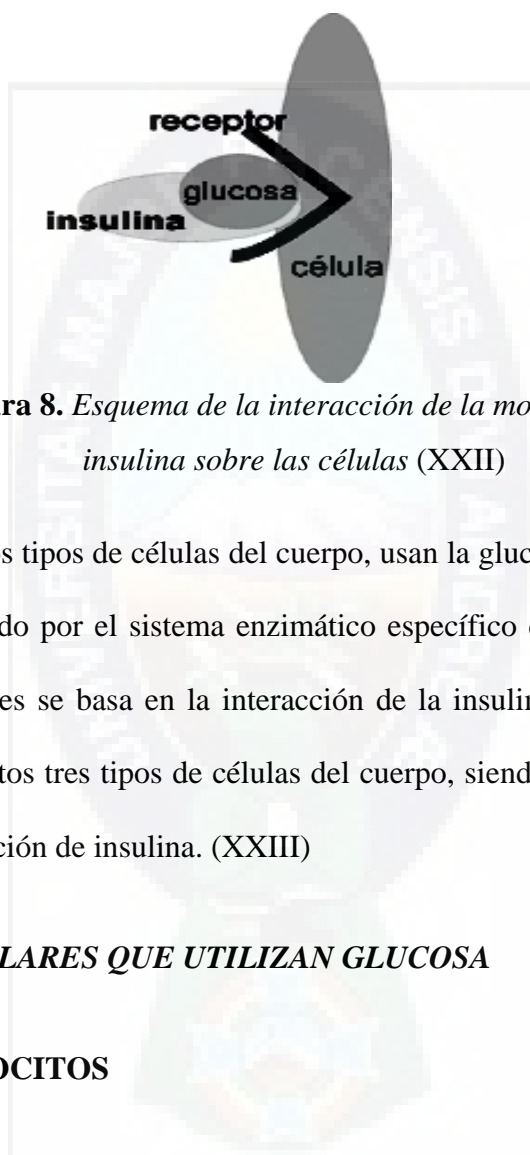


Figura 8. Esquema de la interacción de la molécula de insulina sobre las células (XXII)

Cada uno de estos tipos de células del cuerpo, usan la glucosa de una manera diferente. Este uso está determinado por el sistema enzimático específico de cada una, por lo tanto, el tratamiento de la diabetes se basa en la interacción de la insulina y otras hormonas con los procesos celulares de estos tres tipos de células del cuerpo, siendo la glucosa el estímulo más importante para la secreción de insulina. (XXIII)

5. TIPOS CELULARES QUE UTILIZAN GLUCOSA

a. ADIPOCITOS

La función primaria de la célula del tejido adiposo es almacenar energía en forma de grasa. Estas células contienen enzimas únicas que convierten la glucosa en triglicéridos y posteriormente los triglicéridos en ácidos grasos, que son liberados y convertidos en cuerpos

cetónicos según el hígado los va necesitando. Tanto la conversión de glucosa a triglicéridos como la ruptura de los triglicéridos a ácidos grasos son regulados por la insulina.

La insulina también inhibe la lipasa, un enzima que descompone la grasa almacenada en glicerol y ácido grasos. Por lo tanto, regulando la captación de glucosa en las células grasas, la insulina influye en el metabolismo de las grasas. En ausencia de insulina, las células grasas segregan de forma pasiva la grasa almacenada en grandes cantidades, por lo que no se metabolizan completamente y conducen al diabético a la cetoacidosis. (XXIII)

b. CÉLULAS MUSCULARES

Con respecto al metabolismo de la insulina, las células del músculo tienen dos funciones primarias:

- Convertir la glucosa en la energía que necesita el músculo para funcionar.
- Servir como un depósito de proteína y glucógeno

Como el tejido graso, el músculo necesita que la insulina facilite el transporte de la glucosa a través de la membrana de la célula. La célula del músculo tiene sus enzimas propias para controlar los dos caminos metabólicos hasta la glucosa: su conversión en energía contráctil y su conversión en glucógeno. Cuando el nivel de glucosa en sangre es normal, la insulina también influye sobre las enzimas de las células del músculo al favorecer la captación de aminoácidos e impedir la utilización de la proteína propia. (XXIV)

c. HEPATOCITOS

El glucógeno del hígado es otra forma de almacenamiento de glucosa. Es mucho más fácil disponer del glucógeno para obtener energía que de los triglicéridos, que primero tienen que ser convertidos en ácidos grasos y, posteriormente, en cuerpos cetónicos. El hígado controla estas conversiones y también convierte los aminoácidos en glucosa si es necesario. Este último proceso se llama la gluconeogénesis (formación de nueva glucosa).

Aunque la insulina no sea necesaria para el transporte de la glucosa al hígado, afecta directamente la capacidad del hígado para aumentar la captación de la glucosa al reducir el valor de glucogenólisis (la conversión de glucógeno en glucosa), aumentando la síntesis de glucógeno, y disminuyendo el valor de gluconeogénesis.

Las células β del páncreas controlan el nivel de glucosa. En primer lugar, sirven como un sensor de los cambios del nivel de glucosa en sangre y, después, segregan la insulina necesaria para regular la captación de carbohidratos y mantener los niveles de glucosa dentro de un margen muy estrecho.

Existe un sistema de retroalimentación por medio del cual una pequeña cantidad de carbohidratos estimula las células β para liberar una cantidad también pequeña de insulina. El hígado responde al aumento de la secreción de insulina suprimiendo la conversión de glucógeno (glucogenólisis). Así mismo, la formación de glucosa se paraliza.

Aunque el proceso de estimulación de las células β y la secreción de insulina no se comprenda completamente, se sabe que el metabolismo provoca la síntesis de glucosa mediante un precursor de la insulina llamado proinsulina. La proinsulina se transforma en la

insulina dentro de las célula β y esta insulina se almacena entonces en gránulos y se libera en respuesta a ciertos estímulos; constituyéndose así la glucosa como el estímulo más importante para la secreción de insulina. (XXV)

6. ALMACENAMIENTO DE INSULINA POR LA CÉLULA BETA.

La proinsulina contiene 35 fracciones de aminoácidos más que la insulina. Este péptido de conexión (peptido C) de 35 aminoácidos es fragmentado en el aparato de Golgi y las vesículas inmaduras para producir insulina y péptido C. La insulina consta de una cadena A (21 aminoácidos) y una cadena B (30 aminoácidos) unidas por dos enlaces disulfuro en forma de un complejo de zinc. La concentración de insulina dentro del gránulo es producida por la reducción de su actividad osmótica con el complejo de zinc, con lo que la proteína se precipita y se produce un flujo pasivo de agua fuera del gránulo. Cuando no se forman cantidades adecuadas de insulina se produce la Diabetes mellitus tipo 1. Esto se acompaña de una disminución de células β . La liberación de insulina es estimulada por la elevación de la cantidad de azúcar en sangre. Esto parece ser provocado en parte por el polipéptido gastroinhibidor, producido por las células localizadas en la zona media de las glándulas del duodeno y yeyuno, y por las células α . La estimulación de insulina se acompaña de la inhibición del ácido y pepsina en el estómago. (9)

Por lo tanto la insulina se vierte directamente en la sangre o puede ser almacenada en las células β , siendo en el aparato de Golgi donde se controla la concentración y almacenamiento de insulina y es posible que sea almacenada como complejo de cinc insoluble dentro de los gránulos de las células β . (7)

Islotes de Langerhans.		
Glucagón	20 - 100	pg/mL
Insulina	4 - 25	uU / mL
Péptido C	0.9 – 4.2	ng/mL

Tabla 1. Valores normales de sustancias producidas por los Islotes de Langerhans en suero. (16)

7. ALTERACIONES PROVOCADAS POR FALTA DE INSULINA

La diabetes mellitus es la carencia absoluta o relativa de insulina que da como resultado acumulaciones anormales de grasa, y deficiencias en el metabolismo de las proteínas y los carbohidratos.

Inicialmente, la ausencia en la producción de insulina afecta a la captación y entrada de glucosa en el músculo y células grasas. Cuando la ingesta de glucosa disminuye, el cuerpo demanda combustible, y el glucógeno se libera desde el hígado. El nivel de glucosa en sangre se eleva aún más. Cuando los niveles de glucosa en sangre se acercan a los 180 mg/dL, la capacidad de los conductos renales para reabsorber la glucosa (el umbral renal) se excede, y la glucosa es excretada por la orina (glucosuria). Puesto que la glucosa es un diurético osmótico, se excreta agua y sales en grandes cantidades y se produce la deshidratación celular. Cuando la situación se prolonga, la excesiva diuresis (poliuria) combinada con la pérdida de calorías

ocasiona polidipsia (sed aumentada), polifagia (hambre aumentada) y fatiga: los síntomas clásicos de la diabetes mellitus. (XIX)

El primer intento de las células del cuerpo de contrarrestar la falta de glucosa es metabolizar proteínas, cuyo resultado es la liberación de grandes cantidades de aminoácidos. Algunos de los aminoácidos se convierten en urea en el hígado y se excretan, dando como resultado un balance negativo de nitrógeno. (IX)

En ausencia de insulina, las células del tejido adiposo intentan proveer combustible movilizándolo las reservas grasas. Los ácidos grasos libres se utilizan inicialmente para la producción de energía, pero la mayoría alcanzan el hígado donde se forman tres fuertes ácidos: ácido acetoacético, ácido betahidroxibutírico y acetona.

Estos cetoácidos (o cuerpos cetónicos) son excretados finalmente por el riñón junto con bicarbonato de sodio. La combinación de la acumulación de cetoácidos y la excreción de bicarbonato ocasiona una caída en el pH del plasma, cuyo resultado es una acidosis. (XX)

El cuerpo intenta corregir la acidosis mediante la llamada respiración Kussmaul's, que es una respiración trabajosa y profunda provocada por el esfuerzo del cuerpo para convertir el ácido carbónico en dióxido de carbono. Si no se diagnostica la acidosis, la deshidratación y el desequilibrio de electrolitos afectará al cerebro y, finalmente, causará coma. Si no se trata la deficiencia de insulina se puede llegar a la muerte. (18)

El tratamiento con insulina pretende revertir el estado catabólico creado por la deficiencia de insulina. Cuando el cuerpo recibe insulina, los niveles de glucosa en sangre comienzan a caer, de forma que las grasas dejan de proveer combustible, con lo que cesa la

producción de cuerpos cetónicos, los niveles de bicarbonato sódico en sangre y el PH suben, y el potasio se desplaza intracelularmente a medida que el anabolismo (reconstrucción de tejidos) comienza. (XXIV)

La insulina pancreática se segrega directamente en la circulación portal y es transportada al hígado, que es el órgano central de homeostasis de la glucosa, donde se degrada el 50% de la insulina. La circulación periférica transporta entonces la insulina hasta las células del cuerpo y finalmente al riñón, donde se degrada otro 25% y se produce la excreción. (7)

B. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS (DM)

En la actualidad se acepta que la Diabetes Mellitus forma parte de un grupo heterogéneo de alteraciones metabólicas, genéticas y clínicamente heterogéneas, en el que la alteración de la tolerancia a la glucosa es el común denominador, pero que difieren en su etiopatogenia, historia natural y respuesta al tratamiento.

Los criterios diagnósticos y la clasificación de la diabetes utilizados durante las dos últimas décadas fueron propuestos por el **National Diabetes Data Group (NDDG)** en 1979 y aceptados, con algunas modificaciones, por la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** en documentos publicados en 1980 y 1985. En el año 1997, la **American Diabetes Association (ADA)** propuso un nuevo sistema de diagnóstico y clasificación de la enfermedad, basados en los informes y conclusiones de un comité internacional de expertos semejante al del NDDG.

Posteriormente, en 1998, los expertos de la OMS han aceptado con ciertos matices los cambios propuestos por la ADA.

La nueva clasificación de la Diabetes Mellitus se basa actualmente en la etiopatogenia de la enfermedad y tiene en cuenta las causas y los mecanismos que originan la alteración metabólica. También considera los estadios evolutivos de la diabetes según la gravedad de la hiperglicemia y las pautas terapéuticas para controlarla. Cualquier tipo de diabetes puede evolucionar a través de los diferentes estadios, incluyendo los más avanzados con necesidad de terapia insulínica para mantener la vida. De igual manera, se considera posible una regresión a estadios menos graves, según los casos y circunstancias.

Se resume la nueva clasificación etiológica simplificada de la Diabetes Mellitus. Esta clasificación se ha adaptado a los avances de las investigaciones científicas en la genética y etiopatogenia de algunos tipos de diabetes.

CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE DIABETES
1. Diabetes tipo 1: autoinmune, Idiopática
2. Diabetes tipo 2: con Insulinorresistencia , con Insulinopenia
3. Otros tipos de diabetes:
<ul style="list-style-type: none"> a. Defectos genéticos de la célula beta b. Defectos genéticos de la acción de la insulina c. Enfermedades del páncreas d. Endocrinopatías e. Inducida por fármacos o agentes químicos f. Infecciones g. Formas infrecuentes autoinmunes h. Síndromes genéticos asociados a diabetes
4. Diabetes Gestacional

Tabla 2. Clasificación etiológica simplificada de la Diabetes hasta el año 2004 .Propuesta por la ADA aceptada por la OMS. (XXVII)

1. TIPO 1 (DM1): es mediada inmunológicamente, excepto en un pequeño subgrupo. Ocurre en pacientes jóvenes, se presenta en forma aguda y produce hiperglicemia. Esta forma de DM corresponde a la entidad anteriormente denominada Diabetes Mellitus Insulinodependiente o Juvenil. En la clasificación actual la DM1 se subdivide en dos subtipos, la DM1 A o autoinmune y DM1 B o denominada también idiopática que se caracteriza por no presentar autoanticuerpos y no se asocia al HLA. (52)

La DM1 tiene una modulación predominantemente inmunológica y se ve en jóvenes menores de 30 años, aunque no de manera exclusiva. Hay una concordancia altísima en gemelos y en parientes de primer grado, lo que indica una clara predisposición genética; se han identificado alrededor de 17 locus, y el HLA confirma alrededor de 40% del riesgo genético, relacionado con HLA DR3 y DR4 y se sabe que DQ está estrechamente relacionado con estos dos por desequilibrio de ligamiento. (35)

2. TIPO 2 (DM2): conocida como diabetes del adulto; es el tipo de diabetes más frecuente y se considera que afecta al 90% de la población diabética. Se caracteriza por alteraciones de la secreción y/o de la acción de la insulina, pudiendo predominar uno u otro defecto fisiopatológico. No es raro que se encuentre en una fase asintomática y, por lo tanto, desapercibida y sin diagnosticar, lo que favorece la aparición de complicaciones crónicas de la enfermedad ya en el momento del diagnóstico clínico. Se trata de un grupo heterogéneo de pacientes en los que unas veces predomina el déficit insulinoscretor, mientras que en otras, prevalece la falta de acción de la insulina en los tejidos.

3. OTROS TIPOS DE DIABETES: nuevo grupo surgido por factores genéticos, a veces se relaciona con medicamentos y compuestos químicos. Se está comenzando a pensar

que la DM postrasplante se desencadena debido a los fármacos inmunosupresores que se utilizan, por lo que quedaría en ésta categoría.

La patología más frecuente en nuestro medio, dentro de éste grupo, es sin duda la *Diabetes Autoinmune Del Adulto* en diabéticos tipo 2, lo que otros autores denominaron como diabetes Intermedia la cual se produce por un viraje súbito o paulatino de una DM2 a una DM1 donde es destacable la presencia de diversos autoanticuerpos. (33)

4. TIPO 4 (DM4): es la diabetes gestacional, Se presenta por primera vez en el embarazo y ocurre en el 2% a 5% de todos los embarazos. (36)

Cabe destacar que entre la DM1 y la DM2 existen diferencias genóticas y clínicas, así como de sus patrones de secreción insulínica, muy bien definidas. Existe un número no despreciable de pacientes diabéticos, que originalmente mantienen un buen control metabólico con dieta y/o hipoglucemiantes orales y que finalmente requiere insulina para su control. (33)

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES ENTRE DM1 Y DM2		
Característica	DM1	DM2
Edad de inicio	< 20 años	< 40 años
Desencadenamiento	Agudo/subagudo	Insidioso
Peso corporal	No obesidad	Obesidad (80%)
Cetosis	Frecuente	Rara
Complicaciones microvasculares	++	+
Complicaciones macrovasculares	+	++
Asociación HLA	Presente	Ausente
Masa celular beta	Muy reducida	Conservada
Insulinitis	50 % - 70 %	Rara
Patología autoinmune y endócrina	Frecuente	Rara
Inmunidad celular	35-50% desencad.	< 5 %
Inmunidad humoral	60-80% desencad.	5-20%
Tratamiento con insulina	Imprescindible	A veces necesario

Tabla 3. Principales características diferenciales entre DM1 y DM2 (XXVII)

C. HISTOPATOLOGÍA Y MECANISMOS DE LA DIABETES MELLITUS TIPO1.

Las células mononucleares infiltran las células de los islotes y eliminan paulatinamente las células beta del páncreas. Los mecanismos inmunes abarcan anticuerpos anti-células de islotes, pero es probable que éste no sea el factor primario del daño, sino que se trate de sólo un indicador más de la enfermedad. La mayor parte del daño se debe a los linfocitos activados y las citocinas liberadas por las células mononucleares: TNF, IL-1, IFN- γ y metabolitos de óxido nítrico. Los blancos moleculares son múltiples y, probablemente, no se trata de uno en especial. Entre ellos se cuentan la insulina, las células pancreáticas (islotes) y la carboxipeptidasa. (47)

Los anticuerpos anti-células de islotes son marcadores de susceptibilidad. Se encuentran en 75% de los pacientes con DM1 y 3% a 4% de los parientes en primer grado también los poseen. Un pariente en primer grado que además presente estos anticuerpos, tiene 50% de probabilidad de presentar DM1 a corto plazo. (47)

Actualmente, se ha establecido que la diabetes no es una enfermedad aguda debida a una infección viral aislada, sino una enfermedad autoinmune secundaria a una predisposición genética, que se manifiesta por un daño secuencial del páncreas a lo largo de cierto tiempo, en forma muy parecida al daño de órganos en oleadas que se puede apreciar en enfermedades sistémicas como en el Lupus Eritematoso Sistémico.

Además, se conoce la naturaleza de algunos de los antígenos presentes en las células de los islotes pancreáticos que están relacionados con la autoinmunidad: la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), el gangliósido GM2-1 y la enzima tirosina fosfatasa. Se ha descrito que los ICA's son heterogéneos por su diferente:

- Patrón de tinción de los islotes pancreáticos humanos

- Reactividad hacia páncreas de ratón y
- Reactividad contra algunos determinantes antigénicos de las células de los islotes.

En 1992, dos grupos de investigadores independientemente reportaron la existencia de dos tipos de ICA's en diabéticos tipo 1 y familiares de primer grado, un subtipo minoritario de ICA's que reaccionan con páncreas humanos y de ratas, pero no reaccionan con páncreas de ratón, mostrando un patrón de tinción restrictivo a las células β (ICA-R), las cuales parecen ser que van directamente contra el GAD. En contraste, hay otro subtipo de ICA+ con patrón no restrictivo (ICA-NR) que reacciona con el páncreas humano, de rata y de ratón, tiñe completamente las células de los islotes y no va dirigido contra el GAD. Éste último tiene un alto valor predictivo en el desarrollo de la diabetes tipo 1. Por lo tanto se han descrito dos tipos: unos específicos dirigidos frente a células β de páncreas humano y de rata (patrón restrictivo) y otros dirigidos contra las diferentes células endocrinas de los islotes pancreáticos de hombre, rata y ratón (patrón no restrictivo). Los de patrón no restrictivo presentan mayor predecibilidad en cuanto al desarrollo subsecuente de diabetes en los individuos portadores. (32)

Por ser una enfermedad autoinmune organoespecífica, la DM1 presenta en resumen las siguientes características inmunitarias principales;

- Infiltración monocítica y linfocítica de los islotes de Langerhans
- Presencia de anticuerpos contra múltiples componentes de las células beta de los islotes.
- Existe expresión de HLA DR en las células β , como factor predisponente.
- Es posible una respuesta parcial a la terapéutica inmunosupresora. (21)

D. MECANISMOS PATOGENICOS.

1. ALELOS DE SUCEPTIBILIDAD/ RESISTENCIA

A la vez, más del 90% de los pacientes caucasoides tienen HLA DR3, HLA DR4 o ambos (pacientes heterocigotos DR3/DR4) y existe una relación negativa con HLA DR2, siendo el riesgo adicional cuando están presentes tanto el HLA DR3 y HLA DR4 lo cual no es muy frecuente. Además se ha observado que existe una relación entre los antígenos CMH con genotipos DQ β , esto se denota porque las sustituciones únicas de aminoácidos a posiciones críticas en esta cadena, pueden estar relacionadas con la susceptibilidad a diabetes.

Existe una sustitución (un aminoácido no cargado en lugar de ASP en la posición 57) en animales genéticamente susceptibles a la diabetes, y aunque ésta no identifica exactamente la susceptibilidad, sí indica la importancia potencial de los antígenos del CMH. (21)

El Locus HLA-DQ contiene alelos fuertemente asociados al riesgo de desarrollar la afección y alelos protectores, siendo que en la DM1 existen variaciones en la presencia de alelos en las diferentes poblaciones y etnias, por ejemplo en Uruguay mediante amplificación por PCR del exón 2 del gen DQ β , obtuvieron que el genotipo asociado a pacientes con DM1 fue DQ β *0302 X DQ β *0201,02 y los alelos considerados como protectores fueron DQ β *0603,0604,0607; resultados concordantes con poblaciones caucásicas europeas. (50)

Debido a que nuestra población es genéticamente heterogénea en cuanto a etnias y migraciones asiáticas y europeas, considerando además que los indígenas tienen un componente asiático ancestral; en un estudio que se hizo acerca de frecuencias genéticas HLA en población mestiza boliviana, se encontró que el DR4 y DQ3 son los más frecuentes (19.8% y 32% respectivamente), el DR3 prácticamente estuvo ausente, sin embargo la incidencia de la DM1 es de aproximadamente un 8% en este grupo poblacional, tendiendo a incrementar este

porcentaje, lo cual sugeriría que talvez estarían implicados otros alelos distintos a los reportados en población mestiza mexicana y colombiana en las cuales hay predominio de DR3, DR4 y B18; y en la venezolana (DR3 y DR4). (59)

2. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS

Se ha sugerido la patogénesis autoinmune por estudios de inmunidad humoral, inmunidad mediada por células, la morfología del páncreas y también por observaciones clínicas y tratamiento con drogas inmunosupresoras. Los mecanismos desencadenantes son:

- El mimetismo molecular (proteínas de stress térmico HSP o los superantígenos).
- Alteraciones de la inmunoregulación que involucran a las células T.
- Defectos en los mecanismos de la tolerancia de células T o B.
- Reconocimiento alterado de lo propio.
- Alteración en genes no HLA, como los defectos germinales en los genes del receptor de los linfocitos T, alteraciones en los genes TAP, LMP o en el de las inmunoglobulinas. (60)

En el paciente diabético la presencia de linfocitos sensibilizados contra antígenos pancreáticos fue demostrada por liberación de MIF. Además, linfocitos obtenidos de pacientes con DM tipo 1 e incubados con islotes pancreáticos de ratón estimulados por glucosa, inhiben la secreción de insulina (11)

a. ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD CELULAR.

Existen resultados controversiales sobre el comportamiento sanguíneo de los diferentes tipos de linfocitos B y T, debido al grado de control metabólico de los pacientes, el momento cronológico del estudio y la metodología empleada. Parece más evidente el incremento de linfocitos T activados (CD4+), junto con el aumento de reactividad frente a antígenos de islotes pancreáticos.

En el páncreas es evidente la presencia de insulinitis con predominio de linfocitos T (CD8+) - lo cual indica un fenotipo citotóxico y supresor - y presencia menos notable de macrófagos, células NK, linfocitos B y linfocitos T (CD4+), al tiempo que en las membranas de linfocitos y células beta se han detectado diferentes linfocinas (interleucinas, TNF β e IFN γ).

Estarían entonces presentes dos tipos de linfocitos T citotóxicos. Se describieron linfocitos T citotóxicos CD4+ que pueden matar células sensibles a linfocinas por liberación, por ejemplo, de Factor de Necrosis Tumoral (TNF).

Ésta reacción está restringida por productos Clase II del CMH. Por lo tanto las células β pueden ser destruidas por células citotóxicas restringidas por moléculas clase II. El posible papel de células citotóxicas convencionales restringidas por antígenos clase I en la DM tipo 1 está en discusión ya que células β de varias especies expresarían muy pocos productos de genes clase I.

A pesar de las investigaciones realizadas hasta la fecha, no están claros la naturaleza de la célula que destruye selectivamente la célula β , ni el mecanismo por el cual lo hace, ni la estructura blanco que permite que tales células efectoras selectivamente maten a las células β .

b. PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS.

En fases previas a la manifestación clínica de la DM tipo 1, es posible detectar en sangre (suero) autoanticuerpos dirigidos frente a diferentes antígenos de las células β , que a partir del diagnóstico de la enfermedad van desapareciendo paulatinamente. Se han descrito diversos tipos de posibles antígenos responsables, como los mono-sialogangliósidos, la insulina, la proinsulina, la carboxipeptidasa H, la proteína 64 kD, la proteína de gránulos secretores 38 kD, la proteína del shock térmico (HSP70), las descarboxilasas del ácido glutámico (GAD 65 kD, GAD 67 kD), la proteína p69, la proteína tirosina fosfatasa y otros. (35)

En la actualidad se estudian los valores de determinados autoanticuerpos para conocer su papel en la génesis de la DM tipo 1. Los autoanticuerpos anticitoplásmicos de islotes pancreáticos (ICA) han sido los más estudiados.

Actualmente se valoran por inmunofluorescencia indirecta y ELISA, y son positivos al diagnóstico en el 70-80 % de los casos de DM tipo 1, para luego alcanzar cifras a los dos años de evolución de sólo el 20-30 %. Su frecuencia en familiares de primer grado de individuos con DM tipo 1 es del 3,1 %. (35)

Además cabe mencionar la importancia de la presencia de los ICA's también en pacientes con una clínica peculiar, la denominada Diabetes Autoinmune del Adulto, la cual describe un viraje súbito o evolutivo de pacientes que cursaban una DM tipo 2 a una DM tipo 1 o sea a una forma más agresiva debido a diversos factores, principalmente autoinmunitarios. (33)

Se ha observado que sujetos intolerantes a la glucosa y diabéticos que utilizan hipoglicémicos con presencia de ICA en sueros se volvieron diabéticos tipo 1. Estos

anticuerpos están presentes frecuentemente años antes de desarrollar la clínica y obviamente su aparición está correlacionada con deterioro de la secreción de insulina, sin embargo los ICA pueden estar presentes en sujetos con metabolismo normal de hidratos de carbono. Varios autores creen que los ICA son el resultado de la destrucción de células β más que los agentes citotóxicos reales de células β . (11)

Los autoanticuerpos frente a la superficie celular de islotes pancreáticos (ICSA's) con selectividad para cada tipo específico de célula endocrina y los autoanticuerpos citotóxicos frente célula β tienen escasa significación clínica. Otros anticuerpos valorados son los autoanticuerpos antiproinsulina, y especialmente los autoanticuerpos antiinsulina (AAI), que suelen detectarse en el 30 a 50 % de los pacientes en el momento de diagnosticar la diabetes.

Son objeto de estudio los autoanticuerpos anti-GAD, dirigidos frente a diferentes isoformas 65 kD y 67 kD de la membrana de la célula β ; algunos de estos subtipos fueron inicialmente identificados frente a determinadas poblaciones neuronales ricas en ácido gammaaminobutírico (GABA) en pacientes con síndrome de persona rígida. (28)

El síndrome de la persona rígida, (Stiff Man Síndrome), la cual es una enfermedad neurológica muy rara que se caracteriza por existencia de rigidez muscular progresiva, de predominio axial (relativo al eje o situado sobre eje de una estructura o parte del cuerpo), con espasmos musculares dolorosos que se desencadenan espontáneamente o ante estímulos sensitivo. Los anticuerpos antiglutamato decarboxilasa (Ac. GAD) (enzima que sintetiza GABA a partir del glutamato), son positivos en el 60% de los pacientes, a títulos muy elevados en el suero y el líquido cefalorraquídeo (líquido que protege y circula a través de ciertas estructuras cerebrales y de la médula espinal), significativamente mayores

que los que se observan en la diabetes mellitus tipo 1, pudiendo también ser positivos a otros auto anticuerpos órgano específicos como: los ICA y anticuerpos microsomales y Anticuerpos tiroideos. (XVI)

Los Anticuerpos Contra Islote muestran reactividad cruzada con una determinada porción estructural del virus Coxsackie B4 (proteína P2-C). Esto debido a similitudes detectadas entre las secuencia de aminoácidos de la proteína de éste virus con la descarboxilasa del ácido glutámico. (21)

Además se describen investigaciones que proporcionan evidencia de una asociación entre la infección por ecovirus 16 y la presencia de DM1 identificando anticuerpos ICA, IAA y GADA. Datos que muestran que éste virus pueden inducir un proceso de daño celular autoinmune, apoyando la hipótesis de que las infecciones son factores de riesgo importantes para el desarrollo de diabetes. (34)

En la actualidad parece adquirir relieve diagnóstico la presencia de autoanticuerpos (ICA-512) frente a la proteína tirosina-fosfatasa de los gránulos neurosecretorios de la célula β .

También se ha estudiado que el GAD neuronal (periferie) está asociado a la infiltración linfocítica, lo cual contribuye a la disfunción de los islotes. (29)

En familiares de primer grado y en mujeres con Diabetes Mellitus Gestacional, el riesgo de desarrollar DM1 después del parto se relaciona con la positividad para más de un anticuerpo, este riesgo progresa según el número de marcadores presentes. Desde un 17% para un marcador positivo, hasta un 84% cuando anti-GAD, ICA y antiIA2 son positivos. Las combinaciones que ofrecen mayor sensibilidad son las de ICA + antiGAD y antiIA2 (74% y 75% respectivamente), siendo la asociación de los 3 marcadores la más sensible.

En la siguiente Tabla se detalla presencia de diversos autoanticuerpos que se llegan a producirse en la DM1, su prevalencia en familiares de primer grado y su valor predictivo según describen varios autores. (29, 33, 35, 46)

	DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS	PREVALENCIA EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO	PREVALENCIA EN DM1 / VALOR PREDICTIVO
ICA's	Anticuerpos contra islote de páncreas, autoanticuerpos dirigidos contra los Antígenos del citoplasma de las células de los islotes.	0,9 - 9 %	15 % Menor cuando se utiliza en un grupo diferente a los familiares de 1er. grado.
ICSA's	La positividad para Anticuerpos anti-superficie de las células del Islote (ICSA) ha sido también descrita en mujeres con DMG pero su positividad es predominante en DM1.	8,3%	31,3%
Anti-GAD	La decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es una enzima que controla la biosíntesis del ácido gamma-aminobutírico y ha sido identificada como una molécula antigénica de 64 kDA.	0 - 2,5 %	52 – 82 % 52% en familiares de primer grado y del 88% en gemelos para DM1
Anti-IA2	Anticuerpos Anti-tirosin fosfatasa	81% en familiares de primer grado y del 91% en gemelos.	65%
IAA	Anticuerpos. Anti insulina	0,5 - 47% (+ICA)	16-40%.
Otros	Proteína del shock térmico hsp65, la proteína p69, carboxipeptidas H, molécula de 38 kDA, IA2-β		

Tabla 4. Autoanticuerpos característicos

producidos en la Diabetes Mellitus tipo 1

Cabe describir a la vez, por su connotación autoinmune, la historia natural de la DM 1, la cual se caracteriza por las siguientes fases evolutivas, que transcurren en el período de algunos años (periodo subclínico). (20)

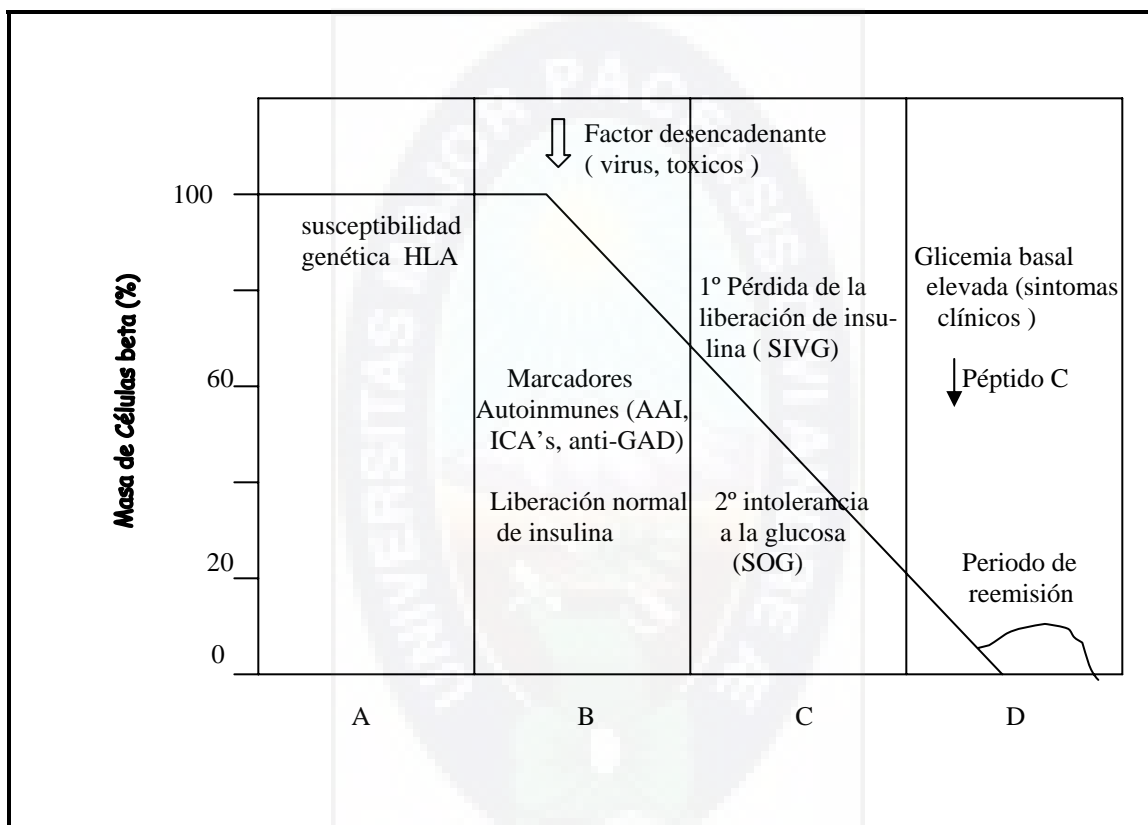


Figura 9. *Historia Natural de la Diabetes Mellitus tipo I (32)* **A)** Susceptibilidad genética. **B)** Autoinmunidad latente. **C)** Alteración metabólica precoz. **D)** Diabetes clínica. **AAI**, autoanticuerpos antiinsulina; **anti-GAD**, autoanticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico; **ICA's**, autoanticuerpos anticitoplasmáticos de islotes pancreáticos; **SIVG**, sobrecarga intravenosa de glucosa; **SOG**, sobrecarga oral de glucosa.

La historia natural de la DM1 revela un periodo subclínico que podría durar años, seguido por la pérdida del control de la homeostasis de la glucosa, lo cual marca el inicio de la diabetes.

La hiperglicemia se produce una vez que la mayoría de las células β han sido destruidas probablemente por células inmunes efectoras citotóxicas, aunque a los anticuerpos detectados en éstos pacientes no se les ha asignado un rol patológico directo, su presencia ha sido demostrada en muchos estudios como predictores útiles de amenaza clínica inminente de al DM1. (60)

Al parecer la susceptibilidad genética heterogénea para el desarrollo de la autoinmunidad, es lo que ha dificultado la identificación de una causa ambiental específica para el desencadenamiento de la patología de ésta enfermedad.

3. FACTORES AMBIENTALES.

a. VIRUS

Existen mecanismos propuestos relacionados con virus, que conllevan a la destrucción de las células β , éstos incluyen: la inducción de la expresión de moléculas de HLA clase II con su subsecuente presentación antigénica o alteraciones en receptores de linfocitos T. Además, las infecciones virales pueden actuar como un factor de estrés, provocando las manifestaciones clínicas de una diabetes tipo I sin desempeñar un papel específico, tanto en la destrucción directa de las células β como en el inicio de un proceso autoinmune. (38)

b. NITRITOS Y NITRATOS

El consumo de nitritos y nitratos por mujeres, en momentos cercanos al parto, puede influir en un eventual desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 1. (38)

c. INGESTIÓN DE LECHE DE VACA

El consumo de proteínas de leche de vaca, particularmente en los estadios tempranos de la vida, puede incrementar la incidencia de la DMID, tanto en animales de experimentación, como en el hombre. *Savilahti et al.* hallaron una anormal e intensa respuesta inmune humoral (IgG e IgA) contra proteínas de la leche de vaca, particularmente en pacientes diabéticos jóvenes. *Karjalainen et al.* encontraron que la albúmina de suero bovino (BSA) contiene una secuencia de 17 aminoácidos, la cual denominaron ABBOS, hacia donde va dirigida la mayor parte de los anticuerpos anti-BSA (IgG). (38)

E. CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS.

En cualquier edad, la presencia de síntomas típicos de diabetes indica la necesidad de la prueba sanguínea de glucosa. La misma prueba y la misma interpretación de los resultados del laboratorio se aplican para definir tanto la DM1 como la diabetes mellitus, tipo 2 (DM2). La distinción entre la DM1 y la DM2 se hace después de tener los resultados del laboratorio y depende además de otros factores. La cetoacidosis diabética por ejemplo, es la descompensación metabólica más frecuente y severa, que predomina en los diabéticos tipo 1. El tratamiento para la cetoacidosis es igual al del Síndrome hiperosmolar hiperglucémico no cetósico: insulina cristalina, hidratación parenteral y administración de potasio.

Se caracteriza por:

- Deshidratación grave y progresiva: con poliuria, polidipsia, oliguria, hipotensión arterial.
- Acidosis metabólica:
- Signos respiratorios: respiración de Kussmaul y aliento cetónico
- Síntomas digestivos: náuseas, vómitos y dolor abdominal (ocasional).
- Estado de conciencia: Varía entre la lucidez, obnubilación y coma neurológico
- Síntomas o signos de la afección causal, especialmente infecciones.
- Los reportes de laboratorio incluye:
 - Gliemia >300 mg/dL
 - Glucosuria >1000 mg/dL
 - Cetonuria >80 mg/dL
 - Cetonemia 50-300 mg/dL
 - Bicarbonato <15 mEq/L
 - PH arterial <7.3
- Electrolitos: Normales o levemente disminuidos sin reflejar las pérdidas reales, en particular potasio.
- El electrocardiograma: para detectar hipocalcemia y para monitorear la administración de potasio.

Ausentes los síntomas, la primera prueba para la diabetes mellitus deberá hacerse a los 45 años de edad y, en caso de un resultado negativo, deberá repetirse cada 3 años después de los 45 años de edad. (I)

Si la persona tiene 1 ó más de los siguientes factores de riesgo, la prueba deberá hacerse cuando se presenten los factores de riesgo y deberá repetirse cada año después:

- Obesidad: si pesa igual o mayor a 20% de su peso ideal o tiene un Índice de Masa Corporal (IMC) que indique obesidad.
- Tener familiares de primer grado (papás, hermanos) con diabetes mellitus
- Ser miembro de un grupo étnico de alto riesgo (hispano, africano-americano, asiático, nativo americano)
- Haber tenido un diagnóstico previo de Diabetes Gestacional (durante el embarazo)
- Haber tenido un hijo con peso al nacimiento mayor a 4.091 kilogramos (9 libras)
- Haber tenido un hijo que nació muerto.
- Padecer la hipertensión arterial igual o mayor a 140/90 mmHg
- Tener historia de "intolerancia a la glucosa en ayunas"
- Tener triglicéridos plasmáticos en una concentración igual o mayor a 150 mg/dL.
- Tener niveles plasmáticos de HDL colesterol igual o menor a 35 mg/dL (II)
- En el caso de niños menores a 11 años, es importante analizar la frecuencia de infecciones. (18)
- Presencia de cuerpos cetónicos, siendo estos un marcador importante de diferenciación para reconocer la DM1

Sabemos que respecto a las consecuencias de la alteración metabólica, hay un incremento de movilización de grasas desde las áreas de almacenamiento que se produce por la liberación de ácidos grasos libres que lleva a una disminución de la lipogénesis, disminución de la glicólisis y elevación de la gluconeogénesis. Todo esto conlleva a una elevación de acetil CoA

u oxal acetato; una elevación en colesterol y triglicéridos lo que a su vez producirá ateromas (LDL, VLDL). (18)

El diagnóstico de DM1 es exacto y preciso. Las normas ordinariamente utilizadas son las de la American Diabetes Association, mismas que son publicadas periódicamente en la revista Diabetes Care; y al aplicar estas normas oficiales en el diagnóstico de la DM1, es imposible especular ya que éste diagnóstico es preciso y determina si se tiene o no la enfermedad. No existen maneras de cuantificar con cifras el grado o la severidad de la DM1. En una persona, el autotratamiento puede requerir de una cantidad diferente de insulina que la que utiliza otra persona con la DM1, pero la severidad de la diabetes NO se mide por la cantidad o el tipo del medicamento que se utiliza en su tratamiento. (II)

El diagnóstico requiere de una prueba de glucosa en sangre, la cual se hace en el laboratorio. Los medidores de glucosa que se utilizan en el automanejo de la diabetes mellitus NO son suficientemente precisos para diagnosticar la DM1 con la confianza necesaria. Igualmente, la prueba de hemoglobina glicosilada (HbA1c) que sirve para monitorear el éxito del tratamiento y autotratamiento de la DM1, NO se recomienda para el diagnóstico de la DM1 debido a una falta de estandarización o uniformidad de la prueba y de sus resultados; actualmente aún hay demasiada variación entre los resultados reportados por los diferentes laboratorios para justificar su uso en el asunto delicado del diagnóstico de la DM1. (III)

Para el diagnóstico inmunitario tenemos a los ICA's (contra membrana y citoplasma), y si se cuenta con los medios se podría recurrir al análisis genético del polimorfismo de HLA o bien de los anticuerpos contra antígenos pancreáticos específicos ya que se ha visto que los anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico preceden al desarrollo de intolerancia

clínica a la glucosa y pueden sugerir que la respuesta inmunitaria a ésta enzima constituiría un marcador muy útil para la vigilancia. (21)

Los valores que indican la presencia de la DM1 se aplican en todos los casos; los valores no varían según la edad, la raza, el peso o el sexo de la persona.

Hay solamente 3 valores que pueden ser utilizados para el diagnóstico de la DM1. Cualquier valor de los 3 siguientes que se utiliza para el diagnóstico de la DM1 tiene que volverse a presentar en un total mínimo de DOS VECES en la misma persona, en días DIFERENTES.

El valor de glucosa sanguínea proporcionado por el laboratorio presenta el resultado de la prueba en miligramos por decilitro (mg/dL) o en milimoles por litro (mmol/L). El factor de conversión de una medida a la otra es 18 (es decir, el número de milimoles de glucosa por litro sangre *multiplicado* por 18 es igual al número de miligramos de glucosa por decilitro de sangre).

Para justificar el diagnóstico de DM1, cualquiera de las tres pruebas siguientes puede emplearse. Por ejemplo, la presencia casual de glucosa sanguínea de 200 mg/dL junto con 1 ó más de los síntomas típicos de la DM1 el lunes tiene que confirmarse en un día subsecuente por una prueba positiva a una de estas 3 criterios:

- 1) una glucosa sanguínea en ayunas igual o mayor a 126 mg/dL (igual o mayor a 7.0 mmol/L), o por

- 2) una glucosa sanguínea [2 horas después de una carga oral de 75 gramos de glucosa anhidra disuelta en agua] igual o mayor a 200 mg/dL (igual o mayor a 11.1 mmol/L), o por
- 3) la presencia casual de glucosa sanguínea de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) junto con 1 ó más de los síntomas típicos de la DM1.

1. PRUEBAS DE LABORATORIO QUE INDICAN DIABETES MELLITUS

PRUEBA	VALORES POSITIVOS
Glucosa sanguínea en ayunas	más de 126 mg/dL de sangre (más de 7 mmol/L de sangre) ^A
Glucosa sanguínea 2 horas después de una carga oral de 75 gramos de glucosa anhidra disuelta en agua:	Iguales o mayores a 200 mg/dL de sangre (igual o mayor a 11.1 mmol/L de sangre)
Glucosa sanguínea casual ^B	igual o mayor a 200 mg/dL de sangre (igual o mayor a 11.1 mmol/L de sangre) y <u>adicionalmente</u> 1 ó más de los síntomas <u>típicos</u> ^C de la DM1

Tabla 5. Pruebas y valores indicadoras de DM1 (III)
La prueba preferida de estas tres es la prueba de glucosa en ayuna o glicemia basal..

2. PRUEBAS DE LABORATORIO QUE INDICAN ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA (pero que NO indican la presencia de la DMI)

Glucosa sanguínea En ayunas:	Igual o mayor a 100 mg/dL de sangre (igual o mayor a 5.55 mmol/L de sangre) PERO menos de 126 mg/dL de sangre (menos de 7 mmol/L de sangre) ^E
Glucosa sanguínea DOS horas posprandial:	Igual o mayor a 140 mg/dL de sangre (igual o mayor a 7.8 mmol/L de sangre) PERO menos de 200 mg/dL de sangre (menos de 11.1 mmol/L de sangre) ^F

Tabla 6. Valores que indican un metabolismo de glucosa que no es óptimo ^D

Definiciones .

^A "En ayunas" significa la ausencia de ingesta calórica por lo menos durante 8 horas. Porque el agua simple no es calórica, la ingesta de pequeñas cantidades de agua simple no interrumpe el ayuno.

Ⓑ "Casual" significa en cualquier momento del día o de la noche, habiendo la persona tomado o no alimento calórico.

Ⓒ Los síntomas típicos de DM1 son: polifagia (comer mucho y/o frecuentemente), polidipsia (tomar líquido en grandes cantidades y/o frecuentemente), poliuria (miccionar mucho y/o frecuentemente), pérdida de peso a pesar de estar comiendo normalmente, visión borrosa ó cualquier otro síntoma provocado por la hiperglicemia

Ⓓ Estos valores NO indican la presencia de DM1, aunque sí indican la presencia de una homeostasis glicémica alterada o imperfecta. Estas alteraciones del control automático y normal de la glicemia sanguínea corporal no son condiciones clínicas, sino que son condiciones de riesgo. Como tal, ellos sugieren una posibilidad (aunque no la certeza) del desarrollo futuro de DM2 y/o de enfermedad cardiovascular.

Ⓔ Esta condición se llama "intolerancia a la glucosa en ayunas."

Ⓕ Esta condición se llama "intolerancia a la glucosa" o "tolerancia alterada a la glucosa."

3. VALORES DE LABORATORIO QUE INDICAN AUSENCIA DE DIABETES

MELLITUS

Glucosa sanguínea en ayunas:	Menos de 100 mg/dL de sangre (menos de 5.55 mmol/L de sangre)
Glucosa sanguínea DOS horas posprandial:	Menos de 140 mg/dL de sangre (menos de 7.75 mmol/L de sangre)

Tabla 7. Valores de pacientes sin DM. (III)

4. MARCADORES INMUNOLÓGICOS

Entre las pruebas laboratoriales inmunológicas de rutina, las que evalúan efectores de la inmunidad celular son laboriosas y, están sujetas a numerosas variables y aún no bien estandarizadas, y su aplicación en el ámbito clínico está todavía lejano, hasta que éstas pruebas sean reproducibles y los componentes involucrados mejor caracterizados. En cambio las pruebas para la detección de autoanticuerpos ya tiene un lugar bien establecido en la rutina clínica del laboratorio, y han probado ser útiles en la detección de autoanticuerpos asociados a la DM1. Éstos pueden ser usados para el diagnóstico diferencial de la diabetes mediada inmunológicamente de otras causas que también pueden originar la DM1. (60)

Por otro lado si se contara con los medios suficientes se podrá conocer analizar e identificar los epítopes de los islotes pancreáticos, para mejorar el Inmunodiagnóstico y así también la Inmunoterapia de la DM1. (53)

En el período preclínico de la enfermedad ICA e IAA son los anticuerpos más frecuentemente positivos. En el debut, los anticuerpos anti-GAD y anti IA-2 se positivizan y se mantienen así aun cuando los ICA han descendido. La asociación ICA positivo con cualquier otro autoanticuerpo tiene mayor valor predictivo que las diferentes combinaciones de GADA, IAA e IA-2 entre sí.

El riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 es de 61% cuando tres o cuatro anticuerpos resultan positivos, comparado con 7% y 0.8% cuando ocurre con uno o ningún anticuerpo , respectivamente. (42)

Son importantes tanto el ambiente como el agente desencadenante y los mecanismos de la inmunidad en la patogenia de la DM1. Sin embargo, uno de los problemas centrales en la prevención de la DM1 es que a medida que estas estrategias son más precoces, son menos

específicas, por lo que su aplicación incluiría individuos que nunca desarrollarían DM1 y, por tanto, tienen que estar muy justificadas éticamente, ser prácticas e inocuas; y, por otro lado, mientras más cercanas estén de la presentación clínica, la posibilidad de éxito es menor, por la escasez de células productoras de insulina que quedan por preservar, aunque la especificidad sea elevada. Este problema está muy ligado a los marcadores disponibles actualmente que identifican a los grupos de riesgo como se muestra en la siguiente tabla. (38)

MARCADOR	ESPECIFICIDAD	COSTO
<i>Antígenos HLA</i>	Muy baja	Alto
<i>ICA</i>	Baja	Alto
<i>Anticuerpos anti-GAD</i>	Baja	Alto
<i>Primera fase de liberación de insulina</i>	Muy baja	Intermedio

Tabla 8. *Marcadores utilizados para identificar individuos con riesgo a desarrollar DM1. (38)*

III. JUSTIFICACIÓN

La tendencia actual respecto a patologías autoinmunes principalmente en el caso de la Diabetes Mellitus, es la prevención antes que el tratamiento ya que éste, se torna incómodo y disminuye la calidad de vida de las personas que llegan a desarrollar ésta enfermedad.

Por esto, es importante que Instituciones sin fines de lucro realicen este aporte al servicio de los pacientes, siendo que a pesar del incremento de la incidencia de Diabetes Mellitus en la población, no existen pruebas genéticas ni inmunológicas que ayuden identificar individuos con predisposición a desarrollar ésta patología o pruebas que nos ayuden a detectar el riesgo de enfermedad de sus parientes más cercanos. Es así, que este trabajo constituye un estudio previo que pretende contribuir y complementar a investigaciones anteriores realizadas en el Instituto SELADIS a cargo de la Lic. De la Barra Zeballos, Susan Ximena quien realizó la “IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTICÉLULAS DE LOS ISLOTES DEL PÁNCREAS (ICAs) EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO DE LOS MISMOS POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA” utilizando páncreas de rata como sustrato, Tesina que se realizó el año 2000 (37) y principalmente, aportar con una alternativa para la prevención de la diabetes en nuestra sociedad.

No obstante que se conocen las limitaciones existentes para el diagnóstico oportuno de la diabetes mellitus, como la vigilancia epidemiológica inadecuada y la ausencia de programas eficaces de prevención y control, llama la atención la creciente morbilidad y mortalidad en esta enfermedad en nuestro medio, que requiere de tratamiento médico costoso y potencialmente peligroso debido a que pone en riesgo la vida del paciente.

Actualmente sobresale la importancia que ha tomado la presencia y detección de anticuerpos, entre ellos los Anticuerpos contra Islote (ICA's) mismos que deben ser investigados especialmente, en familias donde hay antecedentes diabéticos, en los jóvenes que presenten sintomatología diabética y en los que presenten signos contundentes como por ejemplo una glicemia por encima de los límites normales, cuyos casos más frecuentes se presentan en mujeres embarazadas.

En el desarrollo de la diabetes, la aparición de anticuerpos contra células de los islotes y el subsecuente deterioro progresivo en la liberación de insulina como respuesta a la glucosa, son considerados parámetros importantes para evidenciar con mucho éxito para identificar parientes de primer grado en riesgo de desarrollar diabetes, con la finalidad de intervenir previniendo el desarrollo de esta enfermedad., principalmente por medio de la mejora de hábitos de vida.

En el presente trabajo, se tomó como referencia el estudio anterior ya citado (37), en el que se utilizaron cortes histológicos de páncreas de rata y cuyos resultados fueron en su mayoría negativos para la identificación de los anticuerpos contra islotes de páncreas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Tampoco se tomó en cuenta la eliminación de anticuerpos interferentes como los anticuerpos antinucleares, ni se le dio relevancia a la importancia de la fijación de los cortes pancreáticos a las placas además de utilizar un conjugado convencional.

El presente trabajo realizó, la estrategia planteada fue la estandarización de una metodología que permita identificar en forma temprana este marcador, muy útil en el pronóstico: anticuerpos contra islotes de páncreas (ICA's), mediante la técnica de

inmunofluorescencia indirecta, la detección de Anticuerpos Contra Islote de páncreas (ICA's) entre los familiares en primer y segundo grado y a la vez en algunos de los pacientes recientemente diagnosticados como diabéticos, mediante el uso de técnicas ya validadas internacionalmente (IFI). Se utilizó y se compararon dos sustratos (cortes histológicos de páncreas de rata y de páncreas de mono -Kit comercial de la línea Binding Site-), se instauró a la vez una técnica de fijación mediante temperatura de los cortes histológicos realizados a las placas portaobjetos y además de incorporar un conjugado absorbido como reactivos específicos.

Se tomó en cuenta al mismo tiempo, la existencia interferentes determinantes para la detección de ICA's nos referimos a los anticuerpos antinucleares. Para esto se estandarizó previamente la adsorción de los mismos mediante núcleos purificados.

La metodología planteada incluyó la comparación entre los dos sustratos puestos en prueba, comparación que nos sirvió como referencia para elegir el más conveniente y/o evaluar las ventajas y desventajas de los mismos.

Los datos obtenidos favorecerán un cambio de conducta dirigida a la prevención más que a servicios asistenciales en cuanto a la atención de esta patología, ya que si la detección del daño pudiese realizarse de forma temprana podría detectarse a personas con riesgo de daño pancreático y se podría hacer una intervención inmunológica para evitar que el daño progrese y se desarrolle la enfermedad, lo que es poco frecuente en nuestro medio.

IV. OBJETIVOS

A . OBJETIVO GENERAL

- ❖ Identificar Anticuerpos Contra Islote de Páncreas (ICA's) en pacientes diabéticos tipo 1 y en sus familiares mediante Inmunofluorescencia Indirecta, comparando entre un sustrato preparado en el laboratorio y otro preparado comercialmente (Kit comercial).

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Realizar la detección de anticuerpos antinucleares para evitar que estos actúen como interferentes.
- ❖ Estandarizar de la técnica de adsorción de sueros que presenten anticuerpos antinucleares positivos (ANA+) mediante la previa obtención de núcleos purificados en solución.
- ❖ Preparar cortes a congelación en tejido glandular de páncreas de rata para utilizarlo como sustrato “cacero” para la detección de ICA's mediante IFI.
- ❖ Determinar la glicemia basal y la detección de ICA's mediante IFI utilizando ambos sustratos y correlacionar los resultados con la evaluación física de los pacientes.
- ❖ Realizar una evaluación física concreta, mediante parámetros que nos orienten a identificar factores de riesgo de Diabetes Mellitus, en individuos genéticamente predispuestos.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

A. POBLACIÓN

En cuanto a la población en estudio, se citaron pacientes que cursaban la enfermedad de Diabetes Mellitus tipo 1 y a sus familiares (primer y segundo grado).

Se investigaron 14 familias con un total de 40 personas, a quienes se les realizó una historia clínica concreta a partir de un examen físico general y además se les tomó 5 mL de sangre venosa sobre hielo (para evitar el consumo de glucosa por los eritrocitos) misma que fue separada y alicuotada inmediatamente en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética en instalaciones del Instituto SELADIS, suero que se utilizó para la determinación de la glicemia basal, detección de anticuerpos antinucleares y la detección de los Anticuerpos Contra Islole de Páncreas.

Los criterios de inclusión y exclusión se limitaron al cumplimiento de datos correspondiente al formato de historia clínica (ANEXO 2), ya que sólo se excluyeron a los pacientes con datos incompletos o cuyos familiares residen en el interior y a quienes no se tuvo acceso; incluyéndose por lo tanto a todos los individuos (pacientes y familiares) que acudieron a toma de muestra con historia clínica completa según el formato antes mencionado.

B. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA.

Se tomó en cuenta dos grupos, los cuales fueron seleccionados por el tipo de diabetes actualmente predominante en cada familia, ya que todos los pacientes presentaron Antecedentes Patológicos Familiares que incluyeron a uno o más familiares con DM1, pero no se mantuvo este patrón genético de generación en generación, desencadenándose

tanto la DM1 como la DM2 en diferentes casos. A continuación se describe cada uno de ellos.

1. GRUPO N° 1: PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1

Se tomaron en cuenta 8 pacientes que presentan DM1 y 22 familiares en primer o segundo grado de los mismos, como se detalla en el ANEXO 1.

2. GRUPO N° 2: PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Se tomaron en cuenta 10 familiares en primer grado de pacientes que presentan DM2, como se detalla en el ANEXO 1, todos con antecedentes patológicos familiares iniciales de DM1.

Esta clasificación se explica y se resume en la siguiente tabla.

APF.	PATOLOGÍA ACTUAL	N° DE CASOS
Diabetes Mellitus tipo 1	Grupo 1: Diabetes Mellitus tipo 1	30
Diabetes Mellitus tipo 1	Grupo 2: Diabetes Mellitus tipo 2	10
	Total	40

Tabla 9. Frecuencia de la población clasificada según el Tipo de Diabetes actualmente predominante en cada familia. (APF, Antecedentes Patológicos Familiares)

C. EVALUACIÓN MEDIANTE HISTORIAS CLÍNICAS (ANEXO N°1)

Para el procesamiento y análisis de datos se tomó en cuenta datos concretos de todos los pacientes analizados: el género, la edad, peso, talla, relación y grado de parentesco con el paciente, los antecedentes patológicos familiares relacionados al tipo de diabetes u otro tipo de patología, actividad física y el diagnóstico presuntivo .

1. EDAD

Para esto clasificaremos a todos los integrantes de los 2 grupos en 4 rangos descritos a continuación:

- Niños; grupo compuesto por pacientes entre un rango de edad de 0 a 12 años.
- Adolescentes; grupo compuesto por pacientes entre un rango de edad de 12 a 18 años.
- Adultos; grupo compuesto por pacientes entre un rango de edad para las mujeres de 18 a 55 y para los varones de 18 a 65, rango de edad considerado productiva para ambos géneros, y
- Ancianos; grupo compuesto por pacientes entre un rango de edad mayor a 55 para las mujeres y mayor a 65 para los varones.

2. PESO y TALLA

Los datos de peso y talla, fueron evaluados de acuerdo al género y edad, obteniendo el Índice de Masa Corporal (IMC), éste dato permite evaluar el rango de peso recomendado de acuerdo al individuo (Peso Ideal) y relaciona así la glicemia (metabolismo) y consiguientemente con la Diabetes mellitus que el paciente puede desencadenar.

La **Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD)** define el *Peso Ideal* como "*aquel con el cual un individuo se encuentra a gusto, permitiendo que se desarrollen normalmente todas las funciones biológicas*". A la vez, gracias a este dato se relacionan

conjuntamente la talla y el peso actuales del paciente de acuerdo a la edad, siendo difícil evaluarlos individualmente y lograr una estimación correcta de su estado físico.

Fórmula del Índice de Masa Corporal: (14)

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso}}{\text{Altura}^2} = \text{Kg/m}^2$$

El uso de tablas para el cálculo del IMC (ANEXO 3) sólo es apropiado para adultos por lo cual clasificamos a los pacientes de acuerdo a las mismas, catalogándolos según el cálculo de su IMC como pacientes con:

- Delgadez
- Mediano Peso
- Sobrepeso
- Obesidad

En los niños y adolescentes, se midió y registró también la estatura y el peso y se obtuvo su IMC correspondiente utilizando una tabla calculada para niños hasta menores de 18 años de edad (ANEXO 3).

3. ACTIVIDAD FÍSICA

La actividad física se refiere a los hábitos de vida que los diferentes pacientes realizan actualmente de acuerdo a sus ocupaciones y actividades, especialmente el ejercicio físico que desarrollen a diario. El ejercicio físico mínimo recomendable es de 60 minutos de caminata cada 48 horas, lo que puede compensarse 2 periodos de 15 minutos de caminata al día para mantener el peso de cualquier persona. (15)

Además consideramos que lógicamente hay una relación directa entre la actividad física y el sobrepeso, relación gracias a la cual tenemos en cuenta la probabilidad de una evolución desde el sedentarismo hasta la Diabetes como muestra el siguiente esquema;

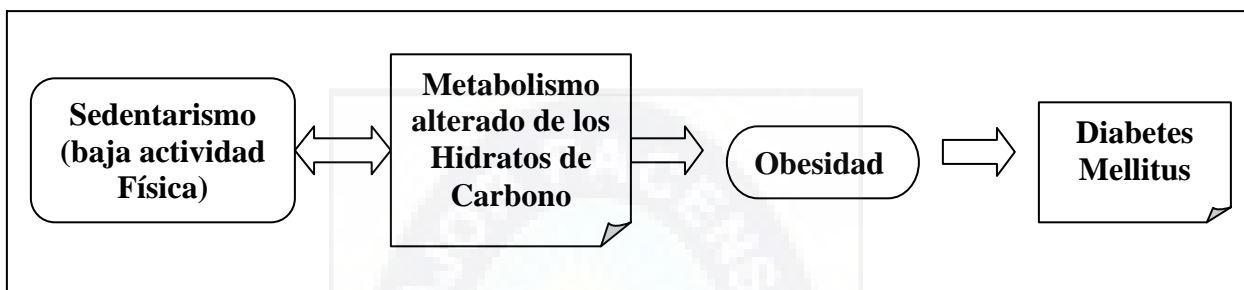


Figura 10. Esquema de progresión clínica a Diabetes

D. DETERMINACIÓN DE LA GLICEMIA BASAL UTILIZANDO EL MÉTODO ENZIMÁTICO.

1. PRINCIPIO

La glucosa de la muestra, es oxidada a ácido glucónico por acción de la glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno producido, en presencia de peroxidasa (POD), 4 – aminofenazona (4-AF) y derivado fenólico, forma una quinoneimina con un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.

(25)



2. MATERIAL

- a. Tubos de hemólisis
- b. Micropipeta de capacidad de 1000 uL
- c. Micropipeta de capacidad de 5 a 40 uL
- d. Gradillas
- e. Tips para medir volúmenes de 1 – 200 uL y 200 – 1000 uL.
- f. Papel absorbente

3. EQUIPOS

- a. Espectrofotómetro (STANBIO PREMIERE · PLUS)
- b. Vórtex (TKA GYROMIXER 0 300-100)
- c. Baño maría (RT 2000 REGATERM)

3. REACTIVOS

- a. Kit enzimático de cuantificación de glucosa TECO.

GLUCOSE (OXIDASE) REAGENT

- b. Estándar de glucosa

GLUCOSE STANDARD
100 mg/ dL

- c. Agua destilada

4. PROCEDIMIENTO

- a. Se identificaron los tubos en el orden siguiente: blanco, estándar, control o pool y las muestras. Se colocaron en cada uno de los tubos 1 mL del reactivo enzimático para glucosa.
- b. Luego se añadieron a los tubos: al blanco no se le agregó nada, al tubo del estándar se le agregó 10 uL del estándar (Kit), al tubo de control se le agregó 10 uL del pool (mezcla de varios sueros recolectados en un mes aproximadamente previo al estudio) para su correspondiente Control de Calidad (ANEXO 5) , y a los tubos de las muestras se les agregó 10 uL de las muestras (sueros) respectivos.
- c. Se mezcló cada uno de los tubos en el vórtex..
- d. Se incubó a 37 °C durante 10 minutos.
- e. Se hizo la lectura en el espectrofotómetro a 505 nm de longitud de onda.

Nota. Además en cada lectura se incluyeron varias lecturas adicionales tanto de tubos estándares y controles (pool) para el control de calidad.

Los resultados obtenidos se subclasificaron de acuerdo al valor obtenido de concentración de glucosa por decilitro de suero (g/dL) según valores de referencia recomendados por el Kit utilizado.

- 0 mg/dL - 70 mg/dL (paciente hipoglicémico)
- 70,1 mg/dL - 110 mg/dL (paciente con glicemia normal)
- 110,1 mg/dL o un valor mayor (paciente hiperglicémico)

**E. OBTENCIÓN DE CÉLULAS BHK-21 COMO SUSTRATO PARA LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA's)
(CONFECCIÓN DE CITOSPINES)**

1. PRINCIPIO

Las células de cultivo celular son células cancerosas que se caracterizan por una división celular acelerada y características morfológicas especiales que permiten realizar cultivos celulares identificando claramente una vez obtenida una proliferación abundante.

Éstas se pueden congelar gradualmente y almacenar a bajas temperaturas en nitrógeno líquido, pudiéndose mantenerlas almacenadas así por periodos largos de tiempo y cuando se requieren, se pueden descongelar y propiciar su proliferación para su empleo en el laboratorio, en éste caso, para utilizarlas como sustrato óptimo para identificar los diferentes patrones de inmunofluorescencia de los Anticuerpos Antinucleares (ANA's) debido a las características nucleares de las mismas.

2. MATERIAL

- a. Cajas de cultivo celular Corning
- b. Pipetas Pasteur
- c. Parafilm
- d. Termo de plastoformo
- e. Tubos de plástico Corning (cap. 15 mL)
- f. Cámara de Neubauer
- g. Portaobjetos preparados con papel filtro.

3. EQUIPOS

- a. Campana de flujo laminar vertical
- b. Microscopio invertido (OLYMPUS BK2)
- c. Microscopio óptico (OLYMPUS CH2)
- d. Centrifugadora (HETTICH SENTRIFUGEN UNIVERSAL 32)

4. REACTIVOS

- a. Alícuota de células de la línea BHK-21 congeladas
- b. Medio de Cultivo RPMI (ANEXO N° 7)
- c. Versene (ANEXO N° 7)
- d. Suero Fetal Bobino (SFB)
- e. Antibióticos y antimicóticos (Penicilina, Streptomicina y Nistatina)
- f. PBS – celular 0,15 M pH 7,5 (ANEXO N°7)

5. PROCEDIMIENTO

- a. Se descongeló una alícuota de las células BHK-21 conservados en tanque con nitrógeno líquido.
- b. Se colocó la alícuota en un termo de plastoformo atemperado a 37 °C con agua, para ayudar a una descongelación rápida.
- c. Se procedió a su amplificación, sembrándolas en medio RPMI con SFB (5–10 %) en cajas de cultivo celular Corning.
- d. Luego de observar la proliferación celular en la caja a las 48 horas aproximadamente, se procedió a versenizar (10 min a 37 °C) y se resuspendieron las células en PBS celular.

- e. Se ajustó la población celular a 2.0×10^6 células/mL en PBS celular y se alicuotó a cada pocito de las placas portaobjetos previamente preparadas (3 pocitos por placa).
- f. Se centrifugó 5 minutos a 1100 rpm para que las células se adhieran a la placa portaobjetos.
- g. Para poder congelarlas y para almacenarlas, se cubrieron con parafilm y se dejaron una hora a 4°C y luego a -30°C hasta el momento del uso.

F. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA's) Y TÍTULO DE ANTICUERPOS EN LAS MUESTRAS PRE - ANÁLISIS DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE DE PÁNCREAS (ICA's).

1. PRINCIPIO

La técnica utilizada es inmunofluorescencia indirecta (IFI) la cual está basada en reacciones antígeno – anticuerpo primarias, en las cuales el complejo formado puede ser evidenciado mediante rastreadores inmunológicos (conjugados antigamaglobulinas humanas – FITC ó conjugado anti IgG humana- FITC).

La reactividad de la muestra se manifiesta con diferentes patrones fluorescentes, frente a diluciones seriadas de los sueros problema. Se incorporaron controles reactivos y no reactivos.

La detección de los ANA's consiste en: utilizar un antígeno (sustrato) en este caso células BHK-21 fijadas con metanol-acetona para permeabilizar las membranas celulares.

Posteriormente se agregó el suero diluido del paciente en el que se sospecha la presencia de anticuerpos antinucleares. Luego se agregó un segundo anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (conjugado) el cual detecta los anticuerpos del suero y finalmente el montaje de las placas con glicerina tamponada (reactivo de montaje) para la observación de los diferentes patrones de inmunofluorescencia de ANA's al microscopio de luz U.V.

2. MATERIAL

- a. Citospines con la línea celular BHK-21
- b. Pipetas pasteur
- c. Cajas coplin
- d. Micropipetas graduables de 20- 200 uL, y de 100 – 1000 uL.
- e. Tips para medir volúmenes de 1 – 200 uL y de 200 a 1000 uL.
- f. Vaso de precipitados
- g. Papel absorbente
- h. Cubreobjetos
- i. Cámara húmeda

3. EQUIPOS

- a. Microscopio con lámpara de luz U.V.(OLYMPUS BH2)
- b. Shaker (Δ 711)

4. REACTIVOS

- a. PBS – IFI 0.1 M pH 7.2 (10X) (ANEXO N°7)
- b. Fijador: metanol /acetona (1:1)
- c. Azul de Evanz diluido (1/70)
- d. Glicerina tamponada

e. Conjugado titulado

Globulina anti IgG humanas marcada con
Fluoresceína (cabra)
Mertiolato sódico 0.1 g/L Na N₃ 1 g/L
Fluoline - G
Bio Mérieux. S. A.

5. PROCEDIMIENTO

- a. Se atemperaron las placas con el sustrato para ANA (células BHK-21), 30 minutos previos a la prueba.
- b. Mientras, se realizaron las diluciones de los sueros de los pacientes 1/40, 1/80, 1/160.
- c. Se fijaron las placas con la mezcla de metanol-acetona durante 2 minutos.
- d. Se lavaron las placas con PBS-IFI 10X.
- e. Se hidrataron durante 10 minutos en cajas coplin con PBS-IFI 10X.
- f. Se secaron las placas por fuera y se las colocó en cámara húmeda.
- g. Se agregaron en orden ascendente 50 uL de las diluciones correspondientes de los sueros.
- h. Se incubaron 35 minutos dentro de las cámaras a temperatura ambiente.
- i. Faltando 10 minutos para este tiempo establecido, se preparó la dilución 1/ 400 (título) del conjugado haciendo un previo cálculo de la cantidad necesaria y suficiente para todas las placas.

- j. Transcurridos los 35 minutos se lavaron las placas con PBS- IFI 10X en agitación por 7 minutos.
- k. Luego fueron secadas por fuera y se colocaron en la cámara húmeda donde se les agregó 30 uL del conjugado previamente preparado.
- l. Se incubaron 35 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
- m. Se lavaron las placas en agitación 10 minutos.
- n. Se secaron las placas por fuera y se añadió alrededor de los pozos glicerina tamponada y finalmente cubreobjetos.
- o. Se observó en microscopio de Inmunofluorescencia con objetivo 20X.
- p. Los sueros de los pacientes que resultaron positivos desde 1/40 hasta fuertemente positivos para ANA's, fueron clasificados para la adsorción de los mismos con núcleos obtenidos para tal efecto.

G. OBTENCIÓN DE NÚCLEOS PARA LA ADSORCIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

1. PRINCIPIO

Para poder adsorber los anticuerpos antinucleares presentes en los sueros, mismos que interfieren en la fluorescencia de los ICA's, recurrimos a la obtención de núcleos de hepatocitos en suspensión, para la adsorción de los ANA's, utilizando una técnica mecánica con sacarosa y Cloruro de Calcio. (41)

Ésta técnica se basa en la desintegrar la membrana celular y dejar libres los organelos citoplasmáticos y al núcleo, utilizando la sacarosa para darle estabilidad al núcleo y al Cloruro de Calcio que en éste caso se ioniza en solución ayudando a la desestabilización de la membrana citoplasmática. Ya que la difusión neta a través de la membrana citoplasmática depende principalmente de su gradiente de concentración a través de la membrana (los solutos se mueven de una concentración alta a una baja) y de su potencial eléctrico a través de la membrana (los solutos avanzan hacia la solución con carga opuesta. Por lo general, el interior de la célula tiene carga negativa). (16) Además ésta solución constituye una solución hipotónica que ayuda, de gran manera, a eliminar los abundantes eritrocitos del tejido hepático, solución que se disocia originando iones positivos y negativos, cuyo mecanismo se remite a la participación de la proteína Banda 3 que permite el ingreso de iones de cloruro que se restituyen como moléculas (Cloruro de Calcio) en el interior de la célula, desestabilizando las proteínas de membrana de los eritrocitos pudiendo así abrir poros y permite así el ingreso de agua al interior de la célula. (16)

Utilizando esta técnica se obtuvieron aproximadamente 10 mL de núcleos en solución en una concentración de 3×10^6 núcleos/mL, por cada 10 a 15 g de tejido empleado.

2. MATERIAL

- a. Cortes de hígado fresco de Ternera.
- b. Hielo
- c. Estuche de disección
- d. Gasa
- e. Tijeras

- f. Tubos colectores
- g. Pipetas pasteur
- h. Cámara de Neubauer
- i. Embudo de vidrio

3. REACTIVOS

- a. Sacarosa 0.25M con 0.003 M de CaCl_2 (ANEXO N°7)
- b. PBS celular 10X
- c. Azul de Evans

4. EQUIPOS

- a. Licuadora (INTERNATIONAL YT-899G)
- b. Centrifugadora (HETTICH SENTRIFUGEN UNIVERSAL 32)
- c. Balanza
- d. Microscopio óptico (OLYMPUS CH2)
- e. Refrigerador (WHITE-WESTINGHOUSE)

5. PROCEDIMIENTO

- a. Se obtuvieron trozos frescos de hígado de ternera de aproximadamente 10g. (sobre hielo) inmediatamente sacrificado el animal.
- b. Se separó el tejido adiposo y conectivo de los tejidos, para cortar el tejido blando en trozos pequeños (todo sobre hielo).

- c. Se enjuagó en solución de sacarosa / CaCl_2 fría ($4\text{ }^\circ\text{C}$) para remover los eritrocitos abundantes del tejido.
- d. Se homogenizó en licuadora 3 a 4 veces en lapsos de 30 segundos utilizando la relación de 90 mL de solución de sacarosa / CaCl_2 para cada 10 g de tejido.
- e. Se filtró el homogenizado 2 veces, por 3 capas de gasa, en tubos colectores.
- f. Se centrifugó el filtrado a 1500 rpm durante 10 minutos varias veces hasta obtener un sobrenadante límpido y transparente.
- g. Se resuspendieron los núcleos en PBS celular y se ajustaron a una concentración de 3×10^6 núcleos/mL haciendo el conteo con la cámara de Neubauer y el correspondiente cálculo.

H. ADSORCIÓN DE LOS SUEROS POSITIVOS PARA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

En pruebas previas logramos anular títulos fuertemente positivos (de título 1/160 a no reactivo desde 1/40) de distintos pacientes, lo que quiere decir que bajamos el título de ANA's en tres diluciones, los resultados fueron repetidos y confirmados con 5 pacientes que presentaron títulos de 1/160 fuertemente positivos, en diferentes ocasiones. Lo que quiere decir que si un suero presenta ANA's positivo hasta 1/80 después de la adsorción su título habrá bajado hasta negativo desde 1/20; y si presenta ANA's positivo hasta 1/40 después de la adsorción su título habrá bajado hasta 1/10 . Esto se explica gráficamente a continuación:

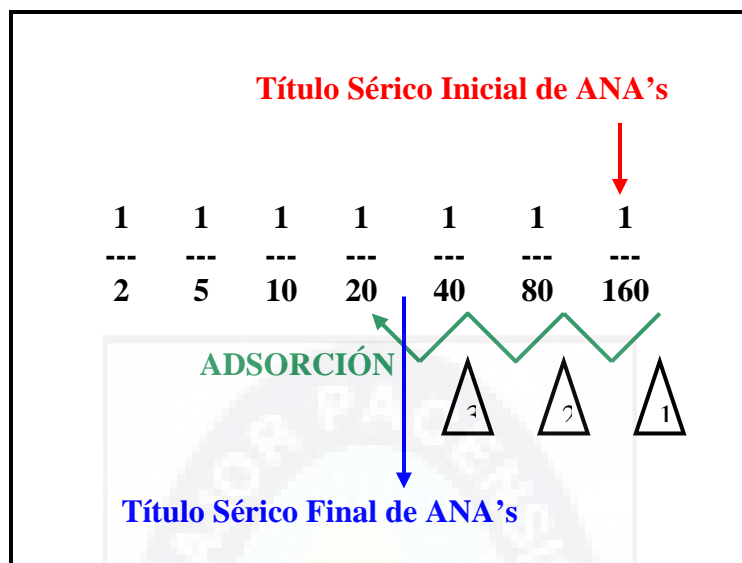


Figura 11. *Ejemplo de la Adsorción de Anticuerpos Antinucleares (ANA's)*

Para ésta prueba se utilizaron controles positivos (control positivo secundario de ANA's) y controles negativos (control negativo primario para ANA's) y, según lo descrito en la figura anterior (Figura 11.), los sueros de los pacientes con título menores a 1/40 bajaron hasta títulos entre 1/10 y 1/5 mismos que no son considerados como interferentes en la identificación de ICA's por la técnica de inmunofluorescencia.

Sometimos a adsorción todos los sueros debido a que la prueba de detección de ANA's se realizó a títulos 1/40, 1/80 y 1/160, pero no se tenía certeza del título de estos anticuerpos en las muestras que resultaron negativas desde título 1/40, además cabe mencionar que son considerados interferentes a partir de 1/30 según las pruebas practicadas en el presente trabajo, por lo cual optamos por realizar la adsorción a todos los sueros.

1. PRINCIPIO

Los anticuerpos antinucleares interfieren en la fluorescencia emitida por los ICA's, es por eso que es aconsejable adsorberlos o eliminarlos de los sueros utilizando para ello núcleos celulares en suspensión para facilitar la reacción con los anticuerpos de los sueros de los pacientes.

2. MATERIAL

- a. Micropipeta cap. 20 – 200 uL
- b. Tubos eppendorf (1.5 mL)

3. EQUIPOS

- a. Estufa (37°C) (TUTNAWER KNOTT TK)
- b. Refrigerador (4 °C) (WHITE – WESTINGHOUSE)
- c. Centrifugadora (HETTICH ZENTRIFUGEN MIKRO 22)

4. REACTIVOS

- a. Sueros de los pacientes conservadas a –20 °C
- b. Suspensión de 3×10^6 núcleos / mL

6. PROCEDIMIENTO

- a. Se mezclaron 200 uL de cada uno de los sueros de los pacientes clasificados por el título de ANA's que presentó según se indica en el paso D, con 200 uL de la suspensión de núcleos, en tubos eppendorf.
- b. Se incubaron las mezclas durante 1 hora a 37°C en la estufa y luego se las trasladó al refrigerador a 4 °C y se las dejó toda la noche.

- c. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos.
- d. Se utilizó el sobrenadante como suero adsorbido para el procedimiento de identificación de ICA's, como una dilución 1/2.

I. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE RATA POR DISECCIÓN.

1. PRINCIPIO

Esta técnica consiste en utilizar el páncreas de rata, el cual se congela utilizando temperaturas bajas en el criostato (-30 °C) para luego ejecutar los cortes sobre portaobjetos, pudiendo utilizarlos finalmente como sustrato en la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Instauramos a la vez una nueva técnica de fijación de los cortes obtenidos a las placas portaobjetos ya que en la técnica usada anteriormente no figuraba ninguna técnica de fijación que no implicara la afectación del tejido.

2. MATERIAL

- a. Estuche de disección
- b. Cajas petri
- c. Portaobjetos
- d. Piseta
- e. Cuchillas para criostato.

3. EQUIPOS

- a. Criostato SHANDON MINI (equipo para cortes en congelación – 30°C)
- b. Freezer (F 250 ELECTROLUX)

4. REACTIVOS

- a. Gel de Carboximetilcelulosa al 3.5% ó 4% para inclusión de los cortes a congelación. (ANEXO N°7)
- b. PBS Celular 0.15 M , pH 7.5 frío.
- c. Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)

5. PROCEDIMIENTO

- a. Para esto, primeramente se diseccionó una rata adulta, manteniendo la viabilidad tisular con solución salina fisiológica con la ayuda de una piseta, para luego identificar al páncreas, extirpándolo y enjuagándolo mediante varios lavados en PBS celular y finalmente se lo congeló cubriéndolo con carboximentil celulosa (3.5% - 4%), pudiendo así conservarlo en congelación a -20°C.
- b. Se extendió un poco del medio de inclusión líquido (gel de carboximetil celulosa) en la superficie del taco del criostato para luego colocar una porción pequeña del tejido con orientación longitudinal y finalmente cubrir nuevamente con el gel y congelarlo a -30°C durante 15 a 30 minutos, esto para proporcionar rigidez del tejido para realizar los cortes.
- c. Se procedió a colocar el taco en la cabeza del micrótopo.

- d. Se realizaron los cortes del tejido, girando la rueda en el sentido de las manecillas del reloj. El espesor fue de 5 – 6 μm .
 - e. A medida que se cortó el tejido, haciendo uso de la defensa plástica, se realizó el montaje en portaobjetos limpios.
 - f. Uno de los cortes fue teñido con tinción universal para diferenciar con el páncreas de mono e identificar los islotes pancreáticos.
- **Fijación de los cortes a las placas portaobjetos.**
- g. Para que los cortes del tejido se mantengan estáticos sobre la superficie de las placas portaobjetos a la hora de realizar la técnica de IFI con las mismas, primero se dejó que los cortes obtenidos se adhieran al portaobjetos durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente.
 - h. Luego se almacenó las placas en congelamiento (-30°C) durante 1 hora como mínimo (las placas con los cortes se pueden almacenar así, durante semanas).
 - i. A la hora de realizar la técnica, las placas con el sustrato en congelación se sacaron de la nevera y se las dejó atemperar durante otros 20 a 30 minutos previos a comenzar la técnica.

J. IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE DE PÁNCREAS (ICA's) POR EL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) UTILIZANDO CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE RATA.

1. PRINCIPIO

Como sustrato se utilizó cortes histológicos de páncreas de rata previamente fijados mediante temperatura a placas portaobjetos. El tejido reaccionó con los autoanticuerpos presentes en el suero del paciente y se unió a antígenos específicos de los cortes histológicos. Luego se utilizó un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia (conjugado), que es un conjugado anti-IgG humana, que es utilizado para unirse a las previas reacciones antígeno – anticuerpo entre componentes del sustrato y los anticuerpos del suero problema. La observación de fluorescencia específica en los Islotes del tejido pancreático, con el microscopio U.V., indicó una prueba positiva.

2. MATERIAL

- a. Placas con cortes histológicos de páncreas de rata como sustrato.
- b. Pipetas pasteur
- c. Cajas coplin
- d. Micropipetas graduables de 20- 200 uL, y de 100 - 1000 uL.
- e. Tips para medir volúmenes de 1 – 20 uL y de 200 – 1000 uL
- f. Vaso de precipitado
- g. Papel absorbente
- h. Cubreobjetos

- i. Gráficas de patrones de inmunofluorescencia de los ICA's en los Islotes de páncreas
- j. Cámaras húmedas.

2. EQUIPOS

- a. Microscopio con lámpara de U.V. (OLYMPUS BH2)
- b. Shaker (Δ 711)

3. REACTIVOS

- a. PBS – IFI 0.1 M, pH 7.2 (10 X)
- b. Azul de Evanz diluido (1/70)
- c. Conjugado titulado y adsorbido:

FLUORESCCEIN CONJUGATES
 Sheep Anti - Human IgG (gamma Chain)
 FITC (Monkey Adsorbed)
 THE BINDING SITE S.A.

- d. Control positivo para ICA's

Human Pancreatic I slet Cell Autoantibody
 (Autoanticuerpos células islote pancreático Hu)
 Control positive (tit 1/640)
 THE BINDING SITE S.A.

- e. Glicerina tamponada

5. PROCEDIMIENTO

- a. Se prepararon las diluciones con PBS – IFI 10X de los controles positivos, negativos y las muestras (1/2, 1/4).
- b. Se colocaron 50 ul de las diluciones sobre los cortes histológicos de páncreas de rata.
- c. Se incubó 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- d. Se lavaron las placas 3 veces con PBS- IFI 10X con la ayuda de pipetas pasteur.
- e. Se secaron las placas por detrás y los bordes cuidadosamente con papel absorbente.
- f. Se preparó el volumen necesario del conjugado a un título de 1/120 con Azul de Evans diluido en PBS-IFI 10X (3.5 mL de PBS con una gota de Azul de Evans).
- g. Se colocaron las placas en cámara húmeda y se le agregó 30 uL del conjugado titulado previamente.
- h. Se incubó 30 minutos en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente.
- i. Se lavó las placas 3 veces cuidadosamente con PBS-IFI 10X con una pipeta pasteur.
- j. Se secó por fuera y se montaron las placas con glicerina tamponada y cubreobjetos evitando las burbujas.
- k. Se observó al microscopio de inmunofluorescencia con objetivo de 10X y 20X y evaluación tomando en cuenta los criterios de lectura.

K. IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE DE PÁNCREAS (ICA's) POR EL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA UTILIZANDO PLACAS COMERCIALES CON CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE MONO

1. PRINCIPIO

La técnica utilizada fue la inmunofluorescencia indirecta y como sustrato se utilizó placas con cortes histológicos de páncreas de mono previamente preparadas comercialmente (Binding Site). El tejido reaccionó con los autoanticuerpos presentes en el suero del paciente y se unió a antígenos específicos de los cortes histológicos. Luego se utilizó un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia (conjugado), que es un conjugado anti- IgG humana, que es utilizado para unirse a las previas reacciones antígeno – anticuerpo entre componentes del sustrato y los anticuerpos del suero problema. La observación de fluorescencia específica en los Islotes del tejido pancreático, con el microscopio U.V., indica una prueba positiva.

2. MATERIAL

- a. Pipetas pasteur
- b. Cajas coplin
- c. Micropipetas graduables de 20- 200 uL, y de 100 – 1000 uL.
- d. Vaso de precipitados
- e. Papel absorbente
- f. Cubreobjetos
- g. Gráficas de patrones de inmunofluorescencia de los ICA's en los Islotes de páncreas.

h. Cámara húmeda.

3. EQUIPOS

- a. Microscopio con lámpara de U.V. (OLYMPUS BH2)
- b. Shaker (Δ 711)

4. REACTIVOS

- a. PBS – IFI 0.1M, pH 7.2 (10 X)
- b. Azul de Evans diluido (1/70)
- c. Glicerina tamponada
- d. Conjugado titulado y adsorbido

FLUORESCCEIN CONJUGATES
 Sheep Anti - Human IgG (gamma Chain)
 FITC (Monkey Adsorbed)
 THE BINDING SITE S.A.

- e. Control positivo de ICA's

Human Pancreatic I slet Cell Autoantibody
 (Autoanticuerpos células islote pancreático Hu)
 Control positive (tit 1/640)
 THE BINDING SITE S.A.

- f. Placas comerciales para el sustrato

MONKEY PÁNCREAS IFA SLIDES
 Páncreas de mono - portas
 THE BINDING SITE S.A.

5. PROCEDIMIENTO

- a. Se prepararon las diluciones con PBS – IFI de los controles positivos, negativos y ordenamos muestras (1/2).
- b. Se colocaron 50 uL de las diluciones sobre los cortes histológicos de páncreas de mono.
- c. Se incubó 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- d. Se llevó las placas a agitación suave al Shaker en cajas coplin con PBS-IFI 10X durante 5 minutos.
- e. Secamos las placas por detrás y por los bordes cuidadosamente con papel absorbente.
- f. Se preparó el volumen necesario del conjugado a un título de 1/120 con azul de Evans diluido en PBS-IFI 10X (3,5 mL de PBS con una gota de Azul de Evans).
- g. Se colocaron las placas en cámara húmeda y se le agregó 30 uL del conjugado titulado previamente.
- h. Se incubó 30 minutos en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente.
- i. Se llevó las placas a agitación suave en cajas coplin con PBS-IFI 10X durante 5 minutos.
- j. Se secó por fuera y se montaron las placas con glicerina tamponada y cubreobjetos evitando las burbujas.
- k. Se observó al microscopio U.V. con objetivo de 10X y 20X y evaluación tomando en cuenta los criterios de lectura.

L. CRITERIOS DE LECTURA.

El Instituto Nacional de Endocrinología (INE) en Cuba con el Dr Eduardo Cabrera Rode como Jefe del Departamento de Inmunología de la Diabetes quien apoyó de gran manera a la realización del presente trabajo, se destaca entre los Organismos internacionales como pionero en la detección de marcadores de riesgo de Diabetes hasta la fecha. El INE al igual que la Asociación Americana de Diabetes (ADA) consideran a un paciente ICA positivo (ICA+) cuando existen títulos de 10 unidades JDF (Juvenile Diabetes Federation) equivalentes a una dilución 1:2, valor que se asumió en el presente trabajo.

Consideramos una muestra positiva al observar fluorescencia en un 90 % de los islotes observados en toda la placa, después de un barrido completo y minucioso, con respecto a lo observado en el control positivo. Por el contrario consideramos una muestra negativa cuando no se observen islotes fluorescentes o bien estos presenten fluorescencia baja o no significativa, misma que podrá deberse a precipitaciones del conjugado. De igual forma para la evaluación por cruces de la fluorescencia se hará una comparación con la intensidad observada en los controles y los patrones que muestren estos, siendo positivas las muestras que presenten una intensidad de dos (++) a tres (+++) cruces. Por todos estos aspectos determinantes es que se utilizaron controles primarios gracias a los cuales también se realizará el control de calidad interno para la técnica de IFI para la búsqueda de ICA's.

M. ANÁLISIS Y EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.

Después de obtener todos los resultados, tanto de la evaluación clínica como de las pruebas clínicas, analizamos los datos con el programa SPSS 11.5.

VI. RESULTADOS.

A. ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO PRINCIPALES

1. OBESIDAD – INDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

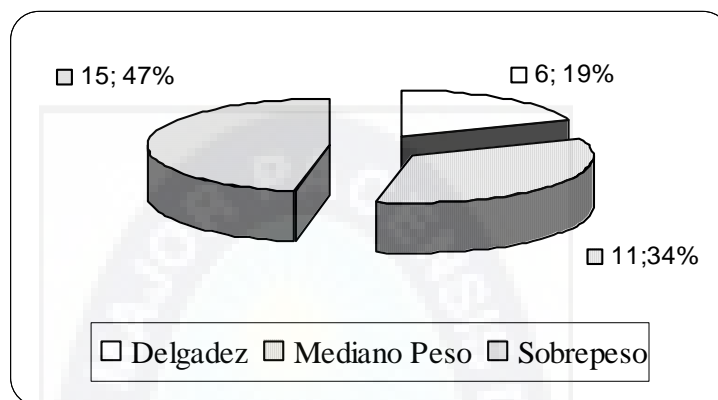


Figura 12. Evaluación de obesidad mediante IMC, cálculo que indica que el 47 % de los pacientes tienen sobrepeso y en ningún caso obesidad.

2. ACTIVIDAD FÍSICA

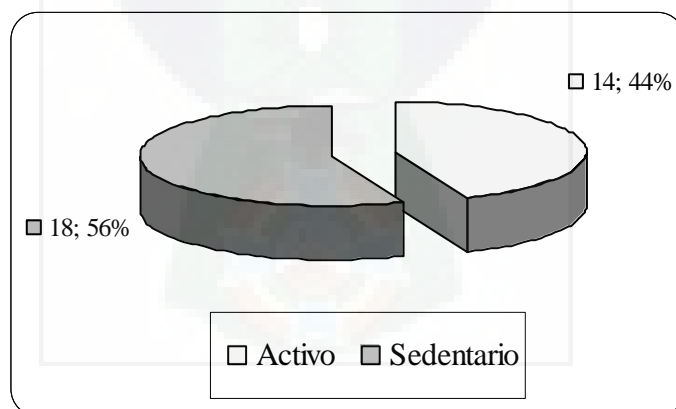


Figura 13. Actividad física de los familiares relacionados a los 3 tipos de diabetes, figura que marca la tendencia al sedentarismo.

3. DETERMINACIÓN DE LA GLICEMIA BASAL UTILIZANDO EL MÉTODO ENZIMÁTICO (CONTROL DE CALIDAD ANEXO 4)

Glicemia Basal	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Normal	35	87	87
Hiperglicemia	5	13	100
Total	40	100	

Tabla 10. *Frecuencia y porcentaje de los resultados globales de Glicemia Basal en la población en estudio.*

GLICEMIA BASAL	CLASIFICACIÓN				TOTAL	
	Pacientes		Familiares			
Normal	4	10%	31	77%	35	87%
Hiperglicemia	4	10%	1	3%	5	13%
TOTAL	8	20%	32	80%	40	100

Tabla 11. *Glicemia basal en Pacientes y Familiares relacionados a Diabetes.*

B. CLASIFICACIÓN DE INDIVIDUOS EN RIESGO ENTRE LOS FAMILIARES

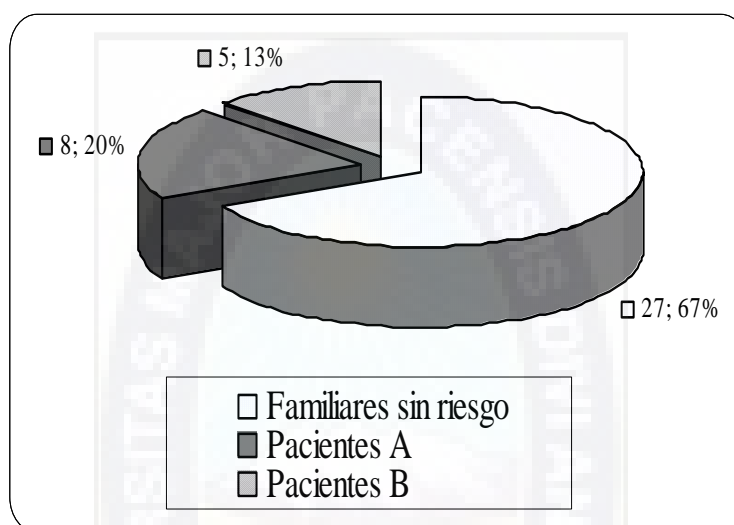


Figura 14. Evaluación clínica determinada por parámetros, (hiperglicemia, sobrepeso, sedentarismo y antecedentes patológicos bien definidos) indica que los familiares sin riesgo representaron el 67%, los Pacientes A (previamente diagnosticados) el 20% y los Pacientes B (con tres o más factores de riesgo) el 13 % restante.

C. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA's) Y TÍTULO DE ANTICUERPOS EN LAS MUESTRAS, PRE - ANÁLISIS DE ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE (ICA's).

TÍTULO DE ANA's	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Reactivo a título 1/160	2	5	5
Reactivo a título 1/80	10	25	30
Reactivo a título 1/40	13	33	63
Menor a 1/40	15	37	100
Total	40	100	100

Tabla 12. *Frecuencia y porcentaje del Título Anticuerpos Antinucleares en Pacientes y Familiares relacionados a Diabetes*

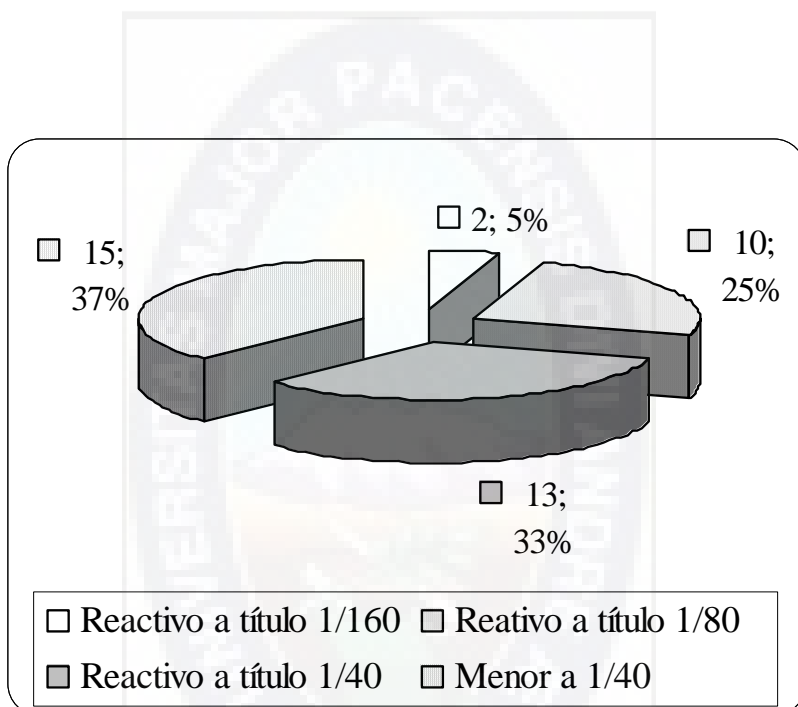


Figura 15. *Título Anticuerpos Antinucleares en Pacientes y Familiares relacionados a Diabetes. 63% de la población presentó reactividad desde 1/40 hasta 1/160, el 37% restante presentó un título menor a 1/40.*

D. ADSORCIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES DE LOS SUEROS

PRE TITULADOS PARA ANA's.

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

Tabla 13. *Frecuencia y porcentaje de muestras sometidas a adsorción y el título final alcanzado. El 100% de muestras presentaron un título de ANA's inferior a 1/40 (El 95% de las muestras no presentaron interferencia y el 5% podrían presentar interferencia por su alta reactividad -muestras cuyo título inicial fue de 1/160-).*

E. IDENTIFICACIÓN DE ICA's POR EL MÉTODO DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (IFI) UTILIZANDO CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE RATA.

1. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SUS FAMILIARES

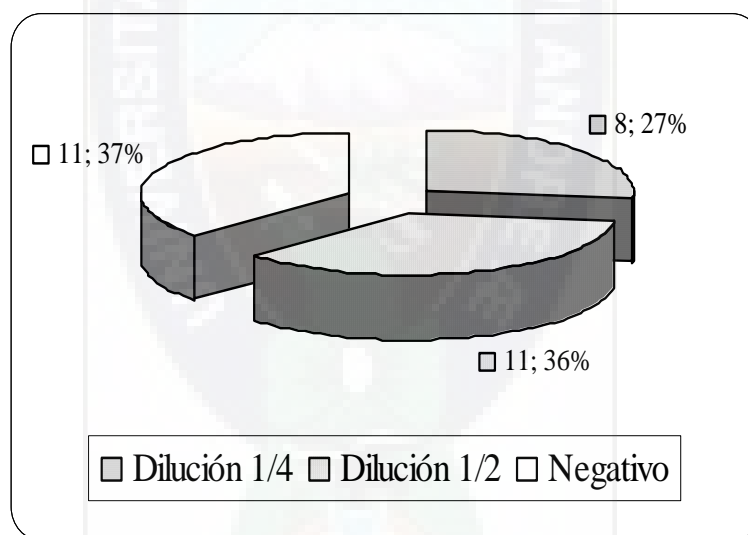


Figura 16. Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de rata, en pacientes con DM1 y sus familiares. Figura que refleja que un 60% son ICA+.

2. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y SUS FAMILIARES.

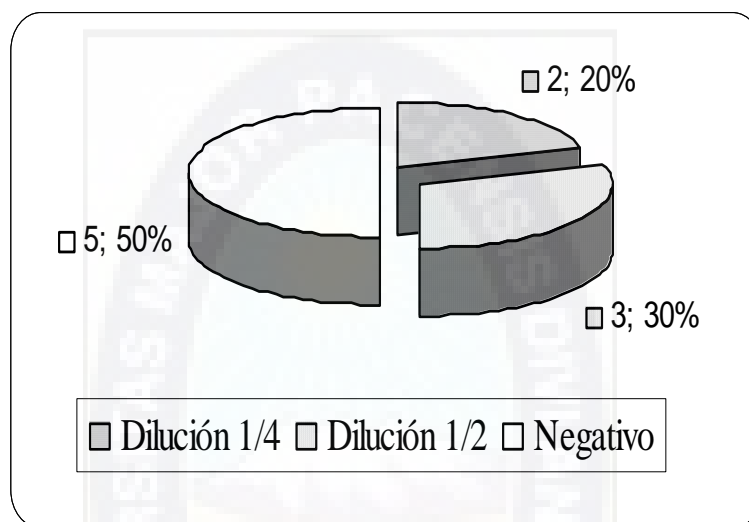


Figura 17. Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de rata, de pacientes con DM2 y sus familiares.

F. IDENTIFICACIÓN DE ICA's POR EL MÉTODO DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA UTILIZANDO CORTES HISTOLÓGICOS DE PÁNCREAS DE MONO.

1. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SUS FAMILIARES.

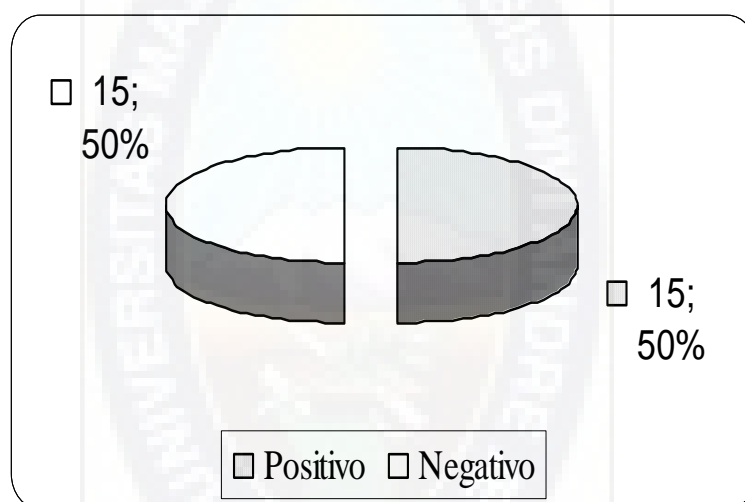


Figura 18. Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de mono, de pacientes con DMI y sus familiares. El 50% de las muestras resultaron positivas para ICA's.

2. PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y SUS FAMILIARES.

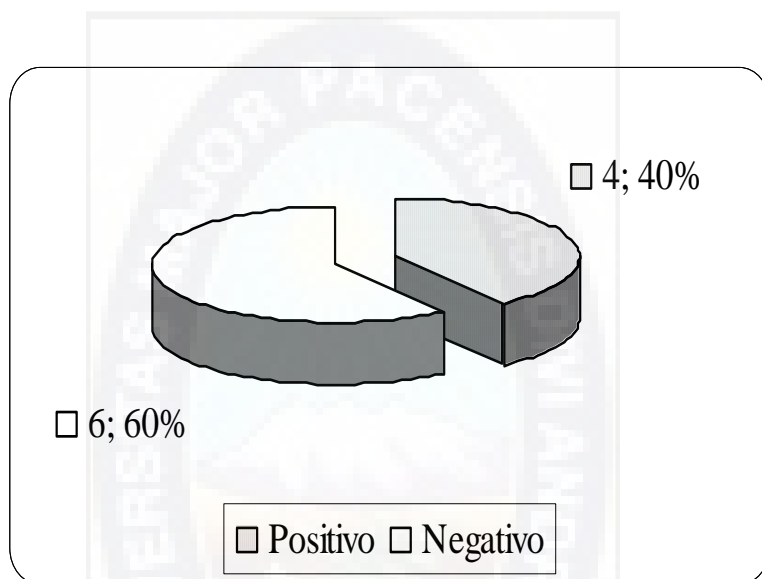


Figura 19. Resultados de la detección de Anticuerpos Contra Islote utilizando páncreas de mono, de pacientes con DM2 y sus familiares.

G. COMPARACIÓN ENTRE SUSTRATOS RATA / MONO

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

Tabla 14. *Comparación porcentual entre los resultados obtenidos con ambos sustratos (Rata Vs. Mono).*

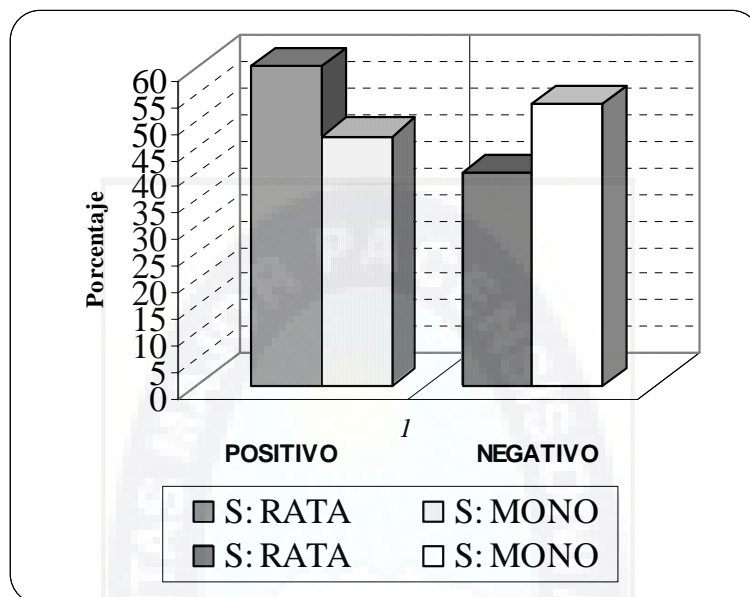


Figura 20. Comparación entre sustratos para la detección de ICA's mediante IFI. Utilizando páncreas de mono como sustrato, se obtuvo mayor cantidad de resultados Negativos y menor cantidad de resultados Positivos con respecto a los resultados obtenidos utilizando páncreas de rata.

VI. DISCUSION

- ❖ El número de pacientes para una Precisión del 5% y un Riesgo α correspondiente al 5%, es representativo ya que actualmente la prevalencia de Diabetes Mellitus en La Paz indica un 10 % de los cuales un 15 a 20% corresponde a Diabetes Mellitus tipo 1. Según estos datos el número mínimo de pacientes sería de 18. En nuestro caso incluimos 14 familias con un total de 40 personas todas con un antecedente familiar marcado de DM1. (ANEXO 10)
- ❖ Respecto a la actividad física de los familiares de los tres grupos, se observó que más de la mitad (56%) se catalogaron como pacientes sedentarios, quienes por general trabajan en oficinas y cuentan con medios de transporte inmediatos, reduciendo así el ejercicio físico al mínimo. Se ha considerado al ejercicio físico como la mejor forma de regularizar el metabolismo tanto de los hidratos de carbono como de los lípidos, por tanto también se considera la mejor forma de prevenir la obesidad y la alteración del metabolismo para que ésta se produzca y obviamente prevenir a la vez la Diabetes Mellitus; es por eso que analizamos este factor predisponente a la obesidad y por tanto a la diabetes.
- ❖ Respecto al análisis de los datos del examen físico general (edad, género, peso, talla) Existe un método simplificado para determinar el peso corporal ideal, si no se dispone de las tablas, pero se necesita una estimación de la contextura de la persona. Por lo tanto se sugiere para estudios posteriores tomar en cuenta la contextura del paciente ya que mediante el uso de éste método se obtendría una mayor aproximación al estado físico general del paciente en cuanto a su peso.

- ❖ Se sugiere a la vez tomar en cuenta datos más precisos, en la historia clínica. La edad en la que la enfermedad se desencadenó, los antecedentes de Diabetes Gestacional en embarazos previos y a la vez si se presentaron o no abortos previos, datos que consideramos importantes. Otro dato importante es tomar en cuenta la hipertensión midiendo la tensión arterial al momento de la toma de muestra. Además se sugiere una evaluación en cuanto a valores clínicos como ser los cuerpos cetónicos, triglicéridos y el HDL colesterol.
- ❖ Los valores de referencia tomados para la concentración de glucosa basal generalmente oscilan entre 70 y 110 mg/dL pero en el presente trabajo no se toman en cuenta los valores altos que caen dentro del rango de referencia, siendo éstos casos en los que se sugeriría determinar una glucosa post-prandial para analizar según los resultados si el metabolismo de la misma estaría alterado en alguna forma constituyendo un indicador de la presencia de una homeostasis glicémica alterada o imperfecta, mismas que no son condiciones clínicas, sino que son consideradas condiciones de riesgo, y como tal, sugieren una posibilidad (aunque no la certeza) del desarrollo futuro de DM2 y/o de enfermedad cardiovascular. Esto también se podría analizar y confirmar convenientemente con una curva de tolerancia a glucosa.
- ❖ Además se deben tomar en cuenta muchos aspectos inherentes a los valores elevados de glucosa, ya que *“Antes de enjuiciar como dentro los valores de referencia o patológicos un resultado de glicemia, debe indagarse si se trata de glicemia “verdadera” o no”* siendo la DM1 la causa más importante y más frecuente de hiperglicemia espontánea (en ayunas) y duradera. Tomemos también en cuenta que en fases precoces, una diabetes genuina puede dar valores todavía considerados dentro los de referencia de glicemia basal y frecuentemente se puede deducir la gravedad de la

diabetes hasta cierto punto. La hiperglicemia puede presentarse además en casos de infecciones agudas (hiperglicemia febril) y una hiperglicemia fisiológica transitoria se observa en excitaciones psíquicas, esfuerzos musculares, por exposición a baños calientes y a veces en le periodo menstrual.

- ❖ En cuanto a la evaluación clínica se observó que los **familiares sin riesgo** representaron un 67% de la población en estudio (individuos aparentemente sanos), quienes No presentaron indicios clínicos suficientes para un Diagnóstico de Diabetes, grupo que está conformado por Familiares Sanos relacionados a pacientes Diagnosticados con Diabetes. El grupo de “**Pacientes A**” representa un 20%, grupo que está conformado por pacientes previamente diagnosticados de diabetes y en tratamiento. El grupo de “**Pacientes B**” representa el 13% restante de la población total en estudio, grupo conformado por familiares detectándose varios factores de riesgo hacia una clínica indicadora de diabetes, esto tomando en cuenta tres parámetros: una glicemia elevada (normal alta) o hiperglicemia, un Índice de Masa corporal (IMC) que nos indique sobrepeso u obesidad y un ritmo de vida sedentario, poniendo además en claro que todos los casos presentaron antecedentes patológicos familiares de diabetes bien definidos.
- ❖ Para la detección y cuantificación del título de Anticuerpos Antinucleares en todas las muestras, se utilizó la técnica estandarizada de inmunofluorescencia indirecta (IFI) empleando células de cultivo BHK-21 como sustrato. Sabiendo que el título considerado como normal mediante esta técnica es de 1/40, 1/80 es catalogado como un título que debe confirmarse y el título 1/160 se considera positivo para ANA's (estado patológico de alguna dolencia reumática); se utilizaron las diluciones 1/40 , 1/80 y 1/160 de los sueros para verificar hasta cual de estos títulos la muestra era

reactiva; para finalmente proceder a la adsorción según el esquema de adsorción antes descrito.

- ❖ Los anticuerpos anti nucleares (ANA's) estuvieron presentes en el 100 % de las muestras, esto debido a que todos alcanzamos un título catalogado como presente en población sana que generalmente no excede el título de 1/40 por encontrarse estos anticuerpos dentro el grupo de “anticuerpos naturales”, pero lo relevante para nuestros fines de adsorción de los sueros, es conocer hasta qué título es reactiva la muestra. Por lo cual, un 63% de la población total en estudio, presentó reactividad desde 1/40 hasta 1/160 y por lo tanto debió ser sometida a la adsorción. El resto de las muestras (37%) resultó negativo (a título 1/40 considerado como “anticuerpos naturales”), se consideró a los ANA's como interferentes desde un título igual o mayor a 1/30, por lo cual, se realizó la adsorción también a éstos sueros considerados de título bajo.
- ❖ Según las pruebas previas a la obtención de núcleos, inicialmente sólo se logró una afectación a nivel de la membrana citoplasmática en la línea de células BHK-21, logrando la permeabilización y fusión a la membrana nuclear pero no adecuada para los fines de adsorción, por lo cual se procedió a la obtención de núcleos más grandes de tejido hepático obteniendo en pruebas repetitivas la eliminación en los sueros con ANA's positivos desde título 1/40 y bajar el título de los sueros fuertemente positivos a títulos que no interfieran en la detección de anticuerpos contra islote ya que la interferencia de éstos era notable.
- ❖ Respecto a la observación microscópica, los criterios de lectura de patrones inmunofluorescentes para la detección de ICA's, al igual que la mayoría de las técnicas de inmunofluorescencia, por ser estas semicuantitativas, y principalmente por basarse principalmente en una apreciación subjetiva del profesional, se catalogó como positiva

una muestra cuando se detectó fluorescencia en un 90 % de los islotes observados en toda la placa después de un barrido completo, esto respecto a los controles tanto positivos como negativos de cada uno de los sustratos (páncreas de mono y páncreas de rata). El control de calidad interno para la técnica de Inmunofluorescencia se realizó gracias a los controles negativos y positivos primarios (sueros purificados comerciales). Cabe mencionar que los patrones fluorescencia fueron diferentes para cada uno de los sustratos siendo más definida la fluorescencia en el páncreas de mono y más distorsionada que en el páncreas de rata debido a la calidad del corte histológico. La intensidad – por cruces - de fluorescencia también fue tomada en cuenta para considerar un resultado como positivo o negativo frente a los controles, asumiendo como positiva la reactividad de una muestra cuando presentó una intensidad representativa (de dos a tres cruces) con respecto a los controles. Se presentó una baja fluorescencia (una cruz) sólo en las muestras que presentaron interferentes (muestras con título pre-adsorción de ANA's de 1/160), mismas que por su intensidad baja se catalogaron como negativas.

- ❖ En La Habana – Cuba, en el Instituto Nacional de Endocrinología se considera a un paciente ICA positivo (ICA+), cuando existen títulos de 10 unidades JDF, estas unidades, en el presente trabajo con el uso de páncreas de mono, equivalen a una dilución 1:2 y además se utiliza, para la técnica de IFI, páncreas humano de grupo O, que se considera más sensible que el de rata o mono y finalmente, los sueros se diluyen 1:2 y se incuban a 30 minutos a temperatura ambiente o toda la noche con un inhibidor de proteasa generado en el Universidad de La Habana, con la incubación de toda la noche se obtiene mayor sensibilidad. Toda esta información se obtuvo gracias al apoyo del Dr. C. Eduardo Cabrera Rode Jefe del Departamento de la Diabetes,

consideraciones que además de ayudarnos al análisis de los datos obtenidos, nos dan pautas para dar énfasis a la prevención de la Diabetes.

- ❖ Los anticuerpos contra los islotes se detectan antes de desarrollar la enfermedad ya que éstos están en mayor concentración 5 a 10 años antes de esto, lo cual estaría en relación con los resultados ya que ninguno de los paciente diagnosticados previamente y con tratamiento (DM1) se detectó la presencia de ICA's según los resultados obtenidos mediante el uso de páncreas de mono (Kit Comercial - Binding site). Y como ya indicamos consideramos como título ICA+ (positivo) a partir de 1/2; por lo cual un 60 % resultó positivo siendo el 85% de estos pacientes niños familiares de pacientes ya diagnosticados con DM1, lo cual es muy significativo por existir una relación con la aparición temprana de un título alto de ICA's, además de la concordancia con signos clínicos característicos.
- ❖ Desarrollamos e instauramos la técnica de fijación de los cortes histológicos (páncreas de rata) a las placas portaobjetos debido a las dificultades que se tuvieron para mantener intactos los cortes ya que con los lavados de las placas los cortes se desprendían y se deterioraban, y principalmente tomando en cuenta que los ICA's son lábiles y susceptibles a cambios químicos en el caso de una fijación química (fijación con Metanol-Acetona). Sin éste paso previo importante, el tejido se eliminaba y/o deterioraba fácilmente lo cual repercutía gravemente a la hora de la lectura en el microscopio de luz U.V. Cabe añadir que algunos autores sugieren que para evitar fluorescencia inespecífica se puede utilizar Tween 20 (al 0.05%) que no se aplicó a ninguno de los sustratos, por haber obtenido resultados totalmente negativos en todos los casos de los pacientes ya diagnosticados en pruebas previas.

- ❖ Desarrollamos e instauramos la técnica de obtención de núcleos purificados en suspensión paso imprescindible para la adsorción de anticuerpos antinucleares de los sueros de los pacientes, pre análisis de ICA's.
- ❖ Para el desarrollo del presente trabajo, fue imposible tomar en cuenta los datos obtenidos en el trabajo de referencia a cargo de la Lic. Susan De La Barra, llevado a cabo en el año 2000, ya que se incluyeron demasiados factores de error, entre ellos; el uso de un conjugado no adsorbido, la falta de una técnica inocua para anticuerpos de fijación del tejido a las placas y principalmente la interferencia de Anticuerpos antinucleares para lo cual la estandarización de una técnica era indispensable. Es por eso que el desarrollo técnico y teórico del presente trabajo, constituye un gran avance dentro de los estudios preliminares en cuanto a Diabetes en nuestro medio se refiere.
- ❖ No se encontró una relación específica en el factor genético de la susceptibilidad hacia la diabetes, ya que por ejemplo; si existe un paciente con DM2 en una familia, la susceptibilidad hacia la enfermedad puede heredarse mediante las leyes Mendelianas, pero lo que no es predecible de heredar, es el tipo de Diabetes que se va a desencadenar, pudiendo ser ésta de DM2, y, posteriormente darse un viraje hacia la DM1 o bien heredarse directamente una DM1. Esta falta de relación puede deberse – según a estudios recientes – al impacto de la nutrición fetal en la salud adulta teoría enunciada por David Barrer, que indica “El viejo modelo de enfermedades degenerativas adultas estaba basado en una interacción entre genes y el medio ambiente en el adulto. El nuevo modelo que se está creando incluye una programación ambiental en la vida fetal y la infancia” dicho de otra manera, un feto desnutrido se ve obligado a desviar sangre rica en nutrientes hacia sus órganos vitales más importantes (el cerebro y corazón) privando a otras partes del alimento que los necesitan entre ellas

el hígado, el páncreas o los riñones, lo cual desencadena trastornos como hipertensión, obesidad, fallas renales y Diabetes en la posteridad. Siendo que los infantes que nacen de madres obesas tienen más probabilidades de nacer grandes y sufran obesidad y diabetes en su edad adulta esto se debe a la incapacidad de la madre para regular los niveles de insulina y azúcar en la sangre, que llegan a la placenta, afectando el páncreas del feto, reduciendo su capacidad de reconocer y responder a la insulina. Teoría que además explicaría la variabilidad de datos acerca de la glicemia.

- ❖ Es importante denotar que las células acinares presentan hemaglutininas, es por eso que distintos autores sugieren utilizar cortes histológicos de páncreas humano, pero de tipo O ya que las hemaglutininas producen interferencia inespecífica importante para leer los resultados en el microscopio de luz U.V. Por lo cual estas hemaglutininas podrían causar una fluorescencia inespecífica; además de la presencia de anticuerpos antinucleares, lo cual explicaría posibles resultados falsos positivos, siendo ésta una desventaja más de éste sustrato (páncreas de rata).
- ❖ El análisis de resultados en cuanto a la detección de ICA's con ambos sustratos, mostró que el 23% de los casos coincidieron como negativos, y un 30% como positivos.
- ❖ Se presentaron diferentes inconvenientes para la evaluación de los resultados ya que la estimación de la sensibilidad y especificidad de cada sustrato era sustancial, no se asumieron los resultados mediante el uso del Kit comercial como referencia por tratarse de una técnica basada en la subjetividad del operador al momento de reconocer la fluorescencia y sus patrones en cada placa. A la vez la presencia de Anticuerpos Contra Islote es considerada como factor de riesgo y no como marcador definitivo (menos por tratarse de un solo marcador) para predecir el desarrollo de

Diabetes Mellitus Tipo 1. Por esto, solo podemos evaluar los resultados obtenidos con otros factores de riesgo que pueden ser indicativos de Diabetes, datos que pudimos verificar mediante la historia clínica de cada paciente. Consideramos como factor de riesgo para Diabetes Mellitus los antecedentes patológicos familiares, el sobrepeso obtenido mediante el IMC, niveles altos de glicemia basal, y el sedentarismo. Si clasificamos a toda nuestra población en pacientes Sanos (pacientes con uno o dos factores de riesgo) y pacientes Enfermos (pacientes con tres o más factores de riesgo) podríamos evaluar la Sensibilidad y Especificidad obteniendo los siguientes datos cuyo cálculo se detalla en el ANEXO 9. La estimación de estos dos parámetros señalan una clara diferencia entre ambos sustratos siendo el más sensible y específico los cortes histológicos de páncreas de mono (Binding Site).

	ICA's (kit)	ICAS's (rata)
SENSIBILIDAD	69.2 %	38.5 %
ESPECIFICIDAD	63.0 %	29.6 %

Tabla 15. *Comparación entre ambos sustratos en cuanto a sensibilidad y especificidad.*

VII. CONCLUSIONES.

- ❖ Se identificó Anticuerpos Contra Islote de Páncreas (ICA's) en pacientes con Diabetes Mellitus y en sus familiares de primer y segundo grado, mediante Inmunofluorescencia Indirecta, comparando entre un sustrato preparado en el laboratorio y otro preparado comercialmente. Técnica útil como “Prueba de Tamizaje”, por lo cual los resultados obtenidos deberán confirmarse con otros marcadores y técnicas más sensibles.
- ❖ Se determinó el título de anticuerpos antinucleares en todas las muestras, ya que todas mostraron un título mínimo de 1/40.
- ❖ Mediante nuestra técnica estandarizada de obtención de núcleos purificados en suspensión, se obtienen aproximadamente 10 mL de núcleos en suspensión en una concentración de 3×10^6 núcleos/mL, por cada 10 a 15 g de tejido empleado.
- ❖ Se estandarizó la técnica de adsorción de sueros que presenten anticuerpos antinucleares positivos (ANA+) mediante los núcleos purificados en solución.
- ❖ Se obtuvieron buenos cortes a congelación en tejido glandular de páncreas de rata para utilizarlo como sustrato “cacero” para la detección de ICA's mediante IFI.
- ❖ Se determinó la glicemia basal en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 y en sus familiares.

- ❖ La evaluación física realizada mediante los parámetros descritos para la identificación de factores de riesgo incluyendo a las pruebas de rutina indicadoras de diabetes, estuvieron en relación con la presencia de ICA's tanto en pacientes como en sus familiares genéticamente predispuestos. Respecto a las pruebas de rutina, la determinación de los valores de glucosa sérica en ayunas tiene un valor determinante en el presente trabajo, ya que, aunque no se realizó ni la cuantificación de glicemia post-prandial, ni la curva de tolerancia a glucosa, nos sirve como indicador del metabolismo alterado de los hidratos de Carbono.
- ❖ La detección de anticuerpos antinucleares fue imprescindible e importante debido a que éstos mostraron ser interferentes para la técnica de IFI en la detección de ICA's, por lo tanto se debe hacer una adsorción previa, siendo una muy buena alternativa la técnica estandarizada y desarrollada en el presente trabajo.
- ❖ En cuanto las ventajas y desventajas de la utilización del páncreas de rata y de mono como sustrato, una desventaja innegable de la utilización de páncreas de rata, recae sobre el tiempo que toma la técnica completa, desde la obtención del órgano, sus cortes en el criostato, su fijación a placas portaobjetos, y la técnica de IFI propiamente dicha, siendo que para la técnica del kit comercial se nos facilitó toda ésta etapa previa.
- ❖ Se consideran sujetos ICA positivos (ICA+) a familiares de primer grado de diabéticos cuando en dos ocasiones consecutivas dos sueros distintos de la misma persona los ICA's persisten, por lo tanto, los resultados de IFI en páncreas de mono del presente trabajo no son, definitivos. La importancia clínica en detectar uno o más auto

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



VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. ABBAS Abul K. Inmunología celular y molecular. McGraw Hill. 3 ed . Madrid – España. 1999. 551p.
2. BALCELLS Gorina Alfonso. La clínica y el Laboratorio. Editorial Masson. 17 ed. Barcelona España. 1997. 694p.
3. EL MANUAL MERK, Editorial Harcourt. 10 ed. Edición del Centenario. 2000. 2540p.
4. EUROPEAN NIDDM POLICY GROUP. Manual para el tratamiento de la Diabetes Mellitus No Insulinodependiente (DMNID). OMS/FID. 2 ed. Barcelona España. 1993. 26p.
5. FARRERAS Valentí y col. Medicina interna. Mosby Doyma. 23 ed. Madrid – España. 1995. 2.v. 2867p.
6. GT LABORATORIO. Reactivos para uso diagnóstico. Rosario Argentina. 2000. 94p.
7. GUYTON, Arthur. Fisiología y Fisiopatología, Editorial Mc Graw- Hill Interamericana. 5 ed. México DF. 1994. 1177p.
8. HAM, Arthur. Tratado de Histología. Nueva Editorial Sudamericana S.A de C.V. 6 ed. 1970. p.1365.
9. LEESON Thomas S. / LEESON C. Roland / PAPARO Anthony A. Texto Atlas de Histología. Nueva editorial Interamericana de McGraw-Hill. 1 ed. México DF. 1990. 741p.
10. MASSÓ J. Guardia / TEIXIDOR J. Rodés, Medicina Interna , Editorial Massón Multimedia, 3 ed. Barcelona – España. 1997, 3579p. (CD)

11. MARGNI R. A. Inmunología e Inmunoquímica. Nueva Editorial Médica Panamericana. 4ed. Buenos Aires – Argentina. 1990. 693p.
12. MINISTERIO DE PREVISIÓN SOCIAL Y SALUD PUBLICA . Unidad Sanitaria La Paz. Guía Práctica de Alimentación para Diabéticos. Programa de ayuda al diabético BOLIVEN. La Paz Bolivia. 1999, 38p.
13. MINISTERIO DE SALUD. Gobierno de Chile. Manual para educadores en Diabetes Mellitus. Programa de Educación en diabetes. OPS Oficina Sanitaria Panamericana Oficina Regional de la OMS. Santiago de Chile – Chile. 2001. 157p.
14. MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES. Bolivia. Manual del manejo técnico de la alimentación para la Diabetes: para el uso del personal de salud / Ministerio de Salud y Deportes; Hospital San Gabriel; Organización Panamericana de la Salud.- La Paz: OPS/OMS, 2004. 46 p.
15. MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES / Organización Panamericana de la Salud, Panel “ Obesidad y Diabetes ”. La Paz – Bolivia. Salón de Eventos Colonial. Lunes 15 de Noviembre 2004.
16. MURRAY Robert K. Bioquímica de Harper. Editorial el Manual Moderno. 23 ed. México, D.F. 1994. 961p.
17. PALOMO G. Iván y col. Fundamentos de Inmunología. Editorial Universidad de Talca. Talca – Chile. 1998. 727p.
18. ROBBINS Ramzi . Patología estructural y funcional. Mc Graw · Hill. 5 ed. Barcelona – España. 1995. Tomo II. 557p.
19. ROIT IVAN et al Inmunología, Editorial Harcourt. 5 ed. Madrid- España. 2000.p.423
20. ROSE K. Noel, et al. Manual of clinical Laboratory Immunology, American society for Microbiology, 5.ed., Washington D.C: USA 1997, 890p.

21. STITES Daniel P, Fundamentos de Inmunología básica y clínica. 9 ed. México D.F.El manual Moderno, 1999. 1099p.
22. TÉLLEZ W. y col. Guía de prácticas Bioquímica Clínica, Universidad Mayor de San Andrés – FCFB, La Paz – Bolivia. 1999. p.117.
23. TESTUT. L / LATARJET A., Compendio de anatomía descriptiva. Salvat editores, S.A. 22 ed. Barcelona – España .1976. 766 p.
24. UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS, Facultad de Medicina, Texto de Semiología Médica, La Paz Bolivia. 1986. 197 p.
25. WIENER LAB GROUP, Vademécum 2001/02, Rosario – Argentina, 2001. 300p.

PUBLICACIONES Y ARTÍCULOS

26. ALBA A. et.al, “ Diabetes mellitus tipo 1: autoinmunidad frente a la célula beta”, ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN, Enero 2004, Vol. 51 N° 3. p. 121 – 125.
27. AKIHISA Imagawa et.al “A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies”, THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, Febrero 2000, Vol.342 N° 5. p. 301 – 307.
28. ARIAS, Manuel et. al. “Utilidad diagnóstica de los anticuerpos antiglutamato decarboxilasa en el síndrome de la persona rígida (stiff-man síndrome”, MEDICINA CLÍNICA .Sábado 21 Marzo 1998. Volumen 110 - Número 10 p. 378 –381.
29. BOITARD Christian / HOMO-DELCARCHE Françoise. “ Autoimmune diabetes: The role of the islets of Langerhans” , VIEW POINT IMMUNOLOGY TODAY. October 1996. Vol. 17 N° 10. p. 456 – 462.

30. BORG H. et al. “High Levels of Antigen-Specific Islet Antibodies Predict Future b-Cell Failure in Patients with Onset of Diabetes in Adult Age”, THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM. 2001. Vol. 86. Nº 7. p. 3032 – 3038.
31. BRUINING G.L, et. al. “Ten- year follow- up study of Islet-cell antibodies and Childhood diabetes mellitus. LANCET. 1989. Vol.19. p.1100-1103.
32. CABRERA Rode Eduardo, et. al. Instituto Nacional de Endocrinología “Características de los anticuerpos anti-islotos del adulto, diabético tipo I de reciente diagnóstico, familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 y diabetes gestacional” REVISTA CUBANA ENDOCRINOLOGÍA. 1999. Vol. 2. Nº 10. p. 85-97.
33. CABRERA Rode Eduardo et.al. Instituto Nacional de Endocrinología. “Diabetes Autoinmune del adulto en diabéticos tipo 2: frecuencia y características”, REVISTA CUBANA ENDOCRINOLOGÍA. Julio 2001. Vol 1. Nº12 . p. 22 -34.
34. CABRERA Rode Eduardo y col. “Type 1 diabetes islet associated antibodies in subjects infected by echovirus 16” , REVISTA DIABETOLOGÍA; 2003, Nº 46, p. 1348 – 1353.
35. CONGEL Ignacio, Puesta al Día. “Diabetes y enfermedades cardiovasculares; Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus”. REVISTA ESPAÑOLA DE CARDIOLOGÍA, Miércoles 1 Mayo 2002. Volumen 55 - Número 05 p. 528 – 538
36. CORCHADO Santiago. “Clasificación y diagnóstico de la diabetes” ; MEDICINE REVISIONES Y ACTUALIZACIONES. Servicio de Endocrinología Hospital Universitario La Paz – Madrid., Jueves 15 Junio 2000. Volumen 08 - Número 19 p. 985 – 990.
37. DE LA BARRA Zeballos, Susan, “Identificación de anticuerpos anticélulas de los islotes del páncreas (ICAs) en pacientes con diabetes Mellitus tipo 1 y en familiares

- de primer grado de los mismos por inmunofluorescencia indirecta con sustrato de páncreas de rata”, Tesina para optar al título de Licenciatura. UMSA – FCFB, La Paz Bolivia , 2000.
38. DIAZ Horta Oscar/ CABRERA Rode Eduardo. “ Estrategias a seguir en la prevención primaria de Diabetes Mellitus Insulinodependiente”, REVISTA CUBANA – ENDOCRINOLOGÍA, Febrero 1996. Vol. 7. Nº 1. p. 12 – 25.
39. Di CESARE E. y col. “Serum Anti-p 53 autoantibodies in Patients with type 1 Diabetes”, ANNALS OF CLINICAL & LABORATORY SCIENCE. 2001. Vol. 31. Nº 3.
40. FEDERACIÓN BOLIVIANA DE DIABETES. LA PAZ. “Día Mundial de la Diabetes 2004: Combate la Obesidad Prevén la Diabetes”. Boletín Informativo Año 1. Nº 2. Noviembre 2004.
41. GARCÍA Rodríguez Carmiña Heidy, “Receptores Estrogénicos: Valoración de procedimientos para diagnóstico precoz de Cáncer de Mama”, UMSA – FCFB, La Paz Bolivia. 1998. 174p.
42. GARCÍA Miriam P./ Ho HYON Sung. “Autoinmunidad de las células beta del páncreas y riesgo de progresión a diabetes tipo 1”. ACTUALIZACIÓN Y AVANCES EN INVESTIGACIÓN. Diciembre 2001. Vol. 21. Nº 2-3. p. 49 – 53.
43. GRAHAM J. y col. “Genetic effects on Age dependent onset and Islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes”, DIABETES. Mayo 2002. Vol. 51. p. 1346 – 1355.
44. GROSS Jorge y col. “Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico” ARQUIVOS BRASILEIROS DE ENDOCRINOLOGIA & METABOLOGIA. Federação Brasileira de Sociedades de Endocrinologia e Metabologia. Febrero 2004. Vol. Nº 46.

45. GÜLBU I. et al , “Comparison of Indirect Immunofluorescence and Peroxidase - Labeled Protein a Methods in Insulin – dependent Diabetes Mellitus”. JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM. 1999. Vol . 12 N° 4. p. 224 – 229.
46. KUPILA Antti. et.al. “Genetic Risk Determines the Emergence of Diabetes-Associated Autoantibodies in Young Children”, DIABETES, Marzo 2002, Vol.51, p. 646 - 652.
47. KEOWN Paul, “Trasplante de Células de Islotes y Páncreas” Hospital General de Vancouver, UNIVERSIDAD DE BRITISH COLUMBIA. 2002. Vol. 5. N° 2.
48. LIPING Yu. “Expression of GAD65 and Islet Cell Antibody (ICA512) Autoantibodies Among Cytoplasmic ICA+ Relatives Is Associated With Eligibility for the Diabetes Prevention Trial-Type 1”. DIABETES. Agosto 2001. Vol. 50. p. 1735 – 1740.
49. MAHMOOD Vessal et. al, “Effects of Teucrium polium on oral glucose Tolerance Test, Regeneration of Pancreatic Islets and activity of Hepatic Glucokinase in Diabetic Rats”. ARCHIVES OF IRANIAN MEDICINE. January 2003. Vol.6. N°1. p.35 – 40.
50. MIMBACAS A./ GONZALES S./H./POGGIO R. , “Alelos HLA-DQ y diabetes mellitus tipo1 en Uruguay” , SOCIEDAD MÉDICA URUGUAYA (SMU) .Noviembre 1998, Vol. 3 N° 4 . p. 326 – 334.
51. NORRIS J. y col. “Timing of initial cereal Exposure in Infancy and Risk of Islet Autoimmunity”, JAMA. Octubre 2003. Vol. 290. N° 13. p. 1713 – 1720.
52. OLSON M. et. al. “Prolonged incubation in the two-colour immunofluorescence test increases the prevalence and titres of islet cell antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus”. DIABETOLOGIA. Mayo 1997. Vol. 30 N° 5. p. 327 – 332.
53. PANAGLOTOPOULOS C./ QIN H. / TAN R./ VERCHERE B. “ Identification of a Beta – Cell – Specific HLA Class I Restricted Epitope in Type 1 Diabetes”, American

- Diabetes Asociation, Rapid publication, DIABETES, November 2003, Vol.52 N° 6. p. 2647 – 2652.
54. PEREZ BRAVO Francisco et. al. “Auto-antibody levels and history of breast-feeding in type 1 diabetic patients”, REVISTA MÉDICA DE CHILE. Junio 2001, Vol. 129 N° 6.
55. RUPPEL Shell Ellen, “Diseños Interiores”. DISCOVER EN ESPAÑOL. Enero 2003. Vol. 7. N° 1. p. 30 – 35.
56. RISTOW Michael et.al. “Fratxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of Beta cell mass”. THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, August 2003, Vol. 112. N° 4. p.527 – 534.
57. SALAMA Benarroch Isacc / SANCHEZ Gustavo. “Factores de riesgo y complicaciones crónicas en el diagnóstico reciente de la Diabetes tipo 2”. REVISTA CUBANA – ENDOCRINOLOGÍA. 2001. Vol.12. N° 2 . p. 76 – 81.
58. SABBAAH E. y col. “Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood – and Adult onset type 1 Diabetes”, DIABETES CARE; September 2000, Vol. 23, N° 9, p. 1326 – 1332.
59. SANCHEZ Lilia y SALINAS María Teresa., “Inmunogenética de la Diabetes Mellitus tipo I en población mestiza boliviana”, SELADIS - Facultad de Ciencias Farmacéuticas y bioquímicas y Hospital Obrero CNS – Medicina Interna y Endocrinología. 1997.
60. SÁNCHEZ Lilia y SALINAS María Teresa., “Un modelo de aplicación de la medicina preventiva: Diabetes Mellitus Insulino Dependiente”, SELADIS - Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas y Hospital Obrero CNS – Medicina Interna y Endocrinología. 1997.

61. TAKAO TANIGUCHI et al. "Association of Rapid-Onset Type 1 Diabetes and Clinical Acute Pancreatitis Positive for Autoantibodies to the Exocrine Pancreas". DIABETES CARE. Diciembre 2001. Vol. 24. N° 12. p. 2156 – 2164.
62. VESSAL M. y col. "Effects of Teucrium polium on Oral Glucose Intolerance Test, Regeneration of pancreatic islets and activity of hepatic glucokinase in Diabetic Rats", IRANIAN MEDICINE. Enero 2003. Vol. 6. N° 1. p. 35 – 39.
63. ZIEGLER A. y col. "Early Infant Feeding an Risk of Developing Type 1 Diabetes – Associated Autoantibodies". JAMA. Octubre 2003. Vol. 290, N° 13, p. 1721 – 1728.

CONSULTA EN INTERNET.

- I. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001938.htm>
- II. http://www.adolescentesxlavida.com.ar/a&b_peso.htm
- III. <http://www.continents.com/diabetes11.htm>
- IV. <http://www.rajeun.net/aadiet.html>
- V. <http://www.meddean.luc.edu/.../HistoImages/hl9-28.jpg>
- VI. http://www.medscape.com/viewarticle/436542_print
- VII. <http://www.nlm.nih.gov/.../ency/imagepages/8883.htm>
- VIII. <http://www.endo-world.com/pancreas.htm>
- IX. <http://www.pathology.mc.duke.edu/.../pancreas.jpg>
- X. <http://www.nejm.org/content/2000/0342/0013/0905.asp>
- XI. <http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1998v3/art4.htm>
- XII. <http://www.sat.org.ar/>
- XIII. http://www.iqb.es/D_Mellitus/Paciente/Manual1/cap03.htm

- XIV. <http://www.iqb.es/.../Paciente/Manual1/Manual10.gif>
- XV. http://www.viatusalud_com diagnostico.htm
- XVI. <http://www.enfermedades-raras.org/es/default.htm>
- XVII. <http://www.eurordis.org>
- XVIII. http://iier.isciii.es/er/prg/er_bus2.asp?cod_enf=2919
- XIX. <http://www.resistenciainsulina.com/rinsulina/resistencia/mod2/modulo2.htm>
- XX. http://www.lilly-argentina.com/trabclin/lispro_08.gif
- XXI. <http://www.sitiomedico.com.uy/artnac/2002/5/29.htm>
- XXII. http://www.diabetesaldia.com/todo_sobre_la_diabetes/bases_del_tratamiento/doc_tora.jpg&imgrefurl
- XXIII. http://www.diabetesaldia.com/todo_sobre_la_diabetes/bases_del_tratamiento.htm
- XXIV. <http://www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/diabetes/prodinsu.htm>
- XXV. http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas.htm
- XXVI. <http://mrw2.interscience.wiley.com>
- XXVII. <http://rochediagnostics.db.clasificación.htm>

ANEXO N°1

5. GRUPO N° 1: PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SUS FAMILIARES.

PACIENTES RELACIONADOS A DMI						
	N°	CÓDIGO	GÉNERO	EDAD (Años)	PARENTESCO	
					RELACIÓN	GRADO
PACIENTES	1	04012	Femenino	50	Hija	1er.grado
	2	07012	Femenino	27	Hermana	1er.grado
	3	07022	Femenino	23	Hermana	1er.grado
	4	09012	Femenino	42	Hija	1er.grado
	5	12022	Femenino	45	Hija	1er.grado
	6	14021	Masculino	46	Hijo	1er.grado
	7	03022	Femenino	85		
	8	10012	Femenino	65		
FAMILIARES	9	02011	Masculino	12	Hijo	1er.grado
	10	04021	Masculino	14	Hijo y Nieto	1er.y 2do.
	11	05012	Femenino	41	Hija	1er.grado
	12	05021	Masculino	44	Hijo	1er.grado
	13	05032	Femenino	39	Hija	1er.grado
	14	06012	Femenino	11	Hija	1er.grado
	15	06021	Masculino	23	Hijo	1er.grado
	16	07032	Femenino	21	Hermana	1er.grado
	17	07041	Masculino	15	Hermano	1er.grado
	18	09021	Masculino	12	Hijo y Nieto	1er. y 2do.
	19	11012	Femenino	55	Hermana	1er.grado
	20	12012	Femenino	36	Hija	1er.grado
	21	12032	Femenino	26	Hija y Nieta	1er. y 2do.
	22	13012	Femenino	34	Hija	1er.grado
	23	13022	Femenino	44	Hija	1er.grado
	24	14011	Masculino	34	Hijo	1er.grado
	25	14032	Femenino	26	Hija y Nieta	1er. y 2do.
	26	03011	Masculino	61	Hijo	1er.grado
	27	10022	Femenino	43	Hija	1er.grado
	28	10032	Femenino	14	Nieta	2do.grado
	29	10042	Femenino	14	Nieta	2do.grado
	30	10052	Femenino	12	Nieta	2do.grado

6. GRUPO N° 2: PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y SUS FAMILIARES

PACIENTES RELACIONADOS A DM2						
	N°	CODIGO	SEXO	EDAD	PARENTESCO	
					RELACIÓN	GRADO
FAMILIARES	1	01011	Masculino	28	Hijo	1er.grado
	2	01022	Femenino	26	Hija	1er.grado
	3	01031	Masculino	20	Hijo	1er.grado
	4	01042	Femenino	18	Hija	1er.grado
	5	08011	Masculino	30	Hijo	1er.grado
	6	08021	Masculino	29	Hijo	1er.grado
	7	08032	Femenino	28	Hija	1er.grado
	8	08042	Femenino	20	Hija	1er.grado
	9	11022	Femenino	30	Hija	1er.grado
	10	11032	Femenino	11	Nieta	1er.grado

ANEXO N° 2
FORMATO DE HISTORIA CLÍNICA

HISTORIA CLÍNICA N°.

FILIACIÓN.

CODIGO:	
NOMBRE	
LUGAR Y FECHA DE NAC.	
EDAD ACTUAL	
GENERO	
C.I.	
OCUPACIÓN ACTUAL	
TELEFONO	DOMICILIO CELULAR OFICINA
ESTADO CIVIL	
DIRECCIÓN ACTUAL	
INSTITUCIÓN ADMIN.TX.	
PESO	
TALLA	
IMC	

ANTECEDENTES FAMILIARES.

FAMILIARES	DIABETICO	NO DIABETICO	VIVO	MUERTO	CAUSAS
PADRE					
MADRE					
HIJO (A)					
HERMANOS					
ABUELO PATERNO					
ABUELA PATERNA					
ABUELO MATERNO					
ABUELA MATERNA					

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS FAMILIARES.

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS.

N° DE HIJOS VIVOS:

MOTIVO DE CONSULTA FRECUENTE:

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS.

DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO: AÑO:

PARÁMETROS DE DIAGNOSTICO.

MEDICO TRATANTE:

ESPECIALIDAD:

FECHA DE SOLICITUD:

ANEXO N° 3
TABLAS DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL

A. TABLAS PARA CÁLCULO DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC) EN ADULTOS

• TABLA DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL (Kg/m²)		
	HOMBRE	MUJER
DELGADEZ PRONUNCIADA	Hasta 14	Hasta 12
DELGADEZ	15 – 20	13 – 18
NORMALIDAD	21 – 25	19 – 23
SOBREPESO	26 – 30	24 – 28
OBESIDAD	31 – 35	29 – 34
OBESIDAD SEVERA	36 – 40	35 – 39
OBESIDAD MÓRBIDA	Arriba de 40	Arriba de 39

- para personas de más de 18 años de acuerdo a la estatura
(http://www.adolescentesxlavida.com.ar/a&b_peso.htm)

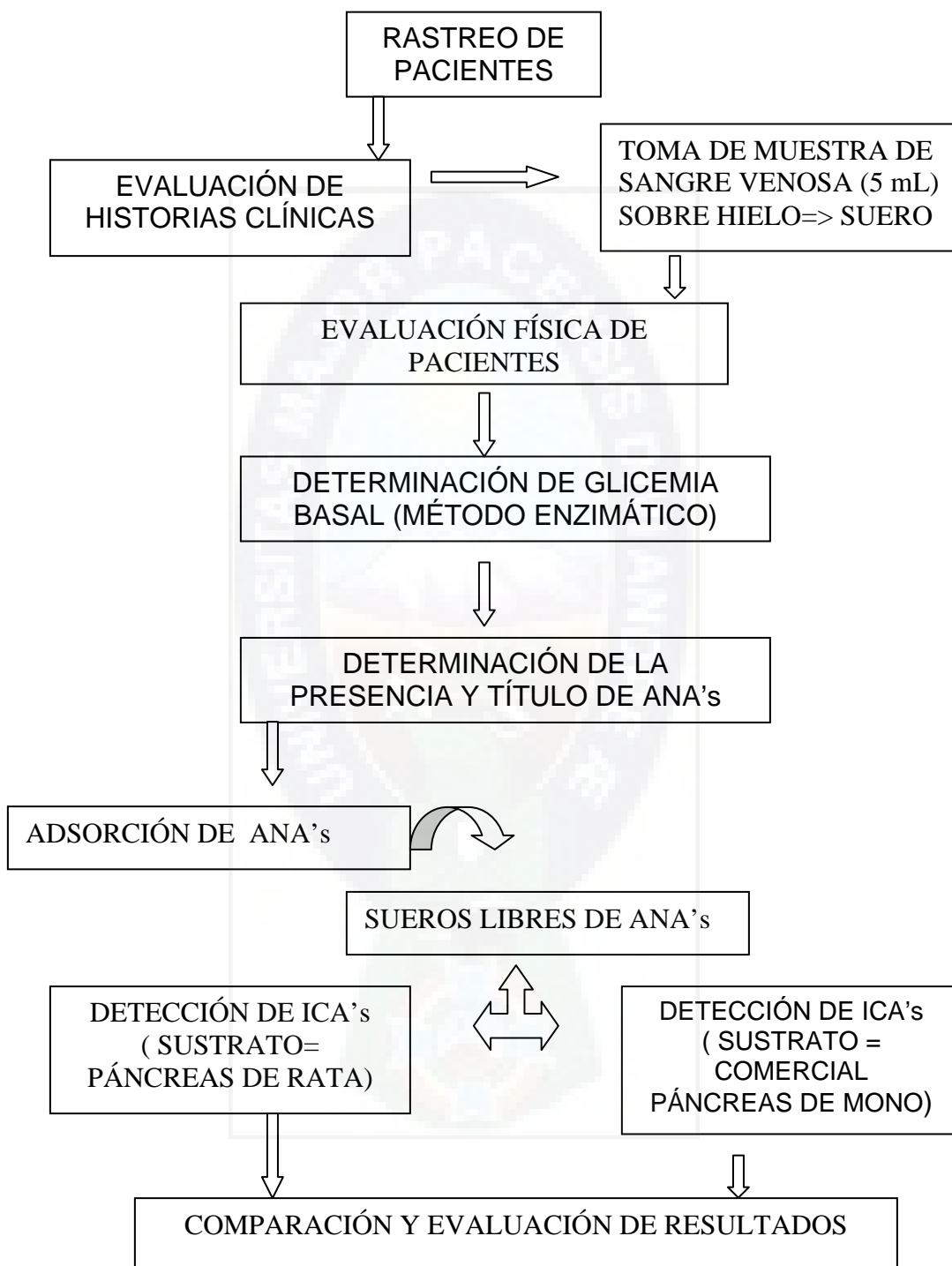
B. TABLA DE PROMEDIO DE PESO Y TALLA PARA NIÑOS Y ADOLESCENTES.

*TABLA DE PROMEDIO DE PESO Y TALLA POR EDAD EN VARONES Y DAMAS				
EDAD	PESO (Kg)		TALLA (cm)	
	VARONES	DAMAS	VARONES	DAMAS
RN	3.39	3.28	50.2	49.4
1 año	9.81	9.24	74.3	72.6
2 años	13.22	12.64	90.2	88.8
4 años	16.02	15.36	101.3	99.8
6 años	19.87	19.02	113.8	112.2
8 años	23.90	24.70	122.3	122.2
10 años	28.90	30.80	132.5	133.3
12 años	36.10	39.70	143.3	145.2
14 años	45.20	47.80	157.2	152.7
16 años	54.00	52.20	165.9	154.7
18 años	65.40	53.30	169.4	154.9

* OPS/OMS (2001) : La tabla de niños desde RN hasta 6 años corresponde a los autores R. Mande, N. La tabla de niños desde 6 a 18 años corresponde a los autores Avendaño A.; Patri, A. ;Med.soc.

ANEXO N°4

METODOLOGÍA GENERAL.



ANEXO N° 5

CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO ENZIMÁTICO PARA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.

A. CONTROL DE CALIDAD DE STANDARES

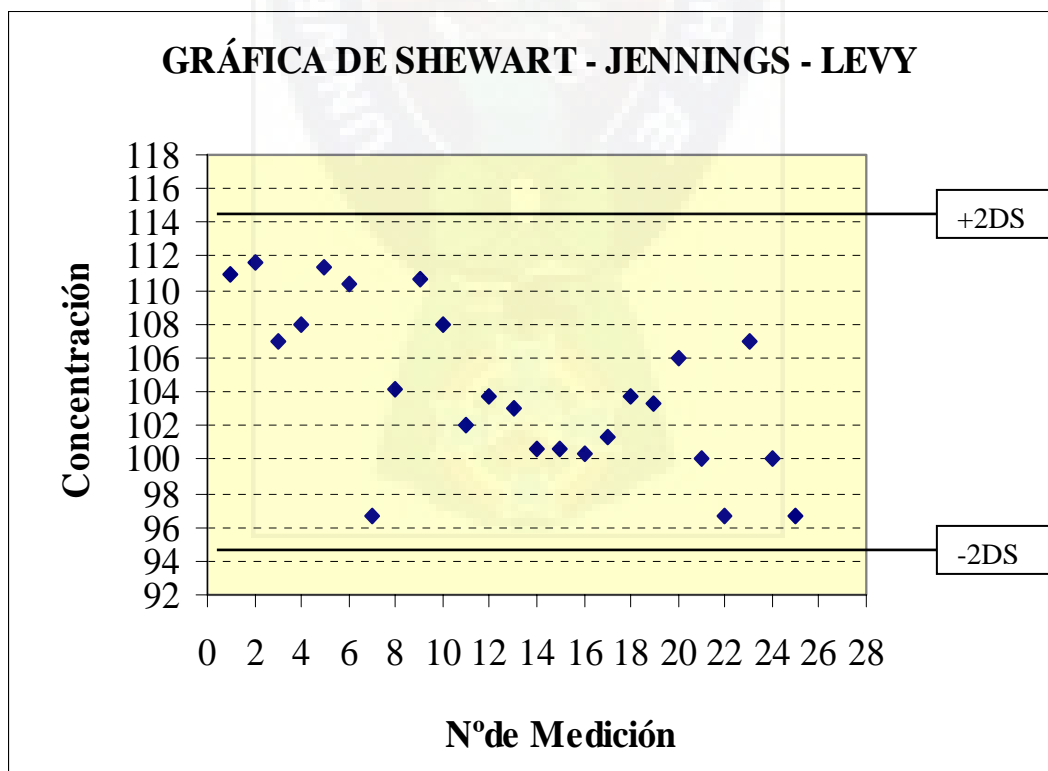
1. GRÁFICA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRECISIÓN : REPRODUCIBILIDAD (STÁNDARES)

Constituyente: Glucosa

Lote N°: 8357

Método: Enzimático

Equipo: STANBIO PREMIERE · PLUS



2. CUADRO DE CONTROL DE CALIDAD DE PRECISI3N : REPRODUCIBILIDAD

(STÁNDARES)

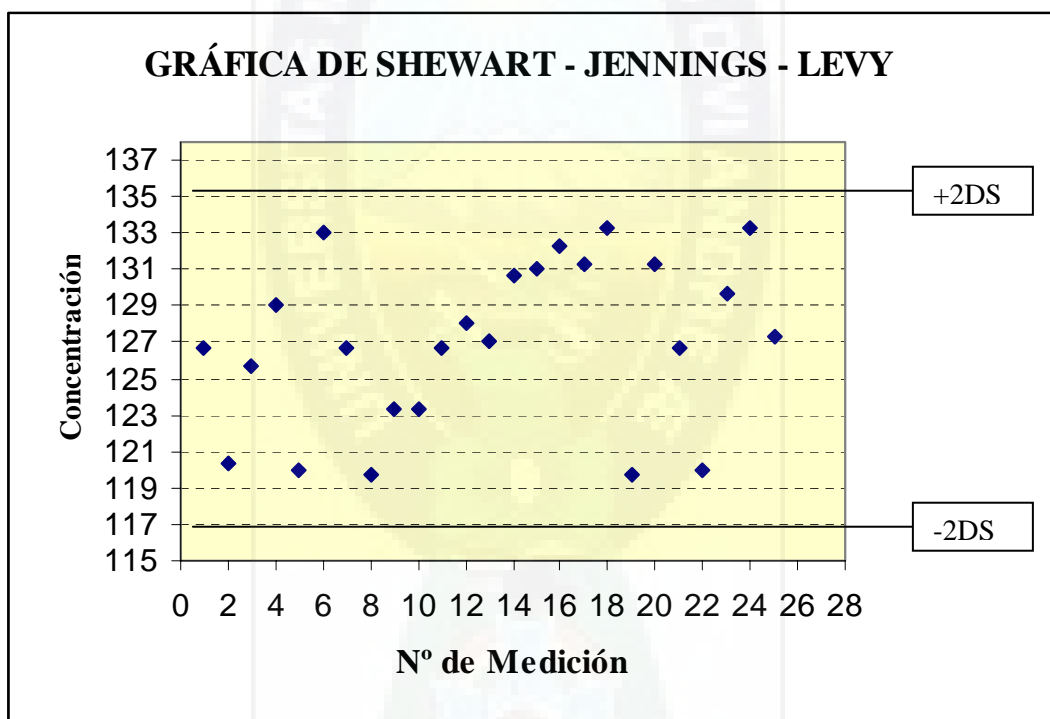
$$n = 25 \qquad P = \sum / n = 104,2 \text{ mg/dL}$$

$$DS = \sqrt{\frac{\sum (X - P)^2}{n - 1}} = 4,7 \text{ m/dL} \qquad CV = \frac{DS}{P} \cdot 100 = 4,5\%$$

Límites de control: Superior: $P + 2DS = 113,5 \text{ mg/dL}$

Inferior: $P - 2DS = 94,8 \text{ mg/dL}$

Nº	(C) mg/dL	ABSORBANCIA	(X - P)	(X - P) ²
1	111	0,333	6,85	46,96
2	111,67	0,335	7,52	56,59
3	107	0,321	2,85	8,14
4	108	0,324	2,85	8,14
5	111,33	0,334	7,18	51,59
6	110,33	0,331	6,18	38,23
7	96,67	0,29	-7,48	55,91
8	104,2	0,312	-0,15	0,02
9	110,67	0,332	6,52	42,55
10	108	0,324	2,85	8,14
11	102	0,306	-2,15	4,61
12	103,67	0,311	-0,48	0,23
13	103	0,309	-1,15	1,32
14	100,67	0,302	-3,48	12,09
15	100,67	0,302	-3,48	12,09
16	100,33	0,301	-3,82	14,57
17	101,33	0,304	-2,82	7,94
18	103,67	0,311	-0,48	0,23
19	103,33	0,31	-0,82	0,67
20	106	0,318	1,85	3,43
21	100	0,3	-4,15	17,2
22	96,67	0,29	-7,48	55,91
23	107	0,321	2,85	8,14
24	100	0,3	-4,15	17,2
25	96,67	0,29	-7,48	55,91

B. CONTROL DE CALIDAD DE CONTROLES (POOL)**1. GRÁFICA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRECISIÓN : REPRODUCIBILIDAD
(CONTROLES)****Constituyente:** Glucosa**Lote N°:** 8357**Método:** Enzimático**Equipo:** STANBIO PREMIERE · PLUS

2. CUADRO DE CONTROL DE CALIDAD DE PRECISI3N : REPRODUCIBILIDAD

(CONTROLES)

$$n = 25 \qquad P = \sum / n = 127,0 \text{ mg/dL}$$

$$DS = \sqrt{\frac{\sum (X - P)^2}{n - 1}} = 4,5 \text{ m/dL} \qquad CV = \frac{DS}{P} \cdot 100 = 3,5 \%$$

Límites de control: Superior: $P + 2DS = 136,2 \text{ mg/dL}$

Inferior: $P - 2DS = 117,9 \text{ mg/dL}$

Nº	(C) mg/Dl	ABSORBANCIA	(X - P)	(X - P) ²
1	126,67	0,38	-0,37	0,14
2	120,33	0,361	-6,71	45,02
3	125,67	0,377	-1,37	1,88
4	129	0,387	1,96	3,84
5	120	0,36	-7,04	49,56
6	133	0,399	5,96	35,52
7	126,67	0,38	-0,37	0,14
8	119,67	0,359	-7,37	54,32
9	123,33	0,37	-3,71	13,76
10	123,33	0,37	-3,71	13,76
11	126,67	0,38	-0,37	0,14
12	128	0,384	0,96	0,92
13	127	0,381	-0,04	0,0016
14	130,67	0,392	2,96	8,76
15	131	0,393	3,96	15,68
16	132,33	0,397	5,29	27,98
17	131,33	0,394	4,29	18,4
18	133,33	0,4	6,29	39,56
19	119,67	0,359	-7,37	54,32
20	131,33	0,394	4,29	18,4
21	126,67	0,38	-0,37	0,14
22	120	0,36	-7,04	49,56
23	129,67	0,389	2,63	6,92
24	133,33	0,4	6,29	39,56
25	127,33	0,382	0,29	0,08

ANEXO N° 6

***MÉTODO ALTERNATIVO PARA DETERMINACIÓN DEL PESO CORPORAL IDEAL**

(SI NO SE DISPONE DE LAS TABLAS)

Se hace una estimación de la siguiente manera:

- Mujeres: se anotan 100 libras (45 kilos) de peso corporal por los primeros 5 pies (1,52 m) de estatura y se suman 5 libras (2,26 kilos) por cada pulgada (2,54 cm) de talla adicional.
- Hombres: 106 libras (48 kilos) de peso corporal por los primeros 5 pies de estatura (1,52 m) y 6 libras (2,71 kilos) por cada pulgada (2,54 cm) adicional.
- Para hacer una estimación más precisa necesitamos conocer la contextura del paciente ya que para personas de contextura grande: se suma un 10%, personas de contextura pequeña: se resta el 10%.

Para determinar la contextura, se mide la circunferencia de la muñeca con una cinta métrica y se utiliza la siguiente tabla para saber si la persona es de contextura pequeña, mediana o grande.

Mujeres:

Estatura inferior a 5'2" (1,58 m)

- pequeña = circunferencia de la muñeca menor a 5,5" (13,9 cm)
- mediana = circunferencia de la muñeca entre 5,5" y 5,75" (13,9 cm y 14,6 cm)
- grande = circunferencia de la muñeca por encima de 5,75" (14,6 cm)

5'2" a 5' 5" (1,58 m a 1,67 m) de estatura:

- pequeña = circunferencia de la muñeca menor a 6" (15,2 cm)
- mediana = circunferencia de la muñeca entre 6" y 6,25" (15,2 cm y 15,8 cm)
- grande = circunferencia de la muñeca por encima de 6,25" (15,8 cm)

Estatura mayor de 5' 5" (1,67 m)

- pequeña = circunferencia de la muñeca menor a 6,25" (15,8 cm)
- mediana = circunferencia de la muñeca entre 6,25" y 6,5" (15,8 a 16,5 cm)
- grande = circunferencia de la muñeca por encima de 6,5" (16,5 cm)

Hombres:

Estatura mayor 5' 5" (1,67 m)

- pequeña = circunferencia de la muñeca entre 5,5" y 6,5" (13,9 cm y 16,5 cm)
- mediana = circunferencia de la muñeca entre 6,5" y 7,5" (16,5 cm y 19 cm)
- grande = circunferencia de la muñeca por encima de 7,5" (19 cm)

* <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001938.htm>

ANEXO N° 7

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN BUFFER FOSFATOS 0.15 M , pH 7.5 (PBS-CELULAR)

PBS - CELULAR 0.15 M pH 7.5	
• Na Cl	2.175 g
• Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	7.633 g
• Na H ₂ PO ₄	1.075 g
• H ₂ O (destilada)	c.s.p. 500 MI

NOTA. Para la preparación del PBS 10X, diluir la solución anterior diez veces.

B. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN BUFFER FOSFATOS 0.1 M pH 7.2 (PBS – IFI)

PBS - IFI 0.1 M Ph 7.2	
• Na Cl	1.165 g
• Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	2.840 g
• K H ₂ PO ₄	0.905 g
• H ₂ O (destilada)	c.s.p. 500 mL

NOTA. Para la preparación del PBS IFI 10X, diluir la solución anterior diez veces.

C. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO RPMI pH 7.2

MEDIO RPMI pH 7.2	
• RPMI 1640	1.636 g
• Bicarbonato de sodio (G.C.C)	0.200 g
• Suero Fetal Bovino (SFB)	3.5 mL
• Antibióticos:	
A. Penicilina 1 000 000 UI	
Disueltos en 5 mL de H ₂ O (d)	0.5 mL
B. Streptomina 1 000 000 UI	
Disueltos en 5 mL de H ₂ O (d)	0.5 mL
• Antimicóticos	
A. Nistatina 100 000 UI	0.5 mL
Disueltos en 5 mL de H ₂ O (d)	
• H ₂ O (destilada estéril)	c.s.p. 100 mL

Nota. Después de preparada ésta solución, se procede a filtrar con filtros milipore (5 nm) en soportes apropiados (Holders) antes de almacenarla o utilizarla.

D. PREPARACIÓN DE VERSENE (pH fisiológico)

VERSENE pH 7.2 -7.4	
• Na Cl	0.02 g
• K Cl	0.02 g
• Na ₂ HPO ₄ (Anhidro)	0.02 g
• EDTA	0.02 g
• H ₂ O (destilada)	c.s.p. 100 mL

NOTA. El proceso de Versenización consiste en someter el cultivo a ésta solución en una cantidad suficiente para cubrir la base de la caja de cultivo, durante 10 minutos a 37 °C.

E. PREPARACIÓN DE CARBOXIMETIL CELULOSA (3.5 %)

CARBOXIMETIL-CELULOSA (3.5 %)	
• Carboximetil-celulosa	3.5 g
• H ₂ O (destilada)	c.s.p. 100 MI

NOTA. Para preparar éste gel, es preciso calentar a unos 70°C una porción del agua destilada previamente medido, agregar la carboximetil-celulosa pesada y finalmente completar el agua para acabar de disolverla.

F. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE SACAROSA 0.25M CONTENIENDO 0.003 M DE Ca Cl₂

SACAROSA 0.25M / 0.003 M CaCl₂	
• Sacarosa	8.5500 g
• Ca Cl ₂ · 2 H ₂ O	0.0442 g
• H ₂ O (destilada)	c.s.p. 100 mL

NOTA. Mantener ésta solución a 4°C

ANEXO N° 8 - RESULTADOS GENERALES
A. DETERMINACIÓN DE LA GLICEMIA BASAL(MÉTODO ENZIMÁTICO)

N° (Flia.)	CÓDIGO	ABSORVANCIA	(C) (mg/dL)
1	01011	0.300	94
	01021	0.350	109
	01031	0.295	70
	01041	0.278	97
2	02011	0.308	100
3	03011	0.305	104
	03022	0.280	87
4	04012	0.319	106
	04021	0.271	91
5	05011	0.263	85
	05021	0.251	81
	05031	0.256	82
6	06011	0,238	80
	06021	0.288	96
7	07012	1,285	443
	07022	0,379	131
	07031	0,260	90
	07041	0,286	99
8	08011	0,300	100
	08021	0,293	98
	08031	0,280	94
	08041	0,280	94
9	09012	0.258	83
	09021	0.259	83
10	10012	0.487	169
	10021	0.233	80
	10031	0,271	94
	10041	0,275	95
	10051	0,280	97
11	11011	0.321	111
	11021	0,278	96
	11031	0,270	93
12	12011	0.259	86
	12022	0.627	209
	12031	0.243	81
13	13012	0.243	76
	13022	0.236	76
14	14012	0.259	84
	14021	0.287	92
	14032	0.269	85

B. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

Nº (Flia.)	CÓDIGO	RESULTADO : PATRÓN / TÍTULO
1	01011	Difuso hasta 1/80
	01021	Difuso y periférico hasta 1/80
	01031	Negativo desde título 1/40
	01041	Periférico + hasta 1/40
2	02011	Difuso + hasta 1/80, periférico + hasta 1/40
3	03011	Difuso + hasta 1/40
	03022	Difuso y periférico + hasta 1/160
4	04012	Difuso y periférico + hasta 1/40
	04021	Negativo desde título 1/40
5	05011	Negativo desde título 1/40
	05021	Negativo desde título 1/40
	05031	Negativo desde título 1/40
6	06011	Negativo desde título 1/40
	06021	Negativo desde título 1/40
7	07012	Difuso + hasta 1/80
	07022	Negativo desde título 1/40
	07031	Difuso y periférico hasta 1/80
	07041	Difuso y periférico + hasta 1/80
8	08011	Difuso y periférico + hasta 1/40
	08021	Difuso y periférico + hasta 1/40
	08031	Difuso + hasta 1/40
	08041	Difuso y periférico + hasta 1/160
9	09012	Negativo desde título 1/40
	09021	Difuso + hasta 1/40
10	10012	Difuso hasta 1/80
	10021	Difuso y periférico + hasta 1/40
	10031	Difuso y periférico hasta 1/40
	10041	Negativo desde título 1/40
	10051	Negativo desde título 1/40
11	11011	Difuso y periférico hasta 1/80
	11021	Negativo desde título 1/40
	11031	Negativo desde título 1/40
12	12011	Negativo desde título 1/40
	12022	Difuso + hasta 1/40
	12031	Difuso y periférico + hasta 1/80
13	13012	Difuso + hasta 1/40
	13022	Difuso y periférico + hasta 1/80
14	14012	Negativo desde título 1/40
	14021	Negativo desde título 1/40
	14032	Difuso + hasta 1/40

**C. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE EN
PÁNCREAS DE RATA**

Nº (Flia.)	CÓDIGO	RESULTADO : TÍTULO
1	01011	Positivo hasta ½
	01021	Positivo hasta ¼
	01031	Positivo hasta ½
	01041	Positivo hasta ¼
2	02011	Positivo hasta ¼
3	03011	Negativo
	03022	Positivo hasta ¼
4	04012	Negativo
	04021	Negativo
5	05011	Positivo hasta ¼
	05021	Positivo hasta ¼
	05031	Negativo
6	06011	Positivo hasta ¼
	06021	Positivo hasta ½
7	07012	Positivo hasta ¼
	07022	Positivo hasta ½
	07031	Positivo hasta ½
	07041	Negativo
8	08011	Negativo
	08021	Negativo
	08031	Negativo
	08041	Negativo
9	09012	Negativo
	09021	Positivo hasta ½
10	10012	Positivo hasta ½
	10021	Positivo hasta ½
	10031	Negativo
	10041	Positivo hasta ½
	10051	Positivo hasta ½
11	11011	Negativo
	11021	Positivo hasta ½
	11031	Negativo
12	12011	Positivo hasta ½
	12022	Negativo
	12031	Positivo hasta ½
13	13012	Positivo hasta ¼
	13022	Positivo hasta ¼
14	14012	Negativo
	14021	Negativo
	14032	Negativo

C. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO ANTICUERPOS CONTRA ISLOTE EN PÁNCREAS DE MONO

Nº (Flia.)	CÓDIGO	REACTIVIDAD A TÍTULO ½
1	01011	Negativo
	01021	Negativo
	01031	Negativo
	01041	Negativo
2	02011	Positivo
3	03011	Positivo
	03022	Positivo
4	04012	Positivo
	04021	Negativo
5	05011	Negativo
	05021	Negativo
	05031	Positivo
6	06011	Positivo
	06021	Positivo
7	07012	Positivo
	07022	Positivo
	07031	Negativo
	07041	Negativo
8	08011	Positivo
	08021	Positivo
	08031	Positivo
	08041	Positivo
9	09012	Negativo
	09021	Positivo
10	10012	Positivo
	10021	Positivo
	10031	Negativo
	10041	Positivo
	10051	Positivo
11	11011	Positivo
	11021	Positivo
	11031	Negativo
12	12011	Negativo
	12022	Negativo
	12031	Positivo
13	13012	Negativo
	13022	Negativo
14	14012	Negativo
	14021	Negativo
	14032	Negativo

E. ADSORCIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

CODIGO	Título Inicial ANA's	Título Final ANA's
3022 8042	1/160	Menor a 1/40
1011 1022 2011 7012 7032 7041 10012 11012 12032 13022	1/80	Menor a 1/20
1042 3011 4012 8011 8021 8032 9012 9021 10022 10032 12022 13012 14032	1/40	Menor a 1/10
1031 4021 5012 5021 5032 6012 6021 7022 10042 10052 11022 11032 12012 14011 14021	Menor a 1/40	Menor a 1/5

ANEXO N° 9 – CRITERIOS DE EVALUACIÓN

ESTIMACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE AMBOS SUSTRATOS

Tabla de clasificación de los resultados en cuanto a los resultados obtenidos y a los factores de riesgo.

	SANOS	ENFERMOS
POSITIVOS (+)	Falsos Positivos (FP)	Verdaderos Positivos (VP)
NEGATIVOS (-)	Verdaderos Negativos (VN)	Falsos Negativos (FN)

Tabla 16. *Clasificación de resultados en una prueba diagnóstica. (XXV)*

Sensibilidad o “fracción de verdaderos positivos (FVP) El criterio de Sensibilidad indica la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo.

Es decir:

$$S = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}}$$

Especificidad o “fracción de verdaderos negativos (FVN), indica la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano

$$E = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos}}$$

1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE ICA's (SUSTRATO: PÁNCREAS DE RATA).

	SANOS	ENFERMOS	TOTAL
POSITIVOS (+)	19	5	24
NEGATIVOS (-)	8	8	16
TOTAL	27	13	40

Tabla 17. *Relación entre la evaluación clínica final y los resultados de la detección de ICA's (Sustrato:páncreas de rata).*

$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100 = \frac{5}{5 + 8} \times 100 = 38.5\%$
$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100 = \frac{8}{8 + 19} \times 100 = 29.6\%$

Figura 21. *Cálculo de la Sensibilidad y Especificidad de la técnica de IFI para la identificación de ICA's sustrato: páncreas de rata).*

2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE ICA's (SUSTRATO: PÁNCREAS DE MONO)

	SANOS	ENFERMOS	TOTAL
POSITIVOS (+)	10	9	19
NEGATIVOS (-)	17	4	21
TOTAL	27	13	40

Tabla 18. Relación entre la evaluación clínica final y los resultados de la detección de ICA's (Sustrato:páncreas de mono).

$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP+FN}} \times 100 = \frac{9}{9+4} \times 100 = 69.2 \%$
$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN+FP}} \times 100 = \frac{17}{17+10} \times 100 = 63.0 \%$

Figura 22. Cálculo de la Sensibilidad y Especificidad de la técnica de IFI para la identificación de ICA's

(sustrato: páncreas de mono).

ANEXO N° 10 – CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Datos.

- ◆ $i = \text{Precisión} = 5\% = 0,05$
- ◆ $\text{Riesgo } \alpha = 5\% \text{ para } \rightarrow \varepsilon = 1,96$
- ◆ $\text{Prevalencia de Diabetes} = 10\%$
- ◆ $\text{Prevalencia de DM1} = 15 - 20\% \text{ del Total (100\%)}$
- ◆ $\text{Prevalencia de DM1} = 1,14\% \rightarrow 0,0114$

$$P = 0,0114$$

$$Q = 1 - 0,0114 = 0,9886$$

$n = \text{número de muestra mínima.}$

$$n = \frac{\varepsilon^2 * P * Q}{i^2}$$

$$n = \frac{\varepsilon^2 * P * Q}{i^2} = \frac{1,96^2 * 0,0114 * 0,9886}{(0,05^2)} = 17,32$$

⇒ $n = 18$ (número mínimo de pacientes)

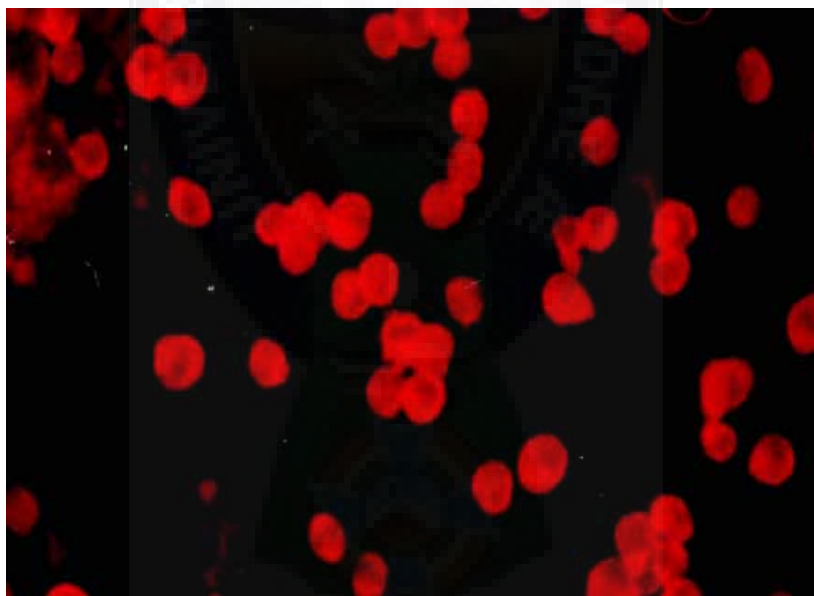
ANEXO N° 11

Figura 23. IFI - *Anticuerpos Antinucleares*
(*control negativo*) (20X)



Figura 24. IFI - *Anticuerpos Antinucleares*

(control positivo) (20X)

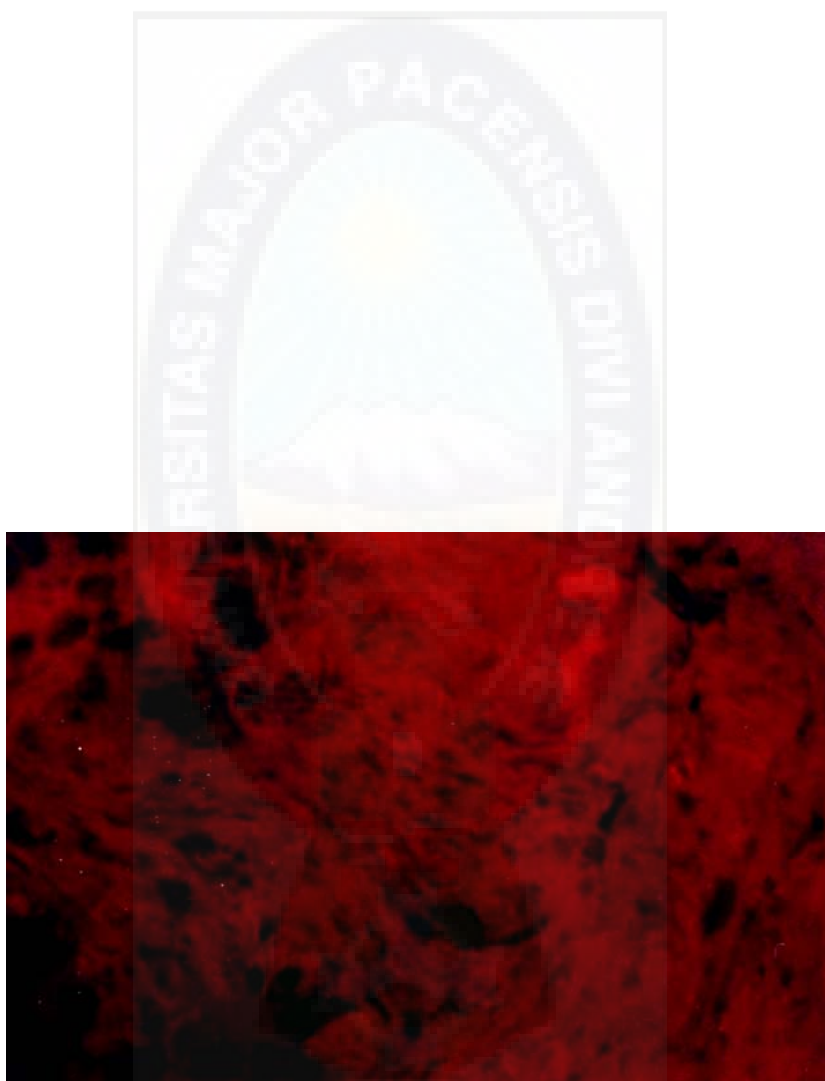


Figura 25. IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático
en corte de páncreas de rata (control negativo) (20X)

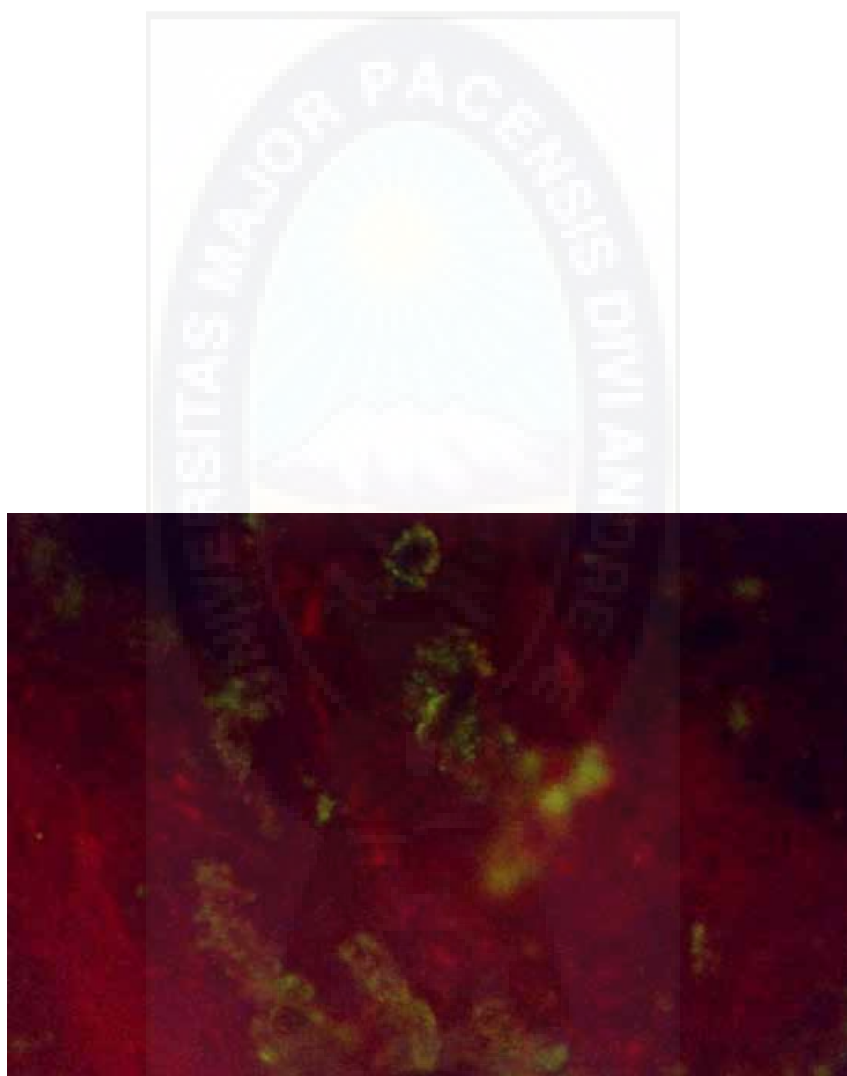


Figura 26. IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático
en corte de páncreas de rata (control positivo) (20X)

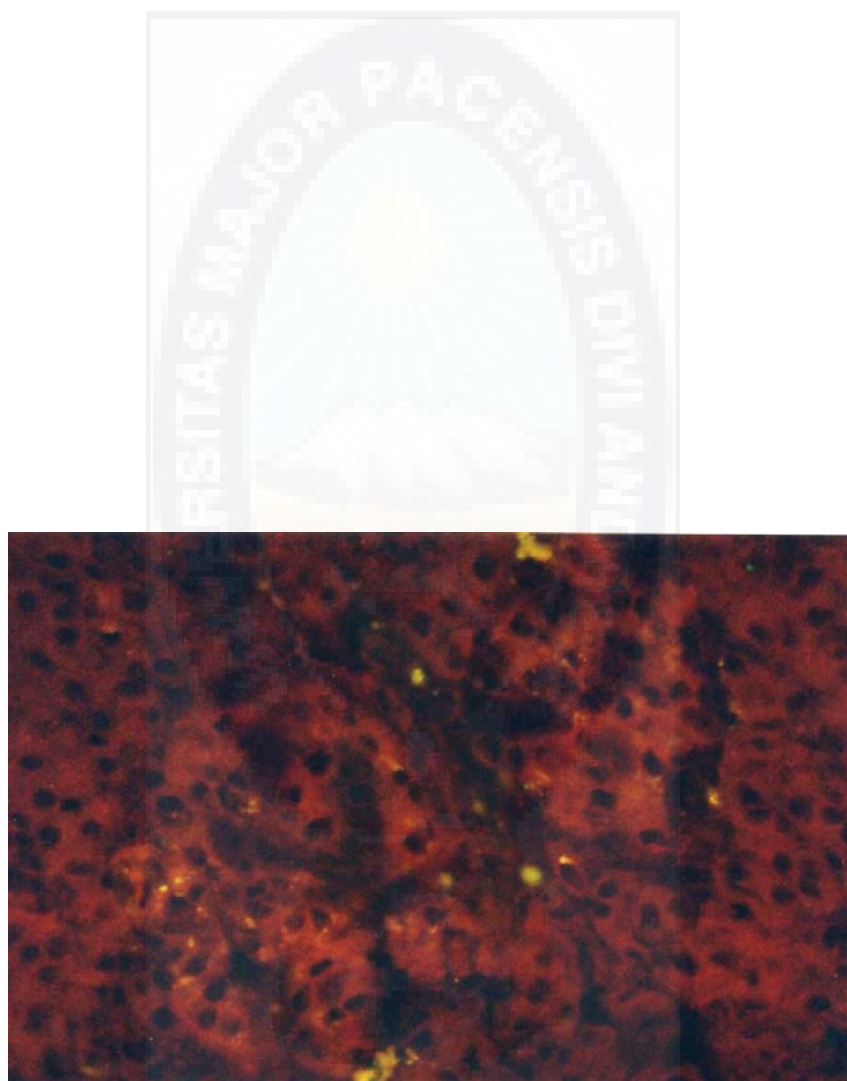


Figura 27. IFI - Anticuerpos Contra Islote pancreático
en corte de páncreas de mono (control negativo) (20X)

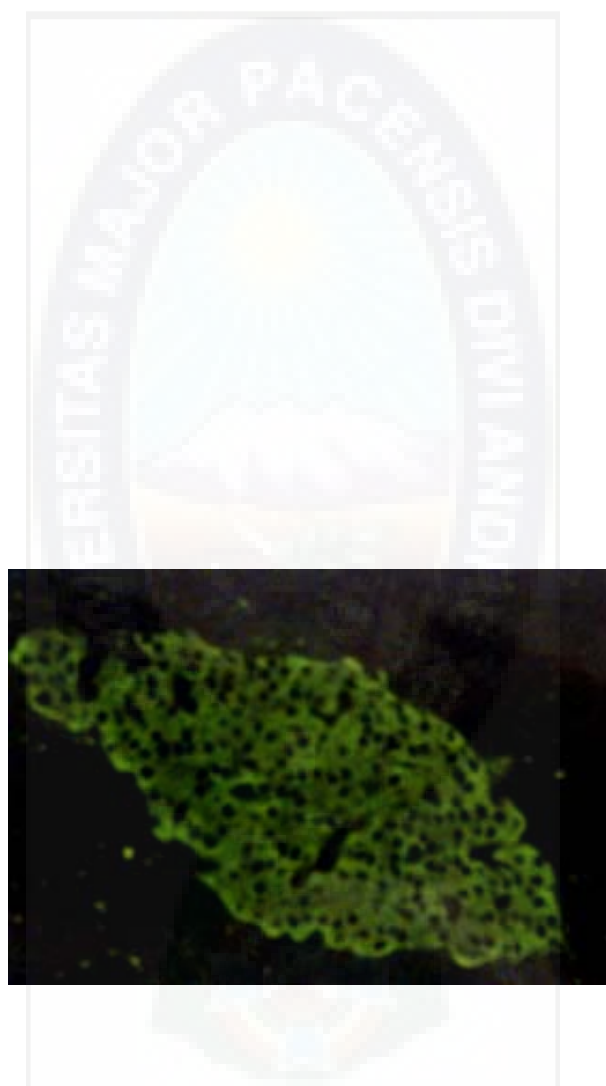


Figura 28. IFI - Anticuerpos *Contra Islote pancreático*
en corte de páncreas de mono (control positivo) (40X)

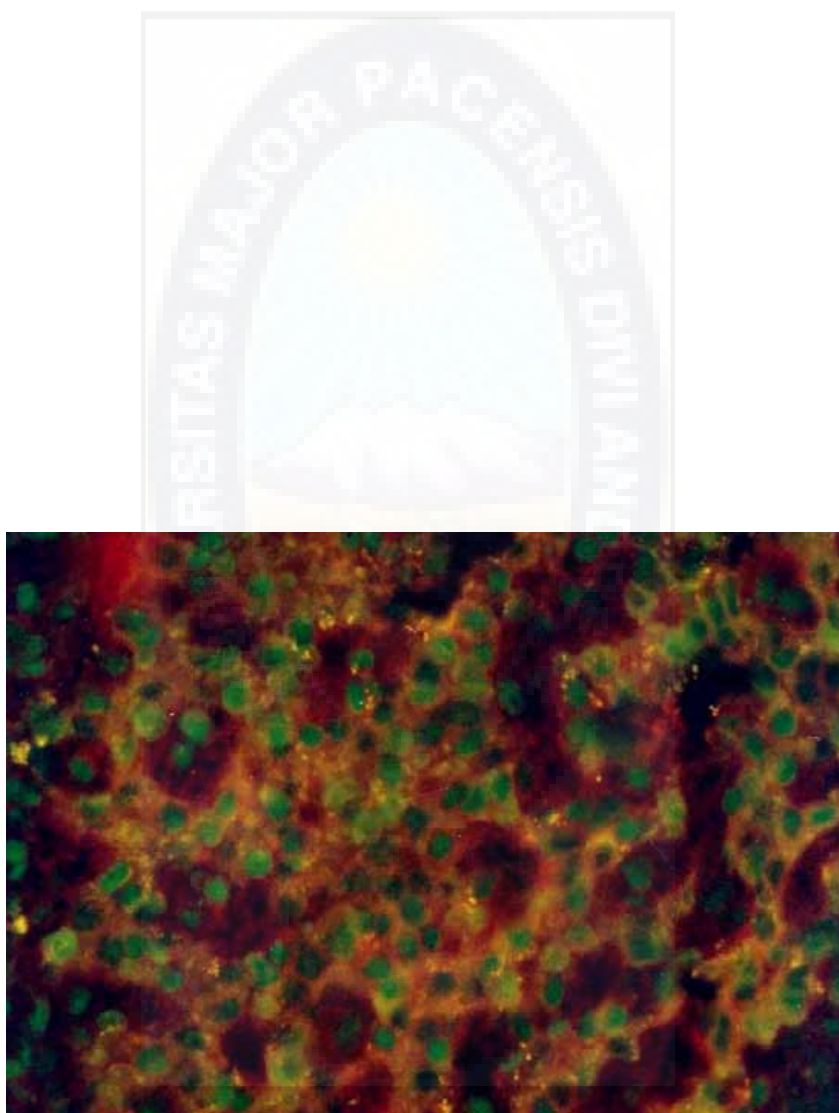


Figura 29. *Immunofluorescencia inespecífica
en páncreas de mono (20X)*

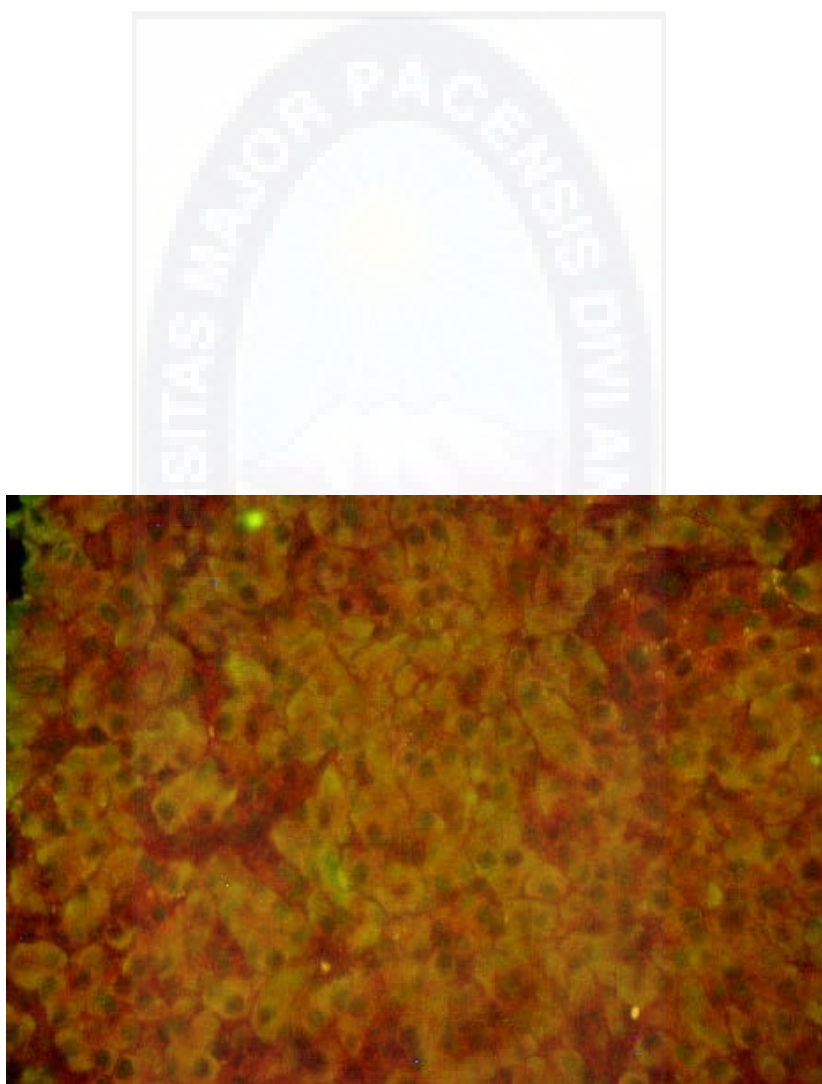


Figura 30. *Interferencia en identificación de Anticuerpos
contra Islote en páncreas de mono con sueros
sin previa adsorción de Anticuerpos Antinucleares.*

