

SINDROME DE HIPOGLUCEMIA AUTOINMUNE CON ANTICUERPOS ESPECIFICOS ANTI-INSULINA HUMANA

JUAN C. CRESTO, JOSE E. ABDENUR, NESTOR CHAMOLES, PABLO BRESCIANI, MAXIMINO RUIZ, BELINDA MASSA, MARIA C. CAMBEROS, JUAN C. BASABE

Endocrinología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez; Hospital de Niños Dr. Pedro de Elizalde; Fundación para el estudio de las Enfermedades Neurometabólicas; Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 1ra. Cátedra de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen Se presenta una mujer de 33 años con una historia de 11 meses de episodios recurrentes de hipoglucemia severa, asociados a anticuerpos anti-insulina y valores variables de peptido-C. Una extracción ácido-alcohólica de suero mostró un nivel basal de insulina de 1.600 uU/ml. La insulina caracterizada por HPLC demostró ser insulina humana. Los anticuerpos fueron específicos para la insulina humana con una subpoblación que reaccionaba con insulina bovina y porcina (IgG, cadena liviana k). Al declinar los síntomas, el tratamiento con plasmaféresis negativizó el título con rapidez. Un seguimiento prolongado demostró la ausencia de recidivas.

Palabras clave: hipoglucemia autoinmune, suero anti-insulina humana

La hipoglucemia debida a anticuerpos anti-insulina de origen autoinmune fue descrita en 1970¹ y hallada frecuentemente a partir de allí^{2,3,4}. El diagnóstico es difícil porque debe ser excluida la producción de anticuerpos por la inyección de insulina exógena.

El presente caso es relatado debido a su comienzo espontáneo (esto es, no inducido por drogas) la presencia de anticuerpos específicos contra insulina humana y la respuesta al tratamiento con plasmaféresis que no ha sido descrito anteriormente en este síndrome.

Caso clínico

Una mujer de 33 años de edad comenzó con síntomas de hipoglucemia en agosto de 1984, presentando inicialmente crisis de palidez, temblor y obnubilación hasta llegar a un coma hipoglucémico, por lo cual fue admitida en Terapia Intensiva. Estos episodios eran

espontáneos, no teniendo relación con la actividad física o el ayuno. Los estudios de rutina, ecografía de abdomen, TC de páncreas, TC de cerebro y EEG fueron normales. Una prueba de tolerancia oral a la glucosa realizada para estudiar sus hipoglucemias fue normal. Durante el dosaje de insulina se comprobó que tenía anticuerpos anti-insulina. Como la paciente era enfermera se sospechó la autoadministración de insulina y fue derivada a la Unidad de Psicopatología. Durante su evaluación psicológica no se hallaron evidencias que presunieran la autoinyección de insulina y como las hipoglucemias continuaban, fue remitida a nuestro laboratorio en junio de 1985 para su estudio.

La historia personal y familiar no aportó elementos diagnósticos, pero permitió excluir tratamientos previos con methimazole, captopril, enalapril, penicilina e hidralazina. Los ciclos menstruales eran normales y regulares y el examen físico fue normal. En los estudios iniciales se hallaron valores bajos de glucemia, con cortisol normal y niveles normales (0,1 ng/ml) o elevados (2,8 ng/ml) de péptido-C de acuerdo al momento evolutivo de la enfermedad. El título de anticuerpos varió a lo largo de la enfermedad. Inicialmente fue del 10% y al año llegó al 50% de captación del trazador radioactivo (insulina-125-I) para caer luego lentamente. Para la comparación final del título de anticuerpos, todas las muestras obtenidas fueron determinadas en un mismo

Recibido: 26-V-1995

Aceptado: 16-I-1996

Dirección postal: Dr. Juan C. Cresto, Endocrinología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Gallo 1330, 1425 Buenos Aires, Argentina

ensayo. Salvo el título de anticuerpos antimitocondriales que dio positivo débil, los demás estudios de autoinmunidad fueron normales.

En un momento en que la paciente estaba en hipoglucemia (10 mg%) se obtuvo sangre de la paciente y se efectuó una extracción ácido-alcohólica de 10 ml de plasma. La insulina inmunoreactiva del material extraído fue de 1.600 uU/ml. El material extraído fue marcado con ^{125}I y luego purificado en gel de almidón preparativo⁵. La zona de insulina fue cromatografiada en Sephadex G 50 superfino, eluyendo con ácido acético 1 M. El pico de insulina fue liofilizado. La insulina así obtenida fue aplicada a una columna de HPLC en fase reversa y corrida simultáneamente con insulina porcina y bovina como control. Se usó un equipo Waters con una columna Bondapack C18 y se cromatografió una muestra de 100 μl de la mezcla de insulinas. Se emplearon dos fases, «A»: 0,1% ácido trifluoroacético y «B»: acetonitrilo/2-propanolol con 0,5% ácido trifluoroacético (relación 3:1). El programa establecido fue: condiciones iniciales, 35% de «B», 5 min; condiciones finales, 44% de «B». Tiempo total 90 min. Se determinó la absorbancia y además se obtuvieron alícuotas cada 20 seg para conteo de la radioactividad.

La caracterización por HPLC de la ^{125}I -insulina extraída del suero de la paciente mostró claras diferencias con las insulinas porcina y bovina, situándose entre ambas. El tiempo de retención fue mayor que el correspondiente a insulina humana (fig. 1).

Los anticuerpos libres de insulina fueron estudiados con curvas dosis/respuesta. Para ello, una muestra de 18,5 ml de plasma del paciente fue precipitada agregando al suero igual cantidad de una solución saturada de sulfato de amonio, pH 7,4. El precipitado fue dializado contra ClNa 0,15 M, pH 7,4. El material dializado fue incubado a 37°C durante 12 hs con enzima degradante de insulina (EDI, 0,1 ml/ml) parcialmente purificada. EDI fue luego inhibida con N-ethylmaleimida 0,5 mM y esta gamma globulina se utilizó en los estudios dosis/respuesta (gamma tratada).

En el primer estudio usando ^{125}I -insulina porcina se observó competición con insulina porcina y bovina y un leve desplazamiento con insulina humana (Fig. 2, A). Un segundo estudio usando ^{125}I -humana mostró sólo competición con insulina humana (Fig. 2, B) al menos en el rango estudiado. La representación según Scatchard de esta curva mostró dos pendientes con valores de afinidad elevada para la insulina humana (K_{a1} : $6,20 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ y K_{a2} : $2,42 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). El cálculo de la afinidad aparente con insulina de cerdo (Fig. 2, A) fue de un orden de magnitud mayor que con insulina humana.

Cuando se seleccionó una población de anticuerpos por cromatografía de afinidad insulina de cerdo-Sepharosa, a partir del suero del paciente libre de

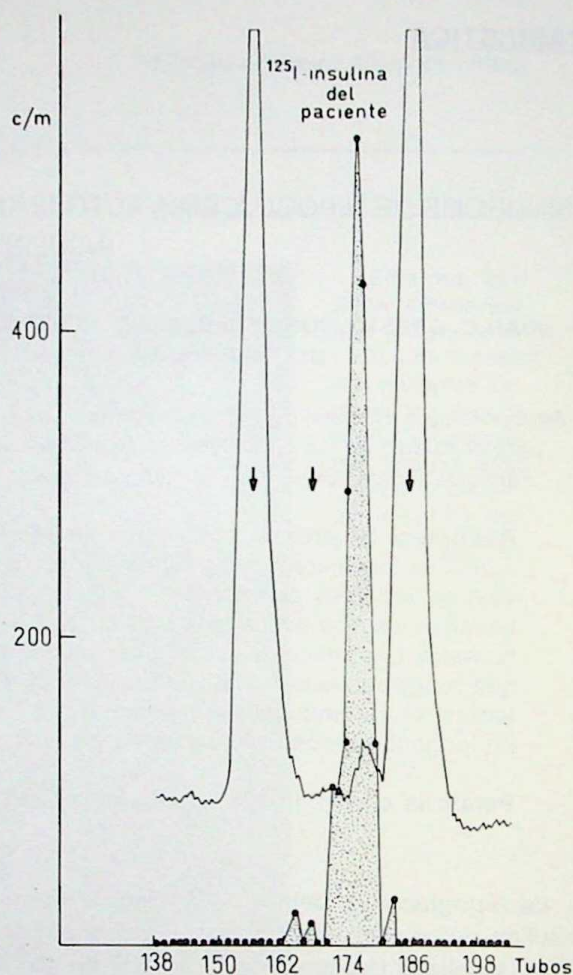


Fig. 1.— Cromatografía en HPLC de la insulina de la paciente luego de una extracción ácido-alcohólica del suero: la insulina extraída fue marcada con ^{125}I , corrida en gel de almidón, cromatografiada en Sephadex y caracterizada con HPLC usando como «standars» insulinas bovina, humana y porcina (ver flechas en ese orden, de izquierda a derecha).

insulina (gamma tratada), se observó que esta subpoblación de anticuerpos presentaba reacción cruzada con la insulina de cerdo y humana (Fig. 2, C). Este experimento explica el resultado hallado con el trazador porcino.

La gamma globulina anti-insulina purificada por afinidad y marcada con ^{125}I fue caracterizada para determinar el tipo de IgG aislado⁶, sólo el suero anti k mostró una banda de precipitación en la autorradiografía (no mostrado).

Mientras se desarrollaba el estudio la paciente continuó con hipoglucemias severas, algunas de las cuales requirieron su internación en Terapia Intensiva, hasta que en junio de 1986 la sintomatología comenzó a declinar gradualmente coincidiendo con la declinación del

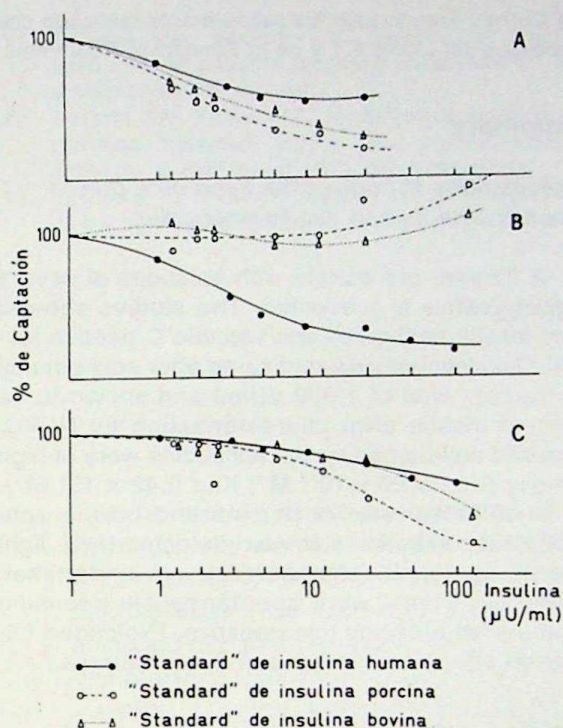


Fig. 2.— Curvas dosis/respuesta con los anticuerpos de la paciente: El suero del paciente fue diluido 1/200, pero la dilución total del suero fue el doble porque inicialmente se lo duplicó en la precipitación con sulfato de amonio.

A) la población total de anticuerpos del paciente fueron usados con trazador porcino. B) la población total de anticuerpos fueron usados con trazador humano. C) una población de anticuerpos seleccionados por afinidad con insulina de cerdo-Sepharosa, fue usada con trazador humano.

título de anticuerpos. En noviembre la paciente terminó sus estudios y se comenzó el tratamiento con plasmaféresis. Se removió en tres sesiones una cantidad de sangre equivalente al 4% del peso corporal. Cada sesión llevó aproximadamente 90 min. Hubo una caída del 35% en las inmunoglobulinas al terminar con el tratamiento. No hubo intercorrientes infecciosas durante la plasmaféresis ni luego de su terminación. La misma, pese a remover sólo el 63% del volumen intravascular, redujo el título de anticuerpos de 8,6% a valores no detectables. En abril de 1987 fue dada de alta libre de síntomas. Los controles hasta la actualidad no han demostrado recidiva de la enfermedad.

Discusión

El síndrome de hipoglucemia autoinmune por anticuerpos anti-insulina fue descrito en 1970¹ y desde entonces se han publicado 125 casos de

los cuales sólo 17, incluyendo el que aquí se relata, han sido hallados fuera de Japon^{7, 8}. La presentación por sexos ha sido casi idéntica con una incidencia mayor en la edad media de la vida. La inducción por drogas que contienen grupos sulfidrilos es muy elevada en los pacientes japoneses (34%) y se han determinado alelos predominantes en el HLA de estos enfermos (Cw4, Bw62, DR4)⁹. De los 17 pacientes no japoneses sólo en 5 el síndrome se presentó en forma espontánea, esto es, sin una enfermedad autoinmune asociada ni inducida por drogas⁷.

Durante el desarrollo de anticuerpos anti-insulina se produce la acumulación de insulina y proinsulina, dependiendo la cantidad acumulada de la concentración molar de los anticuerpos y de la constante de afinidad de los mismos. Esta acumulación progresiva no depende de la cantidad de insulina secretada sino del alargamiento de su vida media al unirse al anticuerpo, llegando a ser de varias horas en lugar de minutos¹⁰. El proceso por el cual se presenta hipoglucemia en pacientes con anticuerpos sigue siendo materia de discusión^{11, 12, 13}.

La paciente presentó hipoglucemias y se demostraron anticuerpos anti-insulina en el primer estudio que se le efectuó. Esta secuencia hipoglucemia-anticuerpos simultáneos no se corresponde con las formas facticias, en donde las hipoglucemias preceden largamente a la aparición de anticuerpos. Al continuar con el estudio, en el primer dosaje se halló un valor basal elevado de péptido-C mientras que en un estudio posterior los valores fueron bajos, indicando una situación de reposo pancreático. A pesar de que la insulina acumulada es endógena, una respuesta pancreática normal ante un estímulo, como ha sido propuesto⁸, no resulta clara en este síndrome. Es más comprensible una respuesta modificada de acuerdo a los niveles de insulina y glucosa en el momento del estudio y a la capacidad de asociación de los anticuerpos. Han sido descritos valores de 35.280 uU/ml de insulina unidos a anticuerpos¹⁴ y capacidades de asociación de esta magnitud actúan como «buffer» y desactivan la insulina secretada obligando a una gran actividad de las células beta.

El análisis del tipo de insulina en la paciente fue explícito al mostrar que no era de origen bovino ni porcino. Debe recordarse además que en esa época la insulina humana no estaba disponi-

ble en la Argentina para tratamiento. El que no se haya dosado proinsulina humana depende exclusivamente de las condiciones del estudio, porque en la autorradiografía del gel de almidón sólo se tomó la zona de insulina.

Como se desprende de los estudios la paciente tenía una población específica de anticuerpos anti-insulina humana. La especificidad de un suero depende de la afinidad de los distintos anticuerpos que la constituyen (y por lo tanto de la similitud o no de las determinantes antigénicas de los antígenos considerados) y de la concentración molar de los anticuerpos. Una diferencia de un orden de magnitud entre cerdo y humano hace al suero «no altamente específico» según la definición de Berzofsky y Schecher¹⁵. Sin embargo, como ha sido sostenido por diversos autores «el suero total es altamente específico para un antígeno determinado cuando los distintos anticuerpos tienen un único antígeno en común»¹⁵, lo que en este caso sólo ocurre con insulina humana. El tipo de anticuerpo hallado (cadena liviana k) con dos constantes de afinidad muy próximas dirigida hacia insulina humana, sugiere una respuesta clonal selectiva. Hallazgos similares han sido publicados^{3, 14}.

Algunos diagnósticos diferenciales deben efectuarse en la hipoglucemia autoinmune. Los pacientes con anticuerpos anti-receptores que presentaron hipoglucemia como única manifestación metabólica, son pocos. Todos ellos cursaban una enfermedad autoinmune grave y respondieron al tratamiento inmunosupresor (para revisión ver cita 8). Estos pacientes carecían de anticuerpos anti-insulina o presentaban títulos marginales.

Un comentario requiere el tratamiento con plasmaféresis. Esta conducta ha sido empleada en pacientes diabéticos resistentes con alto valor de anticuerpos. Aunque el síndrome presenta una evolución favorable, el tratamiento con plasmaféresis negativizó rápidamente el título de anticuerpos y aceleró el curso clínico de la enfermedad. Pese al largo seguimiento realizado, no se encontró recidiva clínica ni bioquímica del síndrome. Esta posibilidad de tratamiento puede ser considerada cuando el diagnóstico está confirmado, sobre todo si se está en las etapas más críticas de la enfermedad.

Agradecimientos: Agradecemos el eficiente trabajo técnico de la Srta. P.I. Castellani y de la Sra. M. M.

de Cornet. Este trabajo fue parcialmente realizado con subsidios del CONICET y de la Fundación Roemmers.

Summary

Autoimmune hypoglycemia syndrome due to specific anti-human insulin antibodies

A 33 year old woman with episodes of severe hypoglycemia is presented. The studies showed anti-insulin antibodies and variable C-peptide levels. Circulating insulin measured after acid-ethanol extraction, was of 1,600 uU/ml and shown to be human insulin after characterization by HPLC. Specific anti-human insulin antibodies were of high affinity (K_{a1} : $6.20 \times 10^{10} M^{-1}$; K_{a2} : $2.42 \times 10^9 M^{-1}$). A small cross-reactive porcine and bovine antibody subpopulation was also detected (IgG, light k type chain). Plasmapheresis was undertaken when symptoms were spontaneously declining and turned antibody titer negative. Prolonged follow-up showed no relapse of this syndrome.

Bibliografía

- Hirata Y, Ishizu H, Ouchi N, et al. Insulin autoimmunity in a case with spontaneous hypoglycemia. *J Jpn Diabet Soc* 1970; 13: 312-20.
- Folling I, Norman N: Hypoglycemia, hypoglycemic attacks, and production of anti-insulin antibodies without previously known immunization. *Diabetes* 1972; 21: 814-26.
- Goldman J, Baldwin D, Rubenstein AH, et al. Characterization of circulating insulin and proinsulin-binding antibodies in autoimmune hypoglycemia. *J Clin Invest* 1979; 63: 1050-9.
- Seino S, Fu ZZ, Marks W, et al: Characterization of circulating insulin in insulin autoimmune syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 64-9.
- Cresto JC, Udrisar DP, Camberos MC, et al. Preparation of biologically active mono 125I-insulin of high specific activity. *Acta Physiol Latinoam* 1981; 31: 17-24.
- Pizzolato MA, Coni F, Salvarezza R. Immunofixation on cellulose acetate: an improved screening method for monoclonal immunoglobulin. *J Immunol Meth* 1979; 26: 365-9.
- Burch HB, Clement S, Sokol M, et al. Reactive hypoglycemic coma due to insulin autoimmune syndrome. *Am J Med* 1992; 92: 681-5.
- Taylor SI, Barbetti F, Accilli D, et al. Syndromes of autoimmunity and hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clinics NA* 1989; 18: 123-43.
- Uchigata Y, Kuwata S, Tokunaga K, et al. Strong association of insulin autoimmune syndrome with HLA-Dr4. *Lancet* 1992; 339: 393-4.
- Fink G, Cresto JC, Gutman RA, et al. Plasma proinsulin-like material in insulin treated diabetics. *Horm Metab Res* 1974; 6: 439-43.

11. Benson EA, Healey LA, Barron EJ. Insulin antibodies in patients receiving penicillamine. *Am J Med* 1985; 78: 857-60
12. Berson SA, Yalow RS. Quantitative aspects of reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* 1959; 38: 1996-2016.
13. Ichihara K, Shima K, Saito Y, et al. Mechanism of hypoglycemia observed in a patient with insulin autoimmune syndrome. *Diabetes* 1977; 26: 500-6.
14. Hirata Y, Tominaga M, Ito J, et al. Spontaneous hypoglycemia with insulin autoimmunity in Grave's disease. *Ann Intern Med* 1974; 81: 214-8.
15. Berzofsky JA, Schechter AN. The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Mol Immunol* 1981; 18: 751-63.

- - -

In conclusion, it appears to me that nothing can be more improving to a young naturalist, than a journey in distant countries. It both sharpens, and partly allays that want and craving, which, as Sir J. Herschel remarks, a man experiences although every corporal sense be fully satisfied. The excitement from the novelty of objects, and the chance of success stimulate him to increased activity. Moreover, as a number of isolated facts soon become uninteresting, the habit of comparison leads to generalization. On the other hand, as the traveller stays but a short time in each place, his descriptions must generally consist of mere sketches, instead of detailed observations. Hence arises, as I have found to my cost, a constant tendency to fill up the wide gaps of knowledge by inaccurate and superficial hypotheses.

En conclusión, me parece que nada puede ser más beneficioso a un joven naturalista que un viaje a distantes países. A la vez agudiza y en parte mitiga aquella necesidad y vehemente deseo que, como Sir J. Herschel destaca, el hombre experimenta aunque todos los sentidos corporales esten completamente satisfechos. La excitación por la novedad de los objetos, la posibilidad del éxito, lo estimulan a la actividad. Más aún, como un número de hechos aislados pronto carecen de interés, el hábito de la comparación conduce a la generalización. Por otra parte, como el viajero está sólo un corto tiempo en cada lugar, sus descripciones deben consistir generalmente en meros bosquejos en lugar de descripciones detalladas. Y de esto surge, como lo descubrí a mi costa, una tendencia constante a llenar las amplias faltas de conocimiento con hipótesis inexactas y superficiales.

Charles Darwin (1809-1882)

The voyage of the Beagle (1845), London: J. M. Dent & Sons Ltd, 1961, pp 486-487