

00544^B 2y.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

División de estudios de posgrado

DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE

T E S I S

Que para obtener el diploma de
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA

presenta

JUAN MANUEL VARGAS MORALES

México, D.F. 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

266770



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo fué dirigido en el laboratorio de Inmunología del "Instituto Nacional de Pediatría"

Tutor: Dr. Renato Berrón Pérez

Sustentante: Q.F.B. Juan Manuel Vargas Morales

A mi madre:

Ma. Concepción Morales Padrón.

A la memoria de mi padre:

Félix Vargas Corona.

A mis hermanos:

Daniel, Gerardo, Juan, Pedro Antonio,

Martha Patricia y José Félix.

A la memoria de mi abuelo:

Pedro Morales Torres

Mi gratitud a:

Dr. Renato D. Berrón Pérez

QBP. Carmen L. Velasco M.

QFB EBC. Romelia Velasco O.

QFB. Ma Angélica Plaza

QBP. Gloria Hernández

QFB EBC. Norma Alicia Salgado Galicia

QC EBC. Lizbeth García Morales

QFB. Natividad Navarrete

Familia Rico Morales

II. DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE

2.1	Definición clínica	33
2.2	Epidemiología	33
2.3	Etiología	34
2.4	Progresión clínica	34
2.5	Predisposición genética	36
2.5.1	Antígenos HLA asociados	38
2.5.2	Modelos animales espontáneos de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune	41
2.5.3	Control genético de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune en el ratón NOD	41
2.6	Factores ambientales desencadenantes de autoinmunidad	43
2.6.1	Enfermedades virales	43
2.6.2	Factores dietéticos	44
2.6.3	Composición de la leche de vaca	46
2.6.4	La leche como factor desencadenante	47
2.6.5	Factores tóxicos	48

III. BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA PROGRESIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE

3.1	Histopatología	49
3.1.1	Insulitis	49
3.2	Respuesta de células T	50
3.2.1	Subgrupos de células T	52
3.2.2	Subgrupos de células T cooperadoras	52
3.3	Respuesta de células B	53
3.4	Autoantígenos blancos de las células T autorreactivas	54
3.4.1	Autoanticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos	55
3.4.2	Identificación del gangliósido GM2-1 como autoantígeno de células beta	56

3.4.3 Autoantígeno 64K o descarboxilasa del ácido glutámico	57
3.4.3.1 Caracterización bioquímica de la GAD	58
3.4.4 La red GABA en la célula beta y el daño en la fosforilación oxidativa mitocondrial	58
3.4.4.1 La GAD como enzima clave de la red GABA	60
3.4.4.2 Alteración de la red GABA en la patogénesis de diabetes autoinmune	62
3.4.5 Mimetismo molecular de un dominio homólogo de GAD 65 con la proteína 2C del virus Coxsackie B y la patogénesis de diabetes autoinmune	64
3.4.6 Autoanticuerpos contra la GAD, la diabetes autoinmune y el "Síndrome del hombre entumecido"	65
3.5 La insulina como autoantígeno en diabetes autoinmune	66
3.6 Autoantígeno ICA 69	67
3.6.1 Autoanticuerpos contra ICA 69 en artritis reumatoide	68
3.7 Autoantígenos fosfatasas de tirosina IA-2 y IA-2beta	69
3.7.1 Los autoanticuerpos contra IA-2 (IA-2A), tienen actualmente el mejor valor predictivo para diabetes autoinmune	71
IV. DIAGNÓSTICO PRECLÍNICO DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y PERSPECTIVAS PARA INMUNOTERAPIA	74
V. COMENTARIOS	77
VI. BIBLIOGRAFÍA	79

RESUMEN

Esta revisión trata sobre la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune; proporciona la información referente a la posible etiología y fisiopatología de la enfermedad, la importancia de genes del complejo principal de histocompatibilidad en humanos y en los modelos animales espontáneos de la enfermedad (el ratón diabético no obeso y la rata biobreeding), así como de los factores ambientales desencadenantes del proceso autoinmune programado genéticamente.

Se describen las bases celulares y moleculares para el desarrollo de la enfermedad, la importancia de los marcadores inmunológicos como son algunos de los autoanticuerpos contra autoantígenos de las células de los islotes pancreáticos, que son útiles para predecir y diagnosticar la enfermedad. Además se plantea el uso de la inmunoterapia para la prevención del desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune en pacientes con factores de riesgo como un mecanismo de prevención primaria aspecto al cual debe dedicarse particular atención.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta revisión son actualizar y relacionar los conceptos referentes a la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, permitiendo plantear nuevas hipótesis de trabajo para poder contribuir en la mejor comprensión de los conceptos fisiopatológicos actuales, a través del conocimiento de los mecanismos desencadenantes medioambientales y factores de riesgo genético para el desarrollo de la enfermedad. También se pretende hacer conciencia de que la prevención primaria por medio de inmunoterapia es una alternativa importante y en la que el uso de marcadores inmunológicos para el diagnóstico preclínico es importante para la intervención terapéutica.

I. INTRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CLÍNICA

1.1 Antecedentes históricos

La diabetes mellitus fue reconocida hace más de mil años, pero fue hasta el siglo pasado que la investigación en la caracterización bioquímica de esta enfermedad se inició y se reveló la asociación entre insulina y los niveles de glucosa sanguínea. Después del descubrimiento de la insulina, se demostró que era necesaria para mantener los niveles normales de glucosa en sangre.

Varios procesos patogénicos son involucrados en el desarrollo de la diabetes mellitus, una de estos es la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, con la pérdida de la secreción de insulina; seguida de sus consecuencias metabólicas como resultado de la resistencia a la acción de la hormona, por lo que se presenta el síntoma característico de hiperglicemia, y en estas condiciones la administración de insulina es esencial (1).

A este tipo de Diabetes se clasifica como diabetes mellitus tipo 1 (diabetes mellitus insulino dependiente). Esta enfermedad fue denominada autoinmune en el año de 1974, cuando en suero de pacientes con enfermedad poliendócrina autoinmune incluyendo diabetes mellitus insulino dependiente, se encontraron anticuerpos contra células de islotes pancreáticos (ICA), que reaccionaron con los islotes de Langerhans en cortes congelados de páncreas humano; además, se observó la presencia de infiltrado linfocítico en los islotes pancreáticos llamándose a este proceso inflamatorio "insulinitis" (2, 3).

En el año de 1981 se describió el primer autoantígeno aislado de células beta denominado proteína 64 K, que en 1990 se identificó como la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y en 1983 se identificaron los anticuerpos contra insulina, presentes antes de la administración

exógena de insulina (4). En los últimos años se han identificado los autoanticuerpos contra las proteínas fosfatasa de tirosinas, que actualmente son el principal marcador de predicción para diabetes autoinmune (68).

El desarrollo de esta enfermedad tiene definitivamente implicado un antecedente poligenético, primariamente caracterizado por una asociación con moléculas del MHC: HLA-DR3 y DR4. El desarrollo de la inmunidad contra los islotes es confirmado en las siguientes dos características: Primero, el tejido blanco es restringido a las células beta, el componente principal de los islotes de Langerhans del páncreas, demuestra que la diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad autoinmune órgano específica. Segundo, modelos animales para DM tipo 1, así como estudios terapéuticos en humanos diabéticos señalan fuertemente el papel predominante de las células T en el proceso de la enfermedad (5).

El desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1, es conceptualmente dividida en varias etapas comenzando con: susceptibilidad genética, evento desencadenante, desarrollo de actividad autoinmune, pérdida progresiva de la secreción de insulina, establecimiento clínico de la enfermedad (hiperglucemia) y la completa destrucción de las células beta pancreáticas.

La manifestación de la hiperglicemia se presenta como un evento tardío que puede ser de varios meses o años, después que se inició la reacción inmune específica y en ese momento la mayoría de las células beta ya han sido destruidas (6).

Como la diabetes mellitus tipo 1 puede presentarse preclínicamente durante varios años antes de la completa destrucción de las células beta, las perspectivas clínicas son dos: diagnósticas y terapéuticas.

La detección de autoanticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos de las células de los islotes se puede utilizar como marcador inmunológico preclínico de la enfermedad en individuos asintomáticos, que serían candidatos para producir tolerancia inmune contra sus propias células

beta. La inmunoterapia podría prevenir la enfermedad, por lo que optimar la predicción de la enfermedad es requisito indispensable para la intervención terapéutica (7, 8).

1.2 Homeostasis de la glucosa

Las fuentes de glucosa sanguínea son principalmente: 1) los carbohidratos de la dieta; 2) de varios compuestos glucogénicos que experimentan gluconeogénesis, tales como aminoácidos glucogénicos, propionato, lactato, glicerol y 3) del glucógeno hepático por glucogenólisis.

La concentración de glucosa en sangre (glucemia) en el hombre, en estado de posabsorción varía entre 80 a 100 mg/dl. Después de la ingestión de una comida con carbohidratos, puede elevarse a 120 ó 130 mg/dl (6.6 ó 7.2 mmol/l). Durante el ayuno, el valor cae alrededor de 60 a 70 mg/dl (3.3 a 4.0 mmol/l). En condiciones normales estos valores son controlados dentro de estos límites. La regulación de los niveles sanguíneos de glucosa es uno de los mecanismos homeostáticos más finamente regulados y en el cual toman parte el hígado, los tejidos extrahepáticos y varias hormonas.

Cuando no se dispone de fuentes exteriores de alimentos, los requerimientos energéticos del organismo deben ser cubiertos mediante la oferta selectiva de calorías almacenadas en tejidos específicos. Cuando el alimento se encuentra disponible, éste debe ser almacenado en un sistema compacto que utilice un mínimo de energía y permita una movilización rápida.

El principio de control del almacenamiento de los alimentos y de su liberación es la hormona insulina. Otras hormonas que intervienen en este control son: glucagón, catecolaminas, glucocorticoides, tiroxina, hormona del crecimiento y la hormona adenocorticotropica (11).

1.2.1 Regulación hormonal de la glucemia

A través de la sangre la glucosa es distribuida a todas las células del organismo, para que la utilicen según sus necesidades. La glucemia depende principalmente de dos tipos de factores hormonales: 1) hipoglucemiante, que permite el paso de glucosa hacia las células y provoca su disminución; 2) hiperglucemiantes, aportan glucosa hacia la sangre (11, 14).

1.2.2 Factor hormonal hipoglucemiante

En condiciones normales del estado alimentado, el único factor hipoglucemiante conocido es el paso de glucosa a las células y es controlado por la hormona insulina, que es el único compuesto con esta acción. Junto con los receptores de insulina y los transportadores de glucosa, el papel desempeñado por la insulina consiste en transferir la glucosa extracelular hacia los sitios de almacenamiento intracelular en la forma de macromoléculas como: glucógeno, lípidos y proteínas. Por consiguiente la glucosa es almacenada en condiciones de abundancia y reservada para los momentos de necesidad.

1.2.3 Insulina

La insulina es una hormona producida por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina con un peso molecular (PM) de 6,000 daltones, es un polipéptido constituido por dos cadenas, A y B unidas por dos puentes disulfuro. La insulina es sintetizada como una preprohormona (PM 11,500) compuesta por cuatro partes: un péptido señal, la cual es una secuencia hidrófoba de 23 aminoácidos; la cadena A con 21 aminoácidos; la cadena B con 30 aminoácidos y un péptido C conector con

31 aminoácidos.

El péptido señal dirige a la molécula a las cisternas del retículo endoplásmico y posteriormente es eliminado. Esto produce la molécula de proinsulina (PM 9,000), la cual se acumula en el aparato de Golgi de modo que es posible almacenar un gran número de moléculas en el interior de una vesícula de secreción.

Las vesículas de secreción comienzan a migrar hacia la interfase de las células beta y los capilares que las irrigan siempre que exista un estímulo secretor mediante mecanismos nerviosos, alimentarios y hormonales. Durante la secreción el péptido C es separado de las cadenas combinadas A y B. Cuando se produce la ruptura de estos gránulos y la descarga de su contenido en la circulación y se liberan cantidades iguales de insulina y péptido C, así como una pequeña cantidad de proinsulina.

El péptido C no tiene una actividad biológica conocida y la proinsulina tiene menos del 5% de la actividad de la insulina. El gen de la insulina humana se ubica en el brazo corto del cromosoma 11 (14, 73).

1.2.3.1 Regulación de la secreción de insulina

El páncreas humano secreta de 40 a 50 unidades de insulina al día, que representan aproximadamente del 15 a 20% de la hormona almacenada en la glándula. La secreción de insulina es un proceso que requiere energía en el que interviene el sistema de microtúbulos y microfilamentos en las células beta.

El regulador fisiológico más importante de la secreción de insulina es el aumento de la concentración de glucosa sanguínea. El umbral de esta concentración para la secreción es el valor de la glucosa sanguínea en ayuno de 80 a 100 mg/dl (4.5 a 5.5 mmol/l) y la respuesta máxima se obtiene a concentraciones de 300 a 500 mg/d (16.5 a 27.5 mmol/l).

La secreción de insulina en respuesta a la glucosa es bifásica. Hay

una respuesta inmediata que corresponde a la primera fase, que comienza en un minuto y dura entre cinco y diez minutos, sucede aún antes de que los alimentos sean absorbidos y es responsable aproximadamente del 2% de la secreción total.

El polipéptido inhibidor gástrico (PIG) es la hormona que estimula la secreción de insulina y que, cuando es elaborado por las células del intestino delgado en respuesta a la absorción de glucosa, provoca una liberación de insulina. El pico mayor de la secreción de insulina se produce durante la absorción de glucosa tardía, que corresponde a la segunda fase, y su estímulo principal es el ingreso de glucosa en las células beta.

Ciertos aminoácidos como : leucina, arginina, histidina y fenilalanina, representan potentes estímulos para la liberación de insulina, los agonistas beta adrenérgicos, agentes farmacológicos como la tolbutamida son otros estimuladores de la secreción de insulina. La insulina no tiene una proteína plasmática transportadora; por lo tanto bajo condiciones normales su vida media plasmática es menor de cinco minutos.

La manifestación más importante de la deficiencia de insulina en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas es la hiperglucemia, principal característica de la diabetes mellitus.(14)

1.2.3.2 Mecanismos de acción de la insulina

La acción de la insulina comienza cuando se une a un receptor glucoproteínico específico en la superficie de la célula blanco. Las diversas acciones de la hormona pueden ocurrir en segundos o minutos, tales como: el transporte de glucosa, efectos metabólicos, activación e inhibición enzimática; o después de algunas horas como son: la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y el crecimiento celular.

El receptor de la insulina es un heterotetrámero formado por dos subunidades designadas como alfa y beta, en la configuración $\alpha_2\text{-}\beta_2$,

unidas por puentes disulfuro. La subunidad alfa (PM 135,000) es enteramente extracelular y fija a la insulina. La subunidad beta (PM 95,000) es una proteína transmembranal. La porción citoplásmica de la subunidad beta tienen actividad de tirosincinasa y un sitio de autofosforilación. Se cree que ambos intervienen en la transducción de la señal y en la acción de la insulina.

El receptor de la insulina es sintetizado y degradado constantemente, su vida media es de 7 a 12 horas, y su gen se localiza en el cromosoma 19. Los receptores de insulina se encuentran en casi todas las células de los mamíferos, en concentraciones de hasta 20,000 por célula y a menudo en algunas que no son consideradas como blanco de la hormona. Debido a que la insulina también interviene en el crecimiento, replicación celular, organogénesis, diferenciación fetal, en la reparación y regeneración tisular.

Mediadores intracelulares de la acción de la insulina. Durante muchos años se han buscado segundos mensajeros para la acción de la insulina; sin embargo ninguno de ellos parece explicar a nivel molecular como ocurren las diversas acciones de la insulina, se han propuesto a la propia insulina, calcio, AMPc, GMPc, péptidos y fosfolípidos derivados de la membrana, cationes monovalentes y a la propia tirosincinasa del receptor. Es importante mencionar que si la actividad de tirosincinasa de estos receptores está alterada por algún medio, se altera también el efecto de la insulina.

Transporte de glucosa. La glucosa debe entrar a la célula como primer paso en la utilización de la energía. La excepción es el hígado donde no se ha identificado un proceso transportador específico. En las células hepáticas la glucosa entra por difusión simple a favor del gradiente de concentración que es siempre excesivo, debido a la rápida conversión intracelular de glucosa a glucosa 6-fosfato, proceso intensificado indirectamente por la insulina, ya que produce activación de la glucocinasa, cuyo efecto es a nivel

de la regulación de la tasa de transcripción del ARN mensajero específico.

En otras células, en particular adipocitos y músculos, la glucosa entra por un sistema transportador específico regulado por la insulina, mecanismo conocido como difusión facilitada. La insulina incrementa el transporte de glucosa mediante la incorporación de transportadores desde un depósito intracelular inactivo en el aparato de Golgi y desplazándolos a un sitio activo en la membrana plasmática.

La insulina también promueve la entrada de aminoácidos a la célula, en particular en el músculo, e intensifica el movimiento de potasio, calcio, nucleósidos y fosfato inorgánico. Estos efectos son independientes de la entrada de glucosa por la acción de la insulina.

Efectos sobre la utilización de la glucosa. En una persona normal, un 50% de la glucosa ingerida es convertida en energía mediante la glucólisis, de un 30 a un 40% en lípidos por la lipogénesis y aproximadamente un 10% en glucógeno por la glucogénesis. Los efectos comprenden básicamente la activación e inactivación de enzimas.

La insulina estimula la glucólisis hepática al incrementar la actividad y la cantidad de varias enzimas clave, incluyendo la glucocinasa, fosfofructocinasa y piruvatocinasa. lo que acelera la utilización de glucosa y así reduce indirectamente su liberación al plasma sanguíneo, además la insulina disminuye la actividad de la glucosa 6-fosfatasa, enzima que existe en el hígado pero no en el músculo. Puesto que la glucosa 6-fosfato no puede atravesar la membrana plasmática, esta acción de la insulina conduce la retención de glucosa dentro del hepatocito.

La insulina además estimula la lipogénesis en el tejido adiposo al (1) proporcionar la acetilCoA y el NADPH necesarios para la síntesis de ácidos grasos; (2) mantener una concentración normal de la enzima acetilCoA carboxilasa, que cataliza la conversión de acetilCoA a malonilCoA, y (3) proporcionar el glicerol necesario en la síntesis de los triacilgliceroles;

además, la insulina inhibe la lipólisis.

En el hígado y en el músculo, la insulina estimula la conversión de glucosa a glucosa 6-fosfato, que después experimenta la conversión a glucosa 1-fosfato y es polimerizada a glucógeno por la enzima glucógeno sintetasa, cuya actividad es estimulada por la insulina.

Efectos sobre la gluconeogénesis. La insulina ejerce un efecto inhibitorio sobre este mecanismo metabólico. La enzima gluconeogénica clave en el hígado es la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), que convierte el oxalacetato en fosfoenolpiruvato. La acción de la insulina es reducir la cantidad de la enzima al inhibir selectivamente la transcripción del gen que codifica al ARN mensajero de esta enzima clave.

Efectos sobre el metabolismo proteico. La insulina tiene un efecto anabólico pues estimula la síntesis de proteínas y retarda su degradación. La insulina aumenta la captación de aminoácidos neutros en el músculo, efecto que no está ligado a la captación de glucosa. También se ha demostrado que la insulina influye en la síntesis de proteínas específicas generando cambios en el ARN mensajero correspondiente.

Por lo tanto las acciones más importantes de la insulina consisten en la estimulación de la transferencia de glucosa y aminoácidos desde la sangre hacia los tejidos insulino dependientes para su almacenamiento macromolecular, la estimulación de la síntesis hepática de glucógeno, la inhibición de procesos catabólicos, como la: glucogenólisis, proteólisis y lipólisis. Además de la inhibición de la gluconeogénesis.

1.2.4 Factores hormonales hiperglucemiantes

En los periodos de ayuno actúan una serie de factores hiperglucemiantes hormonales en respuesta a la disminución de los niveles

sanguíneos de glucosa. Estos agentes tienen su efecto sobre el metabolismo intermedio, para formar glucosa a partir de macromoléculas almacenadas. Por lo tanto, las proteínas y el glucógeno son convertidos en glucosa. De este modo la glucosa formada en el hígado, representa la fuente más importante de glucosa sanguínea no dietética. Los factores hormonales hiperglucemiantes más importantes son los siguientes:

Glucagón. Es una hormona secretada por las células alfa de los islotes del páncreas, estimula la glucogenólisis al activar la fosforilasa del glucógeno. La degradación del glucógeno conduce a una rápida elevación de la glucosa sanguínea. La hormona glucagón no tiene acción sobre la fosforilasa del glucógeno del músculo, además también estimula la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y ácido láctico.

Catecolaminas. Estas hormonas inducen la glucogenólisis en hígado y en músculo, debido a la estimulación de la fosforilasa del glucógeno. En el músculo, a consecuencia de la falta de glucosa 6-fosfatasa, la glucogenólisis sobreviene con una formación de ácido láctico, en tanto que en el hígado, la glucosa es el producto principal, provocando el aumento en su concentración sanguínea.

Glucocorticoides. Estimulan la gluconeogénesis hepática, como resultado del aumento del catabolismo de las proteínas, aumentando la concentración de aminoácidos libres y los aminoácidos glucogénicos se incorporan al metabolismo de los carbohidratos, por lo que pueden llegar a formar glucosa.

Hormona adenocorticotrópica. Estimula la secreción de glucocorticoides de la corteza renal.

Tiroxina. Facilita la absorción intestinal de glucosa y estimula la glucogenólisis a nivel hepático.

Hormona del crecimiento. Inhibe la utilización de glucosa por los tejidos ya que deprime la acción de la hexocinasa, disminuyendo el ritmo de fosforilación de la glucosa y su incorporación a la célula.

1.2.5 Glucemia y efecto regulador renal

Cuando la glucosa sanguínea alcanza valores relativamente altos, el riñón también ejerce un efecto regulador. La glucosa es filtrada libremente por los glomérulos, pero normalmente es reabsorbida por completo hacia la sangre a nivel tubular, este mecanismo requiere de energía.

La carga tubular de una sustancia se define como la cantidad de la misma que se filtra a través del glomérulo por minuto y la capacidad del sistema tubular para reabsorber glucosa está limitada a una carga tubular máxima de 350 mg/min. y depende de la concentración de glucosa en sangre, la velocidad de filtración y de la permeabilidad tubular.

Cuando los valores de glucemia en sangre se elevan, el filtrado glomerular puede contener una mayor cantidad de glucosa de la que puede ser reabsorbida; el exceso pasa a la orina para producir glucosuria. En individuos normales, la glucosuria ocurre cuando la concentración de glucosa en sangre es superior a 180 mg/dl, conocido como umbral renal para glucosa (11, 14).

1.3 Definición clínica de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de alteraciones metabólicas caracterizadas por la hiperglucemia, que resultan de defectos en la secreción o acción o ambas de la insulina.

En la patogenia de la diabetes mellitus el factor predominante es la deficiente acción de la insulina sobre su receptor, lo que produce la hiperglucemia que resulta en la sintomatología clásica de poliuria (por diuresis osmótica), polidipsia (secundaria a poliuria), pérdida de peso (resultado de la pérdida calórica y los ajustes metabólicos consecuentes) así como alteraciones en la agudeza visual.

La hiperglucemia crónica conduce a lesión y disfunción a largo plazo de diversos órganos; especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.

Las complicaciones de tipo crónico son causadas por glucosilación crónica de proteínas tisulares y producción excesiva de polioles, que incluyen: retinopatía con pérdida potencial de la visión; nefropatía que lleva a insuficiencia renal; neuropatía periférica que conduce a ulceraciones en extremidades inferiores, alteraciones vasculares y amputación; y neuropatía autonómica con disfunción gastrointestinal, cardiovascular, genitourinaria y sexual. En estos pacientes son comunes las alteraciones cardiovasculares por aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular y vascular periférica. Así también la hipertensión arterial, las hiperlipidemias y la enfermedad periodontal son frecuentemente encontradas en pacientes diabéticos (3, 5).

Las complicaciones agudas son: cetoacidosis diabética y estado hiperosmolar no cetósico, debidas al descontrol metabólico y de los mecanismos hiperglucemiantes constantes, por lo general acelerados por un factor precipitante. También se incluye la hipoglucemia inducida por sobredosis de insulina exógena utilizada para el tratamiento de diabetes (10).

Actualmente se considera a la diabetes mellitus un problema de salud pública, por su alta frecuencia, prevalencia, morbilidad y mortalidad.

1.3.1 Criterios actuales para el diagnóstico clínico de diabetes mellitus

Actualmente se utilizan tres diferentes formas diagnósticas que deben confirmarse en algún día subsecuente por cualquiera de los siguientes criterios: a) síntomas de diabetes más una cifra casual (no necesariamente en ayuno) de glucemia con valor ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l); b) glucemia de ayuno con valor ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l) y c) glucosa con valor ≥ 200 mg/dl a las dos horas en la curva de tolerancia a la glucosa

estándar con una carga oral de 75g. Después del diagnóstico clínico, el paciente es clasificado en cualquiera de los dos tipos principales de diabetes tipo 1 o 2, o en su caso en algún otro tipo específico de diabetes (3, 5).

1.3.1.1 Glucemia casual y glucemia en ayuno

La glucemia casual con un valor mayor o igual a 200 mg/dl junto con los síntomas de diabetes, garantiza el diagnóstico clínico. Esta puede determinarse a cualquier hora del día y sin considerar el tiempo de la última comida. Los síntomas clásicos de la diabetes incluyen: poliuria, polidipsia y pérdida de peso.

Otro criterio se establece con la concentración plasmática de glucosa en ayuno con un valor mayor o igual a 126 mg/dl en más de dos ocasiones en niños y adultos que no padecen enfermedades intercurrentes, son ambulatorios y han ingerido una dieta normal. El ayuno se considera como la falta de ingesta calórica por lo menos durante 8 horas. Cuando los valores de glucemia en ayuno se encuentran entre normales y diabéticos, entre 110 a 126 mg/dl (6.1 a 7.0 mmol/l), indican la necesidad de confirmar con la prueba oral de tolerancia a la glucosa. (OGTT) (3).

1.3.1.2 Prueba oral de tolerancia a la glucosa

La prueba oral de tolerancia a la glucosa además de utilizarse cuando existen dudas referentes al diagnóstico de diabetes, se usa para diferenciar entre diabetes mellitus y glucosuria renal o bien para determinar una tendencia hacia la diabetes mellitus en los hijos de padres diabéticos.

La tolerancia a la glucosa, se define como la capacidad del organismo para utilizar la glucosa y se determina por la naturaleza de una curva de glucemia, después de la administración de una dosis de prueba de glucosa

por vía oral. Una dosis de 75 gramos de glucosa es la cantidad que permite una mayor discriminación en los adultos. En los niños la dosis es de 1.75 gramos de glucosa por kilogramo de peso corporal (hasta 75 gramos).

Debe obtenerse una muestra sanguínea en ayunas y la glucosa debe ser bebida en una solución de agua a una concentración no mayor de 25 g/dl, con algún aditivo que le confiera sabor. El tiempo cero es el momento de la ingestión de la solución glucosada, la cuál debe ser bebida en un lapso de 5 minutos. Se obtienen muestras sanguíneas a la 1, 2, y 3 horas.

Es preferible determinar la glucosa en el plasma venoso. Los métodos de análisis para glucosa aceptados incluyen el de la hexoquinasa y el de la glucosa oxidasa (12).

Una curva normal se caracteriza por una fase hiperglucémica, que alcanza la cifra menor a 200 mg/dl en la primera hora. La segunda fase, es normoglucémica y se alcanza antes de las 2 horas, le sigue una fase hipoglucémica con cifras ligeramente subnormales; los valores normales de glucosa plasmática son generalmente de 70 a 110 mg/dl (3.9 a 6.1 mmol/l) para el método de glucosa oxidasa; es este caso el valor límite será 110 mg/dl.

En una curva de tipo diabético, la cifra inicial en ayunas puede estar por arriba del valor límite y ser de 140 mg/dl (7.8 mmol/l) o más, con una altura en la fase hiperglucémica superior a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) y un alargamiento notable de la fase hiperglucémica, superior a las 2 y 3 horas, y ausencia de la fase hipoglucémica. En la insuficiencia hepática grave se observa este tipo de curva diabética, pero no existe hiperglucemia en ayuno. En la glucosuria renal el paciente se hace rápidamente normoglucémico. También existen curvas de tipo diabético en el hipertiroidismo, las afecciones hipofisarias hiperfuncionales (3, 10, 11).

1.4 Clasificación de diabetes mellitus y otras categorías de control de glucosa

Clásicamente a la diabetes mellitus se le ha clasificado de acuerdo a la edad de la afección y al tipo de tratamiento farmacológico, agrupándose a los casos de la siguiente manera: diabetes mellitus tipo I o insulinodependiente (DMID), antiguamente conocida como "diabetes mellitus juvenil" y diabetes mellitus tipo II o no insulinodependiente (DMNID) antes denominada "diabetes del adulto".

También incluye otras categorías, como diabetes mellitus gestacional; diabetes mellitus secundaria a otras condiciones y síndromes como: enfermedad pancreática, endocrinopatías, inducida por drogas o sustancias químicas, anormalidades del receptor insulínico y a ciertos síndromes genéticos; disminución de la tolerancia a la glucosa, resultantes de la clasificación publicada en 1979 por el National Diabetes Data Group (NDDG), respaldada por The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus y el Study Group on Diabetes Mellitus de The World Health Organization (WHO) en 1980.

Sin embargo en la revisión de la clasificación por el grupo The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus publicada en 1997 propone los siguientes cambios, para una clasificación etiológica (tabla 1).

1.4.1 Diabetes mellitus tipo 1: autoinmune e ideopática

Con respecto a la diabetes tipo 1, sigue clasificándose así, pero con número arábigo y se elimina el término insulinodependiente, que se basa principalmente en el tratamiento del paciente y no en su etiología, en este grupo se incluyen pacientes con diabetes debida a destrucción de células beta de los islotes de Langerhans por ataque inmunológico, donde

Tabla 1. CLASIFICACION ETIOLOGICA DE LA DIABETES MELLITUS

I. Diabetes mellitus tipo 1	E. Inducida por medicamentos/químicos
A. Autoinmune	1. <u>Vacor</u>
B. Ideopática	2. Pentamidina
II. Diabetes mellitus tipo 2	3. Ácido nicotínico
III. Otros tipos específicos de diabetes	4. Glucocorticoides
A. Defectos genético de la célula beta	5. Hormonas tiroideas
1. Cromosoma 12-HNF-1 α (MODY3)	6. Diazóxido
2. Cromosoma 7-Glucocinasa (MODY2)	7. Agonistas β -adrenergicos
3. Cromosoma 20-HNF-4 α (MODY1)	8. Diuréticos tiacídicos
4. ADN mitocondrial	9. Fenitoína
5. Otros	10. α -interferón
B. Defectos genéticos acción de insulina	11. Otros
1. Resistencia a la insulina tipo A	F. Infecciones
2. Leprechaunismo	1. <u>Rubeola congénita</u>
3. Síndrome de Rabson-Mendehall	2. <u>Citomegalovirus</u>
4. Lipoatrofia diabética	3. Otros
5. Otros	G. Formas raras de diabetes inmune
C. Enfermedades del páncreas exócrino	1. <u>Síndrome del hombre entumecido</u>
1. Pancreatitis	2. Síndrome Acs vs receptor insulina
2. Trauma/pancreatectomía	3. Otros
3. Neoplasia	H. Síndromes genéticos asociados
4. Fibrosis quística	1. Síndrome de Down
5. Hemocromatosis	2. Síndrome de Klinefelter
6. Pancreopatía fibrocalculosa	3. Síndrome de Turner
7. Otros	4. Síndrome de Wolfram
D. Endocrinopatías	5. Ataxia de Friedreich
1. Acromegalia	6. Corea de Huntington
2. Síndrome de Cushing	7. Diabetes insípida
3. Glugagonoma	8. Hipogonadismo
4. Feocromocitoma	9. Porfiria
5. Hipertiroidismo	10. Distrofia miotónica
6. Somatostatina	11. Síndrome de Prader-Willi
7. Aldosteronoma	12. Otros
8. Otros	IV. Diabetes mellitus gestacional

(Diabetes care. 1998, vol. 21: suplemento)

predominan los autoanticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos. En estos casos guarda una fuerte relación con HLA, ligados a genes DQA y B, influenciados por los genes DRB; también hay predisposición a cetosis, aunque la severidad al inicio y durante la evolución del padecimiento se rige por la función residual del páncreas y factores ambientales (1, 3).

En casos en los que no existe evidencia de autoinmunidad, se clasifican como diabetes tipo 1 ideopática (3), se desconoce su etiología y en ellas no se tiene evidencia de autoinmunidad contra células beta, ni relación con el antígeno de histocompatibilidad; además predomina en asiáticos y africanos y presentan diversos grados de deficiencia insulínica. En este grupo no se incluye a pacientes en los que la destrucción en los islotes se debe a otros factores.

1.4.2 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes tipo 2 que es el tipo prevalente de diabetes, aproximadamente un 90% de todos los pacientes diabéticos, se designa con número arábigo y no romano, eliminándose también el término no insulino dependiente.

En este tipo de diabetes existe una deficiencia relativa de insulina. El defecto predominante en esta categoría es la resistencia a insulina, que suele acompañarse de algún defecto de la secreción de insulina. Dicha resistencia esta influenciada por diversos factores como anormalidades en receptores periféricos que pueden incluir alteraciones a nivel posreceptor de insulina, y una sobreproducción hepática de glucosa, sobre todo nocturna.

Tiene un fuerte componente hereditario; de hecho, más de 90% de gemelos monocigóticos concuerdan en el padecimiento. Un dato importante es que en este tipo de diabetes no existe en un inicio deficiencia de insulina, aunque sí hiperinsulinismo, que no es suficiente para compensar la

resistencia, por lo que sobreviene la hiperglucemia.

Otro aspecto característico es la asociación de la diabetes mellitus tipo 2 con la obesidad, pues se ha demostrado que la enfermedad es más frecuente en las personas con sobrepeso. La obesidad trae como consecuencia una disminución del número de receptores para la insulina y, por consiguiente, de la acción de la insulina.

El envejecimiento, la inactividad física y los hábitos alimenticios, son con frecuencia importantes en la etiología de este tipo de diabetes. Por otra parte, la restricción de la ingestión calórica o la pérdida de peso y el ejercicio inducen un control más adecuado de la hiperglucemia (1, 3, 13). En México tiene una prevalencia que oscila entre el 5.6 a 7.8% de la población (9).

1.4.3 Otros tipos específicos de diabetes

En otro rubro se clasifican los tipos de diabetes asociados a defectos genéticos de la célula beta; defectos genéticos de la acción de la insulina; enfermedades del páncreas exócrino; diabetes relacionada a endocrinopatías; con medicamentos; a infecciones y otras formas más raras de diabetes mediadas inmunológicamente, así como síndromes genéticos que se asocian de manera habitual con diabetes. Pero sólo contribuyen con un pequeño porcentaje del total de casos de diabetes mellitus, que principalmente se encuentran distribuidos en los tipos 1 y 2 (3).

Defectos genéticos de la célula beta. Existen tres defectos en las células beta, que se relacionan con diabetes que inicia antes de los 25 años de edad y se caracterizan por alteración en la secreción de insulina, agrupados con anterioridad como diabetes tipo MODY (maturity onset type diabetes young) y se sabe ahora son provocados por mutación en el factor nuclear del hepatocito 1-alfa (HNF1- α) en el cromosoma 12, que es un factor de transcripción hepático. La mutación en el gen de la glucocinasa en el

cromosoma 7p, que resulta en defecto de esta enzima; la glucocinasa a través de mecanismos metabólicos induce la secreción de insulina por las células beta (sirve como "sensor de glucosa" en las células beta). Otra mutación es la del gen del HNF4- α en el cromosoma 20q, implicado en la regulación de la transcripción del HNF1- α .

También existen mutaciones de punto en el ADN, relacionadas con diabetes y otros signos clínicos. Estas mutaciones dan lugar a alteraciones específicas como la conversión de proinsulina a insulina o alteración de la estructura molecular de la insulina.

Defectos genéticos en la acción de la insulina. Existen otras alteraciones genéticas, poco habituales y que dan lugar a defectos en la acción de la insulina, estas anomalías están asociadas con mutaciones del receptor de insulina, pueden producir hiperinsulinemia, ligera hiperglucemia o diabetes grave, algunos individuos con estas mutaciones pueden tener acantosis nigricans (14). Posteriormente, este síndrome fue llamado resistencia a la insulina tipo A. También en este grupo se encuentran alteraciones como leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendehall y lipoatrofia diabética, cuyo defecto se ha localizado en el receptor o posreceptor de insulina, y que por las alteraciones que provocan dan lugar a intolerancia a la glucosa de severidad variable.

Enfermedades del páncreas exocrino. Las enfermedades difusas del páncreas exocrino suelen provocar diabetes, por lesión a las células beta de los islotes; estas incluyen pancreatitis fibrocalculosa, trauma, infección, pancreatectomía, carcinoma pancreático, entre otras.

Endocrinopatías. Otras causas de diabetes mellitus son las endocrinopatías como el síndrome de Cushing, acromegalia, feocromocitoma, glucagonoma, la presencia de cantidades elevadas de hormonas contrarreguladoras como:

hormona del crecimiento, cortisol, glucagon, adrenalina; que producen intolerancia a la glucosa, la cual mejora o remite al resolverse la alteración primaria. En los tumores productores de somatostatina o aldosterona, que causan hipocalcemia la diabetes sobreviene por la inhibición de la liberación de insulina.

Inducida por medicamentos o agentes químicos. También la acción de ciertos medicamentos provoca daño a los islotes, disminución de la secreción de insulina o aumento de la resistencia a la misma, mecanismo por el que se produce diabetes y de los cuales existe una larga lista: diuréticos tiazídicos, glucocorticoides, hormonas tiroideas, ácido nicotínico (11).

Infecciones. Otra clasificación específica relaciona la causa de diabetes a infecciones vírales: rubeola congénita, aunque la mayoría de estos pacientes tienen marcadores HLA e inmunológicos característicos de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune. Además, los virus coxsackie B, citomegalovirus, adenovirus y virus de las paperas han sido implicados en la inducción de esta enfermedad.

Formas raras de diabetes mediadas inmunológicamente. Condiciones como el "Síndrome del hombre entumecido" un desorden autoinmune del sistema nervioso central caracterizado por rigidez del músculo axial con espasmo doloroso. Estos pacientes usualmente tienen altos títulos de autoanticuerpos contra GAD y aproximadamente una tercera parte desarrolla diabetes.

El síndrome de anticuerpos contra el receptor de insulina puede causar diabetes por unión al receptor de insulina, de ese modo bloquea la unión de la insulina a su receptor en los tejidos blanco. Sin embargo, en algunos casos puede actuar como un agonista a la insulina después de la

unión al receptor y poder así causar hipoglucemia. Los anticuerpos contra el receptor de insulina son ocasionalmente encontrados con lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes. En algunos casos pacientes con este trastorno posteriormente pueden presentar acantosis nigricans.

Síndromes genéticos relacionados habitualmente con diabetes.

Múltiples síndromes genéticos son asociados con diabetes. Estos incluyen anomalías cromosómicas del síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Wolfram y otros como: diabetes insípida, hipogonadismo.

1.4.4 Diabetes mellitus gestacional

La diabetes mellitus gestacional (DMG)(15), definida como intolerancia a la glucosa de severidad variable que inicia o se descubre durante la gestación. Esta definición se aplica indistintamente exista o no la necesidad de aplicar insulina para el tratamiento. En el embarazo normal se producen alteraciones metabólicas y hormonales, probablemente sostenidas en alguna predisposición genética.

Al comienzo del embarazo, la progesterona produce una hipertrofia de las células del páncreas, lo que conduce a un incremento de la producción de insulina. Sin embargo se produce posteriormente, entre las semanas 24 a 28 de embarazo, una elevación del cortisol que antagoniza la acción de la insulina, lo que conduce a intolerancia a la glucosa, aún existiendo niveles elevados de insulina circulante.

La prevalencia varía de 1 a 14% (3) de embarazadas dependiendo de la población estudiada, si este estado no se trata adecuadamente, se tiene un elevado riesgo (90%) de complicaciones obstétricas, que incluyen muerte fetal. Los factores de riesgo son: edad mayor de 35 años, obesidad, historia familiar de diabetes, embarazos previos con productos

macrosómicos y pertenecer a algún grupo étnico de alto riesgo; es decir, hispanos, nativos americanos, afroamericanos o asiáticos.

El diagnóstico para DMG se realiza mediante una serie de pasos que incluyen pruebas de tamizaje, curva de tolerancia a la glucosa con carga oral de 100 g. Una vez terminado el embarazo, debe reclasificarse a la paciente con una curva de tolerancia de 2 horas con 75 g de glucosa, para definir si es diabética, con alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), con alteración de la concentración de glucemia en ayuno o normoglucémica (IGF)(16).

1.4.5 Alteración de la tolerancia a la glucosa y de la concentración de glucemia en ayuno

Aún se incluyen en la clasificación otros estados intermedios que se refieren a estados metabólicos entre la homeostasis normal de glucosa y diabetes. El IGT incluye a pacientes que muestran anomalías en lo que respecta a la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT), los cuales no son normales pero tampoco alcanzan valores clásicamente diabéticos, con valores ≥ 140 mg/dl, pero < 200 mg/dl a las 2 horas. El IFG que comprende a pacientes con la prueba de glucemia en ayuno ≥ 110 mg/dl, pero < 126 mg/dl. Aunque no son entidades clínicas en sí, son factores de riesgo para diabetes en el futuro o de enfermedades cardiovasculares y ambos se relacionan con el síndrome de resistencia a la insulina (síndrome X) (13), caracterizado por hiperinsulinemia, obesidad, hipertensión, hipertriacilgliceridemia, incremento de lipoproteína de baja densidad y bajos niveles de lipoproteína de alta densidad (figura 1).

II. DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE

2.1 Definición clínica

Es una enfermedad autoinmune, que resulta de la destrucción selectiva de las células beta productoras de insulina, de los islotes de Langerhans pancreáticos, mediada por células T autorreactivas (3, 18, 19).

Existe una deficiencia real de insulina seguida de sus consecuencias metabólicas, lo que causa hiperglucemia y en estas condiciones la administración de insulina es esencial.

2.2 Epidemiología

Aproximadamente un 10% de todos los pacientes diabéticos corresponden a este tipo. Es común en niños, adolescentes y adultos jóvenes, se presenta con mayor frecuencia entre los 10 y 20 años de edad, pero puede aparecer incluso en la octava y novena década de vida. Se incrementa el diagnóstico clínico inicial entre los 10 y 14 años. En los Estados Unidos de América (EUA) existen 16 millones de personas que han sido diagnosticadas con diabetes, de los cuales 700,000 (17) pertenecen a este tipo, que corresponde a 4.3% del total de diabéticos diagnosticados.

En diversas partes del mundo se ha observado que la frecuencia anual de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune ha aumentado durante los últimos 30 años. La frecuencia anual se define como el número de casos nuevos por cada 100 mil niños en riesgo, la cual es variable; por ejemplo, en Finlandia y Suecia es de 25, en EUA, Dinamarca y Escocia es de 14, en Israel y Francia 4 y por lo menos 1 en Japón. En México la tasa de incidencia reportada es de 1.24/100 mil habitantes/año (9, 10, 20).

2.3 Etiología

Se han relacionado causas genéticas y ambientales entre los factores etiológicos de esta enfermedad. Las evidencias para involucrar factores genéticos vienen de modelos animales como el ratón diabético no obeso (NOD) y la rata Biobreeding (BB). Estos modelos espontáneos de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune y los seres humanos con la enfermedad, tienen por lo menos algún gen en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que contribuye a la susceptibilidad a presentar este tipo de diabetes (7, 21).

En cuanto a los factores ambientales, se pueden mencionar algunos agentes infecciosos que pueden desencadenar el desarrollo de inmunidad contra las células beta, el agente infeccioso mejor conocido que incrementa el riesgo es el virus de la rubeola. Otro factor importante son las proteínas de la leche de vaca (seroalbúmina bovina y beta lactoglobulina)(20).

Una teoría conciliatoria de ambos factores menciona que la presencia de predisposición genética, facilita la acción de los factores ambientales en el desencadenamiento del proceso inmunológico contra las células beta; el factor ambiental inicia el proceso, pero la progresión depende de la presencia o ausencia de antígenos DR3 o DR4 en la región HLA.

Recientemente, se ha sugerido a agentes tóxicos que inducen el desarrollo de la enfermedad, desencadenando el proceso autoinmune.

2.4 Progresión clínica

El desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, es un proceso crónico, que puede ser de varios meses o años, después que se inició la reacción inmune específica. La manifestación de la hiperglucemia se presenta como un evento tardío y en ese momento la mayoría de las células beta ya han sido destruidas (figura 2).

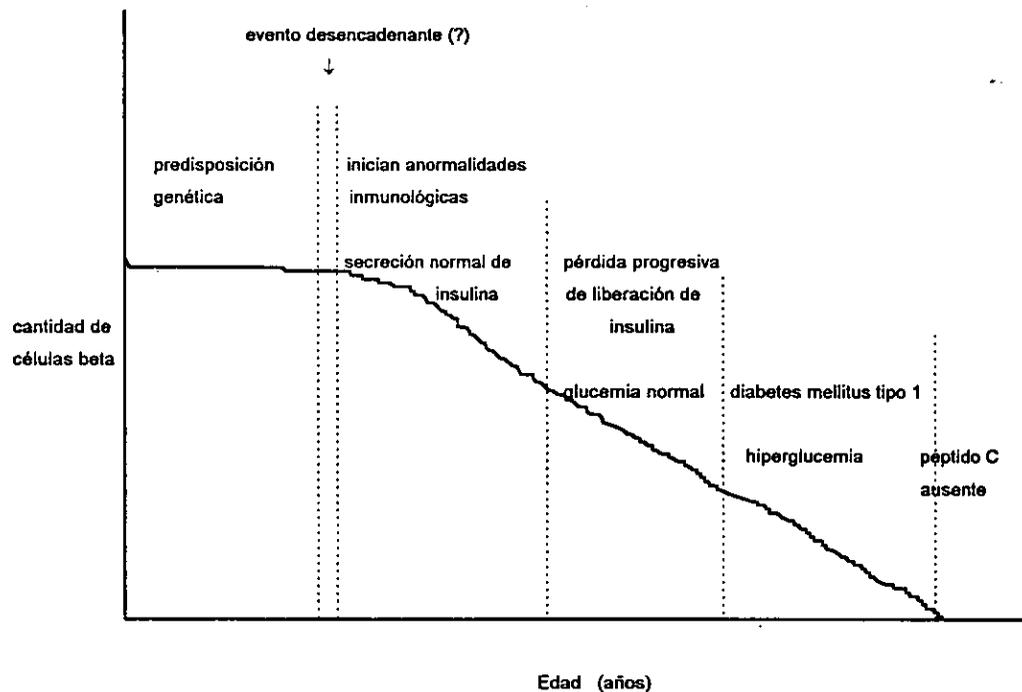


Figura 2. Desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1

(Diabetologia. 1997, 40: 1235-40)

Se divide conceptualmente en varias etapas y comienza con: predisposición genética, evento desencadenante, desarrollo de actividad autoinmune, pérdida progresiva de la secreción de insulina, establecimiento clínico de la enfermedad (hiperglicemia) y termina con la completa destrucción de las células beta pancreáticas (7, 21).

Algunos sujetos susceptibles genéticamente, tienen hipotéticamente un evento desencadenante y posteriormente hay desarrollo de actividad autoinmune. Inicialmente, incluso pacientes con anomalías autoinmunes, tienen secreción normal de insulina. Durante la etapa de pérdida progresiva de la secreción de insulina, las anomalías inmunológicas persisten, a pesar de valores de glucemia normal. El establecimiento clínico de la enfermedad se caracteriza por la presencia de hiperglucemia, en donde aún existe una secreción residual de insulina, pero ya es un evento tardío y que posteriormente concluye con la completa destrucción de las células beta pancreáticas, en donde, la administración exógena de insulina es esencial.

Como la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune tiene una fase previa a la presentación clínica de la enfermedad, los marcadores inmunológicos son útiles para predecir y diagnosticar la enfermedad preclínicamente y seleccionar individuos para inmunoterapia y prevenir la enfermedad.

2.5 Predisposición genética

Actualmente conocemos que la predisposición genética es uno de los factores más importantes involucrados en la etiología de esta enfermedad; además, sabemos que la inmunogenética es una de las herramientas que permite estudiar la susceptibilidad a la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune de manera eficaz.

Las moléculas del MHC se han encontrado en todas las especies de vertebrados estudiadas hasta la fecha. En humanos se denomina HLA

(human leukocyte antigen) por haber sido inicialmente encontrado en los leucocitos. La región HLA esta ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), es una región polimórfica que contiene genes que se han relacionado con la predisposición a diabetes mellitus tipo 1 autoinmune y a otras enfermedades. Dicho polimorfismo, la hace conveniente para identificar los genotipos asociados con la enfermedad (22, 23, 39).

Esta región contiene genes que codifican para varios tipos de proteínas:

Los de clase I, que incluye aproximadamente 17 genes que se relacionan entre sí, incluyendo los de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G y HLA-9.2p. Los de clase II que son los más centroméricos e incluyen los loci DP, DQ, DR y DO/DZ, con genes a y b cada uno. Los de clase III, que se encuentran entre las regiones I y II, codifican proteínas del complemento como C2 y C4, factor B y la enzima 25-hidroxilasa A y B.

Además de estas tres regiones descritas están el gen de la enzima glioxilasa 1, los genes de los factores de necrosis tumoral alfa y beta y otros como los genes de las proteínas de choque térmico HSP70-1 y HSP70-2, todos estos entre el locus HLA-B y los genes de la clase III.

Los genes del HLA se heredan de manera codominante, prácticamente como una sola unidad genética y sus moléculas se expresan en diferentes células. Las moléculas de clase I se expresan en casi todas las células nucleadas (excepto neuronas y trofoblastos maduros), las de clase II se expresan en células como macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células dendríticas, células de Langerhans y linfocitos T activados, participando como presentadores de antígenos.

Los mecanismos de la participación del HLA en el desarrollo de enfermedades todavía son poco conocidos. Las enfermedades asociadas al HLA no muestran herencia mendeliana simple, tienen penetrancia incompleta, su patogenia involucra varios alelos y otros loci fuera del HLA predisponentes y por lo tanto, pueden ser genéticamente heterogéneas. La

combinación de estos factores ha dificultado la identificación de las variables y los mecanismos relacionados con estos padecimientos.

La diabetes mellitus tipo 1 autoinmune es la enfermedad más estudiada con respecto a la asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y aunque se cuenta con datos de todas partes del mundo y sabemos que involucra procesos autoinmunes, cambios tan pequeños como un aminoácido en una cadena de la proteína, o tan complejos como la presencia de determinado alotipo para producir susceptibilidad o protección para una enfermedad, aún existen puntos que faltan por explicar. Además, existe en estos genes, el llamado desequilibrio de unión entre DR y DQ que dificulta definir si un antígeno específico es el responsable de la asociación con la enfermedad, o si es un antígeno secundario al que condiciona dicha relación (22).

2.5.1 Antígenos de HLA asociados

Uno de los primeros antígenos con el que se encontró asociación a esta enfermedad fue el HLA DR4. Sin embargo, de este antígeno, hay varios alelos definidos según su cadena beta (DRB1), de los cuales, sólo algunos se relacionan con la enfermedad y su asociación varía de un grupo étnico a otro, probablemente debido a la existencia de haplotipos con alelos en desequilibrio de unión. Para determinar la susceptibilidad producida por los antígenos, estos se han clasificado de acuerdo a su cadena beta o alfa en diferentes subtipos. Algunos de los subtipos de DR4 asociados con diabetes mellitus tipo 1 autoinmune son el DRB1*0401, *0402 y *405. Otros subtipos de DR4 son "protectores" contra la enfermedad como él *0403, *0406, *0408 (22).

El antígeno HLA DR3 también fue uno de los primeros en asociarse con una susceptibilidad alta a desarrollar la enfermedad. El 95% de los caucásicos con diabetes mellitus tipo 1 autoinmune expresan los alelos DR3

y/o DR4 y la susceptibilidad más alta se encuentra entre los heterocigotos DR3/DR4 (5, 6, 7, 21). Además de los anteriores, se han asociado: HLA DR11, DR13, DR14 y, en menor grado DR7, DR12, DR15 y DR16. Estudios realizados en México muestran asociación con HLA B18 y B21 (22).

Nuevos estudios dirigidos a la cadena beta del gen HLA DQ han demostrado que la presencia de ácido aspártico en el sitio codificado por el codón 57 confiere protección. Este aminoácido se encuentra en los genotipos DQB1*0301, *0303, *0401, *0402, *0503, *0601, *0602, *0603. También se ha demostrado que los alelos, que codifican alanina en la posición 57, como en los subtipos DQB1*0201 y *0302, valina en *0604 y *0501, además de serina en *0502 confiere predisposición variable (26, 40).

Posteriormente se observó una correlación más marcada a susceptibilidad entre individuos portadores de alelos DQA1 que codifican arginina en la posición 52 de la cadena alfa, generalmente se relaciona con el subtipo *0301. Estas observaciones son constantes en todos los grupos étnicos (26, 29, 41).

Aunque se conocen los alelos que pueden predisponer a padecer la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, el riesgo está influido por el efecto combinado de todas las moléculas del HLA, ya que se han observado haplotipos de individuos en los que coinciden alelos protectores con alelos que confieren susceptibilidad, resultando con un riesgo intermedio, o hasta un efecto protector dominante. De que se encuentre o no, un aminoácido ácido o neutro en estos codones, es de lo que depende que se una un péptido y qué secuencias del autoantígeno específico de la célula beta le presente al receptor de células T (TCR), y posteriormente se induzca la respuesta autoinmune

Por lo menos se conocen cuatro moléculas que tienen efecto protector dominante que son: DQB1*0602, DRB1*0403, *0406 y *0408, lo que puede explicar la diferencia de incidencia en los diferentes grupos étnicos. Se conocen ciertos haplotipos con riesgos relativos elevados para la

enfermedad como son: DRB1*0301-DQB1*0201 y DRB1*0405-DQB1*0302.

Como resultado del conocimiento del riesgo relativo de padecer o no la enfermedad, de acuerdo a la presencia de ciertos alelos de susceptibilidad, se puede suponer que un individuo heterocigoto con un alelo que confiere resistencia como el DR2 y otro que de susceptibilidad como DR4 en presencia de DQB1*0302, forma péptidos diabetogénicos que se unen al receptor para el cual son más afines. En este caso se uniría a DR2 y el resultado sería un efecto protector contra la enfermedad. Si, el individuo fuera heterocigoto con DR4 en presencia de DQB1*0302 y el otro DR diferente a DR2 (DRX), el péptido diabetogénico más afín a DR4, se uniría a este receptor provocando susceptibilidad a padecer diabetes mellitus tipo 1 autoinmune.

El orden de afinidad de moléculas de clase II por el péptido diabetogénico será: DR2 > DR5 > DQB1*0302 > DR4, DR3, DR7, DR6 > DQB1*0301.

Otra relación interesante de los antígenos HLA con la diabetes mellitus tipo 1 es con respecto a las complicaciones crónicas, principalmente en la aparición de retinopatía diabética. En Wisconsin, en un estudio epidemiológico basado en poblaciones para retinopatía diabética, se encontró que los pacientes diabéticos con HLA DR4 y sin HLA DR3, tenían cinco veces más riesgo de padecer retinopatía; el antígeno HLA DR8 se encontró que tiene una relación inversa. En México recientemente se ha encontrado relación del HLA DRB*1406 con el desarrollo de retinopatía diabética.

Algunos de los aspectos importantes del conocimiento de la inmunogenética de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, son que se ha logrado el mejor entendimiento sobre algunos mecanismos de la enfermedad. Pero todavía debe trabajarse para poder comprenderse completamente la complejidad de este padecimiento. Otro aspecto importante del conocimiento de la predisposición genética es que permitirá

revelar los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad.

Como la susceptibilidad a la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, está profundamente influenciada por la genética y el riesgo varía significativamente de acuerdo a la presencia de ciertos antígenos HLA DR y HLA DQ, se propone pueden ser utilizados como marcadores preclínicos en el desarrollo de la enfermedad, por lo que se podría dar consejo genético a familiares de pacientes con este padecimiento, según sus factores de predisposición genética particulares y ser candidatos para inmunoterapia (6, 22, 28).

2.5.2 Modelos animales espontáneos de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune

El conocimiento de la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, ha sido descubierto y caracterizado en dos modelos animales espontáneos de la enfermedad que son: El ratón diabético no obeso (NOD) y la rata Biobreeding (BB). En donde se ha encontrado la importancia de un gen o genes similares al MHC en seres humanos, así como las anomalías de las células T que precede a esta enfermedad, y se ha podido afirmar que es un evento autoinmune programado genéticamente (7, 21, 24).

En estos modelos espontáneos fue donde se comenzó a explicar la progresión preclínica y clínica de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune y donde se han realizado los ensayos para inmunoterapia (5, 6).

2.5.3 Control genético de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune en el ratón NOD

El ratón NOD fue descubierto en los Shionogi Research Laboratories

en Japón, obtenido por una cruce de cepas de ratones para establecer características específicas. Los ratones NOD desarrollan espontáneamente la enfermedad con una inmunopatología muy similar a la respuesta humana.

La presentación clínica de la enfermedad entre las 12 y 16 semanas de edad (equivalente para adolescentes humanos), es seguida de la aparición de síntomas incluyendo, hiperglucemia, glucosuria, hipercolesterolemia, cetonuria, poliuria y polifagia. La insulinitis es la lesión histopatológica y es encontrada en ambos sexos hacia la cuarta semana de vida.

La inmunidad celular y humoral es contra las células beta antigénicas y puede haber memoria tanto en humanos como en ratones NOD. Los autoanticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos (ICA) pueden también ser detectados en el suero de estos ratones. La respuesta es mediada por células T autorreactivas, principalmente CD4 en contraste con CD8 en humanos encontrados en biopsias de páncreas de pacientes humanos diabéticos, que han muerto durante el pico de la enfermedad.

La incidencia de la enfermedad es usualmente del 82% en hembras, mientras que en los machos es relativamente baja y altamente variable. Los factores del medio ambiente se dicen son importantes para influir en esta diferencia.

En humanos y ratones NOD, la susceptibilidad es controlada por una combinación de genes del MHC y otros genes no MHC, por lo que los ratones NOD son la especie más explotada para estudiar la genética de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune. Los genes involucrados son los IA e IE localizados en el cromosoma 17, semejantes a los de clase II en humanos, agrupados en el locus *idd1*. Los otros genes no MHC involucrados se encuentran en los cromosomas 3, 14, 11 y 7, que son importantes pero que por sí mismos no son suficientes para que se desarrolle este padecimiento.

Muchos de los locis no MHC tienen relación con el reconocimiento y respuesta de la célula T, por ejemplo para la expresión de algunas citocinas.

Una lista de estos locis incluye al idd2 en el cromosoma 9, idd3 en el cromosoma 3 en donde se encuentra el gen para la interleucina 2 (IL2), idd4 en el cromosoma 11 donde se encuentran los genes para otras citocinas como IL-4, IL-5, IL-3 y otras.

La misma correlación para susceptibilidad del alelo DQB1 en humanos fue encontrada para la molécula I-A en su cadena beta; en los que alelos asociados con susceptibilidad codifican alanina, serina o valina en la posición 57, mientras que si contienen alelos con ácido aspártico no se asocia con el padecimiento.

Los estudios actualizados en ratones NOD pueden ayudar a comprender las bases para la tolerancia inmune en esta enfermedad y así aplicarla en la inmunoterapia de humanos con alto riesgo de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune(6, 7, 21,25, 26).

2.6 Factores ambientales desencadenantes de autoinmunidad

Las evidencias que asocian la etiología y la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune están fuertemente asociadas a factores medioambientales. Algunos estudios epidemiológicos sugieren que ciertos virus y el tipo de alimentación, además de la predisposición genética, facilitan el desencadenamiento y la continuación del proceso patológico autoinmune que conduce a la destrucción de las células beta (10).

2.6.1 Enfermedades vírales

Epidemiológicamente se ha notado que las enfermedades como la influenza han aumentado el número de personas diagnosticadas con diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, pero no todas las personas que tienen contacto con la influenza la desarrollan, lo que confirma la predisposición genética. Otras infecciones involucradas se deben al virus coxsackie B y el

picornavirus, que ocasionan la expresión de proteínas en la superficie de las células infectadas, las cuales van a ser reconocidas por el sistema inmunológico y se induce la producción de citocinas como interferón gamma y el factor de necrosis tumoral, que es lo que va a provocar la destrucción de las células beta. Estas sustancias alteran la respuesta inmune e inducen la expresión de los antígenos por las células beta y de esta manera contribuye a que se desarrolle el proceso inflamatorio, llamado insulinitis.

Los mecanismos por los cuales los virus inducen la enfermedad han estado sujetos a considerables especulaciones. Una suposición es que la susceptibilidad a desarrollar la diabetes autoinmune subsecuente a una infección viral está ligada con la genética. En un estudio con 250 niños quienes murieron de una variedad de infecciones virales agudas, se encontró que siete murieron por infección de virus Coxsackie B, de estos siete niños, cuatro tenían destrucción significativa de las células beta. Si estos niños hubieran sobrevivido a la fase aguda de la infección, sin duda hubieran desarrollado diabetes autoinmune.

Otros virus asociados para que se desencadene la enfermedad son: citomegalovirus, paperas, sarampión, varicela y rubeola. La infección congénita por el virus de la rubeola es la más fuerte candidata a incrementar la frecuencia de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, ya que se ha encontrado que 20% de los niños presentan la enfermedad después de la infección prenatal (20, 27, 33, 42).

2.6.2 Factores dietéticos

Las prácticas de alimentación infantil y su relación con la etiología de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune tienen una larga historia y se basan en numerosos estudios que tuvieron como objetivo desentrañar el complejo mecanismo que relaciona el tipo de alimentación recibida por el lactante, con el posterior desarrollo de la enfermedad.

Las primeras observaciones provienen de un estudio ecológico escandinavo publicado en 1984, sobre las prácticas de amamantamiento. Los hallazgos de esa investigación sugieren que la ausencia de lactancia natural, o la introducción precoz de la leche de vaca en la dieta, predisponían al desarrollo posterior de diabetes autoinmune en individuos con susceptibilidad genética. Aunque aún existe controversia por los resultados obtenidos. Gerstein, en un metaanálisis, reunió y analizó todas las publicaciones existentes y seleccionó alrededor de 20 trabajos que satisfacían criterios científicos rigurosos. La conclusión de su búsqueda fue que existe asociación, moderada, pero estadísticamente significativa, entre la pronta introducción de la leche de vaca y la terminación prematura del amamantamiento en forma conjunta o alternativa con el desarrollo prematuro de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune en la niñez.

Los autores señalan que ya era conocida la asociación entre la enfermedad y la presencia en ellos de anticuerpos contra diversas proteínas lácteas. También se da a conocer la presencia de autoanticuerpos contra un fragmento de albúmina sérica bovina de 17 aminoácidos (ABBOS), en el 100% de una población infantil finlandesa con diabetes autoinmune de reciente diagnóstico.

En un estudio se comprobó que la adición de proteínas de la leche de vaca a la alimentación de ratas genéticamente susceptibles a la diabetes autoinmune desencadena en ellas la enfermedad. Cuando se eliminaron las proteínas enteras, y se administraron liofilizadas, la incidencia de la diabetes fue prácticamente nula. Investigaciones recientes han identificado la analogía entre una región de la albúmina sérica bovina y la estructura primaria de las subunidades beta de las proteínas I-A, DQ y DR.

Otros autores dicen que al agregar el HLA DQB1 como variable puede aumentar el riesgo en niños alimentados tempranamente con leche de vaca (30, 31).

2.6.3 Composición de la leche de vaca

La composición de la leche, principalmente compuesta de proteínas, es genéticamente controlada en el hombre y en animales domésticos. La leche está compuesta de una mezcla de proteínas específicas, lípidos, vitaminas, minerales y carbohidratos, la concentración varía según la especie. Las interacciones entre los componentes crean un compuesto microestructural el cual va a influir en su valor nutricional.

La mayoría de las proteínas de la leche son sintetizadas en las células mamarias, pero algunas proteínas séricas como la albúmina puede estar presente en cantidades muy pequeñas.

En la leche humana y bovina la proteínas son divididas en dos grupos: caseínas y proteínas del suero de la leche. Las caseínas comprenden una familia de fosfoproteínas, y en bovinos, representan aproximadamente el 80% del total de las proteínas de la leche. Hay una considerable diferencia de las especies en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas, sin embargo tienen las mismas propiedades biofísicas.

La caseína interacciona con el calcio y fosfatos para formar micelas o agregados. El tamaño de los agregados está limitado por la caseína Kappa, la cual cubre las micelas y previene mayor agregación. La proteína que se encuentra en mayor cantidad en el suero de la leche de vaca es la beta lactoglobulina, la cual no se encuentra presente en la leche humana. Las lactoalbúminas son sintetizadas en las células mamarias y su función es en el transporte del retinol en la leche, lo cual es importante por el hecho de que la leche es una excelente fuente dietética de esta vitamina. Otra proteína del suero de la leche es la alfa lactoalbúmina que se encuentra en la leche humana y bovina y está involucrada en la síntesis de lactosa. Menos del 20% del total de los aminoácidos de la albúmina difieren entre las especies.

2.6.4 La leche como factor desencadenante

La homología de la albúmina entre las especies ha levantado interrogantes acerca de que la albúmina del suero de la leche bovina, o más específicamente, la secuencia llamada ABBOS, que pueda servir como desencadenante del proceso autoinmune que concluye con la presentación clínica de diabetes.

Karjalainen, propuso una hipótesis en la que el péptido ABBOS es inmunogénico sólo en individuos con haplotipo de riesgo de HLA que confiere susceptibilidad a diabetes (DQ y DR), capaz de reconocer y presentar al péptido como antígeno.

En un estudio con 142 niños finlandeses con diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, comparándolo con niños sanos de la misma edad y sexo, además de adultos donadores de sangre. Les fueron determinados anticuerpos contra la albúmina sérica bovina (BSA), anticuerpos IgG contra caseína y anticuerpos contra la beta lactoalbúmina. Se encontró que los niños diabéticos tienen niveles elevados de anticuerpos IgG, los cuales incluyen anticuerpos directos contra ABBOS, BSA, caseína y beta lactoalbúmina.

Los resultados obtenidos son importantes, porque los finlandeses tienen una de las más altas incidencias de esta enfermedad en el mundo, además de otras enfermedades genéticas, como causa de su aislamiento geográfico y por tener una gran cantidad de lugares con un pequeño grupo de pobladores, por lo que la población tiene un alto grado de homogeneidad con respecto a su conjunto genético. Algunos estudios posteriores han encontrado conclusiones diferentes, por lo que sigue siendo un tema sujeto a controversias (20, 32, 34, 43).

2.6.5 Factores tóxicos

Algunas toxinas químicas pueden producir diabetes tipo 1 en humanos. Algunos venenos atacan directamente a las células beta pancreáticas; otros desencadenan el proceso autoinmune. Por ejemplo, en Corea se reportaron 300 casos de diabetes tipo 1, de los cuales 250 fueron debidos a la ingestión accidental o intencional de un veneno para ratas, conocido como Vacor, que contiene como principio activo, N-3-piridimetil-N'-p-nitrofenilurea.

Otros agentes químicos pueden causar esporádicamente hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, tales como: bloqueadores de canales de calcio, cimetidina, corticosteroides, vincristina, etc.

El Aloxxan se conoce desde 1954 como inductor de diabetes tipo 1, en modelos animales. También es conocida la Estreptozotocina, en la que una exposición a bajas dosis en ratas, desarrolla un proceso autoinmune principalmente dirigido contra las células beta, así como el inicio gradual de diabetes (6, 35, 36, 38).

III. BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA PROGRESIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE

3.1 Histopatología

La diabetes mellitus tipo 1 autoinmune se caracteriza por la deficiencia en la producción de insulina, secundaria a la destrucción mediada inmunológicamente de las células beta del páncreas (que constituyen del 70 al 80% de la población de células de los islotes de Langerhans). El grado de destrucción celular varía dependiendo de la progresión preclínica y clínica de la diabetes, encontrándose una población hasta de 10% del normal de células beta a los seis meses posteriores a la aparición clínica de la enfermedad. En casos de progresión crónica, las células beta están completamente ausentes en muchas ocasiones.

Entre otros cambios histológicos se encuentran: hipertrofia de islotes, en mayor grado al inicio de la enfermedad, que quedan constituídos de células alfa principalmente; degeneración hidrópica de los islotes y atrofia de los mismos. Comúnmente el resto de los tipos celulares pancreáticos están conservados (células alfa, delta y secretoras de péptido pancreático) (6, 10).

3.1.1 Insulitis

El término insulitis indica la presencia de un proceso inflamatorio en los islotes de Langerhans. La presencia de insulitis sólo se ha observado en islotes que contienen células beta e indica que se ha desarrollado una reacción inmune contra la parte endócrina, dirigida a autoantígenos célula beta específicos y desencadenada por un factor medioambiental.

Se ha observado que la mayoría de los linfocitos T, del infiltrado inflamatorio de los islotes de páncreas de autopsias de pacientes con diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, del ratón NOD y

la rata BB son CD8, lo que podría traducirse como mecanismo de citotoxicidad celular. También se encuentran otros tipos de linfocitos como células K y NK, así como linfocitos T CD4; generalmente los macrófagos no son numerosos en este infiltrado.

Las moléculas de HLA que más se expresan en las células beta son el de clase II y las HLA de clase I está aumentada su expresión en todo el resto de las células del islote y debido a que las células beta no expresan normalmente HLA clase II, se sugiere que esta expresión anómala de moléculas contribuye de forma importante en el desarrollo de la diabetes. Además se incrementa la expresión de IL-2, que indica actividad de células inmunológicas, lo que sugiere una respuesta inmune específica contra un antígeno de la célula beta. En el infiltrado inflamatorio también se encuentra un gran número de linfocitos B; también se han detectado depósitos de IgG y la presencia de proteínas del complemento (6, 20).

3.2 Respuesta de linfocitos T

El papel de las células T en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, inicialmente se basó en la observación de infiltraciones de células mononucleares en los islotes pancreáticos en el comienzo de la enfermedad.

El papel de las células T fue ilustrado por: los efectos de drogas supresoras (las cuales retardaban el comienzo de la enfermedad), la detección de células T autorreactivas en pacientes con la enfermedad, la recurrencia de insulinitis asociada a la destrucción de trasplante de páncreas en pacientes con diabetes y por último la "transferencia" de la enfermedad por trasplante de médula ósea de un paciente diabético a un paciente no diabético inmunosuprimido.

También estudios en animales han demostrado que las células T son capaces de transferir diabetes. La ocurrencia de la enfermedad es timo

dependiente y se requiere la presencia de células T CD4+ y CD8+.

Las células T están presentes en el comienzo de la insulinitis y se ha demostrado su presencia en sangre periférica en pacientes con diabetes autoinmune con diagnóstico reciente ó preclínico. Sin embargo, las células T autorreactivas también son encontradas en sujetos control con HLA que no predisponen a padecer la enfermedad, aunque se encontraron en menor cantidad y son menos reactivas.

Por lo tanto, el encontrar células T autorreactivas en la circulación no significa precisamente una enfermedad autoinmune, sino que también debe ocurrir anomalías inmunológicas para que se induzca el proceso destructivo de las células beta.

La lista de antígenos como blancos de las células T aún sigue incrementándose, y muchos de ellos, los cuales son potencialmente diabetogénicos, no están restringidos únicamente a células beta. Un ejemplo es el autoantígeno glutamato descarboxilasa (GAD 65), el cual es expresado igualmente en otros tipos celulares.

La gran mayoría de los estudios en humanos que se ha hecho con células T reactivas contra antígenos de las células beta han sido realizados en células T de la circulación periférica, en vez de células T propias de la insulinitis. Claramente se sabe que las lesiones insulíticas son más aptas para contener células T patogénicas, pero se han hecho pocos estudios en estas células inflamatorias. Debido principalmente a la pobre accesibilidad del órgano blanco, a la pobre disponibilidad del páncreas postmortem y por el mismo estado tardío del proceso de la enfermedad.

En pacientes con diabetes autoinmune con trasplante de páncreas, la recurrencia de la enfermedad se asocia con una infiltración de células T en los injertos de páncreas, con un predominio de células T CD8+ sobre CD4+ (7, 20, 21, 25, 37).

3.2.1 Subgrupos de células T

En humanos y ratones en estadios tardíos de la enfermedad, en las lesiones insulíticas la mayoría de los linfocitos expresaron CD8. Lo que se ha demostrado sólo en los modelos animales, es que las células CD4 se requieren para el efecto diabetogénico y las células CD8 potencian dicho efecto.

Las células T son críticas para el proceso de destrucción de las células beta; se sabe que la timectomía neonatal previene el desarrollo de diabetes en los ratones NOD y la diabetes puede ser transferida tanto a ratones neonatos y jóvenes NOD. La inducción de la diabetes en esta transferencia adoptiva es dependiente de células T CD4 y CD8 y no requiere de involucrar a los linfocitos B. Sin embargo, solamente las células CD4 son críticas en el proceso de destrucción de las células beta.

El daño a la célula beta no resulta de la interacción directa entre células T CD4 y células beta, sino que es el resultado de la inflamación del tejido dañado, inducida por las células CD4 dependiente de la presencia de macrófagos. Además, la depresión de macrófagos, previene el desarrollo de insulitis y por lo tanto de diabetes en estos ratones (25, 37).

3.2.2 Subgrupos de células T cooperadoras

Las células T CD4 se dividen en dos subgrupos con diferentes actividades biológicas sobre la base de la producción de citocinas después de una respuesta inmune: Las Th1 son caracterizadas por la producción de IL-2 e INF-gamma y son asociadas con la respuesta inmune celular. Las Th2 son asociadas con la respuesta humoral y por la producción de IL-4 y de IL-10.

La gran mayoría de las células T reactivas de islotes humano son Th1 y la citocina que se encontraba incrementada principalmente fue INF-gamma; la

expresión de IL-2 fue similar a los islotes control.

Estudios en ratones NOD apoyan fuertemente el papel de las células Th1 en la patogénesis de la diabetes. La destrucción de las células beta parece ser un estadio del proceso, en el cual antes del proceso destructivo, previamente se observan sólo células T que circundan los islotes, pero no los invaden. Una característica de esta proinsulinitis es la expresión de IL-4 y no de INF-gamma de las células T circundantes, pero al tiempo que comienza la enfermedad, los islotes muestran una infiltración masiva de células T conocida como insulinitis.

Una característica de esta insulinitis destructiva en ratones NOD, es la alta producción de INF-gamma que se encuentran en el infiltrado, lo cual indica la patogenicidad del subgrupo Th1. Además, la enfermedad puede ser prevenida por anticuerpos monoclonales contra el INF-gamma.

Por lo tanto, se observa que las células Th1 son células efectoras en la diabetogénesis en los ratones NOD y las células Th2 no inducen diabetes, pero si proveen protección a través de la regulación retroalimentaria de células Th1, por lo que la anergia de células Th2 puede ser un factor de susceptibilidad para la diabetes (25, 26, 37, 38).

3.3 Respuesta de linfocitos B

Los linfocitos B comprenden sólo una menor proporción de los linfocitos de la sangre y la mayoría de los linfocitos B circulantes se encuentran en estado de reposo. Se conoce además poco acerca de las características de los linfocitos B que circulan antes del comienzo clínico de la enfermedad y se cree que un desequilibrio entre los subgrupos de células T puede afectar la capacidad de los linfocitos B para producir anticuerpos.

Se ha observado que en algunos pacientes con diagnóstico reciente de diabetes se incrementa la secreción espontánea de anticuerpos; lo mismo se ha observado en pacientes que presentan simultáneamente tiroiditis de

Hashimoto y diabetes autoinmune.

Smerdon y colaboradores, en 1994 demostraron que existe un aumento cuantitativo de linfocitos B en pacientes en estado prediabético y diabético, en gemelos estudiados prospectivamente. El incremento de los linfocitos B es a expensas del subgrupo CD5+ principalmente en aquellos pacientes con diagnóstico reciente de diabetes y en prediabéticos, pero no en pacientes con un tiempo prolongado de inicio de la enfermedad.

Las células B CD5+ son un subgrupo de linfocitos B circulantes que se encuentra normalmente en adultos sanos y que se encuentran en altas concentraciones durante la etapa fetal en bazo y cordón umbilical. Este subgrupo de células B produce anticuerpos principalmente de la clase IgM, dirigidos contra una variedad de antígenos propios incluidos DNA desnaturalizado y la fracción Fc de IgG humana. El incremento en el número de células B CD5+ ha sido reportado en otras enfermedades autoinmunes como: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastemia gravis, enfermedad de Graves, síndrome de Sjögren's y púrpura trombocitopénica inmune.

El papel del subgrupo de células B CD5+ en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, incluida la diabetes tipo 1, aún no está bien establecido (5, 44).

3.4 Autoantígenos blancos de células T autorreactivas

Los animales responden a un amplio número de antígenos, produciendo anticuerpos; esto es un fenómeno fisiológico normal, pero existe una gran diferencia entre la producción de anticuerpos en condiciones normales y en las enfermedades autoinmunes, como es el caso de la diabetes mellitus autoinmune, en la cual como una respuesta de los linfocitos B y células plasmáticas, hay producción de autoanticuerpos, secundaria a la destrucción de las células beta inducida por células T

autorreactivas; los autoanticuerpos son producidos en respuesta a autoantígenos de las células pancreáticas.

En las dos últimas décadas una gran cantidad de autoantígenos de los islotes pancreáticos han sido reportados, de los cuales aún no está bien definido su papel patogénico. También se sabe que la expresión y distribución de la mayoría de estos autoantígenos no es exclusiva de las células beta (4, 5).

3.4.1 Autoanticuerpos contra células de los islotes pancreáticos

La diabetes mellitus tipo 1 fue establecida como fenómeno autoinmune en el año 1974, cuando en suero de pacientes con enfermedad poliendócrina autoinmune incluyendo diabetes mellitus insulino dependiente, se encontraron anticuerpos contra células de los islotes pancreáticos (ICA), que reaccionaron con los islotes de Langerhans en cortes congelados de páncreas humano (2).

Numerosos estudios fueron publicados antes de 1984 utilizando ensayos para la determinación de ICA, no estandarizados. Posteriormente los grupos de investigadores realizaron talleres internacionales para estandarizar la determinación; la utilización de un estándar común mejoró la precisión del ensayo (46).

Una síntesis de estos estudios sugiere que: 1) los ICA son comúnmente encontrados en pacientes con reciente diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1, pero que su frecuencia disminuye a medida que la edad de los pacientes es mayor; 2) se demostró que la frecuencia y título de anticuerpos disminuye con el incremento en la duración de la enfermedad; 3) la frecuencia de los ICA se incrementa en parientes de primer grado, y en pacientes con otra enfermedad autoinmune órgano específica; 4) se asocian altos títulos de autoanticuerpos con una pérdida más rápida de la función residual de las células beta a partir del inicio clínico de la enfermedad; 5)

estos autoanticuerpos preceden al inicio clínico de la enfermedad y son un marcador para pacientes con diabetes mellitus tipo 1, que inicialmente fueron clasificados y tratados como diabéticos tipo (5, 18, 19, 45).

Hasta ahora los ICA han tenido el lugar de importante como marcador de la enfermedad y tienen una prevalencia que fluctúa entre el 60 al 85%, son detectados por inmunofluorescencia indirecta, tiñen el citoplasma y la membrana de las células de los islotes del páncreas de humanos, monos y ratas. Pertenecen a la clase IgG, usualmente se encuentran a títulos menores de 1:160. En la población normal, la incidencia de estos autoanticuerpos varía entre el 2 a 4% (4, 47, 48).

3.4.2 Identificación del gangliosido GM2-1 como autoantígeno de células beta

Los ICA son un grupo heterogéneo de autoanticuerpos y una de las principales metas en la investigación de la diabetes mellitus tipo 1 ha sido la identificación de los antígenos causales.

La naturaleza del antígeno que induce la producción de los ICA, que son detectados en cortes congelados de páncreas humanos, por el método de inmunofluorescencia indirecta, durante mucho tiempo quedó sin conocerse, así como su papel patogénico, aunque evidencias indirectas sugerían que era un glucolípido (2, 50).

Posteriormente en 1995 un grupo de investigadores demostró que el principal autoantígeno blanco para los ICA es un monogangliósido pancreático denominado GM2-1, el cual es un potente inhibidor de la unión de los ICA a los cortes congelados de páncreas de algunos sueros positivos a estos autoanticuerpos (49, 51).

Los gangliósidos son glucolípidos que contienen ácido siálico, los cuales son componentes de la membrana y citoplasma celular; están involucrados en la interacción célula a célula, así como en la unión a

hormonas, toxinas, virus y autoanticuerpos a la membrana celular. Los gangliósidos están formados por una porción hidrófila (una cadena de oligosacárido) y una porción terminal hidrófoba (una ceramida). La ceramida contiene una esfingosina y un ácido graso, mientras que el oligosacárido puede ser de longitud variable conteniendo por lo menos un residuo de ácido siálico.

El gangliósido GM2-1 es aislado principalmente de islotes pancreáticos, tejido del sistema nervioso central y periférico, en humanos, ratas y ratones. Este gangliósido es altamente expresado en el ratón NOD en la etapa preclínica de la enfermedad, pero comienza a disminuir significativamente con la progresión de la destrucción de las células beta (4, 49).

3.4.3 Autoantígeno 64K o descarboxilasa del ácido glutámico

En el año de 1982, otro antígeno denominado 64K fue identificado, por inmunoprecipitación de islotes radiomarcados con sueros de pacientes con diabetes mellitus tipo 1; inicialmente se pensó que era específico de las células beta y que era blanco de autoanticuerpos tempranos en el proceso de la enfermedad (52, 53). Posteriormente, en el año de 1990 se identificó al antígeno de 64K como la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD); varios estudios han demostrado que efectivamente esta enzima es el blanco de los autoanticuerpos contra la proteína 64K, así como de las células T autorreactivas(4, 55).

La identificación del autoantígeno 64K como la enzima GAD permitió el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos para la determinación de los autoanticuerpos contra la GAD y se usó como un método más accesible para estimar el valor predictivo de estos autoanticuerpos para la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune(57, 58).

3.4.3.1 Caracterización bioquímica de la GAD

La GAD es una enzima que cataliza la conversión del ácido glutámico a ácido gamma-aminobutírico (GABA), que es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central. Además del páncreas en donde se encuentra en niveles elevados de esta enzima, también se localiza en los ovarios y testículos (57).

Existen dos isoformas de esta enzima codificadas por genes diferentes: GAD 65 y GAD 67; el nombre de estas proteínas se les da por la diferencia en su peso molecular 66,600 y 65,300 daltones, respectivamente. Excepto por diferencias alélicas, la GAD de cerebro y páncreas son idénticas. En cuanto a su distribución la isoforma GAD 65 es más abundante en los islotes. Se ha observado que los autoanticuerpos contra GAD (GADA) reconocen a las dos isoformas, que tienen secuencias casi idénticas las cuales son inmunológicamente reactivas (7, 21, 57).

3.4.4 La red GABA en la célula beta y el daño en la fosforilación oxidativa mitocondrial

El ácido glutámico y el ácido gamma-aminobutírico son los aminoácidos libres que se han encontrado en mayor cantidad en las células beta, sin embargo se sabe que el GABA no funciona en las células beta como un neurotransmisor.

Existen evidencias que respaldan un papel paracrino para el GABA de las células beta, principalmente en la modulación de la secreción de glucagon por las células alfa pancreáticas, por medio de un mecanismo llamado red GABA. Esta función paracrina del páncreas depende críticamente de la fosforilación oxidativa.

En los islotes pancreáticos como en las neuronas, la obtención de alta energía depende de la fosforilación oxidativa de la mitocondria. En particular

las células beta requieren de ATP mitocondrial para la producción y liberación de insulina, su función endocrina. El incremento de ATP que es estimulado por los niveles altos de glucosa sanguínea es la señal para la liberación de insulina mediante un bloqueo de los canales de potasio en la membrana de las células beta.

El papel clave de la fosforilación oxidativa en la producción de ATP, está señalado claramente por la alta susceptibilidad de las células beta a deficiencias de energía por consecuencia de mutaciones genéticas mitocondriales, que ahora ya se reconoce como un tipo de diabetes. Se considera que varias toxinas, algunos estados febriles o hasta incluso una sobrecarga de azúcar, pueden inducir una deficiencia de la fosforilación oxidativa similar a la que resulta de las mutaciones genéticas, aunque sólo transitoriamente. Esta deficiencia de la fosforilación oxidativa inducida ambientalmente podría alterar la red GABA de las células beta.

Las semejanzas de la célula beta y las neuronas son: su dependencia de la fosforilación oxidativa para la obtención de energía; la alta concentración de la GAD la cual es secretada por medio de microvesículas parecidas a las de la secreción sináptica (SLMV). Tanto el papel endocrino como el paracrino de la célula beta dependen estrictamente de la actividad funcional de la fosforilación oxidativa de la mitocondria.

En resumen, el incremento de los niveles de ATP producido por la aceleración de la fosforilación oxidativa, en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre, promueve la liberación de insulina, pero también facilita la acumulación del GABA en las SLMV, así como su liberación dentro de los islotes para que inhiba la secreción de glucagón por las células alfa; se evita de esta manera el efecto antagónico del glucagón a la acción de la insulina.

La red GABA y la fosforilación oxidativa están íntimamente conectadas en la célula beta por medio de la enzima mitocondrial GABA transaminasa, que dirige el catabolismo del GABA a la formación de

succinato. El succinato entra al ciclo de Krebs y es oxidado en la cadena respiratoria de la mitocondria, hasta dióxido de carbono y agua. La generación de succinato permite que se remueva alfa-cetoglutarato, el cual evita que las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, en particular la isocitrato deshidrogenasa sean inhibida por altos niveles de ATP.

Esta vía puede ser crítica para mantener la activación preferencial de la fosforilación oxidativa mitocondrial durante la estimulación con glucosa para la liberación de insulina, por lo que es necesario que esté estrictamente regulada dentro de la célula beta, para mantener un equilibrio óptimo entre el catabolismo y liberación del GABA y para una adecuada comunicación paracrina (Fig. 3) (36, 58).

3.4.4.1 La GAD como enzima clave de la red GABA

Dado que la actividad de la GAD es el paso limitante de la red GABA, la GAD podría ser la enzima clave de este mecanismo, así como del funcionamiento normal de la secreción de insulina y de la función paracrina en los islotes pancreáticos, por lo tanto, las células beta podrían compensar alguna alteración de la red GABA controlando la actividad de la GAD.

El parecido entre las células beta y las neuronas refiere rápidamente a estudios en daño oxidativo del cerebro, por ejemplo hipoxia, en donde la expresión y actividad de la GAD se incrementan en respuesta al exceso de ácido glutámico que resulta del daño a la respiración mitocondrial.

La acumulación del ácido glutámico es inevitable en las células con defecto en la cadena respiratoria porque el dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) no puede ser reoxidado y, como resultado, el equilibrio de la glutamato deshidrogenasa se cambia hacia la producción de ácido glutámico. Por consiguiente, en células beta como en cerebro, la fiebre, la hipoxia o estrés por tóxicos medioambientales, podrían ser perjudiciales a la función bioenergética de la mitocondria y al metabolismo del GABA; por lo

tanto, el resultado sería una sobre-producción de la GAD dentro de la célula (36).

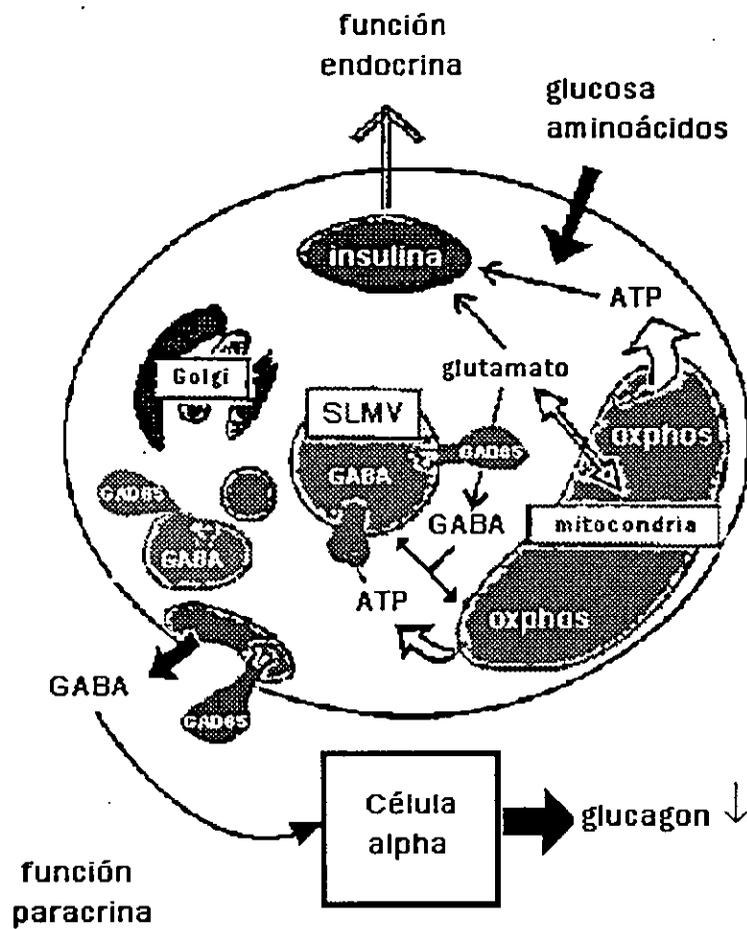


FIGURA 3. Función paracrina de GAD

3.4.4.2 Alteración en la red GABA en la patogénesis de diabetes mellitus autoinmune

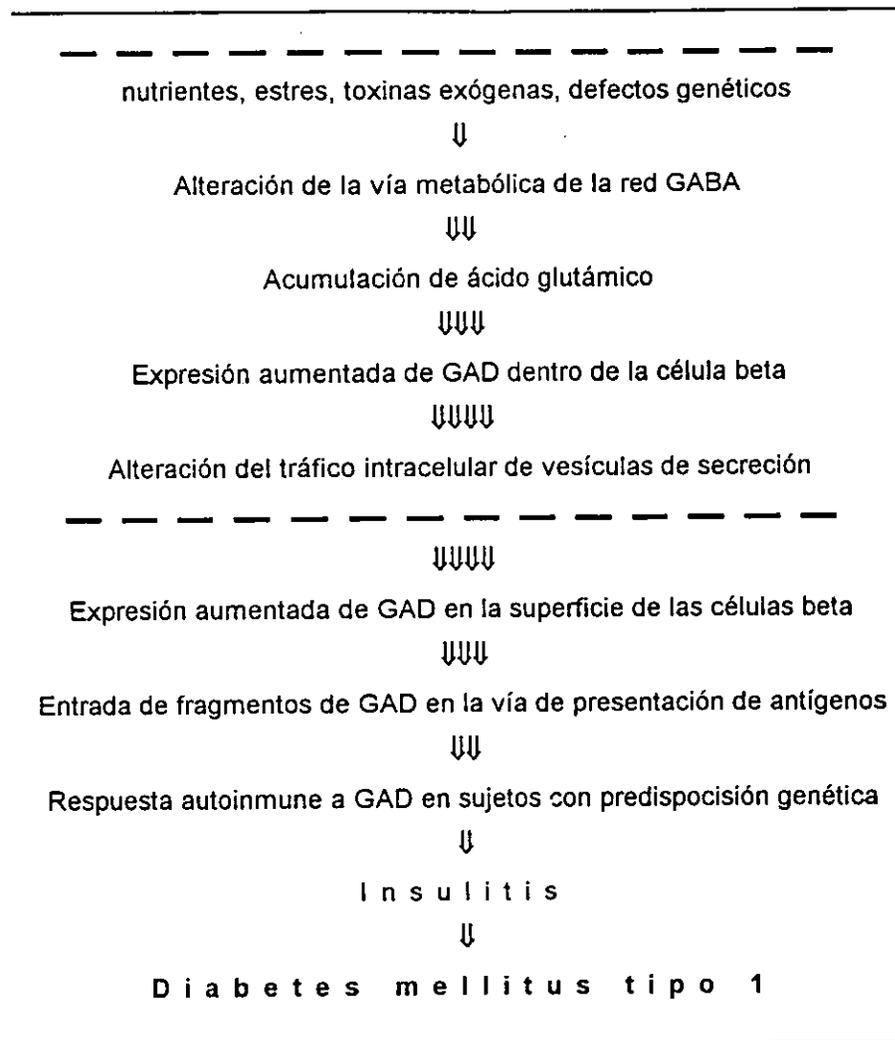
En la alteración de la red GABA se propone como concepto central, que la célula beta responde con un incremento en la expresión de la GAD, secundario a un exceso en la acumulación de ácido glutámico ocasionado por tóxicos, daño metabólico o de otro origen; que interfiere en el tráfico intracelular de las SLMV y como consecuencia aumenta la presentación extracelular de la GAD 65 asociada a las SLMV.

El aumento de la expresión intracelular de la GAD y de la presentación en la superficie de las células beta podrían alterar la tolerancia en algún individuo con susceptibilidad genética e iniciar la destrucción autoinmune y el posterior desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 (Fig. 4).

Estudios en modelos animales apoyan esta teoría; el trabajo realizado con células T de bazo de ratones NOD, demostró que las células T responden antes a la GAD que a otros autoantígenos y que la inyección intratímica de esta enzima previene el desarrollo de la enfermedad. En humanos células CD4 y CD8 han sido selectivamente estimuladas por péptidos sintéticos derivados de la GAD (38, 58).

El efecto tóxico del rodenticida Vacor, que inhibe específicamente la respiración mitocondrial, es un ejemplo de inducción metabólica de la enfermedad y proporciona evidencias que respaldan el concepto de que la disfunción mitocondrial podría ser relevante en la patogénesis de la diabetes mellitus autoinmune (5, 35, 36).

FIGURA 4. EVENTOS METABOLICOS ASOCIADOS CON AUTOINMUNIDAD A GAD



(Diabetologia. 1997, 40: 352-56)

3.4.5 Mimetismo molecular de un dominio homólogo de GAD 65 con la proteína 2C del virus Coxsackie B y la patogénesis de la diabetes

El mecanismo por el cual los enterovirus pueden contribuir a la destrucción de las células beta puede ser demostrado de la siguiente manera. Los virus pueden destruir de manera directa por una infección lítica o por medio de una respuesta inmune dirigida contra la célula beta infectada por el virus. Las células beta además pueden ser dañadas específicamente por radicales libres como el óxido nítrico y citocinas como el INF-gamma, que son producidas como consecuencia de la infección viral y al proceso inflamatorio.

Por otra parte un mecanismo alternativo, llamado mimetismo molecular, podría también jugar un papel en la inducción de autoinmunidad, ocasionando la destrucción de las células beta pancreáticas. El mimetismo molecular se basa en una secuencia homóloga entre un antígeno extraño, por ejemplo una proteína viral, y una proteína del individuo con susceptibilidad genética. Los factores genéticos y los virus como factor medioambiental, son integrados en un mismo concepto etiológico.

En el año de 1992 se reportó que existe una homología entre la isoforma GAD 65 y la proteína 2C, una proteína no estructural del virus Coxsackie B. Una completa homología fue reportada para 10 aminoácidos y semejante en nueve residuos. Los autoanticuerpos contra la GAD también preceden al desarrollo clínico de la enfermedad y tienen una prevalencia del 80% en pacientes con reciente diagnóstico.

En un estudio con autoanticuerpos con reactividad al autoantígeno GAD 65 y a péptidos sintéticos de 2C, se obtuvieron evidencias de reacción cruzada con los anticuerpos contra los antígenos. La reactividad cruzada entre la GAD 65 y la proteína 2C fue además demostrada en el ratón NOD y presenta una relación con alelos del MHC que están asociados con susceptibilidad a diabetes. La presentación de los dominios homólogos por

moléculas del MHC es un requisito indispensable para la reactividad cruzada en células T. En humanos, la relación entre los dominios homólogos a moléculas HLA que son asociadas a diabetes no ha sido reportado hasta ahora (20, 27, 33).

3.4.6 Autoanticuerpos a la GAD, la diabetes autoinmune y el “Síndrome del hombre entumecido”

Los autoanticuerpos reactivos a la GAD (GADA) han sido encontrados en un 60% de pacientes con una rara enfermedad neurológica conocida como el “Síndrome del hombre entumecido” (SMS).

Las diferentes isoformas de la GAD en cerebro y célula beta pueden estar relacionadas con la patogénesis de la diabetes autoinmune y con la del SMS, que son desordenes clínicos distintos pero asociados con respecto a que la GAD es el blanco de los autoanticuerpos reactivos; se conoce que la isoforma GAD 65 predomina en los islotes pancreáticos.

Se han encontrado diferencias en cuanto al tipo de daño celular que sucede en las dos enfermedades. Tanto las neuronas como las células beta expresan la GAD, sólo que en el caso de la diabetes autoinmune, las células beta son destruidas y en el SMS no son destruidas, sólo son afectadas. Este grado de daño sugiere una relación directa entre los GADA y la enfermedad. No todos los pacientes con SMS desarrollan diabetes autoinmune y sólo una pequeña parte de los pacientes con diabetes autoinmune presentan el SMS.

Se ha observado que el desarrollo del SMS involucra una fuerte respuesta humoral hacia la GAD e incluye reconocimiento de epítopes que usualmente están ausentes en la diabetes autoinmune, como resultado de la relación diferente de los linfocitos B y las neuronas que secretan el GABA. Por ejemplo el microambiente del sistema nervioso central es protegido por la barrera hematoencefálica y el antígeno requiere para iniciar una respuesta autoinmune cruzar esta barrera, mientras que las células beta expresan

moléculas del MHC por lo que pueden presentar péptidos propios al sistema inmune, mientras que las neuronas normalmente no lo hacen.

En cuanto a la patogénesis, se ha encontrado una relación inversa entre los títulos de los GADA y la respuesta de las células T a la isoforma GAD 67. Por lo que la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune representa al tipo de respuesta inmune mediada por células T CD4+ Th1, que median la reacción de hipersensibilidad tardía y el SMS representa el tipo de respuesta por células T CD4+ Th2, que median la producción de altos títulos de autoanticuerpos. Esta hipótesis correlaciona con la evidencia de que la destrucción de las células beta por células Th1 es indispensable para la patogénesis de la diabetes autoinmune(3, 21, 67).

3.5 La insulina como autoantígeno en diabetes autoinmune

En el año de 1983 autoanticuerpos a la insulina fueron encontrados en más de la mitad de un grupo de pacientes con diabetes autoinmune de reciente diagnóstico. Los autoanticuerpos son más frecuentes en adolescentes en los que la velocidad de destrucción de las células beta es rápida.

La aparición de autoanticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos, aunque normalmente a títulos bajos, frecuentemente indica el inicio clínico de la enfermedad. La inmunorreactividad a la insulina es secundaria a la destrucción de las células beta, aunque no necesariamente fuera de lugar a la progresión de la enfermedad. La prevalencia de estos autoanticuerpos varía de 35 a 50%.

Dado que es el único autoantígeno célula beta específico y que la tolerancia oral a la insulina puede retardar la progresión de la enfermedad en el ratón NOD, se debería continuar estudiando el papel patogénico de los autoanticuerpos a la insulina (4, 5, 20, 37).

3.6 Autoantígeno ICA 69

Otro antígeno que ha sido descrito recientemente y que es importante para el diagnóstico preclínico de la diabetes autoinmune es el ICA 69. El autoantígeno ICA 69 es una proteína de función desconocida con un PM de 69,000 daltones la cual es expresada en páncreas, corazón y cerebro y, en menor cantidad, en pulmón, hígado y riñón (20, 37, 59). En el páncreas es expresado preferentemente en los islotes de langerhans que en la parte exócrina (62, 63).

Información de cuatro grupos de investigadores sugiere que el ICA 69 es una molécula blanco para desencadenar autoinmunidad diabética, lo cual se basa en las siguientes observaciones: 1) la detección de autoanticuerpos o células T autorreactivas contra la proteína ICA 69 en niños con diagnóstico reciente de diabetes autoinmune; 2) la presencia de autoanticuerpos contra ICA 69 en suero de individuos prediabéticos y diabéticos (60, 61).

La proteína ICA 69 fue observada primero por un grupo de investigadores australianos como una proteína desconocida que era precipitada por anticuerpos contra la albúmina sérica bovina (BSA) en extractos de islotes endógenos radiomarcados. Posteriormente esta proteína fue clonada por dos grupos independientes. Inicialmente dos y posteriormente tres regiones fueron detectadas con una homología estructural con la albúmina sérica bovina. Loci de ICA 69 humanos y murinos son ahora disponibles. La incidencia reportada es del 80% en pacientes con reciente diagnóstico, los cuales tenían células T autorreactivas o autoanticuerpos a la proteína ICA 69 (59, 60, 65).

Estudios con células T de niños con reciente diagnóstico de diabetes autoinmune sugieren una posible imitación antigénica entre la proteína ICA 69 humana, en particular una secuencia de 11 aminoácidos el cual es epítoto llamado Tep-69 que se sabe es reconocido por células T, y la región ABBOS de 17 aminoácidos de la BSA proteína de la leche de vaca, que

induce inmunidad anormal en individuos con susceptibilidad genética a diabetes autoinmune.

La inmunización de ratones NOD con BSA o ICA 69 genera una completa reactividad cruzada en células T que responden a los epítopes inmunodominantes el ABBOS y Tep-69 respectivamente. Tal respuesta es débil o ausente en cepas de ratones sanos. Además los ratones NOD neonatos inyectados con ABBOS o Tep-69 muestran tolerancia cruzada, pero la tolerancia inducida por el epítope ABBOS es transitoria.

La inyección neonatal de Tep-69 reduce la incidencia de la enfermedad, mientras que con ABBOS se tiene sólo un efecto pequeño. En contraste, la inmunización sistémica de jóvenes ratones NOD hembras con ABBOS pero no con Tep-69 reduce la incidencia de diabetes y retrasa el desarrollo de la enfermedad. Las observaciones anteriores demuestran la pérdida de la tolerancia a la proteína ICA 69 en el ratón NOD y el descubrimiento de la imitación antigénica entre los dos epítopes reconocidos por células T en la proteína ICA 69 y la BSA, necesitan nuevos estudios para entender la base molecular de esta imitación antigénica y cómo estos epítopes pueden desarrollar y modificar el curso de la enfermedad (59).

3.6.1 Autoanticuerpos contra ICA 69 en artritis reumatoide

Se han encontrado también respuestas elevadas de autoanticuerpos contra la proteína ICA 69 en pacientes con artritis reumatoide, pero no en pacientes con otras enfermedades inmunes como la enfermedad de Crohn, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple y colitis ulcerosa.

Por ejemplo, en un estudio publicado en el año de 1995 en el cual se trabajó con 99 pacientes con diabetes mellitus autoinmune, de los cuales en 21 (21%) se encontraron autoanticuerpos contra el autoantígeno ICA 69 comparándolo con sólo 3 de 49 del grupo control (6%). En cuanto a los pacientes con artritis reumatoide 5 de 16 (31%) sus sueros fueron positivos

para autoanticuerpos contra la proteína ICA 69. En los pacientes con las otras enfermedades inmunes no se encontró la presencia de estos autoanticuerpos.

La expresión de la proteína ICA 69 fuera de los islotes ya ha sido investigada en otros órganos pero se conoce muy bien la presencia de esta proteína en la membrana sinovial. Es interesante notar que varios autoantígenos blanco para la reacción autoinmune en el desarrollo de diabetes, también ocurre fuera de los islotes, como para la GAD y para la proteína de choque térmico HSP 65 (37).

La relación encontrada con la diabetes autoinmune y la artritis reumatoide con los autoanticuerpos a la proteína ICA 69, sucede también con los autoanticuerpos a la GAD con el SMS. Por lo tanto, la identificación del epítipo reconocido por las células T en artritis reumatoide sería importante para explicar tal relación (65, 66).

3.7 Autoantígenos fosfatasas de tirosina IA-2 y IA-2beta

En años recientes se han identificado autoanticuerpos contra una proteína transmembranal del grupo de las fosfatasas de tirosina que tiene un peso molecular de 106,000 daltones, la cual es precursora de los fragmentos trípticos de 40,000 daltones. Los fragmentos trípticos de 40,000 daltones ya habían sido descritos como proteínas de membrana de los islotes celulares que eran reconocidos por inmunoglobulinas de pacientes con diabetes autoinmune (3, 68).

La fosfatasa de tirosina precursora de los fragmentos trípticos de 40,000 daltones es denominada IA-2 o ICA 512, ya que su secuencia de DNA es idéntica; la porción de 40,000 daltones corresponde a la porción intracelular de la proteína. La IA-2 es expresada en células neuroendocrinas, incluidas células beta, alfa y delta de los islotes pancreáticos, células de la pituitaria y de la médula adrenal (62).

En los primeros estudios para la identificación de los autoanticuerpos contra la IA-2, se utilizó la proteína recombinante como fuente de antígeno; en cerca del 70% de pacientes con diabetes autoinmune fueron encontrados autoanticuerpos contra esta proteína y la presencia de estos autoanticuerpos demostraría posteriormente ser un buen marcador predictivo en individuos con alto riesgo de padecer la enfermedad. Particularmente se encontró que muchos pacientes con autoanticuerpos contra células de islotes pancreáticos (ICA) determinados por inmunofluorescencia indirecta no tenían autoanticuerpos contra GAD 65, pero si presentaban autoanticuerpos contra la proteína IA-2.

Han sido identificados 21 miembros de la familia de la fosfatasa de tirosina, que fueron aisladas de secuencias cortas de nucleótidos amplificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa a partir de un banco de cDNA, formado con cDNAs de células beta de ratón y un par de iniciadores derivados de secuencias de nucleótidos de proteínas de fosfatasa de tirosina conocidas. Tres de estas 21 proteínas eran desconocidas, pero una de ellas mostró una gran similitud a la IA-2 y se le denominó IA-2beta. Sin embargo el papel funcional y patogénico de estas dos proteínas aún se desconoce, pero parece ser que juegan un papel importante en la transducción de señales intracelulares e intercelulares.

La proteína IA-2beta presenta un dominio extracelular, una región transmembranal y un dominio intracelular. El dominio intracelular tiene 376 aminoácidos y el 74% de ellos son idénticos a los de la porción intracelular de la proteína IA-2, considerado como el principal autoantígeno en la predicción preclínica de diabetes autoinmune. Una secuencia parcial del dominio extracelular de IA-2beta indica que difiere sustancialmente de la IA-2 ya que sólo son idénticas en un 26% de su composición. Las dos proteínas son expresadas en islotes pancreáticos y cerebro.

El 45% (23 de 50) de sueros de pacientes con diabetes autoinmune inmunoprecipitaron el dominio intracelular IA-2beta y ninguno de los sueros

de pacientes control (0 de 50). Experimentos de inhibición competitiva mostraron que los anticuerpos del suero de pacientes con diabetes autoinmune reconocen a determinantes comunes y distintos en las proteínas IA-2 y la IA-2beta. Se sabe que una gran cantidad de sueros de pacientes con diabetes autoinmune inmunoprecipita a fragmentos trípticos de 37,000 y 40,000 daltones de islotes celulares, ya que comparten epítopes comunes de reactividad cruzada, pero la identidad de las proteínas precursoras había permanecido desconocida.

En estudios recientes se demostró, que el tratamiento de las proteínas IA-2B y de IA-2 con tripsina producían fragmentos trípticos de 37,000 y 40,000 daltones respectivamente y que estos fragmentos podrían ser inmunoprecipitados con suero de pacientes diabéticos. Además la absorción de suero de pacientes con diabetes autoinmune con proteínas recombinantes de IA-2beta y la IA-2 sin marcar radioactivamente, antes de la incubación con fragmentos trípticos de 37,000 y 40,000 daltones radiomarcados bloquearon la inmunoprecipitación de estos últimos (68, 69, 70).

3.7.1 Los autoanticuerpos contra IA-2 (IA-2A) tienen actualmente el mejor valor predictivo para diabetes autoinmune

Un estudio finlandés terminado en 1997, y hecho con 758 niños y adolescentes menores a 15 años de edad con diagnóstico reciente de la enfermedad, relacionó los IA-2A con otros autoanticuerpos y con marcadores de riesgo genético en diabetes autoinmune. Se les determinó niveles de autoanticuerpos contra IA-2 (IA-2A), autoanticuerpos contra la GAD 65 (GADA) y autoanticuerpos contra insulina (IAA) con ensayos de unión a radioligandos; para la determinación de autoanticuerpos contra células de islotes pancreáticos (ICA) se utilizó inmunofluorescencia indirecta y los alelos HLA DR por serología.

Los IA-2A fueron detectados en el 85.9% del total de los casos sin considerar el género y la edad. El 71.3% de los pacientes fueron positivos para tres autoanticuerpos, y un 90.7% fueron positivos por lo menos a dos. Cincuenta y cuatro sujetos (7.1%) tenían sólo un autoanticuerpo detectable, mientras que solamente dieciséis pacientes (2.1%) resultaron negativos para los cuatro autoanticuerpos.

En el 85.9% del total positivos para IA-2A, están incluidos 171 pacientes (22.6% del total de los casos) que resultaron negativos para los GADA, lo que indica que es el mejor marcador predictivo de diabetes autoinmune en niños y adolescentes menores a 15 años. La relación de los IA-2A fue similar en un estudio belga sólo que en pacientes menores a 20 años de edad.

Se encontró que los IA-2A se relacionan principalmente con moléculas HLA DR4 principalmente en pacientes finlandeses con diabetes autoinmune, mientras que los GADA se asocian más con HLA DR3 y DQB1. Lo que indican estos resultados es que los IA-2A y los GADA se complementan. La prevalencia de IA-2A fue similar en ambos sexos; en este aspecto los IA-2A difieren a los GADA en que son más frecuentes entre niñas y entre pacientes mayores a 10 años de edad; también difieren con los ICA y los IAA en que están asociados principalmente con el desarrollo de diabetes en la juventud.

Además los GADA han sido asociados en pacientes con reciente diagnóstico de diabetes que tienen autoanticuerpos contra tiroides microsomal y tiroglobulina. Esto implica que los GADA son un signo de autoinmunidad general en pacientes con diabetes, mientras que los IA-2A podrían ser un marcador más específico de la destrucción de las células beta.

Los resultados indican que casi todos los pacientes con diagnóstico reciente durante la niñez, pueden ser identificados por la búsqueda de estos autoanticuerpos. La combinación de los IA-2A y los GADA identifican al

95.5% del total de los casos de diabetes mellitus tipo 1 autoinmune (70, 71).

IV. DIAGNÓSTICO PRECLÍNICO DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOINMUNE Y PERSPECTIVAS PARA INMUNOTERAPIA

Como la diabetes mellitus tipo 1 puede presentarse preclínicamente durante varios años antes de la completa destrucción de las células beta, las perspectivas clínicas son dos: diagnósticas y terapéuticas.

Los autoanticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos de las células de los islotes se pueden utilizar como marcadores inmunológicos preclínicos de la enfermedad en individuos asintomáticos; como la susceptibilidad a la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune está profundamente influenciada por la genética y el riesgo varía significativamente de acuerdo a la presencia de ciertos antígenos HLA DR y HLA DQ, también pueden ser utilizados como marcadores preclínicos en el desarrollo de la enfermedad y se podría proporcionar consejo genético a familiares de pacientes con este padecimiento, según sus factores particulares de predisposición genética y podrían ser considerados candidatos para inmunoterapia (6, 22, 28).

La inmunoterapia puede prevenir la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune, por lo que optimar la predicción de la enfermedad utilizando los marcadores inmunológicos y genéticos es requisito indispensable para la intervención terapéutica (7, 8).

La diabetes mellitus tipo 1 autoinmune es una enfermedad para la que no existe aún un tratamiento curativo. Las metas para el tratamiento actual, a través de la administración exógena de insulina sólo se limitan a prevenir complicaciones futuras y la muerte. Estas medidas son las siguientes: 1) mantener cifras de glucemia en ayuno entre 90 y 120 mg/dl; 2) evitar situaciones de hiperglucemia, hipoglucemia, cetosis y cetoacidosis, 3) mantener un estado de bienestar psicológico y lograr un desarrollo y crecimiento normales; 4) prevenir el desarrollo, disminuir la gravedad o ambos de las complicaciones tardías como retinopatía, neuropatía, nefropatía y enfermedad macrovascular. El tratamiento consiste en siete

puntos principales: insulina, dieta, ejercicio, monitoreo, educación y soporte psicológico familiar (10).

Con respecto a la inmunoterapia se han utilizado inmunosupresores químicos (inespecífica), así como la inducción de tolerancia inmunológica (específica) contra las propias células beta y se han obtenido diversos resultados; sin embargo una observación general, es que si, entre más temprano se utiliza el tratamiento se tienen mejores resultados, logrando como objetivo final niveles normales de glucemia en forma permanente, tratando de preservar la función de las células beta, así como el mayor número de ellas.

En cuanto a la inmunosupresión química utilizando drogas como la azatioprina, la ciclosporina y la prednisolona, se obtienen buenos resultados. Sin embargo, se ha observado que en pacientes que reciben drogas esteroidales como la prednisolona combinada con azatioprina o ciclosporina, producen remisiones mayores; sin embargo, la inmunosupresión química inespecífica siempre tiene un riesgo debido a los efectos colaterales de las drogas utilizadas (6, 7, 37).

En cuanto a la inducción de tolerancia inmunológica, se ha observado que tanto la inyección intratímica o intravenosa de células de islotes pancreáticos, así como de GAD pueden prevenir el desarrollo de diabetes en el ratón NOD y la rata BB. También con la administración oral o parenteral de insulina se logra retardar la enfermedad.

Se ha observado que la administración oral de insulina en el ratón NOD además desvía el balance de citocinas en los islotes pancreáticos del patrón Th1 a Th2, por el aumento de la expresión de IL-4; lo que inhibe la insulinitis. Sin embargo, el efecto de la insulina oral es limitado, pero los resultados son mayores al utilizar un adyuvante bacteriano, la proteína OM-89 de *Escherichia coli* que actúa como un inmunoestimulador inespecífico. El efecto además se relaciona con el aumento de citocinas Th2 y la disminución de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible

(iNOS) en los macrófagos por la exposición al adyuvante.

Otras formas inespecíficas de inmunosupresión que han sido utilizadas en el ratón NOD son la supresión linfocitaria utilizando anticuerpos monoclonales contra CD4 y CD3 y también previenen el desarrollo de diabetes. Por lo tanto, la inducción de tolerancia en células T, pueden ser útil en la aplicación de la inmunoterapia para humanos con alto riesgo de diabetes (37, 38, 58, 72).

V. COMENTARIOS

Una conexión importante entre la inmunología y la diabetes mellitus comprende la predicción y el proceso para la prevención primaria de la diabetes mellitus tipo 1 autoinmune. En la comprensión de la enfermedad como proceso autoinmune ha sido importante la existencia de dos excelentes modelos espontáneos de la enfermedad (el ratón diabético no obeso y la rata biobreeding), en los que se ha demostrado que la predisposición genética es uno de los factores más importantes involucrados en la etiología de esta enfermedad, así como otras hipótesis etiológicas medioambientales.

La combinación de ambos factores, en la que la presencia de predisposición genética mediante la presencia de antígenos DR3 y DR4, facilita la acción de los factores ambientales para desencadenar el proceso inflamatorio que inicia la destrucción de las células beta, es una de las hipótesis etiológicas más aceptadas.

Los programas dirigidos contra la predicción y prevención primaria contra la diabetes autoinmune deberán incluir tanto marcadores inmunológicos como los genéticos. Dentro de los marcadores inmunológicos la determinación de autoanticuerpos contra GAD y autoanticuerpos contra la proteína IA-2, en conjunto tienen actualmente el mayor valor predictivo (74).

En el caso de proteínas enterovirales y las prácticas de alimentación infantil como factores de riesgo otras estrategias preventivas también podrían ser útiles: 1) el desarrollo de vacunas enterovirales para una gran cantidad de serotipos y su aplicación a la población de alto riesgo, así como incrementar la promoción del hábito de lavado de manos antes de la ingesta de alimentos, principalmente en infantes en las etapas de lactantes y escolares; estas estrategias podrían reducir en gran parte las infecciones enterovirales de la población con susceptibilidad genética; 2) promover que la ingesta dietética sea balanceada en relación a las proteínas, especialmente

después de alguna enfermedad febril; 3) promover la alimentación con leche materna y retardar la introducción de proteínas animales en la dieta de los niños y 4) la administración de suplementos de vitaminas a la dieta, podrían ser protectores durante las enfermedades febriles agudas (35).

También es importante conocer el efecto que producen los factores medioambientales en forma individual o combinados en la diabetes autoinmune. Por lo que estudios en los modelos animales espontáneos de la enfermedad estudiando uno o varios factores, permitiría encontrar estrategias más adecuadas para la prevención.

Estudios antropológicos de diferentes culturas en los hábitos de alimentación, dieta y las prácticas de higiene como el lavado de manos antes de ingerir alimentos, podrían explicar las diferentes frecuencias geográficas de la enfermedad.

En la identificación de la etiología de una enfermedad multifactorial como la diabetes autoinmune se requiere de la cooperación y comunicación entre varias disciplinas científicas a nivel básico y clínico. Esta colaboración sería muy útil para lograr las mejores estrategias de prevención y tratamiento, lo que se reflejaría en la disminución de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Goodfellow, P.N. , Schmit, K. (1994). From the simple to the complex. *Nature* 371: 104-105.
2. Bottazzo, G. F. , Crhistensen A. , Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *The Lancet* 1278-1282.
3. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. (1997). *Diabetes care* 20: 1183-1195.
4. Harrison, L. C. (1992). Islet cell antigens in insulin-dependent diabetes: Pandora's box revisited. *Immunology today* 13:348-353.
5. Hagopian, W. , Lernmark, A. Autoimmune diabetes mellitus. *The autoimmune diseases II. Academic press, Inc. (1992) 235-278.*
6. Boitard, C. , Bach, J. Insulin-dependent diabetes mellitus: an autoimmune disease. *Molecular autoimmunity. Academic Press, Ltd. Norman talala. (1991) 276-310.*
7. Flier, J. , Underhill, L. (1986). Type I diabetes mellitus. *The new England journal of medicine.* 314: 1360-1370.
8. Ginsberg, B. (1994). The role of technology in diabetes therapy. *Diabetes care* 17: 50-55.
9. Meza-Mendoza, S. Fanghanel-Salmón, G. , Gutiérrez-Gutiérrez, R. (1997). Transplante de islotes pancreáticos. *Revista de endocrinología y nutrición* 5: 27-32.
10. Zúñiga-González, S. (1995). Etiología, fisiopatología, clínica y tratamiento de la diabetes mellitus tipo I. *Medicina general, Abril* 11-24.
11. Skillman, T. , Diabetes mellitus. *Pesce, A. , Kaplan, L. Química clínica. Editorial médica panamericana (1991) 610-645.*
12. Salgado-Cabrera, M. , Blanco-López, A. (1995). Recursos logísticos de la diabetes mellitus. *Acta pediátrica de México* 16. 201-207.
13. Artículo 1494,(1997). Resistencia a la insulina y síndrome X. *Médico general* 19-22.
14. Mayes, P. Regulación del metabolismo de carbohidratos. , Granner, D. *Hormonas del páncreas. Bioquímica de Harper. El manual moderno. (1988) 185-207, 574-563.*
15. Hoet, J. , et al. (1985). Summary and Recommendations of the second International Workshop-conference on gestacional diabetes mellitus. *Diabetes* 34: 123-126.
16. Jovanovic, L. (1985). Screening for gestational diabetes. Optimum timing and criteria for retesting. *Diabetes* 34: 21-23.
17. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. (1998). *Diabetes care* 21: suplemento 1.

18. Schatz, D. , Krischer, J. , et al. (1994). Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. *J.Clin. Invest.* 94: 2403-2407.
19. Sundkvist, G. , Hagopian, W. (1994). Islet cell antibodies, but not glutamic acid decarboxylase antibodies, are decreased by plasmapheresis in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1159-1165.
20. Berdanier, C. (1995). Diet, autoimmunity, and insulin-dependent diabetes mellitus: a controversy. *P.S.E.B.M.* 209: 223-231.
21. Eisenbarth, G. , Castano, L. Diabetes mellitus. *Clinical Immunology. Mc. Samters* (1996) 1007-1032.
22. Rodríguez-Reyna T. , Zúñiga-Ramos, J. , Granados-Arriola, J. (1998). Inmunogenética de la diabetes mellitus insulinodependiente. *Revista de endocrinología y nutrición* 6 (1): 7-10.
23. Theofilopoulos, A. (1995). The basis of autoimmunity: part II genetic predisposition. *Immunology today* 16 (3): 150-159.
24. Like, A. , Appel, M. (1982). Autoantibodies in the BB/W rat. *Diabetes* 31: 816-820.
25. Jaramillo, A. , Gill, B. (1994). Insulin dependent diabetes mellitus in the non.obese diabetic mouse. a disease mediated by T cell anergy?. *Life sciences* 55 (15): 1163-1177.
26. Wicker, L. , Todd, J. (1995). Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 179-200.
27. Karjalainen, J. , Knip, M. (1988). Relationship between serum insulin autoantibodies, islet cell antibodies and Coxsackie-B4 and mumps virus-specific antibodies at the clinical manifestation of type 1 diabetes. *Diabetologia* 31: 146-152.
28. Davies, L. , Kawaguchi, Y., et al. (1994). A genoma-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371: 130-136.
29. Tosi, G. , Facchin, A. , et al. (1994). Assessment of the DQB1-DQA1 complete genotype allows best prediction for IDDM. *Diabetes care* 17 (19): 1045-1049.
30. Drash, A. , Kramer, M. , et al. (1994). Infant feeding practices and the possible relationship to the etiology of diabetes mellitus. *Pediatrics* 94 (5): 752-754.
31. Bodington, M. , Mc Nally, P. (1994). Cow's milk and type I childhood diabetes: no increase in risk. *Diabetic medicine* 11 (7): 663-665.
32. Saukkonen, T. , Savilahti, E. , et al. (1994). Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of antibodies to bovine serum albumin but not to ovalbumin. *Diabetes care* 17 (9): 970-976.
33. Vreugdenhil, G. , Geluk, A. , et al. (1998). Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD 65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-

DR3 molecule. *Diabetologia* 41: 40-46.

34. Saukkonen, T., Virtanen, S., et al. (1998). Significance of cow's milk protein antibodies as risk factor for childhood IDDM: interactions with dietary cow's milk intake and HLA-DQB1 genotype. *Diabetologia* 41: 72-78.

35. Haverkos, H. (1997). Could the aetiology of IDDM be multifactorial?. *Diabetologia* 40: 1235-1240.

36. Esposti, M., Mackay, I. (1997). The GABA network and the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 40: 352-356.

37. Roep, B. (1996). T-cell responses to autoantigens in IDDM. *Diabetes* 45: 1147-1156.

38. Theofilopoulos, A. (1995). The basis of autoimmunity: part I mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology today* 16 (2): 90-98.

39. Granados-Arriola, J., Yamamoto-Furusho, J. (1996). Las bases genéticas de las enfermedades autoinmunes. *Revista de endocrinología y nutrición* 4 (1): 6-14.

40. Moghaddam, P., Knijf, B., et al. (1998). Genetic structure of IDDM1. *Diabetes* 47: 263-269.

41. Wherret, D., Singer, S. (1997) Reduccion in diabetes incidencia in an I-A^{g7} transgenic nonobese diabetic mouse line. *Diabetes* 46: 1970-74.

42. Foulis, A., McGill, M. (1997) A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia* 40: 53-61.

43. Reimer, R., Field, C. (1997) Ontogenic changes in proglucagon mRNA in BB diabetes prone and normal rats weaned onto a chow diet. *Diabetologia* 40: 871-78

44. Smerdon, R., Peakman, M., et al. (1994). CD5+ B-cells at the onset of type I diabetes and in the prediabetic period. *Diabetes care* 17 (7): 657-664.

45. Barbosa, J., Chavers, B. (1982). Islet cell antibodies and histocompatibility antigens (HLA) in insulin-dependent diabetics and their first-degree relatives. *Diabetes* 31: 585-588.

46. Bonifacio, E., Bingley, P. (1990). Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *The Lancet* 335: 147-149.

47. Krischer, J., Schatz, D., et al. (1993). Insulin and islet cell autoantibodies as time-dependent covariates in the development of insulin-dependent diabetes: a prospective study in relatives. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 743-749.

48. Chaillous, L., Delamaire, M., et al. (1994). Combined analysis of islet cell antibodies that cross-react with mouse pancreas, antibodies to the Mr 64,000 islet protein, and antibodies to glutamate decarboxylase in type I diabetic patients. *Diabetes care* 17 (10): 1115-1123.

49. Dotta, F., Previti, M., Dionisi, S. (1995). GM2-1 pancreatic islet ganglioside: identification and characterization of a novel islet-specific molecule. *Diabetologia* 38: 1117-1121.

50. Colman, P. , Nayak, R. , Campbell, Y. (1988). Binding of cytoplasmic islet cell antibodies is blocked by human pancreatic glycolipid extracts. *Diabetes* 37: 645-652.
51. Dotta, F. , Colman, P. , Lombardi, P. (1989). Ganglioside expression in human pancreatic islets. *diabetes* 38: 1478-1483.
52. Baekkeskov, S. , Nielsen, J. , Marnier, B. (1982). Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298: 167-169.
53. Baekkeskov, S. , Landin, M. , Kristensen, J. (1987). Antibodies to a 64,000 Mr islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 79: 926-934.
54. Christie, M. , Pipeleers, D. , Lernmark, A. (1990). Cellular and subcellular localization of an Mr 64,000 protein autoantigen in insulin-dependent diabetes.
55. Baekkeskov, S. , Aanstoot, H. , Christgau, S. (1990). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-156.
56. Cram, D. , Barnett, L. , Joseph, J. (1991). Cloning and partial nucleotide sequence of hman glutamic acid decarboxylase cDNA from brain and pancreatic islets. *Biochemical and biophysical research communications* 176 (3): 1239-1244.
57. Harrison, L. , Honeyman, M. , Deaizpurua, H. (1993). Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *The Lancet* 341: 1365-69.
58. Eisembarth, G. (1994). Mouse or man, is GAD the cause of type I diabetes?. *Diabetes care* 17 (6): 605-607.
59. Karges, W. , Hammond-McKibben, D. , Gaedigk, R. (1997). Loss of self-tolerance to ICA69 in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 46: 1548-1556.
60. Karges, W. , Gaedigk, R. , Cheung, R. (1997). Molecular cloning of murine ICA69:diabetes-prone mice recognize the human autoimmune-epitope Tep-69, conserved in splice variants from both species. *Biochim Biophys Acta* 1360: 97-101.
61. Karges, W. , Pietropaolo, M. , Dosch, H. (1996). Gene expression of islet cell antigen P69 in man, mouse and rat. *Diabetes* 45: 513-521.
62. Mally, M. , Cirulli, V. , Hayek, A. (1996). ICA69 is expressed equally in the human endocrine and exocrine pancreas. *Diabetologia* 39: 474-480.
63. Pietropaolo, M. , Castano, L. , Babu, S. (1993). Islet cell autoantigen 69K (ICA 69): molecular cloning and characterization of a novel diabetes associated autoantigen. *J. Clin. Invest.* 92: 359-371.
64. Bonifacio, E. , Genovese, S. , Braghi, S. (1995). Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 38: 816-822.
65. Martin, S. , Kardorf, J. , Schulte, B. (1995). Autoantibodies to the islet antigen ICA 69

occur in IDDM and in rheumatoid arthritis. *Diabetologia* 38: 351-355.

66. Li, L. , Hagopian, W. , Brasher, H. (1994). Identification of autoantibody epitopes of glutamic acid decarboxylase in Stiff-man syndrome patients. *J. Immunol* 152: 930-934.

68. Lu, J. , Li, Q. , Xie, H. (1996). Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2 beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37 kDa tryptic fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2307-2311.

69. Hatfield, E. , Hawkes, C. , Payton, M. (1997). Cross reactivity between IA-2 and phogrin/IA-2beta in binding of autoantibodies in IDDM. *Diabetologia* 40: 1327-1333.

70. Gorus, F. , Goubert, P. , Semakula, C. (1997). IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in mew-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. *Diabetologia* 40: 95-99.

71. Savola, K. , Bonifacio, E. , Sabbah, E. (1998). IA-2 antibodies- a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Diabetologia* 41: 424-429.

72. Hartmann, B. , Bellman, K. , Ghiea, I. (1997). Oral insulin for diabetes prevention in NOD mice: potentiation by enhancing Th2 cytokine expression in the gut through bacterial adjuvant. *Diabetologia* 40: 902-909.

73. Mercado, R. (1984). Insulina al alcance de todos. *Información científica y tecnológica* 6: 38-39.

74. Hahl, J. , Simell, T. , Ilonen, J. (1998). Costs of predicting IDDM. *Diabetologia* 41: 79-85.