



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS MEDICAS ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL "SIGLO XXI"

**"PORCENTAJE DE CÉLULAS NKT EN PACIENTES PEDIÁTRICOS  
CON DIABETES TIPO 1 Y SUS FAMILIARES DE PRIMER GRADO"**

## **TESIS DE POSGRADO**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA**

**PRESENTA:**

**BIOL. MAYRA VAAL AGUILAR.**

**TUTOR: DRA. RITA ANGÉLICA GÓMEZ DÍAZ**  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA. UMAE  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES.  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

-  
Dra. Rita Angélica Gómez Díaz.  
Investigador Asociado D de la UIM en Epidemiología Clínica.  
UMAE Hospital de Especialidades, CMN SXXI.

-  
Biol. Mayra Vaal Aguilar

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente quiero agradecer a mi familia por darme el apoyo y el ánimo de llevar a cabo todas mis metas.

Un especial agradecimiento a la Dra. V. Carolina Bekker Méndez y su gran equipo de trabajo por contar con el apoyo de la M. en C. Alicia Ocaña; al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, a la Dra. Elsy Canché Pool, a la M. en C. Nonantzin Beristain Covarrubias. por su gran ayuda y apoyo. A la Dra. Rocío Herrera por su colaboración y gran ayuda en la captación de pacientes. Un especial agradecimiento a Ricardo Saldaña Espinosa por su apoyo y finalmente, pero no menos importantes, a la Quim. Sandra Campo León., a la Dra. Renata Saucedo García. y a la Quim. Leticia Ramírez por su colaboración y el incondicional apoyo que siempre me brindaron para llevar a cabo la elaboración del proyecto.

## **INDICE**

Resumen.....	1
Marco teórico.....	2
Planteamiento del problema.....	10
Justificación.....	12
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	15
Material y métodos.....	16
▪ Diseño del estudio.....	16
▪ Población de estudio.....	16
▪ Descripción general del estudio.....	16
▪ Criterios de selección.....	17
▪ Tamaño de la muestra.....	18
▪ Análisis estadístico.....	19
▪ Variables de estudio.....	20
▪ Procedimientos.....	31
Aspectos éticos.....	41
Resultados.....	42
Discusión.....	58
Conclusiones.....	65
Bibliografía.....	66
ANEXOS.....	69

## **INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Características clínicas, bioquímicas y antropométricas de los pacientes con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado y sujetos control sanos. ....	43
<b>Tabla 2.</b> Comparación de los porcentajes de células NKT periféricas entre los diferentes grupos evaluados. ....	47
<b>Tabla 3.</b> Distribución de la positividad de los anticuerpos (anti-GAD65, anti-IA2, anti-insulina) en las familias afectadas con un paciente pediátrico con diabetes tipo 1 y las familias control sanas. ....	48
<b>Tabla 4.</b> Frecuencias génicas de los alelos HLA-DRB1 en pacientes con diabetes tipo 1 y familiares de primer grado comparada con familias control y con un estudio de baja resolución realizado en 381 controles sanos. ....	49
<b>Tabla 5.</b> Frecuencias génicas de los alelos HLA-DQB1 en pacientes con diabetes tipo 1 y familiares de primer grado comparada con familias control y con un estudio de baja resolución de 381 controles sanos. ....	51
<b>Tabla 6.</b> Frecuencias génicas de la distribución de dos-locus del Haplotipo de HLA Clase II en pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado comparadas con familias control y un estudio de baja resolución de 381 controles sanos ordenada de forma descendente. ....	52
<b>Tabla 7.</b> Frecuencias génicas de la distribución de dos-locus del Haplotipo de HLA Clase II en pacientes con diabetes tipo 1 comparadas con un grupo control sano ordenada de forma descendente. ....	54
<b>Tabla 8.</b> Frecuencias génicas de la distribución de dos-locus del Haplotipo de HLA Clase II en los familiares de pacientes con diabetes tipo 1 comparadas con los familiares de los controles sanos. ....	55
<b>Tabla 9.</b> Genotipos heterocigotos u homoigotos observados en pacientes con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado y familias control sanas. ....	56

## **RESUMEN**

### **“PORCENTAJE DE CÉLULAS NKT EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIABETES TIPO 1 Y SUS FAMILIARES DE PRIMER GRADO”**

#### **INTRODUCCION.**

La diabetes tipo 1 es una enfermedad crónica mediada por inmunidad con período silencioso de duración variable antes de que se manifieste clínicamente, caracterizado por la pérdida selectiva de células productoras de insulina en los islotes pancreáticos en individuos genéticamente susceptibles. Durante el periodo que comprende del año 2000 al 2010 la incidencia de diabetes tipo 1 ha aumentando notablemente (3.4 a 6.2/100 000 habitantes).

Existe evidencia de que la diabetes tipo 1 es considerada como una enfermedad autoinmune órgano-específica, en la que participan factores etiológicos de tipo inmunológico (auto-anticuerpos predictivos específicos Anti-GAD, Anti-IA2, Anti-IAA, células reguladoras NKT), genético (haplotipos de riesgo DRB1\*0302, DRB1\*0405, DQA1\*0301, DQB1\*0302) y ambiental. Diversos estudios en ratones y en humanos proponen una relación entre el padecimiento autoinmune de diabetes tipo 1 con el porcentaje de células NKT y han concluido diferentes resultados como el incremento, la disminución o estados normales de esta población celular que nos lleva a preguntarnos cómo se comporta este subconjunto linfocítico en población mexicana.

**OBJETIVO.** Comparar el porcentaje de células NKT en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico y sus familiares de primer grado (padres y hermanos) contra la de sujetos sanos de la misma edad y sexo.

**MATERIAL Y METODOS.** Diseño: Casos y controles.

Universo de estudio: pacientes pediátricos con diagnóstico de diabetes tipo 1 de reciente inicio (máximo 3 meses de evolución), sus familiares de primer grado (padres y hermanos) y familias control. Análisis del porcentaje de células NKT, anticuerpos predictivos y haplotipos HLA de riesgo y protección.

**RESULTADOS.** Se compararon 22 familias de pacientes con diabetes tipo 1 (n=63) y 22 familias con un control sano de la misma edad de los pacientes (n=54). El tiempo de evolución de la enfermedad fue de 38 (12-82) días. El porcentaje de células NKT periféricas intra-grupos mostró significancia estadística ( $p=0.019$ ), al igual que la comparación entre los porcentajes de los pacientes con diabetes tipo 1 (0.03%) y los de los controles sanos (0.12%) ( $p=0.015$ ). El 54.5% de los pacientes con diabetes tipo 1 presentaron anticuerpos positivos (anti-GAD, anti-IA2, anti-insulina) y 10/22 pacientes (45.5%) fueron negativos. El 81.8% de los pacientes con DT1 presentaron por lo menos un alelo de riesgo DR03/04 (OR 3.1 IC 95% [0.8-12.3]) y el 95.5% (OR 6.2 IC 95% [0.7-58]) de los pacientes resultó positivo a alelos de riesgo DQB03/02. Los pacientes y familiares de primer grado que presentan el haplotipo DRB1\*04/DQB1\*03 tienen 2.50 y 2.17 veces más el riesgo de presentar la enfermedad que el grupo control sano [OR 2.50 IC 95% [0.63-6.84],  $p=0.045$ ; OR 2.17 IC 95% [1.15-4.11],  $p < 0.009$ ] respectivamente.

**CONCLUSIONES.** Existen diferencias en el porcentaje de células NKT entre pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico cuando se compara con los controles sanos.

Los hallazgos encontrados hasta el momento apoyan que los familiares de pacientes con diabetes tipo 1 presentan una mayor frecuencia de los haplotipos HLA de riesgo y las familias control presentan más alta frecuencia de los haplotipos protectores acorde con los datos reportados para población mexicana.

Nuestros datos sugieren que el porcentaje de células NKT no se correlaciona con la positividad a los anticuerpos ni con el HLA de susceptibilidad.

## **MARCO TEÓRICO**

La diabetes tipo 1 es una enfermedad crónica mediada por inmunidad con período silencioso de duración variable antes de que se manifieste clínicamente, caracterizado por la pérdida selectiva de células productoras de insulina en los islotes pancreáticos en individuos genéticamente susceptibles. En los últimos 10 años se han aportado nuevos conocimientos, tanto en la patogenia y tratamiento de esta enfermedad.

En nuestro país, no contamos con datos sobre la prevalencia de diabetes tipo 1 en población pediátrica a nivel nacional. Aunque la incidencia de diabetes tipo 1 en México es baja comparada con otros países, los estudios epidemiológicos realizados sobre su incidencia en nuestro país demuestran que se ha incrementado en los últimos años. El reporte de diversas instituciones del Valle de México por el Grupo Ciudad de México, informó una incidencia, en 1984, de 0.43 y en 1988 de 0.47 casos por cada 100 000 habitantes <sup>1</sup>. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 0.6/100 000 habitantes en México<sup>2</sup>. En el año 2008, la División de Epidemiología del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reporta los resultados acumulados de morbilidad por grupos de edad (en intervalo semanal), que muestran un incremento en los últimos 4 años, mientras que el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) y el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) reportan una incidencia de diabetes tipo 1 durante el periodo que comprende del año 2000 al 2010 de 3.4 a 6.2/100 000 habitantes<sup>3</sup>.

En la consulta externa del servicio de endocrinología de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, la diabetes tipo 1 es el principal problema de atención médica de tipo endocrinológico, atendiendo en promedio entre 68 a 69 casos anuales de primera vez.

Existe evidencia de que la diabetes tipo 1 es considerada como una enfermedad autoinmune órgano-específica, en la que participan factores etiológicos de tipo inmunológico, genético y ambiental.

La participación del componente autoinmune proviene de tres tipos de evidencia:

a) La presencia de un infiltrado inflamatorio (insulitis) en los islotes de Langerhans. El daño primario es debido a una respuesta inmune celular donde las células Th1 (CD4+) activan células específicas *in situ* Tc (CD8+) dirigidas contra la célula  $\beta$ .

b) Genética: Durante los últimos años, la GWA (Genome-Wide Association, por sus siglas en inglés) se ha dado a la tarea de implementar estrategias para la identificación de los genes de riesgo que desencadenan la diabetes tipo 1. A la fecha, se han determinado diferentes regiones clasificadas en regiones HLA y no-HLA. La primera representa la mayor parte de los riesgos genéticos, mientras que las regiones no-HLA en su mayoría sólo representan un OR (Odds Ratio) de 1.3 o menos. <sup>4</sup>

Dentro de la región HLA, se han reportado haplotipos de riesgo y predictivos de diabetes tipo 1 que conllevan a una vulnerabilidad genética. En población México-americana el haplotipo DRB1\*0302 es de riesgo mientras que el

haplotipo protector es DRB1\*1402. En cambio, para los mestizos mexicanos los haplotipos de riesgo son DRB1\*0405, DQA1\*0301, DQB1\*0302.<sup>5-7</sup>

c) La producción de auto-anticuerpos específicos contra auto-antígenos de los islotes pancreáticos. La evidencia inicial de autoinmunidad, fue la presencia de estos anticuerpos circulantes que reaccionaban con los islotes pancreáticos en un alto porcentaje de individuos al momento de presentar o establecer el diagnóstico de diabetes tipo 1 de reciente inicio, es decir desde la primer semana hasta los 3 meses de evolución.<sup>8,9</sup> En la actualidad se conoce que principalmente son tres las proteínas blanco de los islotes para la respuesta de anticuerpos: la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), la fosfatasa de tirosina (IA-2), la insulina (IAA). Por otro lado se ha descrito que el ZnT8 (Slc30A8) es un auto-antígeno (catión transportador de zinc) que reacciona con auto-anticuerpos que se expresa específicamente en los islotes de las células beta en el 60% de los pacientes recién diagnosticados. La cuantificación de los anticuerpos contra auto-antígenos, ha sido útil para conocer la actividad de la enfermedad, para determinar su grado de progresión y contribuye a clasificar y predecir el estado clínico de los pacientes. Del 60% al 80% de los pacientes recién diagnosticados presentan anticuerpos anti-GAD65, un porcentaje semejante (60 al 70%) presentan anti-IA2 y ZnT8 y solamente entre un 30% al 50% presentan anticuerpos anti-insulina. Los estudios prospectivos en familiares de pacientes con la enfermedad, muestran que la presencia de dos o más tipos de auto-anticuerpos proporciona un alto valor predictivo para la presentación de la enfermedad.

La respuesta autoinmune crónica se manifiesta clínicamente con la destrucción del 60 al 80% de las células pancreáticas  $\beta$  productoras de insulina<sup>10-14</sup>. La

insulinitis que se observa en los islotes así como en sus alrededores está constituida principalmente de macrófagos y linfocitos T. Diversos estudios han mostrado que la inflamación aparece desde etapas anteriores a la manifestación del daño tisular y la destrucción de las células  $\beta$  correlaciona directamente con presencia de linfocitos T productores de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en los infiltrados locales de los islotes.<sup>15-19</sup>

La respuesta autoinmune en la diabetes tipo 1, se debe a una falla de los mecanismos reguladores de la inmunidad adquirida, los cuales corresponden a la expansión y/o función de las poblaciones de linfocitos T reguladores.

Existen dos grupos importantes de células T en la respuesta inmunológica adaptativa o específica:

b) Células Citotóxicas o supresoras: CD8<sup>+</sup>.

a) Células T Colaboradoras: CD4<sup>+</sup>:

i) Th1 en la inmunidad celular, Th2 en la inmunidad humoral y Th17 en inflamación.

ii) Células T Reguladoras:

A la fecha no se ha identificado, con precisión, a la población de células reguladoras también llamadas células Tregs (con el inductor celular Foxp3), dentro de este grupo existen varios candidatos incluyendo a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, células T Reguladoras naturales (nTregs), Inducibles (iTregs), y las células tipo linfocitos asesinos naturales denominados en inglés “killers” o NKT.<sup>20</sup>

Las NKT fueron identificadas en 1987 en el ratón<sup>21,22</sup> y en 1993-1994 se describió su contraparte en humanos.<sup>23,24</sup> Se trata de una población de linfocitos que expresan el receptor para el antígeno de linfocitos T (TCR), que

es un receptor específico de las células T, así como el marcador común de las células NK (NK 1.1 para el ratón y CD161 en el humano). Para no confundir unas con otras, es importante resaltar la diferencia más representativa de las células NK y las células NKT: las primeras carecen de receptor TCR. La población de células NKT, definida como heterogénea puede ser CD4<sup>+</sup>, o CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (doble negativas= DN) o bien CD8<sup>+</sup>; constituidas por una cadena alfa invariante conformada de las regiones variables V $\alpha$ 24 y V $\beta$ 11.<sup>25</sup>

Estas células responden a antígenos presentados en el contexto de moléculas CD1d con su importante función reguladora mediada por la secreción de las citocinas anti-inflamatorias: INF- $\gamma$  e IL-4.<sup>26</sup>

En términos de autoinmunidad e inflamación, los principales resultados provienen de la prevención de diabetes en el modelo de ratones diabéticos no obesos (NOD).<sup>27</sup> Diversos estudios muestran un defecto del número y función de las células NKT en esos ratones y se ha demostrado que la enfermedad disminuye mediante la transferencia adoptiva de poblaciones enriquecidas de células NKT.<sup>28-31</sup>

En años recientes, se ha demostrado que en el ratón NOD existe una adecuada correlación entre el número de células NKT periféricas y el daño tisular pancreático, lo que lo valida como un modelo para estudios de diabetes tipo 1 en humanos,<sup>32</sup> puesto que los ratones NOD presentan características muy similares en el desarrollo de diabetes tipo 1 semejantes a lo que sucede en la diabetes humana (presencia de insulitis previo al padecimiento de la enfermedad, destrucción de las células  $\beta$  productoras de insulina atribuible a linfocitos T auto-reactivos).<sup>33</sup> Así, Novak J y cols, demostraron por vez primera que las células NKT periféricas pueden inhibir la diferenciación de células CD4<sup>+</sup>

(células importantes en la respuesta inmune innata y adaptativa: Células colaboradoras Th1 y Th2 de las de los procesos inmunológicos) tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones NOD, independientemente de la expresión del marcador CD1d. Este hallazgo sugiere que las células NKT periféricas pueden activarse y generar una respuesta inmunitaria sin expresar dicho marcador. Esta situación es relevante porque se creía que las células NKT necesitaban la expresión de CD1d para realizar sus funciones, y se ha demostrado que otras citocinas también las activan.<sup>34</sup>

Se sabe que la deficiencia numérica y funcional de células NKT (detectada en timo y bazo de ratones NOD a las 3 semanas de edad) media la patogénesis de diabetes tipo 1, pero la fase de desarrollo de las células T en la cual ésta deficiencia ocurre se desconoce. Wagner ha propuesto que las células T convencionales y NKT doblemente negativas tienen un linaje común y que este linaje en el desarrollo del timo de ratones NOD es defectuoso.<sup>35</sup>

Se ha postulado que las células NKT se originan de un precursor de células T del timo y que la deficiencia en dicha población en ratones NOD se debe con toda probabilidad a defectos intrínsecos en el linaje de las células T lo cual resulta en el desarrollo de la diabetes autoinmune.<sup>36</sup>

En varios modelos de diabetes tipo 1 en ratones, el incremento de las células NKT ayuda a prevenir el desarrollo del padecimiento, debido a que las células T CD8 juegan un papel muy importante en la patogenia de diabetes. La frecuencia de las NKT promueve insulinitis severa y diabetes exacerbada. Análisis de células CD8<sup>+</sup> diabetogénicas muestran que las células NKT aumentan su activación, su expresión y su diferenciación a células productoras de INF- $\gamma$ . Estudios sobre la influencia de la células NKT en las células

diabetogénicas CD8<sup>+</sup> revelan que las NKT no sólo fallan en la regulación sino que contribuyen en el desarrollo de diabetes.<sup>37</sup>

En los últimos 10 años los estudios en humanos, han documentado disminución en el número y capacidad de producción de IL-4<sup>38</sup> de las células NKT provenientes de pacientes con diabetes tipo1, mientras que otros describen un incremento en la frecuencia de esas células.<sup>39,40</sup>

Por otro lado, otros autores, han encontrado que, tanto la frecuencia de NKT como la producción de IL-4 se conservan durante el curso de diabetes tipo 1. Lee y sus colaboradores sugieren que el aumento o disminución del número de células V $\alpha$ 24 NKT en humanos se deben a factores genéticos y que no son alterados por procesos autoinmunes.<sup>41</sup>

Recientemente, en pacientes colombianos, al comparar un grupo control sano con diabetes tipo 1 y 2 y alteraciones tiroideas autoinmunes, no se encontraron diferencias entre el grupo con diabetes tipo 1 vs controles sanos, pero el número de células NKT se encontró elevado en diabetes tipo 2.<sup>42</sup>

La discrepancia en los datos parece provenir del tipo de población seleccionada para el estudio y de los marcadores utilizados para su identificación, ya que se había reportado cierta controversia en la elección de los marcadores que identifican específicamente las poblaciones de células NKT. Algunos hallazgos revelan diferencias importantes en los requerimientos homeostáticos y en la maduración funcional de las células iNKT entre humanos y ratones, tal como ha sido recientemente demostrado a través del análisis de las células iNKT en V $\alpha$ 14<sup>+</sup> en el timo murino del ratón WT (Wild Type), que demuestra la producción de INF- $\gamma$  a través del estímulo con  $\alpha$ -galactosylceramida ( $\alpha$ -GalCer), que es un activador potente de las células NKT,

demonstró disminución en la severidad del daño autoinmune de la célula beta, sugiriendo además un papel protector de las células NKT CD1-restringidas y un vínculo causal entre la deficiencia de las células NKT y la inducción de la diabetes tipo 1.<sup>43-45</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la patogenia de la diabetes tipo 1 se ha implicado el papel de la autoinmunidad, sin embargo aún no se conoce el mecanismo implicado en la respuesta inmune que permite iniciar con la destrucción de la célula en los islotes pancreáticos. A pesar de que se han reportado estudios donde las células NKT se han visto involucradas en la respuesta inmune contra los islotes pancreáticos y aunado a que éstas células podrían participar en las fases iniciales del proceso autoinmune de la diabetes tipo 1, el papel preciso y la trascendencia de las células NKT en la diabetes tipo 1 no son del todo conocidos, dado que existe inconsistencia de los datos reportados. En algunos estudios la concentración de las células NKT la han reportado incrementada, en otras disminuida o sin diferencias entre pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado y personas sanas.

Los sujetos diagnosticados con diabetes tipo 1 tienen altos porcentajes de auto-anticuerpos específicos contra la célula beta del páncreas, siendo éstos una de las herramientas principales para su diagnóstico. Estudios prospectivos han demostrado que la presencia de dos o más tipos de los anticuerpos específicos, proporciona un alto valor predictivo para presentar la enfermedad en familiares de primer grado de pacientes con diabetes tipo 1. Por lo que es importante conocer la vulnerabilidad genética (HLA) a la que la población mexicana está expuesta.

Partiendo de la falta de evidencia e inconsistencia reportada, consideramos que es importante conocer y comparar la porcentaje de las

células NKT en pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico, sus familiares de primer grado y personas sanas; que, junto con la determinación de los anticuerpos específicos y la de los alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) de riesgo o predictivos de la enfermedad, nos permitirá caracterizar a los familiares de pacientes con diabetes tipo 1 con el fin de implementar estrategias de detección y prevención temprana en población mexicana así como aportar conocimiento de la respuesta humoral de las células NKT en dicho padecimiento autoinmune que hasta la fecha se desconoce.

## **JUSTIFICACIÓN**

La incidencia de diabetes tipo 1 en nuestro país se ha incrementado en los últimos años y son escasos los reportes epidemiológicos a nivel nacional. Por lo anterior, es necesario implementar estrategias de detección y prevención temprana en los hermanos de los pacientes con diabetes tipo 1 que acuden a la consulta externa del servicio de endocrinología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, dada la naturaleza de la enfermedad y su asociación con los genes que regulan la respuesta inmune.

Una de las metas de este trabajo es conocer el estatus celular de las poblaciones de NKT periféricas, con el fin de evaluar su papel en la fisiopatogénesis de la diabetes tipo 1 mediante la identificación de la población activada *in vivo*. Además, se evaluará la alteración de la respuesta humoral al inicio de la enfermedad de pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado.

Considerando que las células NKT son un conjunto de linfocitos que participan en la inmuno-regulación de la respuesta inmune contra los islotes pancreáticos y aunado a que éstas células podrían participar en las fases iniciales del proceso autoinmune, es de nuestro interés comparar las concentraciones de células NKT, así como determinar los auto-anticuerpos específicos predictivos de la enfermedad, sus haplotipos HLA en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico, en sus familiares de primer grado, y en sujetos sanos de la misma edad y género.

Cabe mencionar y enfatizar, que debido a la gran inconsistencia que se ha suscitado en la literatura al respecto y a la falta de estudios en nuestro país, el presente trabajo nos aportará conocimiento nuevo sobre el papel que juegan las células NKT en la fisiopatología de la enfermedad. Lo cual nos permitirá complementar la caracterización, desde el punto de vista inmunológico (anticuerpos anti GAD, anti-IA2 y anti-insulina), clínico, bioquímico (HbA1c, insulina y péptido C), y genético (HLA) de la población pediátrica con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado.

Por lo que surge la siguiente **pregunta de investigación:**

¿Cuál es el porcentaje de células NKT periféricas en pacientes con diabetes tipo 1 en el servicio de endocrinología de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y en sus familiares de primer grado comparada con sujetos sanos de la misma edad y sexo?

### **HIPÓTESIS**

El porcentaje de las células NKT periféricas en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico y sus familiares de primer grado es diferente al de sujetos sanos de la misma edad y sexo.

## **OBJETIVOS GENERALES**

Comparar el porcentaje de células NKT periféricas en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico y sus familiares de primer grado (padres y hermanos) con respecto al de sujetos sanos de la misma edad y sexo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar la población de células NKT activadas *in vivo* para conocer su porcentaje en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico, sus familiares de primer grado y sujetos sanos de la misma edad y género.
2. Determinar el porcentaje de HbA1c, las concentraciones de insulina y péptido C en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico, sus familiares de primer grado y sujetos sanos de la misma edad y género.
3. Determinar la concentración de anticuerpos (anti-GAD, anti-IA2, anti-insulina) en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico, sus familiares de primer grado y sujetos sanos de la misma edad y género.
4. Determinar los haplotipos (HLA) en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico, sus familiares de primer grado y sujetos sanos de la misma edad y género.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Diseño: Estudio de Casos y Controles.

Universo de estudio: Pacientes pediátricos con diagnóstico de diabetes tipo 1 de reciente inicio (máximo 3 meses de evolución) y sus familiares de primer grado (padres y hermanos). Y un grupo control de menores clínicamente sanos y sus familiares de primer grado.

Los sujetos sanos se buscaron (de las mismas características que su contraparte con diabetes) en los hijos de los trabajadores derechohabientes de las UMAES del CMN SXXI y de la Escuela Benito Juárez de la SEP; a cada uno se le extendió la invitación de participar en el estudio y cada control sano que accedió voluntariamente a participar se fue incluyendo de manera simultánea que los pacientes con diabetes tipo 1. Cada uno de los participantes, así fueran pacientes como sujetos sanos incluidos en el estudio son derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social

El estudio se realizó en el Servicio de Endocrinología de la UMAE Hospital de Pediatría y la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica de la UMAE del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional "Siglo XXI"; la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología (UIMII) de la UMAE Hospital de Infectología. CMN "La Raza" IMSS; en colaboración con el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN); previa aprobación por la Comisión Nacional de Investigación Científica con el número 2010-785-045.

### *Metodología:*

A cada sujeto se le invitó a participar en este estudio con previo consentimiento informado; a los que voluntariamente aceptaron participar se les realizó un historial clínico: (antecedente familiar de diabetes, día de inicio de la diabetes, medidas antropométricas: edad, peso, talla, IMC, TA), y se tomó una muestra de sangre periférica en ayunas, de 10 cc con una jeringa estéril para la determinación de la biometría hemática completa, HbA1c, insulina, péptido C, anticuerpos anti GAD-AB, anti-IA2-AB, anti-insulina, HLA y células NKT.

La determinación de los anticuerpos (anti GAD-AB, anti-IA2-AB, anti-insulina), insulina y péptido C) se procesó en la Unidad de Investigación de Bioquímica de la UMAE Hospital de Especialidades y Pediatría del CMN SXXI por medio de kits comerciales. La cuantificación de la población NKT se llevó a cabo por medio de citometría de flujo.

## **CRITERIOS**

### ***Criterios de inclusión:***

- a) Pacientes pediátricos con diagnóstico de diabetes tipo 1 de acuerdo con los criterios de la ADA, con una evolución de la enfermedad máxima a 3 meses a partir del diagnóstico, cualquier sexo, mayores de 2 años y menores de 17 años de edad.
- b) Familiares de primer grado (padres y hermanos) de los pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico.

c) Sujetos clínicamente sanos de la misma edad y género que los pacientes con diabetes tipo 1 y seleccionados al azar de una población diferente a la de los pacientes con diabetes tipo 1.

d) Familiares de primer grado (padres y hermanos) de los sujetos clínicamente sanos.

Cada uno de los participantes fueron derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social.

***Criterios de exclusión:***

- Sujetos con diagnóstico de diabetes tipo 2, MODY, neonatal o diabetes secundaria o cualquier otra enfermedad autoinmune.
- Sujetos clínicamente sanos con antecedente familiar de diabetes o alguna otra enfermedad autoinmune.

**TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Con un poder estadístico (1-β) de 80% y 95% de confianza (1-α), se realizó el cálculo de tamaño de muestra para ANOVA de una vía utilizando los datos encontrados para células NKT identificadas mediante CD3+ Vα24+ Vβ11+ por Kukreja A y cols.<sup>39</sup> (media de porcentaje: controles 0.74% y pacientes con DT1 0.30%. Utilizando la fórmula para medias de grupos independientes:  $n = 2 \{ [ ( Z\alpha - Z\beta ) \sigma ] / (\mu_1 - \mu_2) \}^2$

Donde:

$$Z\alpha = 1.96 \quad \mu_1 = 0.74\%$$

$$Z\beta = -0.84 \quad \mu_2 = 0.30\%$$

$$\sigma = 0.06$$

Se requirieron 29 pacientes con DT1 de reciente diagnóstico y 29 controles clínicamente sanos. Además de un aproximado de 116 familiares de primer grado (padres y hermanos) para cada grupo (Grupo 1: casos y Grupo 2: controles).

### **ANALISIS ESTADISTICO**

Utilizamos las medidas de resumen apropiadas de acuerdo al nivel de medición y tipo de distribución (paramétrica o no paramétrica). Empleamos estadística descriptiva con medidas de tendencia central (media y desviación estándar [DE] si presentan distribución normal; o mediana, mínimo, máximo y rango en caso de distribución no paramétrica) para los datos relacionados con las variables cuantitativas (como: edad, peso, talla, IMC, tiempo de evolución de a partir del diagnóstico de la enfermedad, porcentaje de células NKT), y para las variables cualitativas proporciones para variables como: sexo, y porcentaje de familiares con anticuerpos positivos y negativos. Para realizar la comparación entre los grupos de la concentración de las células NKT empleamos como estadísticos inferenciales ANOVA de una vía o prueba de Kruskal-Wallis dependiendo de su distribución. Se considera significancia estadística cuando a un valor de  $p < 0.05$ .

Se utilizará el paquete SPSS para Windows versión 16.

## **VARIABLES DE ESTUDIO**

### **VARIABLES DEPENDIENTES**

Diabetes tipo 1

### **VARIABLES INDEPENDIENTES**

Porcentaje de células NKT periféricas

Haplotipos HLA.

### **VARIABLES INTERMEDIAS**

Autoanticuerpos: GAD 65-AB, IA2-AB, Anti-Insulina,

### **VARIABLES ANTECEDENTES**

Edad

Sexo

Peso

Talla

IMC

TA

Tiempo de diagnóstico de diabetes tipo 1.

Hemoglobulina Glucocilada (HbA1c)

Glucosa

Insulina

Péptido C

Biometría Hemática Completa (BHC)

## **Definición de las variables**

### **1. Nombre: Diabetes tipo 1.**

**Definición conceptual:** La diabetes tipo 1 es una enfermedad que resulta de la destrucción progresiva de las células  $\beta$  del páncreas con la consecuente pérdida de la secreción de insulina y elevación de la glucosa sanguínea. La falta de insulina lleva a un estado catabólico en el cual el organismo al no poder utilizar los sustratos energéticos dispone de la reserva de carbohidratos, grasas y proteínas.

**Definición operacional:** Diagnóstico de diabetes tipo 1: De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes, se realiza en base a manifestaciones clínicas (poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable, cetoacidosis) y bioquímicamente (la determinación de glucemia plasmática de ayuno  $\geq 100$  mg/dl que debe confirmarse repitiendo el examen en un día diferente) ó una glucemia plasmática en cualquier momento del día  $\geq 200$  mg/dl, (sin considerar el tiempo de la última comida), aunado a que amerite la aplicación insulina para su tratamiento. **Tipo de variable:** Cualitativa

**Escala:** Nominal.

**Unidad de Medición:** En este caso su presencia hará el diagnóstico de la enfermedad.

### **2. Nombre: Anti GAD 65-AB.**

**Definición conceptual:** La descarboxilasa del ácido glutámico o GAD, es una proteína de 64 Kd que se encuentra en los islotes pancreáticos. Existe en dos isoformas (una de 65 Kd y 67 Kd). El anticuerpo empleado para su detección está dirigido a GAD 65-AB.

**Definición operacional:** Concentración sérica del anticuerpo contra la descarboxilasa del ácido glutámico medida en UI/ml mediante radioinmunoanálisis utilizando el Kit de GenWay GAD-AB ELISA antibody assay.

**Tipo de variable:** Cualitativa

**Escala:** Nominal. (dicotómica)

**Unidad de Medición:** Positivo/ Negativo. (Valor positivo: < 5.0 UI/mL, valor negativo: ≥ 5.0 UI/mL)

### **3. Nombre: Anti-IA2-AB.**

**Definición conceptual:** La IA2-AB es una proteína intrínseca de la membrana de los gránulos secretores expresados en las células β del páncreas productoras de insulina.

**Definición operacional:** Concentración sérica de anticuerpo medida en UI/ml mediante radioinmunoanálisis utilizando el Kit de GenWay IA2 ELISA antibody assay ().

**Tipo de variable:** Cualitativa

**Escala:** Nominal (dicotómica)

**Unidad de Medición:** Positivo/ Negativo. (Valor positivo: < 7.5 IU/mL, valor negativo: ≥ 7.5 UI/mL).

### **4. Nombre: Anti-insulina.**

**Definición conceptual:** La insulina es una hormona producida por las células β de los islotes del páncreas. Los AAI corresponden a los anticuerpos dirigidos contra esta hormona.

**Definición operacional:** Concentración sérica de anticuerpo medida en UI/ml mediante radioinmunoanálisis utilizando el Kit de GenWay insulín ELISA antibody assay.

**Tipo de variable:** Cualitativa

**Escala:** Nominal (dicotómica)

**Unidad de Medición:** Positivo/ Negativo (Valor positivo: > 1.05 UI/mL, valor negativo: < 0.95 UI/mL)

## **5. Nombre: HLA.**

**Definición conceptual:** Conjunto de genes implicados en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario.

**Definición operacional:** Se tipificará los alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) (moléculas clase I y clase II ).

**Tipo de variable:** Cualitativa

**Escala:** Nominal (dicotómica)

**Unidad de Medición:** Protección (negativo)/Susceptibilidad o de riesgo (positivo) para DRB1\*0405, DQA1\*0301, DQB1\*0302I)

## **6. NOMBRE: Porcentaje de NKT en sangre periférica.**

**Definición Conceptual:** Las células NKT es una población de linfocitos que expresan el receptor para el antígeno de linfocitos T ( $TCR_{\alpha\beta}$ ) así como el marcador común de las células NK (NK 1.1 para el ratón, NKRP1A (CD161) en el humano.

**Definición operacional:** Se cuantificará el número de células NKT de las muestras de sangre periférica por citometría de flujo. Se emplearan anticuerpos comerciales anti-CD3, anti V $\alpha$ 24, anti-V $\beta$ 11.

**Tipo de Variable:** Se considera una variable cuantitativa ya que se expresará en función de la proporción existente de células NKT tanto en pacientes con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado y sujetos controles.

**Escala:** Continua.

**Unidad de Medición:** Porcentaje.

#### **7. Nombre: Hemoglobulina Glucosilada (HbA1c).**

**Definición conceptual:** Proteína en sangre, utilizada comúnmente como prueba diagnóstico en individuos en riesgo y en pacientes con diabetes para saber si el control que realiza éste sobre la enfermedad ha sido bueno durante los últimos tres o cuatro meses. Punto de corte entre el 5.7 a 6.4 %.

**Definición operacional:** Se toman 3 mL de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA y se procesan las muestras con el Aparato Modular PE de Roche del laboratorio central.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** Porcentaje

#### **8. Nombre: Glucosa.**

**Definición conceptual:** Azúcar utilizado por los tejidos como forma de energía al combinarlo con el oxígeno de la respiración. Glucosa plasmática en ayunas menor a 100 mg/dL.

**Definición operacional:** A los participantes del estudio se les toma una muestra de sangre en un tubo seco sin anticoagulante, y la muestra se procesa en el laboratorio central , con un aparato modular PE de Roche.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** mg/dL.

## **9. Nombre: Insulina**

**Definición conceptual:** Hormona polipeptídica producida por las células betas de los islotes de Langerhans del páncreas. Mantiene la concentración de glucosa en nuestra sangre. Lo consigue porque cuando el nivel de glucosa es elevada el páncreas la libera a la sangre. Su función es favorecer la absorción celular de la glucosa.

**Definición operacional:** Las muestra de sangre tomadas se procesarán en el laboratorio central con un aparato modular PE de Roche.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** unidades internacionales/Lt.

## **10. Nombre: Péptido C.**

**Definición conceptual:** Subproducto que se crea cuando se produce la hormona insulina. El péptido C se mide para establecer la diferencia entre la insulina producida por el cuerpo y la insulina inyectada en el organismo. Sus niveles normales van de 0.5 a 2.0 ng/mL. ó 150-250 pg/mL.

**Definición operacional:** Las muestras de sangre tomadas se procesarán en el laboratorio central con un aparato modular PE de Roche.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** ng/mL. pg/mL.

#### **11. Nombre: Biometría Hemática Completa (BHC).**

**Definición conceptual:** Prueba de detección básica y constituye la técnica del laboratorio que se pide con mas frecuencia. Los datos que se proporcionan constituyen información diagnostico muy valioso sobre el sistema hematológico y otras partes del cuerpo, pronostico, respuesta al tratamiento y recuperación. Consta de una serie de pruebas que determinan el número, variedad, porcentaje, concentración y calidad de las células sanguíneas:

#### **FÓRMULA BLANCA**

**Cuenta leucocitaria:** constituye una guía muy útil sobre la gravedad de la enfermedad. En distintos padecimientos, se observan patrones específicos de la respuesta leucocitaria.

**Cuenta leucocitaria diferencial:** se expresa en forma de porcentaje del numero total de leucitos, es importante tanto la distribución de los glóbulos blancos como el tipo de leucocitos y el grado con el que aumentan y disminuyen, el porcentaje es relativo de cada tipo de leucocito presente en la sangre.

## FÓRMULA ROJA

**Cuenta eritrocitaria:** medición muy importante para determinar la anemia o policitemia, determina el número total de glóbulos rojos o eritrocitos en 1 mm<sup>3</sup> de sangre.

**Hematocrito:** determina la masa eritrocitaria, los resultados se expresan como porcentaje de eritrocitos en un volumen de sangre completa, constituye una medida muy importante de la anemia o policitemia.

**Hemoglobina:** la medición de la hemoglobina forma parte de la biometría hemática, sirve para detectar enfermedades que se acompañen de anemia, ayuda a determinar la intensidad de anemia, a vigilar la respuesta al tratamiento y valorar la policitemia.

**Índices eritrocitarios:** se utilizan para diferenciar las anemias, si se utilizan en conjunto al examinarse los glóbulos rojos en el frotis es posible obtener un cuadro muy claro de la morfología de los glóbulos rojos. Con base a los índices a los eritrocitos se clasifican en normales o anormales, en cuanto a volumen o contenido de hemoglobina.

1. **Volumen corpuscular medio (VCM):** el mejor índice para clasificar las anemias es el tamaño de cada célula. Este índice expresa el volumen que ocupa un solo eritrocito y se mide en micras cúbicas del volumen medio. El volumen corpuscular medio expresa si el tamaño del glóbulo rojo es normal (normocítico), menor (microcítico) o mayor (macrocítico).

**Definición operacional:** Las muestras se toman en un tubo de 3 mL. con anticoagulante EDTA y las muestras se procesarán en el laboratorio central con dos posibles aparatos C XT 1800 y XT 2000.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** Números absolutos.

## **12. NOMBRE: Edad**

**Definición conceptual:** Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.

**Definición operacional:** Se restará la fecha de nacimiento extraída del expediente clínico, a la fecha de la entrevista actual con el mismo

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** Meses, años.

## **13. NOMBRE: Sexo**

**Definición conceptual:** Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales

**Definición operacional:** Se extraerá del expediente clínico de cada paciente

**Tipo de variable:** Cualitativa

**Escala:** Nominal dicotómica

**Unidad de medición:** Masculino/Femenino.

## **14. NOMBRE: Peso.**

**Definición conceptual:** Fuerza ejercida sobre un kilogramo de masa por una intensidad de gravedad estándar.

**Definición operacional:** Al momento de la consulta, se le pesará con una báscula.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** Kg.

#### **15. NOMBRE: Talla.**

**Definición conceptual:** Medida convencional para determinar la estatura o altura de las personas.

**Definición operacional:** Se determinará midiendo a la persona en el momento de la consulta.

**Tipo de variable:** Cuantitativa.

**Escala:** Continua.

**Unidad de medición:** Metros y centímetros.

#### **16. NOMBRE: Índice de Masa Corporal (IMC).**

**Definición conceptual:** Indicador antropométrico que describe el peso relativo para la estatura, reflejando tanto la masa grasa como la masa libre de grasa. Indicador de sobrepeso y obesidad.

**Definición operacional:** Se determinará por medio de la fórmula correspondiente ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), de acuerdo a los valores de peso y talla de cada paciente, y posteriormente se realizará el diagnóstico de acuerdo a las tablas de CDC2000.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** kg/m<sup>2</sup> Eutrófico Percentil (P)  $\geq 50 < 85$ , Sobrepeso  $\geq 85 < 95$ , Obesidad  $\geq 95$ .

**17. NOMBRE: Tensión Arterial (o presión arterial).**

**Definición conceptual:** Presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias. Es imprescindible para que circule la sangre por los vasos sanguíneos y aporte el oxígeno y los nutrientes a todos los órganos del cuerpo para que puedan funcionar.

**Definición operacional:** En el momento de la consulta se medirá la presión arterial con un baumanómetro.

**Tipo de Variable:** Cuantitativa.

**Escala:** Continua.

**Unidad de Medición:** mmHg

**18. NOMBRE: Tiempo diagnóstico de Diabetes tipo 1.**

**Definición conceptual:** Tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad.

**Definición operacional:** Se tomará la fecha de diagnóstico de la enfermedad del expediente clínico, y como máximo será un periodo de 3 meses de haber sido diagnosticado.

**Tipo de variable:** Cuantitativa

**Escala:** Continua

**Unidad de medición:** Meses

**Obtención de células mononucleares:** Las muestras de sangre heparinizada se diluyeron en una relación 1:1 con solución salina (PBS), posteriormente se agregaron en tubos de 15 cm<sup>3</sup> con Ficoll Hypaque en una relación 1:2 de muestra sanguínea/Ficoll. Se centrifugaron 30 min a 1600 rpm a temperatura ambiente. Las células mononucleares recuperadas de la interfase y la fenotipificación de las poblaciones se llevó a cabo mediante citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-CD3-APC (BD Biosciences), anti-V $\alpha$ 24-PE, anti-V $\beta$ 11-FITC (Beckman Coulter).

El porcentaje de linfocitos NKT se obtuvo mediante el análisis por citometría de flujo para cada sujeto. En este análisis se eligió la región correspondiente de linfocitos de acuerdo al tamaño y granularidad de la población y a partir de esta región se obtuvo el porcentaje de las células CD3+, V $\alpha$ 24+, V $\beta$ 11+, que identifican a las células NKT.

Los números absolutos de la población NKT se calcularon utilizando el número de leucocitos y el porcentaje de linfocitos reportados en la biometría hemática de la muestra previamente reportada. Para el cálculo mencionado se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Células iNKT/ml: } \frac{\text{Leucocitos} \times \% \text{Linfocitos (en la BH)}}{100} \times \frac{\% \text{ células NKT (en la citometría de flujo)}}{100} \times 1000$$

**Marcaje de Células NKT:** Previo al marcaje de las células NKT con sus anticuerpos específicos, las células mononucleares se incubaron con gammaglobulina humana 30 mcg/1 x 10<sup>6</sup> células durante 20 min a 4 °C, posteriormente se distribuyeron con una cantidad de 2 x 10<sup>6</sup> células en cada tubo para citometría. Se añadieron los anticuerpos anti-human-CD3-APC (BD

Biosciences) y anti-V $\alpha$ 24-PE y anti- V $\beta$ 11-FITC (Beckman Coulter) a cada tubo correspondiente incubándose durante 30 min a 4 °C, y posteriormente el exceso de anticuerpo se eliminó con lavados de PBS y centrifugando por 5 min a 1500 rpm a 4 °C. Posteriormente, las células ya marcadas con los anticuerpos fueron refrigeradas y fijadas con para formaldehído al 4% para su posterior lectura.

### ***Determinación del sistema HLA clase II por PCR-SSO:***

Se realizó de la siguiente manera:

- a) Extracción de DNA automatizada con el equipo AutoGeneFlex Star y el kit comercial FlexiGene DNA AGF3000:

A partir de un volumen de 1mL de sangre periférica se añadió una solución de lisis; por medio de centrifugación el núcleo celular y las mitocondrias precipitaron formando un pellet. El pellet fue resuspendido e incubado en una solución amortiguadora de desnaturalización que contenía sales caotrópicas y una proteasa comercial (QIAGEN). Este paso removió el material contaminante como proteínas. Posteriormente el DNA fue precipitado por medio de la adición de isopropanol, recuperado por centrifugación, lavado con alcohol al 70%, secado y resuspendido en una solución amortiguadora de hibridación (10mM Tris Cl, pH 8.5) y finalmente almacenado a temperaturas de 2 a 8 °C o a -20 °C en un ultracongelador.

- b) Cuantificación y ajuste de la concentración de DNA:

El DNA extraído debe tener una concentración entre 100-200 ng/uL. La pureza ( $A_{260/280}$ ) debe ser igual o mayor a 1.5. Para corroborar la extracción de DNA se preparó un gel de agarosa al 1.5 % para electroforesis con una cantidad de

entre 3 y 5 uL de muestra. Por otra parte, para medir la concentración total y pureza del DNA contenido en las muestras, se utilizó el equipo Nanodrop 2000 Thermo Scientific, espectrofotómetro de micro volúmenes, que utiliza 2uL de muestra de DNA extraído y la cuantificación la determina midiendo cantidad de DNA, RNA (A260) y proteínas (A280) así como la pureza (radio 260/280).

c) Determinación de HLA clase II:

i) Amplificación de las muestras por PCR-SSO: en tubos estériles de 1.5 mL se preparó un master Mix con agua destilada estéril, solución de amplificación, solución de cebadores-HLA y LipA-Taq, llevando a un volumen de 45 uL por muestra en tubos de PCR debidamente marcados. Se añadieron 5 uL de DNA extraído y cuantificado; al tubo de control negativo se añadieron 5 uL de agua destilada. El perfil de amplificación utilizado fue el siguiente: 35 ciclos (desnaturalización 95°C por 5 min, desnaturalización 95°C – 20 segundos, alineación de cebadores a 58°C – 20 segundos, estiramiento de cebadores a 72°C – 20 segundos y Elongación 72°C – 10 min).

ii) Desnaturalización e hibridación: en un tubo de PCR debidamente marcado se agregó la solución de desnaturalización y posteriormente se añadieron 10 uL de muestra amplificada y previamente descongelada por 15 minutos. Se precalentaron las soluciones de hibridación y lavado astringente en un baño de 37 a 56°C, asegurándose de que todos los cristales se hayan disuelto. Durante el proceso de desnaturalización, se precalentó el equipo Baby Bee de Biodist y se marcaron debidamente las tiras de nitrocelulosa para cada muestra. Una vez que el equipo Baby Bee alcanzó 56°C, se añadieron 2mL por muestra de la solución de hibridación precalentada y 2mL de DNA desnaturalizado en cada carril de la bandeja del equipo, dejando mezclar los reactivos por 10 minutos.

Pasado este tiempo, se añadieron las tiras de nitrocelulosa cuidadosamente con pinzas en los carriles y se corrió el programa de hibridación automatizado del equipo Baby Bee por 30 minutos.

iii) Lavados astringentes: tras la hibridación, se aspiró el líquido mezclado de los reactivos, y se agregaron 2 mL de solución de lavado astringente precalentada a cada carril incubando por 20 segundos a temperatura ambiente repitiendo el paso por duplicado. Se agregaron 2mL de solución de lavado astringente precalentada dejándose incubar por 10 minutos a 56°C. Una vez pasado el tiempo, se aspiró el líquido de cada carril dejando enfriar el equipo a temperatura ambiente. iv) Revelado de color: cuando el equipo bajó a temperatura ambiente, se lavó cada tira de nitrocelulosa 1 minuto con 2mL de solución de lavado 5x diluida. Tras el lavado, se aspiró el líquido y nuevamente se lavó durante 1 minuto con 2mL de solución de lavado 5x diluida. Tras el segundo lavado, se aspiró de nuevo el líquido y se agregaron 2mL de solución de conjugado 100x diluida a cada carril por 30 minutos. tras el proceso de conjugado, se aspiró el líquido y se añadieron 2mL de solución de lavado 5x diluida por un minuto repitiendo el lavado nuevamente. Se aspiró el líquido y se agregaron 2mL de tampón de sustrato a cada carril incubando por 1 minuto. Se añadieron 2mL de solución de sustrato diluida a cada carril y se dejaron incubar las muestras 30 minutos. Tras el proceso de revelado, se aspiró el líquido y se lavaron las tiras de nitrocelulosa dos veces con 2mL de agua destilada durante 3 minutos. Tras hacer los dos lavados, se retiraron las tiras con pinzas y se colocaron en papel absorbente, hasta que secaron completamente, dichas tiras fueron guardadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

***Determinación de Insulina por medio del Kit de RIA para Insulina:*** Kit

Radio Inmuno Ensayo (RIA: Radioimmunoassay por sus siglas en inglés) para la determinación cuantitativa por medio de radioactividad y reacción específica entre antígeno-anticuerpo de Insulina en suero, plasma y otros tejidos.

Se etiquetaron 6 tubos de vidrio (1,2,3,4,5, y 6). Se añadió 1.0mL de solución de ensayo a cada uno de los seis tubos y se prepararon diluciones seriales añadiendo 1.0mL del estándar 200uU/mL al tubo 1, se mezcló bien y se transfirió 1.0mL de la mezcla del tubo 1 al tubo 2, se mezcló bien y se transfirió 1.0mL del tubo 1 al tubo 3, se mezcló bien y se transfirió 1.0mL del tubo 3 al tubo 4, se mezcló bien y se transfirió 1.0mL del tubo 4 al tubo 5 y finalmente se mezcló bien y se transfirió 1.0mL del tubo 5 al tubo 6, mezclando bien.

El proceso una vez realizadas las mezclas anteriores, se divide en 2 días:

Día 1:

1. Se colocaron 300 uL de amortiguador bloqueador a los tubos 3 y 4 (NSB: Non-Specific Binding por sus siglas en inglés), 200 uL de solución de ensayo a los tubos de referencia 5 y 6 y 100 uL de solución amortiguadora a los demás tubos.
2. Se añadieron 100 uL de solución de control de calidad y solución estándar por duplicado.
3. Se añadieron 100 uL de cada muestra.
4. Se colocaron 100 uL de Insulina Híbrida previamente purificada ya de fábrica.
5. Se añadieron 100 uL de anticuerpo anti-insulina a todos los tubos con excepción de los tubos 1 y 2 y 5 y 6 (NSB).

6. Se resuspendieron las muestras y se mezclaron por medio de vortex y se dejaron incubando toda la noche (20-24 horas) a temperatura ambiente (22-25°C).

Día 2:

7. Se adicionó 1.0 mL de reactivo precipitante frío (4°C) a todos los tubos con excepción de los tubos 1 y 2.
8. Se mezclaron las muestras por medio de vortex y se dejaron incubando por 20 minutos a 4°C.
9. Las muestras se centrifugaron a 4°C con excepción de los tubos 1 y 2 durante 20 minutos a 2000-3000 xg.
10. Inmediatamente después del tiempo de centrifugación, los tubos se decantaron con excepción de los tubos 1 y 2, se secaron y drenaron entre 15-60 segundos y se secó el exceso de líquido en la abertura de cada tubo.
11. Finalmente se cuantificaron las muestras en un contador de gamma durante 1 minuto.

***Determinación de péptido-C Humano por medio del Kit de RIA para***

***Péptido-C humano:*** Kit Radio Inmuno Ensayo (RIA: Radioimmunoassay por sus siglas en inglés) para la determinación cuantitativa por medio de radioactividad y reacción específica entre antígeno-anticuerpo de péptido C humano en suero, plasma y otros tejidos.

Las muestras de suero fueron almacenadas en un ultra congelador a -20°C.

Antes de comenzar el inmunoensayo, las muestras fueron descongeladas y se

tomaron como máximo 100uL de su volumen total. El proceso de RIA se divide en dos días:

Día 1:

1. Se colocaron 200 uL de amortiguador bloqueador (3-4) NSB, (Non-Specific Binding por sus siglas en inglés) y 100 uL en los tubos de referencia (5-6).
2. Se añadieron 100 uL de solución de control de calidad y estándares por duplicado.
3. Se colocaron 100 uL de cada muestra.
4. Se añadieron 100uL de péptido C humano previamente purificado en el amortiguador de ensayo a diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.5, 1.2, 5 ng/mL).
5. Se añadieron 100uL de anticuerpo anti-Péptido C a todos los tubos con excepción de los tubos 12, y los tubos NSB (3-4).
6. Se resuspendió la mezcla por medio de vortex, se cubrió con papel parafilm y se dejaron incubando las muestras de 20 a 24 horas a 4°C.

Día 2:

7. Finalizada la incubación, se adicionó 1.0 mL de reactivo Precipitante frío (4°C) a todos los tubos con excepción 1 y 2.
8. Se resuspendieron, se mezclaron por medio de vortex y se dejaron incubar durante 20 minutos a 4°C.
9. Una vez pasado el tiempo de incubación, todos los tubos con excepción del tubo 1 y 2, se centrifugaron a 4°C durante 20 minutos a 2000-3000 xg.
10. Inmediatamente después del tiempo de centrifugación, a las muestras se les decantó el sobrenadante, con excepción del tubo 1 y 2, drenando y secando los

tubos entre 15-60 segundos, secando así también el exceso de líquido en la abertura del tubo.

11. Finalmente todas las muestras se cuantificaron en un contador gamma por 1 minuto.

***Determinación de Anticuerpos utilizando el Kit EIAab<sup>TM</sup> por ELISA para anti-IA2, anti-GAD y anti-IAA:***

La prueba de ELISA está basada en la técnica de inmunoensayo de unión competitiva de enzimas. Cada placa de 96 pozos está tratada específicamente para un sólo anticuerpo: anti-IA2, anti-GAD y anti-IAA. Las muestras séricas se añaden a cada pozo de la placa que a su vez está tratada con una preparación específica de anticuerpos policlonales conjugados con biotina y avidina conjugada con la peroxidasa del rábano (por sus siglas en inglés Horseradish Peroxidase o HRP). Se utilizó un sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine por su nomenclatura en inglés) en cada pozo de cada muestra y solamente en aquellas muestras que contengan el anticuerpo en cuestión (anti-IA2, anti-GAD y anti-IAA), anticuerpo conjugado de biotina y conjugados de enzimas de Avidina se apreció un cambio de color. La reacción enzimática requirió de la adición de una solución a base de ácido sulfúrico y el cambio del color se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de  $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ . La concentración de los anticuerpos (anti-IA2, anti-GAD y anti-IAA) en las muestras procesadas se determinó comparando el O.D. de cada muestra contra la curva estándar.

Procedimiento:

Antes de pipetear cualquier reactivo, éstos se mezclaron previamente. Se utilizaron placas tratadas para cada anticuerpo (anti-IA2, anti-GAD y anti-IAA) y el procedimiento fue el mismo para cada placa:

1. Se añadieron 100 uL de la solución Estándar diluida seriadas de una solución stock de 20 U/mL a 0 U/mL: diluciones seriales, blanco o muestra por pozo. Las muestras utilizadas fueron de suero obtenido de sangre periférica, centrifugada a aproximadamente 1000xg durante 20 minutos. El suero fue pipeteado con cuidado de la muestra centrifugada, colectado en alícuotas de 600 uL y almacenado a temperaturas entre -20°C y -80°C. Una vez colocadas las muestras, el estándar y el blanco en la placa de 96 pozos, se cubrió dicha placa con la tapa y se dejaron incubar por 2 horas a 37°C.
2. Al término de la incubación, se retiró el líquido de cada pozo, sin lavar.
3. Se añadieron 100 uL del Reactivo de Detección a cada pozo de la placa. Se cubrió con su tapa y se dejó incubar 1 hora a 37°C.
4. Se aspiró el líquido transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la placa con una solución de lavado previamente diluida (30 mL de solución de lavado en 705 mL de agua destilada) añadiendo 400uL aproximadamente repitiendo este paso tres veces para completar un total de tres lavados. Después de los lavados, se removi6 la solución de lavado aspirándola o decantándola. Se colocó la placa bocabajo en papel secante.
5. Se adicionaron 100 uL del Reactivo de Detección B a cada pozo. Se cubrió la placa con una nueva tapa y se dejó incubar por 1 hora a 37°C.

6. Se repitieron los pasos de lavado y de aspirado con solución de lavado en el pasó 4.
7. Se añadieron 90 uL de solución de sustrato a cada pozo. Se cubrió la placa con una nueva tapa y se dejó incubar entre 15 y 30 minutos a 37°C protegida de la luz.
8. Se adicionaron 50 uL de solución de término a cada pozo.
9. Finalmente se determinó la densidad óptica de cada pozo utilizando un lector para microplacas programado para 450 nm.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

1. A los padres de los pacientes con diabetes tipo 1 participantes en el estudio se les informó el objetivo del proyecto, su trascendencia y sus beneficios.

2. Se solicitó por escrito consentimiento informado a los padres y Asentimiento Informado a los menores de edad para la participación en el estudio (Anexo 4 y 5).

3. El protocolo de investigación cuenta con la autorización de la Comisión Nacional de Investigación Científica (2010-785-045).

4. La toma de sangre no pone en peligro la vida de los participantes, no es riesgoso y las molestias son mínimas; de acuerdo al Reglamento de la SSa en materia de investigación este proyecto tiene un riesgo menor al mínimo. El participante no recibe ningún beneficio directo. Sin embargo, los hallazgos en este estudio permitirán ampliar el conocimiento sobre el papel que juegan las células NKT en la fisiopatología de la diabetes tipo 1.

5. Este estudio cumple con los requisitos de ética propuestos por la Comisión Nacional de Investigación Científica y con los criterios de ética estipulados en las diferentes instancias nacionales (Ley Nacional de Salud) e internacionales (la declaración de Helsinki y modificaciones subsecuentes de las distintas Asambleas Médicas Mundiales).

## **RESULTADOS**

### *Pacientes con diabetes tipo 1 y su grupo control sano*

Se incluyeron a pacientes pediátricos de 2 a 15 años de edad con diabetes tipo 1 con un periodo máximo de evolución de 3 meses; Contamos con los datos completos de 22 familias de pacientes con diabetes tipo 1 y 22 familias con un menor clínicamente sano. Se estudiaron 63 familiares de primer grado de los pacientes y 54 de los sujetos control.

Las características clínicas de los pacientes con diabetes tipo 1 y su grupo control sano se describen en la Tabla 1. La mediana de edad del grupo de los pacientes incluidos fue de 9 años con un mínimo de 2 años y un máximo de 15 años donde la distribución de género fue mayor para el sexo femenino (8 niños, 36.3% y 14 niñas, 63.6%). De acuerdo a la distribución de los datos, la media del peso (kg) fue de  $35.9 \pm 15.3$  (10 kg-63 kg) y del IMC fue de  $18.8 \pm 3.1$  kg/m<sup>2</sup> (11.3 kg -23.7 kg). El reporte de los niveles de glucosa y hemoglobina glucosilada (HbA1c) en suero de los pacientes, mostraron mediana de 88 mg/dL (45 mg/dL -342 mg/dL) y de 8% (5.6 mg/dL -14.8 mg/dL) respectivamente.

Se incluyeron 22 (28.9%) sujetos sanos, 9 (40.9%) hombres y 13 (59%) mujeres sujetos sanos con edades entre los 2 y los 17 años. La mediana de edad del grupo de sujetos sanos fue de 11 años (2-16). La media del peso corporal fue de  $37.5 \pm 20.2$  kg (10 kg -90 kg) y del IMC de  $18.1 \pm 3.7$  kg/m<sup>2</sup> (13 kg/m<sup>2</sup> -29.6 kg/m<sup>2</sup>). La mediana de la HbA1c fue de 5.4% (4.5% -6.1%) y de glucosa de 87.5 mg/dL (68 mg/dL -98 mg/dL). Al comparar las variables clínicas y bioquímicas entre los grupos de pacientes y sujetos sanos, solo la

HbA1c (p=0.001), el péptido C (p=0.001) y la insulina (p=0.012) fueron estadísticamente significativa (Tabla 2) no así para la edad (0.990), el peso (p=0.716), la talla (p=0.879), el IMC (P=0.557), la TAS (P=0.676), la TAD (P=0.526) y la glucosa (p=0.510); ni tampoco cuando se compararon los grupos restantes (madres, padres y hermanos correspondientes), como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características clínicas, bioquímicas y antropométricas de los pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado y sujetos control sanos

Variable/ Grupo	Pacientes con diabetes	Controles	Valor de "p"	Madres de pacientes	Madres de controles	Valor de "p"	Padres de pacientes	Padres de controle s	Valor de "p"	Hermanos de pacientes	Hermano s de controles	Valor de "p"
<b>n=</b> <b>Género:M/F</b>	22 (25.9%) 8 (36.3%)/14 (63.6%)	22 (28.9%) 9 (40.9%)/13 (59%)		22 (25.9%)	20 (26.3%)		17 (22.4%)	19 (25%)		24 (28.2%) 8 (33.3%)/16 (66.6%)	15 (19.7%) 4 (26.7%)/11 (73.3%)	
<b>Edad (años)</b>	9 (2-15)	11 (2-16)	0.990	37 (22-52)	40 (25-50)	0.496	42 (23-54)	39 (27-50)	0.144	15 (3-25)	13 (4-20)	0.339
<b>Peso (kg)</b>	35.9 ± 15.3 (10-63)	35.7±20.2 (10-90)	.716	70.4±11.8 (48-91)	65.4±11.1 (53-96)	0.134	77.6±14.3 (46-104)	85.9±19. 1 (66-130)	0.274	54±22.8 (16-107)	43.8±16.7 (15-64)	0.194
<b>Talla (mts)</b>	1.39 (0.78-1.74)	1.42 (0.83-1.78)	0.879	1.57 (1.45-1.71)	1.55 (1.47-1.72)	0.157	1.65 (1.59-1.80)	1.69 (1.57-1.93)	0.333	1.57 (1.00-1.76)	1.55 (1.04- 1.72)	0.564
<b>IMC (peso/talla<sup>2</sup>)</b>	18.3 ±3.1 (11.3-23.7)	18.1±3.7 (13.0-29.6)	0.557	28.2±3.62 (21.4-34.7)	26.9±3.3 (22.2-32.3)	0.262	27.8±4.4 (16.9-33.6)	29.5±4.6 (22.4-40.8)	0.579	22.1±5.5 (12.9-35.6)	19.2±3.9 (13.8- 26.6)	0.089
<b>TAS (mmHg)</b>	90 (80-100)	90 (80-120)	0.679	100 (69-120)	100 (85-120)	0.238	100 (88-130)	110 (90-160)	0.706	90 (80-120)	97 (80-115)	0.807
<b>TAD (mmHg)</b>	60 (50-70)	60 (50-80)	0.526	70 (60-89)	70 (60-90)	0.768	70 (60-100)	70 (60-90)	0.974	60 (50-80)	65 (50-70)	0.667
<b>HbA1c (%)</b>	8.0 (5.6-14.8)	5.4 (4.5-6.1)	0.001	5.6 (4.4-13.5)	5.4 (4.7-15.3)	0.290	5.8 (4.5-12.1)	5.7 (5.1-7.8)	0.715	5.3 (4.0-6.7)	5.4 (4.3-5.9)	0.964
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	88 (45-342)	87.5 (68-98)	0.510	91 (65-226)	91.5 (71-271)	0.968	96 (76-346)	96 (83-217)	0.642	85 (67-94)	87.5 (76- 97)	0.086
<b>Insulina</b>	30.6±24.2	15.3±9.2	0.012	18.6±13.2	25.3±15.8	0.669	14.6±5.5	21.2±13. 0	0.937	14.5±7.7	19.4±2.1	0.954
<b>Péptido C</b>	2.8±2.0	2.4±1.4	0.001	2.2±1.6	2.6±1.8	0.774	2.0±0.97	3.4±1.8	0.462	1.8±1.3	2.6±2.0	0.289

El tiempo de evolución de la enfermedad en los pacientes con diabetes tipo 1 fue de 38 días (12-82) (mediana y límites). Con respecto a las dosis de unidades de insulina por kilogramos de peso (U/Kg) se obtuvo una mediana de 0.65 U/Kg (0.25-1.15).

Familiares de primer grado de los pacientes con diabetes tipo 1 y del grupo de controles sanos

Los familiares de los pacientes con diabetes tipo 1 y los familiares de primer grado de los controles sanos fueron divididos en 3 grupos: madres, padres y hermanos. El número total de las madres de los pacientes con diabetes tipo 1 que participaron en nuestro estudio fue de 22 (25.9%), con mediana de la edad de 37 años (22-52). La media del peso fue de  $70.4 \pm 11.8$  kg (48 kg -91 kg); a su vez la media del IMC obtenido fue de  $28.2 \pm 3.62$  kg/m<sup>2</sup> (21.4 kg -34.7 kg). La mediana de HbA1c en este grupo fue de 5.6 % (4.4%-13.5%) con niveles de glucosa 91 mg/dL (65 mg/dL -226 mg/dL). El grupo de los padres de los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron 17 (20%); la mediana de edad de dicho grupo fue de 42 años (23-54). La media del peso fue de  $77.6 \pm 14.3$  kg (46 kg -104 kg) con IMC de  $27.8 \pm 4.4$  kg/m<sup>2</sup> (16.9 kg/m<sup>2</sup> -33.6 kg/m<sup>2</sup>). La mediana del porcentaje de HbA1c del grupo de los padres de los pacientes con diabetes tipo 1 fue de 5.8% (4.5%-12.1%), con niveles de glucosa 96 mg/dL (76 mg/dL -346 mg/dL) mg/dL. Finalmente, el grupo de los hermanos de los pacientes incluidos en el estudio: fueron en total 24 (28.2%), 8 hombres (33%) y 16 mujeres (66.6%). Sus edades oscilaron entre los 3 y los 25 años, con una mediana de 15 años. La media del peso fue de  $54 \pm 22.8$  kg (16 kg -107 kg). En cuanto al IMC la media fue de  $22.1 \pm 5.5$  kg/m<sup>2</sup> (12.9 kg/m<sup>2</sup> -35.6 kg/m<sup>2</sup>). La

mediana de los porcentajes de HbA1c obtenidos fue 5.3% (4% -6.7%) y de los niveles de glucosa 85 mg/dL (67 mg/dL -94 mg/dL) (Tabla 1).

Los familiares de los sujetos sanos, al igual que los familiares de los pacientes, fueron divididos en 3 grupos: madres, padres y hermanos.

El número total de las madres de los sujetos sanos que participaron en nuestro estudio fue de 20 (26.3%). La mediana de la edad fue 40 años (25-50), con peso promedio de  $65.4 \pm 11.1$  kg (53 kg -96 kg) e IMC de  $26.9 \pm 3.3$  kg/m<sup>2</sup> (22.2 kg/m<sup>2</sup> -32.3 kg/m<sup>2</sup>). La mediana de HbA1c en este grupo fue de 5.4% (4.7% - 15.3%) y de los niveles de glucosa 91.5 mg/dL (71 mg/dL -271 mg/dL).

Del grupo de los padres de los sujetos sanos que participaron en nuestro estudio: en total fueron 19 (25%) padres con una mediana de edad de 39 años (27-50). La media del peso fue de  $85.9 \pm 19.1$  kg (66 kg -130 kg), con IMC de  $29.5 \pm 4.6$  kg/m<sup>2</sup> (22.4 kg/m<sup>2</sup> - 40.8 kg/m<sup>2</sup>). La mediana de la HbA1c fue de 5.7% (5.1% -7.8%), con niveles de glucosa de 96 mg/dL (83 mg/dL -217 mg/dL).

Finalmente el grupo de los hermanos de los sujetos sanos incluidos en el estudio, fueron en total 15 (19.7%) individuos 4 (26.7%) hombres y 11 (73.3%) mujeres; con una mediana para la edad de 13 años (4-20) y peso promedio  $43.8 \pm 16.7$  kg (15 kg -64 kg) con IMC ( $19.2 \pm 3.9$  kg/m<sup>2</sup> (13.8 kg/m<sup>2</sup> -26.6 kg/m<sup>2</sup>)). Los porcentajes de HbA1c con mediana de 5.4% (4.3% -5.9%) con glucosa de 87.5 mg/dL (76 mg/dL -97 mg/dL). Dichos valores se muestran en la tabla 1.

Al comparar las variables clínicas y bioquímicas entre los grupos de familiares de primer grado de los pacientes con diabetes tipo 1 y los familiares de primer grado del grupo control sano, no se observó ningún valor significativo en los

valores de péptido C e insulina (Tabla 1) y ningún valor significativo en las variables clínicas y antropométricas (Tabla 1).

*Porcentajes de células NKT periféricas en pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado y controles.*

Los porcentajes de las células NKT obtenidos por citometría de flujo fueron comparados entre los pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 de reciente inicio y sus familiares de primer grado contra los porcentajes de los sujetos sanos y sus respectivos familiares de primer grado.

Dado que los datos no presentaron distribución normal se muestran las medianas y rangos, así como la prueba Kruskal-Wallis para buscar diferencias entre los grupos con respecto al porcentaje de las células NKT (Tabla 2).

El análisis de comparación de las medianas y sus rangos, intra-grupo se realizó con U de Mann Whitney. Al aplicar la prueba Kruskal-Wallis se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), con  $p=0.019$ . Mientras que para grupos independientes se obtuvo un valor significativo con la prueba U de Mann-Whitney al comparar a los pacientes con los sujetos sanos ( $p=0.015$ ). La comparación entre sí de los grupos restantes (madres, padres y hermanos) resultaron no ser estadísticamente significativos (Tabla 2).

<b>Tabla 2.</b> Comparación de los porcentajes de células NKT periféricas entre los diferentes grupos evaluados.		
Grupos de Estudio	% NKT	Valor <i>p</i>
Pacientes	0.03 (0.01-0.74)	0.015
Controles	0.12 (0.02-0.75)	
Madres Paciente	0.11 (0.03-0.91)	0.076
Madres Control	0.07 (0.02-0.21)	
Padres Pacientes	0.07 (0.01-0.31)	0.151
Padres Control	0.10 (0.02-0.44)	
Hermanos pacientes	0.11 (0.01-0.92)	0.777
Hermanos Control	0.20 (0.01-1.35)	

*Concentración de anticuerpos en pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado y controles.*

Más de la mitad de los pacientes con diabetes tipo 1 presentaron niveles positivos a alguno de los anticuerpos (anti-GAD, anti-IA2, anti-insulina) y 10/22 pacientes (45.5%) fueron negativos. El mismo comportamiento mostraron los familiares de primer grado con anticuerpos positivos. El 59.1% (n=13) de los sujetos sanos presentó positividad a un anticuerpo, mientras que el 4.5% (n=1) fue positivo a dos anticuerpos y el 36.4% (n=8) resultó negativo a los anticuerpos medidos.

En la Tabla 3 se describe la distribución de la positividad de los anticuerpos en el grupo de pacientes, controles y familiares según el número de anticuerpos positivos.

**Tabla 3.** Distribución de la positividad de los anticuerpos (anti-GAD65, anti-IA2, anti-insulina) en las familias afectadas con un paciente pediátrico con diabetes tipo 1 y las familias control sanas.

<b>Grupo</b>	<b>1 anticuerpo positivo</b>	<b>2 anticuerpos positivos</b>	<b>Anticuerpos negativos</b>
Pacientes con diabetes tipo 1	40.9% (n=9)	13.6% (n=3)	45.5% (n=10)
Control	59.1% (n=13)	4.5% (n=1)	36.4% (n=8)
Familiares de primer grado del paciente Madre	40.9% (n=9)	9.1% (n=2)	50% (n=11)
Familiares de primer grado del control Madre	45% (n=9)	10.0% (n=2)	45% (n=9)
Familiares de primer grado del paciente Padre	47.1% (n=8)	11.8% (n=2)	41.2% (n=7)
Familiares de primer grado del control Padre	47.4% (n=9)	5.3% (n=1)	47.4% (n=9)
Familiares de primer grado del paciente Hermanos	41.7% (n=10)	8.3% (n=2)	50% n=12)
Familiares de primer grado del control Hermanos	33.3% (n=5)	13.3% (n=2)	53.3% (n=8)

*HLA en pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado y controles.*

**Tabla 4** . Frecuencias génicas de los alelos HLA-DRB1 en pacientes con diabetes tipo 1 y familiares de primer grado comparada con familias con control y con un estudio de baja resolución realizado en 381 controles sanos.

HLA-DRB1	Pacientes DT1		Familia Pacientes		Familia Control		381 controles sanos	
	n	g.f.	n	g.f.	n	g.f.	n	g.f.
*04	20	0.455	45	0.3571	49	0.3224	196	0.257
*08	5	0.114	15	0.1190	15	0.0987	93	0.122
*12 (05)	4	0.091	13	0.1032	11	0.0724	6	0.007
*17 (03)	4	0.0909	10	0.0794	14	0.0921	54	0.07
*18 (03)	4	0.0909	9	0.0714	13	0.0855	1	0.001
*09	3	0.068	9	0.0714	5	0.0329	7	0.009
*14 (06)	2	0.045	1	0.0079	0	0.0000	67	0.087
*01	1	0.023	5	0.0397	3	0.0197	62	0.081
*16 (02)	1	0.023	7	0.0556	0	0	38	0.049
*07	0	0	6	0.0476	12	0.0789	69	0.09
*10	0	0	0	0	0	0	12	0.015
*11 (05)	0	0	0	0	3	0.0197	46	0.06
*13 (06)	0	0	5	0.0397	19	0.1250	66	0.086
*15 (02)	0	0	1	0.0079	8	0.0526	45	0.059

Los alelos DRB1\* se compararon en 4 grupos diferentes: pacientes con diabetes tipo 1, familiares de pacientes con diabetes tipo 1, familias control y 381 controles sanos de un estudio de baja resolución. Los alelos con mayor frecuencia en la población de pacientes con diabetes tipo 1 corresponden a los alelos DRB1\*04 con una frecuencia génica de 0.455, así mismo el DRB1\*08 con una frecuencia génica de 0.114 y los alelos DRB1\*12(05), DRB1\*17(03) Y DRB1\*18(03) tuvieron una frecuencia génica de 0.091. Los alelos menos frecuentes en el grupo de los pacientes con diabetes tipo 1 fueron DRB1\*01 y DRB1\*16(02) con una frecuencia génica de 0.023, mientras que los alelos DRB1\*07, DRB1\*10, DRB1\*11(05), DRB\*13(06) y DRB\*15(02) fueron totalmente nulos. A su vez, los alelos más frecuentes en los familiares de los pacientes con diabetes tipo 1 fueron DRB1\*04 (f.g. 0.357), DRB1\*08 (f.g.

0.119), DRB1\*12(05) (f.g.0.103), DRB1\*17(03) (f.g. 0.079) y DRB1\*18(03) y DRB1\*09 con una frecuencia génica de 0.071. Los alelos menos frecuentes en las familias con un hijo con diabetes tipo 1 fueron DRB1\*14(06) y DRB1\*15(02) con una frecuencia génica de 0.008; mientras que los alelos DRB1\*10 y DRB1\*11(05) resultaron nulos. En las familias con un hijo control sano los alelos más frecuentes fueron DRB1\*04 (f.g 0.322), DRB1\*13(06) (f.g. 0.125), DRB1\*08 (f.g. 0.99), DRB1\*17(03) (F.G. 0,092), DRB1\*18(03) (f.g. 0.085) y DRB1\*07 (f.g. 0.079). los alelos menos frecuentes en este grupo evaluado fueron DRB1\*01 y DRB1\*11(05) con una frecuencia génica de 0.020; mientras que los alelos que no se expresaron fueron DRB1\*14(06), DRB1\*16(02) y DRB1\*10. Los resultados del grupo de controles sanos del estudio de baja resolución mostraron que los alelos más frecuente en población mexicana sana fueron DRB1\*04 (f.g. 0.257), DRB1\*08 (f.g. 0.122), DRB1\*07 (f.g. 0.09), DRB1\*14(06) (f.g. 0.087), DRB1\*13(06) (f.g. 0.086) y DRB1\*01 (f.g. 0.081) mientras que los alelos menos frecuentes fueron DRB1\*12(05) (f.g. 0.007) y DRB1\*18(03) (f.g. 0.001). (Tabla 4)

**Tabla 5 .** Frecuencias génicas de los alelos HLA-DQB1 en pacientes con diabetes tipo 1 y familiares de primer grado comparada con familias de control y con un estudio de baja resolución de 381 controles sanos.

HLA-DQB1	Pacientes diabetes tipo 1	g.f.	Familias Paciente	g.f.	Familias Sanas	g.f.	381 Controles	g.f.
*0302/01/03	24	0.545	70	0.556	76	0.500	350	0.459
*0201	9	0.205	21	0.167	30	0.197	124	0.162
*04	7	0.159	20	0.159	22	0.145	93	0.122
*0501/02	2	0.045	5	0.040	1	0.007	107	0.14
*0601/02	2	0.045	10	0.079	23	0.151	88	0.115

Para DQB1, los alelos más frecuente observados en el grupo de los pacientes con diabetes tipo 1 fueron DQB1\*03 con una frecuencia génica de 0.545, seguido del alelo DQB1\*02 con una frecuencia génica de 0.205, DQB1\*04 (f.g. 0.159). Por otra parte los alelos menos frecuentes en este grupo fueron DQB1\*05 y DQB1\*06 con una frecuencia génica de 0.045 respectivamente. En los familiares de los pacientes con DT se observó prioritariamente el alelo DQB1\*03 con una frecuencia génica de 0.555, seguido de los alelos DQB1\*02 (f.g. 0.166), DQB1\*04 (f.g. 0.158), DQB1\*06 (0.079) y por último DQB1\*05 (f.g. 0.039). En las familias control las frecuencias más altas corresponden a DQB1\*03(f.g.0.5), DQB1\*02 (f.g. 0.197), DQB1\*04 (f.g. 0.144), DQB1\*06 (f.g. 0.151) y el alelo menos frecuente fue DQB1\*05 con una frecuencia génica de 0.006. Con respecto a los resultados del estudio de baja resolución en controles sanos las frecuencias de alelos mayormente observadas corresponden a los alelos DQB1\*03 (f.g. 0.459), DQB1\*02 (f.g. 0.162) y DQB1\*05 (f.g. 0.14); siendo DQB1\*06 (f.g.0.122) y DQB1\*06 (f.g. 0.115) los alelos de menos frecuencia. (Tabla 5)

**Tabla 6.** Frecuencias génicas de la distribución de dos-locus del Haplotipo de HLA Clase II en pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado comparadas con familias control y un estudio de baja resolución de 381 controles sanos ordenada de forma descendente.

	Pacientes	Familias pacientes	Familias Control	381 sujetos sanos
HLA-DRB1/DQB1	g.f.	g.f.	g.f.	g.f.
*04/*03	0.909	0.7142	0.4342	0.2335
*08/*04	0.0454	0.0316	0.1314	0.1141
*03/*02	0.3636	0.252	0.1314	0.0682
*08/*03	0.1818	0.2062	0.0657	0
*12/*04	0.136	0.1746	0	0
*01/*05	0	0	0	0.0787
*03/*03	0	0.0476	0.171	0
*07/*02	0	0	0.1314	0.0813
*11/*03	0	0	0.092	0.0511
*13/*06	0	0.0158	0.1578	0.0524
*14/*03	0	0	0.092	0.0603
*15/*06	0	0.0158	0.0394	0.0538
*16/*03	0	0	0	0.038

Los haplotipos más frecuentes observados en el grupo de pacientes con diabetes tipo 1 fueron DRB1\*04/DQB1\*03 con una frecuencia génica de 0.909, DRB1\*08/DQB1\*04 (f.g. 0.0454), DRB1\*03/DQB1\*02 (f.g. 0.3636) y DRB1\*08/DQB1\*03 (f.g. 0.1818); el haplotipo menos frecuente fue DRB1\*12/DQB1\*04 (f.g. 0.136), mientras que los haplotipos DRB1\*01/DQB1\*05, DRB1\*03/DQB1\*03, DRB1\*07/DQB1\*02, DRB1\*11/DQB1\*03, DRB1\*13/DQB1\*06, DRB1\*14/DQB1\*03, DRB1\*15/DQB1\*06 y DRB1\*16/DQB1\*03 tuvieron una frecuencia nula.

Por otra parte en las familias de los pacientes con diabetes tipo 1 se observó una mayor frecuencia de los haplotipos DRB1\*04/DQB1\*03 (f.g. 0.7142), DRB1\*08/DQB1\*03 (f.g. 0.2062), DRB1\*03/DQB1\*02 (f.g. 0.2520), DRB1\*12/DQB1\*04 (f.g. 0.1746), DRB1\*03/DQB1\*03 (f.g. 0.0476) y DRB1\*08/DQB1\*04 (f.g. 0.0316), seguido de DRB1\*13/DQB1\*06 y DRB1\*15/DQB1\*06 con una frecuencia génica de 0.0158 respectivamente. A

su vez, los haplotipos DRB1\*01/DQB1\*05, DRB1\*07/DQB1\*02, DRB1\*11/DQB1\*03, DRB1\*14/DQB1\*03 y DRB1\*16/DQB1\*03 no se observaron. (Tabla 6)

La mayores frecuencias génicas observadas en el grupo de las familias control se observaron en los haplotipos DRB1\*04/DQB1\*03 (f.g. 0.4342), DRB1\*16/DQB1\*03 (f.g. 0.1578), DRB1\*03/DQB1\*03 (f.g. 0.1710) y DRB1\*08/DQB1\*04, DRB1\*03/DQB1\*02 y DRB1\*07/DQB1\*02 con una frecuencia génica de 0.1314 respectivamente. Seguidos de los haplotipos DRB1\*11/DQB1\*03 y DRB1\*14/DQB1\*03 con una frecuencia génica de 0.092. Así mismo, los haplotipos DRB1\*12/DQB1\*04, DRB1\*01/DQB1\*05 y DRB1\*16/DQB1\*03 no se observaron. (Tabla 6)

Por lo que respecta a los sujetos sanos del estudio de baja resolución con el que se compararon los resultados de este estudio, los haplotipos DRB1\*04/DQB1\*03 (f.g. 0,2335), DRB1\*08/DQB1\*04 (f.g. 0.1141), DRB1\*07/DQB1\*02 (f.g. 0.813), DRB1\*01/DQB1\*05 (f.g. 0,0787), DRB1\*03/DQB1\*02 (f.g. 0.0682) y DRB1\*14/DQB1\*03 (f.g. 0.0603) fueron los que se observaron con mayor frecuencia, seguidos de los haplotipos DRB1\*15/DQB1\*06 (f.g. 0.0538), DRB1\*11/DQB1\*03 (f.g. 0,0511) y DRB1\*16/DQB1\*03 (f.g. 0.038). Así mismo los haplotipos DRB1\*08/DQB1\*03, DRB1\*12/DQB1\*04 y DRB1\*03/DQB1\*03 no se observaron. (Tabla 6)

**Tabla 7.** Frecuencias génicas de la distribución de dos-locus del Haplotipo de HLA Clase II en pacientes con diabetes tipo 1 comparadas con su grupo control sano ordenada de forma descendente.

HLA-DRB1/DQB1	PACIENTES		CONTROLES		OR(IC 95%)	<i>p</i>
	n	g.f.	n	g.f.		
*04/*03	20	0.909	11	0.5	2.50(0.93-6.84)	0.009
*03/*02	8	0.3636	4	0.1818	2.22(0.54-9.71)	0.216
*08/*03	4	0.1818	2	0.0909	2.10(1.31-17.62)	0.4
*12/*04	3	0.136	0	0	INDEFINIDO	0.079
*08/*04	1	0.0454	4	0.1818	0.23(0.01-2.38)	0.169
*07/*02	0	0	1	0.0455	0.00(0-17.62)	0.317
*01/*05	0	0	0	0	0	0
*14/*03	0	0	3	0.1364	0.00(0-2.23)	0.079
*15/*06	0	0	0	0	0	0
*13/*06	0	0	3	0.1364	0.00(0-2.23)	0.079
*11/*03	0	0	2	0.0909	0.00(0-4.2)	0.154
*16/*03	0	0	0	0	0	0
*03/*03	0	0	4	0.1818	0.00(0-1.50)	0.041

Como se observa en la tabla 7, los únicos valores significativos en la comparación de frecuencias génicas de los haplotipos DRB1/DQB1 en los pacientes con diabetes tipo 1 y en su grupo control sano fue para el haplotipo DRB1\*04/DQB1\*03 (OR 2.50 IC 95% [0.93-6.84],  $p=0.045$ ) y el haplotipo DRB1\*03/DQB1\*03 (OR 0 IC 95% [0-1.50],  $p=0.041$ ).

**Tabla 8.** Frecuencias génicas de la distribución de dos-locus del Haplotipo de HLA Clase II en los familiares de pacientes con diabetes tipo 1 comparadas con los familiares de los controles sanos.

HLA-DRB1/DQB1	FAMILIAS PACIENTES		FAMILIA CONTROLES			
	n	g.f.	n	g.f.	OR(IC 95%)	p
*04/*03	45	0.7143	22	0.4074	2.17(1.15-4.11)	0.009
*03/*02	16	0.252	6	0.1111	2.47(0.87-7.39)	0.062
*08/*03	13	0.2062	3	0.0556	4.03(1.03-18.34)	0.023
*12/*04	11	0.1746	0	0	INDEFINIDO	0.001
*08/*04	2	0.0316	6	0.1111	0.27(0.04-1.54)	0.096
*07/*02	0	0	9	0.1667	0.00(0-0.48)	0.001
*01/*05	0	0	0	0	0	0
*14/*03	0	0	4	0.0741	0.00(0-1.30)	0.029
*15/*06	1	0.0158	3	0.0556	0.28(0.01-3.07)	0.244
*13/*06	1	0.0158	9	0.1667	0.00(0-0.78)	0.004
*11/*03	0	0	5	0.0926	0.00(0-0.98)	0.014
*16/*03	0	0	0	0	0	0
*03/*03	3	0.047619048	9	0.1667	0.27(0.06-1.12)	0.04

Por otra parte, en la comparación de las frecuencias génicas de los grupos de familiares de primer grado de los pacientes con diabetes tipo 1 y los del grupo control sano, sólo los haplotipos DRB1\*04/DQB1\*03 (OR 2.17 IC 95% [1.15-27.4.11],  $p=0.009$ ), DRB1\*08/DQB1\*03 (OR 4.03 IC 95% [1.03-18.34],  $p=0.023$ ), DRB1\*12/DQB1\*04 (indefinido,  $p=0.001$ ), DRB1\*07/DQB1\*02 (OR 0 IC 95% [0-0.48],  $p=0.001$ ), DRB1\*14/DQB1\*03 (OR 0 IC 95% [0-1.30],  $p=0.029$ ), DRB1\*13/DQB1\*06 (OR 0.00 IC 95% [0-0.78],  $p=0.004$ ), DRB1\*11/DQB1\*03 (OR 0.27 IC 95% [0-0.98],  $p=0.014$ ) y DRB1\*03/DQB1\*03 (OR 0.27 IC 95% [0,06-1.12],  $p=0.040$ ) (Tabla 8).

<b>Tabla 9.</b> Genotipos heterocigotos u homoigotos observados en pacientes con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado y familias control sanas.		
<b>HAPLOTIPOS</b>	<b>PACIENTES Y FAMILIARES</b>	<b>CONTROLES Y FAMILIARES</b>
<b>Alelos DR3 ó DR4 positivos</b>	n(%) Pacientes: 18 (81.8) (OR 3.1 IC [0.8-12.3])  Familiares: 43 (68.3%) (OR 1.5 IC [0.55-1.9])	n(%) 13 (59.1)  FAMILIARES 27 (50)
<b>DQ2/DQ3</b>	Pacientes: 21 (95.5) (OR 6.2 IC [0.7-58])  Familiares: 82.5% (OR 1.4 [IC 0.42-4.6])	Controles: 17 (77.3)  Familiares: 38 (70.4)
<b>ALTO RIESGO</b>	<b>PACIENTES</b>	<b>CONTROLES</b>
<b>DR3/DR4</b>	6(27.3)	2(9.09)
<b>DR3/DR3</b>	0	2(9.09)
<b>DR4/DR4</b>	2(9.09)	2(9.09)
<b>DR1/DR4</b>	1(4.5)	1 (4.5)

El 81.8% de los pacientes con diabetes tipo 1 presentaron por lo menos un alelo DR3, DR4 (OR 3.1 IC 95% [0.8-12.3]) y el 95.5% (OR 6.2 IC 95% [0.7-58]) de los pacientes resultó positivo a alelos DQ2, DQ3. El 59.1% de los controles sanos fue positivo a alguno de los alelos DR3, DR4 y el 77.3% positivos a algún alelo DQ2, DQ3. Por su parte, el 68.3% (OR 1.5 IC 95% [0.55-1.9]) de los familiares de primer grado de los pacientes con diabetes tipo 1 tipificó positivo para alelos DR3, DR4 y el 82.5% (OR 1.4 IC 95% [0.42-4.6]) positivos para alelos DQ2, DQ3 (Tabla 9), mientras que el 50% de los familiares de los

controles sanos resultaron positivos a alguno de los alelos DR3, DR4 y finalmente el 70.4% de este grupo resultó positivo a alguno de alguno de los alelos DQ2, DQ3.

Se observó una frecuencia del 27.3% de los genotipos heterocigotos DR3/4 y DR1/4 en los pacientes con diabetes tipo 1 en comparación con el 9.09 % del grupo de los sujetos control; el genotipo DR3/DR3 no resultó positivo en ningún paciente con diabetes tipo 1, mientras que el 9.09 % de los sujetos control lo presentaron; el 9.09% de los pacientes presentaron DR4/DR4 similar al 9.09% de los sujetos control y finalmente el 4.5% de los pacientes con diabetes tipo 1 expresó DR1/DR4 y a su vez el 4.5% de los sujetos control lo expresaron como se muestra en la tabla 9.

## **DISCUSIÓN**

Diversos estudios clínicos han reportado deficiencias y defectos funcionales en las células NKT relacionadas con padecimientos autoinmunes como lo es la diabetes tipo 1. Sin embargo su mecanismo funcional deficiente y la importancia que podrían tener dichas células en el diagnóstico de la enfermedad aún se desconoce.<sup>25</sup>

En este trabajo analizamos la población de células NKT utilizando los anticuerpos anti-CD3, anti-V $\alpha$ 24 y anti-V $\beta$ 11 como marcadores que caracterizan a estas células. Los resultados con los que contamos hasta ahora sobre el porcentaje de células NKT señalan que existe una disminución desde el punto de vista cuantitativo (en el porcentaje) que marca una diferencia significativa entre el grupo de pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado y controles, lo cual concuerda con los hallazgos reportados previamente.<sup>39,46</sup> Hay estudios que muestran inconsistencia de los datos de las poblaciones de células NKT, en dónde se observan deficiencias, incrementos o estados normales en función y número en pacientes con diabetes tipo 1 y sujetos sanos.<sup>38-42,46-48</sup> En contraste, nuestros resultados muestran un bajo porcentaje de células NKT en el grupo de los pacientes con diabetes tipo 1 de reciente inicio en comparación con los porcentajes observados en el grupo de los sujetos sanos, lo que apoya el fondo autoinmune de la diabetes tipo 1 con fallas en los mecanismos reguladores. Estos fallos van ligados a la deficiencia numérica y a la deficiente producción de citosinas que incrementan la predisposición a padecimientos autoinmunes. Unas de las principales herramientas para determinar cómo los defectos de las células NKT aparecen,

son los estudios de asociación genómica de las células NKT de individuos con características celulares diferentes como el aumento o disminución en el número de dichas células.<sup>49</sup> Una posibilidad es que los polimorfismos en moléculas importantes para el desarrollo de las células NKT, tales como receptores SLAM<sup>50</sup> o el factor de transcripción PZLF<sup>51</sup> puedan predecir las variaciones numéricas de dichas células en cada persona.<sup>52</sup>

Una de las limitantes principales de nuestro estudio es que sólo hemos evaluado el porcentaje de células NKT de sangre periférica, pues en estudios murinos el número de células NKT se ha reportado normal mientras que en otros tejidos se han encontrado deficiencias significativas.<sup>32</sup> Desafortunadamente esas técnicas y la obtención de tejidos humanos es extremadamente difícil. Sin embargo, la mayoría de los estudios revisados coinciden en incrementar las estrategias para el estudio de esta población celular ya que además de estudiar la concentración de citosinas y el número total de células NKT de sangre periférica, se ha demostrado que existen muchas otros defectos potenciales en la función tanto de las células NKT periféricas así como las que provienen de otros tejidos.<sup>38,41,53</sup>

La cuantificación de los anticuerpos que principalmente reaccionan contra los islotes pancreáticos: Anti-GAD, Anti-IA-2 y Anti-IAA ha sido muy útil para conocer la actividad de la enfermedad, determinar su grado de progresión y contribuye a clasificar y predecir el estado clínico de los pacientes afectados. Diversos estudios prospectivos en familiares de los pacientes con la enfermedad, muestran que la presencia de dos o más tipos de auto-anticuerpos proporciona un valor predictivo de la enfermedad.<sup>11,13</sup>

Los datos presentados en la tabla 2 muestran que los grupos de las familias con sujetos sanos tienen más altos porcentajes de positividad a un anticuerpo que los porcentajes de las familias afectadas, no así en la presencia de dos anticuerpos, donde los porcentajes de las familias afectadas son mayores que los porcentajes de las familias con sujetos sanos. Los datos con los que contamos hasta ahora sugieren que el porcentaje de células NKT no se relaciona con la positividad a los anticuerpos. Sin embargo, resulta interesante observar que en casi la mitad tanto de los familiares de los pacientes como de los controles con anticuerpos positivos el porcentaje de NKT es discretamente menor.

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune con un fuerte componente genético y aproximadamente entre el 40 y el 50% de los genes relacionados con este padecimiento se le atribuyen a la variación alélica de la región HLA. La participación directa de los genes de HLA de clase II DRB1 y DQB1 en diabetes tipo 1 está bien establecida, con efectos de predisposición y protectores.<sup>57 54</sup> Los haplotipos de mayor riesgo reportados en población mexicana son: DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201; DRB1\*0405-DQA1\*0301-DQB1\*0302 mientras que los haplotipos de protección son: DRB1\*0403-DQA1\*0301-DQB1\*0302; DRB1\*0407-DQA1\*0301-DQB1\*0302; DRB1\*0411-DQA1\*0301-DQB1\*0302; DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602, DRB1\*1303-DQA1\*0103-DQB1\*0603; DRB1\*0802-DQA1\*0301-DQB1\*0402<sup>5-7,55-57</sup> Se comparó el HLA de 44 familias, 22 familias con un paciente con diabetes tipo 1 y los familiares de primer grado y 22 familias con un sujeto control sano.

Además nuestros resultados se compararon con un estudio de baja resolución de 381 sujetos controles sanos para corroborar nuestros hallazgos.

Como se observó en la tabla 6, se esperaba encontrar una alta frecuencia en los alelos de riesgo DRB1\*04 y DRB1\*03<sup>55-57</sup> en los pacientes y sus familiares de primer grado que su vez en conjunto es mayor a la frecuencia encontrada en las familias controles. En cuanto a lo que se refiere a DRB1, los alelos más frecuentes en la población de los pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado, corresponden a DRB1\*04 con una frecuencia génica de 0.455 y 0.357 respectivamente y DRB1\*03 con una frecuencia génica de 0.090 para los alelos DRB1\*17(03) y DRB1\*18(03) coincidiendo con reportes previos.<sup>51</sup> Por otro lado, los alelos más frecuentes en las familias de los controles sanos fueron DRB1\*04 (f.g. 0.322), DRB1\*13(06) (f.g. 0.125), DRB1\*08 (f.g. 0.99) DRB1\*17(03) (f.g.0.092), DRB1\*18(03) (f.g. 0.0855) y DRB1\*07 (f.g. 0.079) (Tabla 4) siendo DRB1\*03, DRB1\*13(6) y DRB1\*08 reportados como los alelos protectores más representativos en población mexicana.<sup>56,58</sup> Además en los resultados de la tabla 6 se puede observar que en el grupo de pacientes con diabetes tipo 1 los alelos DRB1\*07, DRB1\*10, DRB1\*11(05), DRB\*13(06) y DRB\*15(02) tienen frecuencia nula mientras que en los grupos de las familias control y los 381 controles sanos del estudio de baja resolución presentan una considerable frecuencia, lo que podría explicar la diferencia génica de los pacientes con diabetes tipo 1 con respecto a los sujetos sin dicha enfermedad.

Como se observó en el grupo de los pacientes con diabetes tipo 1, el alelo más frecuente de DQB1 fue DQB1\*03 (f.g. 0.545), en el grupo de las familias de pacientes el alelo de DQB1 más frecuente corresponde de igual forma a

DQB1\*03 (f.g. 0.555) y en las familias control sanas una frecuencia génica de 0.5, estos datos coinciden con los resultados reportados en el estudio de baja resolución de los 381 sujetos sanos como se observa en la tabla 4. Sin embargo en algunos estudios el alelo de riesgo mayormente reportado DQB1\*02,<sup>55,57</sup> que en nuestra población de pacientes se observó con una frecuencia génica de 0.205, en los familiares de primer grado 0.1666 y en las familias control sanas 0.1973. Finalmente nuestros datos coinciden en que los alelos más frecuentes en las familias control, son de mayor a menor frecuencia génica: DQB1\*03 (f.g. 0.5), DQB1\*02 (f.g. 0.197) DQB1\*06 (f.g. 0.151), DQB1\*04 (f.g. 0.144) y corresponden con los alelos protectores reportados en población mexicana (Tabla 5).<sup>55</sup>

Los haplotipos protectores DRB1\*13(06),DQB1\*06 y DRB1\*08,DQB1\*04<sup>54</sup> se observan de manera más frecuente en las familias control ( 0.4342 y 0.0394) respectivamente, que en el grupo de pacientes con diabetes tipo 1 DRB1\*13(06),DQB1\*06 (f.g. 0.00) y DRB1\*08,DQB1\*04 (f.g. 0.0454); en las familias de pacientes con diabetes tipo 1 (0.158 y 0.0316) respectivamente; en las familias control sanas (0.1578 y 0.1314) y finalmente en el estudio de baja resolución de sujetos sanos (0.0524 y 0.1141) (Tabla 6).

El haplotipo DRB1\*04,DQB1\*03 es considerado de riesgo para pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares mientras que también es protector para sujetos sin dicho padecimiento; en nuestro grupo de pacientes con diabetes tipo 1 se observó una frecuencia génica de 0.909, en el grupo de familiares de primer grado una frecuencia génica de 0.7142, en las familias control sanas una frecuencia génica de 0.4342 y en los resultados reportados del estudio de baja resolución una frecuencia génica de 0.2335, siendo éste haplotipo el más

frecuente de los 4 grupos evaluados. Cuando se comparan las frecuencias génicas observada del haplotipo de riesgo DRB1\*03/DRB1\*02, la frecuencia génica de los pacientes (0.3636) es mayor que la frecuencia génica de sus familiares de primer grado (0.252), que la frecuencia génica de las familias control sanas (0.1314) y que la frecuencia reportada en el estudio de baja resolución de controles sanos (0.0682) debiéndose quizá al padecimiento autoinmune regulado por genes específicos. Como se observó en la tabla 7, el haplotipo DRB1\*04/DQB1\*03 (OR 2.50 IC 95% [0.63-6.84],  $p=0.045$ ) resultó significativo, es decir, que los pacientes con diabetes tipo 1 al presentar el haplotipo DRB1\*04/DQB1\*03 incrementa 2.50 veces más el riesgo de presentar la enfermedad de diabetes tipo 1 que los controles sanos, lo que coincide con los datos reportados para poblaciones mexicanas. Pese a este hallazgo, el haplotipo DRB1\*03/DQB1\*03 (OR 0 IC 95% [0-1.50],  $p=0.041$ ) también resulta significativo al comparar el grupo de pacientes con su grupo control, probablemente debido al tamaño de la muestra pues éste haplotipo génico no ha sido reportado en la literatura consultada. Por otro lado, en el grupo de los familiares de primer grado de los pacientes con diabetes tipo 1, se observa que el haplotipo DRB1\*04/DQB1\*03 (OR 2.17 IC 95% [1.15-4.11,  $p=0.009$ ) considerado de riesgo como se ha citado anteriormente, tiene una mayor frecuencia que en el grupo de los familiares de primer grado del grupo de controles sanos y tienen un riesgo 2.17 veces mayor de presentar diabetes tipo 1 que el grupo de familiares control sano. Por su parte, el haplotipo DRB1\*13/DQB1\*06 (OR 0.00 IC 95% [0-0.78],  $p=0.004$ ) y ha sido reportado frecuentes en el estudio de baja resolución con el que nuestros datos fueron comparados<sup>58</sup> y reportado como haplotipo protector en la literatura

consultada<sup>55-57</sup> (Tabla 8), coinciden con nuestros datos en siendo más frecuente en controles sanos que en pacientes y familiares de primer grado. Pese a observar estos resultados, los haplotipos DRB1\*08/DQB1\*03 (OR 4.03 IC 95% [1.03-18.3],  $p=0.023$ ) y DRB1\*03/DQB1\*03 (OR 0.27 IC 95% [0,06-1.12],  $p=0.040$ ) se están expresando con mayor frecuencia en familiares de primer grado de pacientes con diabetes tipo 1 que en el grupo control de familiares sanos ( f.g. 2062 vs f.g. 0.0556) debido tal vez, como se ha sugerido, al tamaño muestral pues ninguno de estos haplotipos se ha sido reportado en estudios previos en población mexicana. Por otro lado, cabe mencionar que los haplotipos DRB1\*07/DQB1\*02 (OR 0 IC 95%[0-0.48],  $p=0.001$ ), DRB1\*14/DQB1\*03 (OR 0 IC 95% [0-1.30],  $p=0.029$ ) y DRB1\*11/DQB1\*03 (OR 0.27 IC 95% [0-0.98],  $p=0.014$ ) se están comportando de manera protectora y esto coincide con los reportes de estudios previos como el estudio de baja resolución y la literatura citada.<sup>55-57</sup> (Tabla 8)

Los genotipos heterocigotos DR3/4 y DR1/4 y el genotipo homocigoto DR3/3 se encuentran asociados a una mayor predisposición para desarrollar diabetes tipo 1. DR3/DR4 es el que se ha descrito como el genotipo de mayor riesgo que los genotipos homocigotos DR3/DR3, DR1/DR4 (OR=61.3)<sup>7</sup>. El 81.8% de los pacientes con diabetes tipo 1 y el 59.1% de los sujetos sanos expresaron algún genotipo heterocigoto u homocigoto (Tabla 9). Como se muestra en la tabla 9, el genotipo DR3/DR4 se presenta en un 27.3% en los pacientes con diabetes tipo 1 mientras que dicho genotipo se expresa en un 9.09% de los sujetos sanos coincidiendo así con la literatura consultada.

## **CONCLUSIONES**

Existen diferencias en el porcentaje de células NKT entre pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico cuando se compara con los controles sanos.

Nuestros datos sugieren que el porcentaje de células NKT no se relaciona con la positividad a los anticuerpos.

Los hallazgos encontrados hasta el momento apoyan que los familiares de pacientes con diabetes tipo 1 presentan una mayor frecuencia de los haplotipos HLA de riesgo y las familias control presentan más alta frecuencia de los haplotipos protectores como se ha encontrado en los datos reportados para población mexicana y en los resultados observados en estudios de baja resolución de sujetos controles sanos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Robles VC, Cornejo BJ, Dorantes AL, Gutiérrez L, Magos C, Pérez Pasten E. Actualización del registro de diabetes mellitus tipo I Grupo Ciudad de México. Memorias XXIX Reunión Anual, Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología A.C. Acapulco, Gro. Nov. 1989: 19.
- 2) Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. For the World Health Organization DIAMOND Project Group. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 883-892.
- 3) Gómez-Díaz R., Pérez-Pérez G., Hernández-Cuesta I.T., Carmen Rodríguez-Garcí J.C., Guerrero-López R., Aguilar-Salinas C.A., Wacher N.H. Incidence Of Type 1 Diabetes In Mexico: Data From An Institutional Register 2000–2010. *Diabetes Care* 2012; 35.
- 4) Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009; 360(16),1646-54.
- 5) She JX. Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 1998; 17, 323-329.
- 6) Erlich HA, Zeidler A, Chang J, Shaw S, Raffel LJ, Klitz W, Beshkov Y, Costin G, Pressman S, Bugawan T, et al. HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. *Nat Genet*. 1993; 3(4): 358–364.
- 7) Gorodezky C, Olivares A, Debezo H, Rodriguez L, Altamirano N, Robles C. MHC-dependent molecular mechanisms of susceptibility and protection in type 1 diabetes in mexicans. *Gac Med Mex* 1995;131: 395-402.
- 8) Baekkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J and Lenmark. A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 1982; 298: 167-169.
- 9) Karlsson M, Ludvigsson J. The ABBOS peptide from bovine serum albumin causes an IFN-gamma and IL-4 mRNA response in lymphocytes from children with recent onset of type I diabetes. *Diab Res Clin Pract* 2000; 47: 199-207.
- 10) Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2002; 277: 43545-43548.
- 11) Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 1996; 45(7): 926–933.
- 12) Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(43):17040–17045.
- 13) Leisle D, Lipsky P, and Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest* 2001; 108: 1417-1422.
- 14) Notkins AL and Lernmark A.. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unsolved issues. *J Clin Invest* 2001; 108: 1247-1252
- 15) Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25 years review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 1986; 29: 267-274.
- 16) Hannim A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Seimell O. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 90: 1901-1910.
- 17) Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, Moriwaki M, Itoh N, Yamamoto K, Iwahashi H, Yamagata K, Waguri M, Nanmo T. et al. Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomenon in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2001; 50: 1269–1273.
- 18) Rabinovitch A, Soares-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC, Powe RF. INF-g gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1995; 154: 4878-4882.
- 19) Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991; 165: 97-103.

- 20) Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Ann. Rev. of Immunol.* 2010; 28: 445-489.
- 21) Budd RC, Miescher GC, Howe RC, Lees RK, Bron C, MacDonald HR. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med* 1987; 166: 577-582.
- 22) Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, Pardoll DM. A novel population of T-cell receptor  $\alpha\beta$ -bearing thymocytes which predominantly expresses a single V $\beta$  gene family. *Nature.* 1987; 329: 251-254.
- 23) Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8-  $\alpha\beta$  T cells demonstrates preferential use of several V $\beta$  genes and an invariant TCR  $\alpha$  chain. *J Exp Med* 1993; 178: 1-16.
- 24) Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor  $\alpha$  chain is used by a unique subset of MHC class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 1994; 180: 1097-1106.
- 25) Berzins SP, Mark J, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 131-142.
- 26) Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568.
- 27) Baxter AG, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI. Association between alphabeta TCR+CD-CD- Te-cell deficiency and IDMM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997; 46: 572-582.
- 28) Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 1998; 187(7): 1047-1056.
- 29) Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC. Over expression of natural killer T cells protects V $\alpha$ 14- J $\alpha$ 281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J. Exp. Med* 1998; 188: 1831-1839.
- 30) Falcone M, Brian Y, Tucker L, Rodriguez E, Sarvetnick. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanism for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1999; 190: 963-972.
- 31) Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, Silveira P, Shepherd D, Naidenko OV, Godfrey DI, Baxter AG. Cytometric and functional analysis of NK- and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int Immunol* 2001; 13: 887-896.
- 32) Berzins SP, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Hammond KJ, Sidobre S, Baxter A, Smyth MJ, Kronenberg M, Godfrey DI. Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 247-252.
- 33) Shimizu J, Carrasco-Marin E, Kanagawa O, Unanue ER. Relationship between  $\beta$  cell injury and antigen presentation in NOD mice. *J. Immunol* 1995; 155: 4095-4099.
- 34) Novak J, Lucie Beaudoin L, SeHo Park S, Thibault Griseri T, Luc Teyton L, Albert Bendelac A, Lehuen A. Prevention of Type 1 Diabetes by Invariant NKT Cells Is Independent of Peripheral CD1d Expression. *J. Immunol* 2007; 178: 1332-1340.
- 35) Wagner MJD, Hussain S, Mehan M, Verdi JM, Delovitch TL. A Defect in Lineage Fate Decision during Fetal Thymic Invariant NKT Cell Development May Regulate Susceptibility to Type 1 Diabetes. *J. Immunol* 2005; 174: 6764-6771.
- 36) Yang Y, Bao M, Yoon JW. Intrinsic Defects in the T-Cell Lineage Results in Natural Killer T-Cell Deficiency and the Development of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse. *Diabetes* 2001; 50: 2691-2699.
- 37) Griseri T, Beaudoin L, Novak J, Mars LT, Lepault F, Liblau R, Lehuen A. Invariant NKT Cells Exacerbate Type 1 Diabetes Induced by CD8 T cells. *J. Immunol* 2005; 175: 2091-2101.
- 38) Kent S, Chen Y, Clemmings SM, Viglietta V, Kenyon NS, Ricordi C, Hering B, Hafler DA. Loss of IL-4 Secretion from Human Type 1a Diabetic Pancreatic Draining Lymph Node NKT Cells. *J. Immunology* 2005; 175: 4458-4464.
- 39) Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclare N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:131-140.

- 40) Janos K, Engelmann P, Farkas K, Richman G, Eck S, Lolley J, Jalahej H, Borowiec M, Kent S, Treszl A, Orban T. Reduced CD4<sub>+</sub> subset and Th1 bias of the human iNKT cells in Type 1 diabetes mellitus. *J. Leukoc. Biol* 2006; 81: 654–662.
- 41) Lee P, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 793–800.
- 42) Roman-Gonzales A, Moreno ME, Alfaro JM, Uribe F, Latorre-Sierra G, Rugeles MT, Montoya CJ. Frequency and function of circulation invariant NKT cells in autoimmune diabetes mellitus and thyroid disease in Colombian patients. *Human Immunol* 2009; 70(4): 262-268.
- 43) Baev DV, Peng XH, Song L, Barnhart JR, Crooks GM, Weinberg KL, Metelitsa LS. Distinct homeostatic requirements of CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> subsets of V $\alpha$ 24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood* 2004; 104: 4150-4156.
- 44) Lee H, Nong C, Shinj, Oh S, Jun S, Park YK, Hong S, Lee GR, Park SH. The presence of CD8<sup>+</sup> invariant NKT cells in mice. *Exp. Mol. Med* 2009; 41(12): 866-862.
- 45) Wang B, Geng YB, Wnag CR. CD1-restricted NK T Cells Protect Nonobese Diabetic Mice from Developing Diabetes. *J Exp Med* 2000; 194: 313–319.
- 46) Wilson, S. B. Extreme TH1 bias of invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391: 177–181.
- 47) Oikawa, Y. High frequency of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1818–1823.
- 48) Tsutsumi, Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with type 1 diabetes. *Diabet. Med.* 2006; 23: 1145–1150.
- 49) Esteban, L. M. *et al.* Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J. Immunol.* 2003; 203: 171: 2873–2878.
- 50) Borowski, C. & Bendelac, A. Signaling for NKT cell development: the SAP–FynT connection. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 833–836.
- 51) Savage, A. K. *et al.* The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 2008; 29: 391–403.
- 52) Godfrey, D. I. & Berzins, S. P. Control points in NKT cell development. *Nature Rev. Immunol.* 2007; 7: 505–518.
- 53) Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, Rugeles M, Atkinson MA, Landay AL, Wilson SB. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 2007; 122: 1–14.
- 54) Valdes A.M., Thomson G., Barcellos L.F. Genetic variation within the HLA class III influences T1D susceptibility conferred by high-risk HLA haplotypes. *Genes and Immunity* 2010; 11: 209–218.
- 55) Gorodezky C., Alaez C., Murguía A., Rodríguez A., Balladares S., Vazquez M., Flores H., Robles C. HLA and autoimmune diseases: Type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmunity Reviews* 2006; 5: 187-194.
- 56) Rodríguez-Ventura AL, Yamamoto-Furusho JK, Coyote N, Dorantes LM, Ruiz-Morales JA, Vargas-Alarcón G, Granados J. HLA-DRB1\*08 allele may help to distinguish between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus in Mexican children. *Pediatric Diabetes* 2007; 8: 5–10.
- 57) Alaez C, MN Vázquez-García MN, Gorodezky C. DQA1 and DQB1 Promoter diversity and linkage disequilibrium with class II haplotypes in Mexican Mestizo population. *Genes and Immunity* 2001; 2, 216–221.
- 58) Barquera R, Zúñiga Joaquín, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J, Torres-García D, García-Salas C, Silva B, Cruz-Robles D, Anaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Molecular Immunology* 2008; 45: 1171–1178.

# **A N E X O S**

## **ANEXO 1**

### **INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

---



DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE ATENCIÓN MÉDICA  
COORDINACIÓN DE UNIDADES MÉDICAS DE ALTA ESPECIALIDAD  
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.

#### **Carta de Consentimiento Informado**

##### ***Nombre del Estudio***

Porcentaje de células NKT en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado.  
Aprobación por la Comisión Nacional de Investigación Científica con el número 2010-785-045.

##### ***Propósito del Estudio***

Su hijo ha sido invitado a participar en el estudio debido a que:

- a) presenta diabetes tipo 1 de reciente inicio, es decir que tiene como máximo 3 meses de habersele diagnosticado.
- b) Es hermano (a) de algún paciente con diabetes tipo 1 de recién diagnóstico.

Dicho estudio de investigación se lleva a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, y de igual manera, se han invitado a participar a otros sujetos con diabetes tipo 1 de entre 2 y 17 años de edad.

Su participación es completamente voluntaria, y al ser menor de edad se les solicita a los padres o tutores el consentimiento informado que a continuación se describe.

En nuestro país la diabetes tipo 1 se ha incrementado en los últimos años. Se han reconocido marcadores, es decir, moléculas en la sangre que predicen la aparición de la enfermedad y ello permite identificar a la población en riesgo de padecer diabetes tipo 1 y tomar las medidas necesarias para evitar o retardar la presencia de dicha enfermedad en familiares de personas con diabetes.

Estudios recientes demuestran una alteración en el sistema inmunológico (sistema de nuestro cuerpo que nos defiende de agresiones del medio ambiente, como las infecciones) que hace que no se produzca la insulina necesaria para evitar que se desencadene diabetes tipo 1.

El objetivo del estudio al que ha sido invitado a participar es conocer el porcentaje de células NKT del paciente con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado (papá, mamá y hermanos).

##### ***Procedimientos***

Si usted decide participar ocurrirá lo siguiente:

Su participación en el estudio consiste en una visita en donde se le realizará una historia clínica completa, así mismo se determinará el peso, talla, perímetro de cintura y cadera, se obtendrán mediciones de tensión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, y posteriormente se les tomará una muestra sanguínea de 10 ml con una jeringa estéril desechable para la determinación de anticuerpos (anti GAD65, anti IA2, anti-insulina, insulina, péptido C, células NKT) y estudios de laboratorio para medir glucosa, hemoglobina glicosilada y una biometría hemática completa que se realizará para determinar la cantidad de células en su sangre. Nos tardaremos aproximadamente 10 minutos en tomarle la muestra de sangre. Los estudios de laboratorio que le realizaremos tienen el propósito de saber más sobre

sus condiciones generales de salud y de su enfermedad. Le entregaremos los resultados de sus estudios de laboratorio en aproximadamente 10 días. En ningún caso la cantidad de sangre obtenida será mayor de 10 ml para cada participante. Las muestras de sangre obtenidas se procesarán el mismo día de haberlas tomado y al finalizar el proceso de obtención de las células NKT, que son las células de nuestro interés, el sobrante de las muestras sanguíneas se desechará. Ninguna muestra de sangre será guardada por ningún motivo.

El proyecto está registrado ante la Comisión Nacional de Investigación en con el número: 2010-785-045

### ***Posibles Beneficios***

El sujeto que participe en el estudio, no recibirá ningún beneficio directo. Sin embargo, los hallazgos en este estudio permitirán avances en la fisiopatogénesis de la diabetes tipo 1 y su utilidad a futuro como posible marcador para la identificación temprana de los familiares de los pacientes con diabetes tipo 1 que puedan estar en riesgo de padecer dicha enfermedad.

### ***Posibles inconvenientes***

Los riesgos que implica el estudio son mínimos ya que en algunas ocasiones el procedimiento para tomar las muestras de sangre pueden causar un poco de dolor o una discreta molestia, y es posible que se le pueda formar un moretón.

### ***Privacidad y Confidencialidad***

La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarlo (nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial. Es nuestra responsabilidad informarle de los resultados, aclararle sus dudas, mantener una vigilancia adecuada de su salud durante la realización de las pruebas y mantener la confidencialidad de los resultados, ninguna persona ajena al estudio tendrá acceso a su expediente y a la información que obtengamos con sus resultados.

### ***Resultados o información nueva***

Durante el transcurso de este estudio, le informaremos de cualquier hallazgo nuevo. Si le llegamos a proporcionar información nueva, le solicitaremos un nuevo consentimiento para seguir participando en este estudio.

### ***Participación y Retiro***

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Tanto el niño como los padres son libres de rehusar participar en el estudio. Si decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS; es decir, su decisión no afectará su derecho de obtener los servicios de su unidad médica. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El no participar en el estudio no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado desde el momento en que aceptó participar.

### ***Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio***

El investigador principal se compromete a responder cualquier llamada al Tel. 56 27 69 00 Ext. 22292 y 21481 sobre las dudas de los riesgos y beneficios, en caso de molestias o dudas de 7:30-14h en días hábiles. En la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de especialidades o del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

**Declaración de Consentimiento**

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

\_\_\_\_\_  
Firma del Padre o tutor

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante

**Firma del encargado de obtener el consentimiento informado**

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Encargado

\_\_\_\_\_  
Firma del Encargado

Mi firma como testigo certifica que el (la) participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia de manera voluntaria.

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1 Parentesco

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 2 Parentesco

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 2

## **ANEXO 2**

### **INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

---



DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE ATENCIÓN MÉDICA  
COORDINACIÓN DE UNIDADES MÉDICAS DE ALTA ESPECIALIDAD  
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE PEDIATRIA CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.

#### **ASENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS MAYORES DE 8 AÑOS**

#### **PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA:**

***Porcentaje de células NKT en pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado. Con el número de registro ante la CNIC: 2010-785-045***

Se te ha invitado a participar en este estudio porque tienes diabetes tipo 1. Tu participación consiste en una visita al hospital, donde te tomaremos una muestra de sangre de tu brazo. Quizá te pueda doler un poquito, pero se te quitará rápido. Si no quieres participar, respetaremos tu decisión y no se te obligará a hacerlo. Tus papás saben que te estamos invitando a participar y ellos están de acuerdo en que te preguntemos si quieres o no ayudarnos en realizar este trabajo.

**“Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Me han respondido mis dudas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo.**

**Acepto participar en la investigación”.**

Nombre del niño/a \_\_\_\_\_

Firma del niño/a: \_\_\_\_\_

Fecha: México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_\_

***Si no sabe leer:***

**“He sido testigo de la lectura exacta del documento de asentimiento al participante potencial y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando de que ha dado su asentimiento libremente”.**

Nombre del testigo (diferente de los padres) \_\_\_\_\_

Huella dactilar del niño/menor



Firma del testigo \_\_\_\_\_

Parentesco \_\_\_\_\_

Fecha México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_\_.

Copia dada al participante \_\_\_\_\_ (iniciales del investigador/asistente)

El Padre/madre/apoderado ha firmado un consentimiento informado \_\_\_Si \_\_\_No (iniciales del investigador/asistente) \_\_\_\_\_.

**ANEXO 3**

**HOJA DE RECOLECCION DE DATOS**

Fecha \_\_\_\_\_

**PROPÓSITO No.** \_\_ **Procedencia (HGZ o UMF)** \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

No. De afiliación \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

**Antecedentes Heredofamiliares:**

Diabetes Mellitus Tipo 1 \_\_\_\_\_

Diabetes Mellitus tipo 2 \_\_\_\_\_

Cardiopatía isquémica \_\_\_\_\_

Hipertensión Arterial \_\_\_\_\_

Obesidad \_\_\_\_\_

Dislipidemias \_\_\_\_\_

Otras \_\_\_\_\_

**Exploración Física**

Peso \_\_\_\_\_ Kg Talla \_\_\_\_\_ m IMC \_\_\_\_\_ P. cintura \_\_\_\_\_ P. cadera \_\_\_\_\_

TAS \_\_\_\_\_ TAD \_\_\_\_\_ FC \_\_\_\_\_ FR \_\_\_\_\_

**BHC:** WBC \_\_\_\_\_ NEU \_\_\_\_\_ LYM \_\_\_\_\_ MONO \_\_\_\_\_ EOS \_\_\_\_\_ BASO \_\_\_\_\_

RBC \_\_\_\_\_ Hb \_\_\_\_\_ HCT \_\_\_\_\_ MCV \_\_\_\_\_ MCH \_\_\_\_\_ MCHC \_\_\_\_\_ RDW \_\_\_\_\_ PLAQ \_\_\_\_\_

**PL:** CT \_\_\_\_\_ TG \_\_\_\_\_ HDL-Col \_\_\_\_\_ LDL-Col \_\_\_\_\_

**QS:** Glucosa \_\_\_\_\_ Cr \_\_\_\_\_ Acido úrico \_\_\_\_\_

**HbA1c:** \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**MADRE** \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

No. De afiliación \_\_\_\_\_

Procedencia (HGZ o UMF) \_\_\_\_\_

**Antecedentes Heredofamiliares:**

Diabetes Mellitus Tipo 1 \_\_\_\_\_

Diabetes Mellitus tipo 2 \_\_\_\_\_

Cardiopatía isquémica \_\_\_\_\_

Hipertensión Arterial \_\_\_\_\_

Obesidad \_\_\_\_\_

Dislipidemias \_\_\_\_\_

Otras  
\_\_\_\_\_

**Exploración Física**

Peso \_\_\_\_\_ Kg Talla \_\_\_\_\_ mts IMC \_\_\_\_\_ P. cintura \_\_\_\_\_ P. cadera \_\_\_\_\_

TAS \_\_\_\_\_ TAD \_\_\_\_\_ FC \_\_\_\_\_ FR \_\_\_\_\_

**BHC:** WBC \_\_\_\_\_ NEU \_\_\_\_\_ LYM \_\_\_\_\_ MONO \_\_\_\_\_ EOS \_\_\_\_\_ BASO \_\_\_\_\_

RBC \_\_\_\_\_ Hb \_\_\_\_\_ HCT \_\_\_\_\_ MCV \_\_\_\_\_ MCH \_\_\_\_\_ MCHC \_\_\_\_\_ RDW \_\_\_\_\_ PLAQ \_\_\_\_\_

**PL:** CT \_\_\_\_\_ TG \_\_\_\_\_ HDL-Col \_\_\_\_\_ LDL-Col \_\_\_\_\_

**QS:** Glucosa \_\_\_\_\_ Cr \_\_\_\_\_ Acido úrico \_\_\_\_\_

**HbA1c:** \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**PADRE** \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

No. De afiliación \_\_\_\_\_

Procedencia (HGZ o UMF) \_\_\_\_\_

Antecedentes Heredofamiliares:

Diabetes Mellitus Tipo 1 \_\_\_\_\_

Diabetes Mellitus tipo 2 \_\_\_\_\_

Cardiopatía isquémica \_\_\_\_\_

Hipertensión Arterial \_\_\_\_\_

Obesidad \_\_\_\_\_

Dislipidemias \_\_\_\_\_

Otras  
\_\_\_\_\_

Exploración Física

Peso \_\_\_\_\_ Kg Talla \_\_\_\_\_ mts IMC \_\_\_\_\_ P. cintura \_\_\_\_\_ P. cadera \_\_\_\_\_

TAS \_\_\_\_\_ TAD \_\_\_\_\_ FC \_\_\_\_\_ FR \_\_\_\_\_

**BHC:** WBC \_\_\_\_\_ NEU \_\_\_\_\_ LYM \_\_\_\_\_ MONO \_\_\_\_\_ EOS \_\_\_\_\_ BASO \_\_\_\_\_

RBC \_\_\_\_\_ Hb \_\_\_\_\_ HCT \_\_\_\_\_ MCV \_\_\_\_\_ MCH \_\_\_\_\_ MCHC \_\_\_\_\_ RDW \_\_\_\_\_ PLAQ \_\_\_\_\_

**PL:** CT \_\_\_\_\_ TG \_\_\_\_\_ HDL-Col \_\_\_\_\_ LDL-Col \_\_\_\_\_

**QS:** Glucosa \_\_\_\_\_ Cr \_\_\_\_\_ Acido úrico \_\_\_\_\_

**HbA1c:** \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**HERMANO** \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

No. De afiliación \_\_\_\_\_

Procedencia (HGZ o UMF) \_\_\_\_\_

Antecedentes Heredofamiliares:

Diabetes Mellitus Tipo 1 \_\_\_\_\_

Diabetes Mellitus tipo 2 \_\_\_\_\_

Cardiopatía isquémica \_\_\_\_\_

Hipertensión Arterial \_\_\_\_\_

Obesidad \_\_\_\_\_

Dislipidemias \_\_\_\_\_

Otras  
\_\_\_\_\_

Exploración Física

Peso \_\_\_\_\_ Kg Talla \_\_\_\_\_ mts IMC \_\_\_\_\_ P. cintura \_\_\_\_\_ P. cadera \_\_\_\_\_

TAS \_\_\_\_\_ TAD \_\_\_\_\_ FC \_\_\_\_\_ FR \_\_\_\_\_

**BHC:** WBC \_\_\_\_\_ NEU \_\_\_\_\_ LYM \_\_\_\_\_ MONO \_\_\_\_\_ EOS \_\_\_\_\_ BASO \_\_\_\_\_

RBC \_\_\_\_\_ Hb \_\_\_\_\_ HCT \_\_\_\_\_ MCV \_\_\_\_\_ MCH \_\_\_\_\_ MCHC \_\_\_\_\_ RDW \_\_\_\_\_ PLAQ \_\_\_\_\_

**PL:** CT \_\_\_\_\_ TG \_\_\_\_\_ HDL-Col \_\_\_\_\_ LDL-Col \_\_\_\_\_

**QS:** Glucosa \_\_\_\_\_ Cr \_\_\_\_\_ Acido úrico \_\_\_\_\_

**HbA1c:** \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_