



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIA
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“FRECUENCIA DE CÉLULAS NKT Y PERFIL DE CITOCINAS EN SUJETOS
PEDIÁTRICOS CON DIABETES TIPO 1 DE RECIENTE DIAGNÓSTICO”**

MODALIDAD DE GRADUACIÓN:

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ABRIL ADRIANA ARELLANO LLAMAS

TUTORA:

RITA GÓMEZ DÍAZ.

ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN: FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. JUNIO DE 2014



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.

INDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Material y métodos.....	12
Resultados.....	33
Discusión.....	44
Conclusiones.....	50
Bibliografía.....	51
Anexos.....	55

RESUMEN.

Introducción. Las células NKT (NKT) son reguladoras del sistema inmune, el número disminuido se asocia a la aparición de DT1 en ratones NOD, las observaciones en humanos son contradictorias. Las células NKT polarizan la respuesta inmune Th1, Th2 y Th17.

Hipótesis: El número de células NKT será menor y la concentración de interleucinas de respuesta Th1 mayor en sujetos con diabetes tipo 1 (DT1) de reciente diagnóstico que en sus hermanos y controles sanos. **Métodos:** Diseño observacional, transversal, analítico, prospectivo. Se incluyeron sujetos con DT1 de reciente diagnóstico (<3 meses de evolución), sus hermanos (H) y sujetos sanos (C). Se midió porcentaje de células NKT y la concentración de interleucinas (IFN γ , IL2, IL6, IL8, IL10, IL12p70, IL4, IL5, IL17, IL1 β , TNF α y TNF β). Se compararon los datos con prueba de Kruskal-Wallis, correlación de Pearson y análisis de covarianza para variables confusoras. **Resultados:** Fueron 124 sujetos (DT1 48, C 32 y H 44), no hubo diferencias antropométricas, la HbA1c fue mayor y el péptido C menor en DT1 que en los otros dos grupos y la edad de H fue mayor ($p < 0.001$). No se encontró diferencia de células NKT entre DT1 (0.176 ± 0.202) y C (0.118 ± 0.133), pero el porcentaje fue mayor en H (0.246 ± 0.188 , $p = 0.002$). Se demostraron diferencias significativas de las interleucinas IFN γ , IL-8, IL-12p70 e IL17 siendo mayores para los DT1 que los H. Se observó correlación débil entre el porcentaje de NKT e IL10 $r = 0.192$ ($p = 0.039$), IL2 $r = 0.180$ ($p = 0.054$), IL6 $r = 0.278$ ($p = 0.003$), IL1 β $r = 0.291$ ($p = 0.002$), sólo en el grupo de DT1. **Conclusión:** En pacientes con DT1 de reciente inicio es menor el porcentaje de células NKT y mayor la concentración de IFN γ , IL-8, IL-12p70 e IL17 que en hermanos.

INTRODUCCIÓN.

Epidemiología de la Diabetes tipo 1.

La Diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune contra el islote pancreático, cuya prevalencia en México es baja en comparación con otros países. En el registro de la Ciudad de México en 1989 reportó una incidencia de 0.47/100,000; en 1998 en Boca del Río Veracruz fue de 1.15/100,000^[1,2]. Diez años después, se observó aumento en la prevalencia de esta patología de acuerdo con el Registro de Atención Integral de la Salud en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)^[3]. En el continente americano se observa menor prevalencia que en Europa ^[4], fortaleciendo la evidencia que existe sobre la relación étnica con la aparición de la enfermedad.

En el IMSS se ha observado un incremento en la incidencia de la diabetes tipo 1. Se realizó un análisis desde el año 2000 y hasta 2010 a partir de los registros de la Dirección de Prestaciones Médicas, de los que se retomaron los casos incidentes de pacientes pediátricos con DT1 a nivel nacional, el incremento observado fue de 3.4 a 6.2 casos por 100,000 asegurados menores de 19 años de edad, la máxima tasa de incidencia se registró en el año 2006 (8.8 casos por 100,000 asegurados pediátricos). El aumento de la incidencia se debió principalmente a casos ubicados en el grupo etario de entre 10 a 14 años de edad, y no hubo predominio de sexo para todo el grupo, aunque para los menores de 5 años hubo mayor prevalencia en hombres^[5].

La Diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune que presenta agregación familiar^[6,7], la cual ha podido ser observada en registros nacionales europeos, en los que los casos familiares representan hasta el 10.2% de todos los casos. Además la tasa estandarizada de incidencia es de 8.23 para hijos de padres afectados, 11.9 para un hermano y de 21.88 para gemelos^[6], siendo de 32.33 para gemelos monocigóticos ^[7]. En otras palabras, los hermanos de sujetos con DT1 tienen un riesgo mucho mayor de padecer la enfermedad que la población en general.

Orígenes genéticos e inmunológicos de la Diabetes tipo 1.

La agregación familiar observada en los estudios epidemiológicos ha dado sustento a la búsqueda de causas genéticas de la DT1. El complejo mayor de histocompatibilidad ocupa un lugar único como el nexo que une la medicina clínica, la inmunología y la genética, muchas enfermedades, incluida la DT1 se ha asociado a los genes localizados en el MHC. Los genes más importantes codifican al grupo de antígenos leucocitarios (HLA), una familia de proteínas de superficie esenciales para la función inmunológica. Los genes del HLA presentan una gran variabilidad que ha dado lugar a la diversidad de la respuesta inmune y la susceptibilidad a diversas enfermedades.

Las moléculas del HLA que se asocian a la DT1 son las de clase II, responsables de la selección del timo en el repertorio de células T y participan directamente en la presentación de antígenos a las células T CD4+. La región genética del HLA clase II contiene los alelos DP, DQ y DR, que a su vez se dividen en subregiones.

Los loci DR y DQ del HLA clase II contienen alelos de riesgo para la DT1, siendo DR3, DR4-DQ8 los que aportan el mayor riesgo. Así mismo, se han reportado alelos de protección en la población caucásica (DRB1-DQB1 DRB1*1602-DQB1*0602, DRB1*07-DQB1*0303, DRB1*13-DQB1*0603,y DRB1*14-DQB1*0503)^[8]. En México, Gorodezky y colaboradores describieron que variaciones en las posiciones 57 y 74 de DRB1 contribuyen a la severidad y expresión de la DT1, y que los haplotipos DRB1*0501, DQA1*0102 y DQB1*0602 son protectores y DRB1*0405, DQA1*0301 y DQB1*0302 de riesgo ^[9].

Estrategias nuevas de investigación han puesto a disposición estudios amplios del genoma que permiten explorar a lo largo del material genético nuevos genes asociados con la enfermedad. Estos estudios han encontrado en consonancia con los estudios epidemiológicos e inmunológicos que los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (HLA) son los determinantes del riesgo hereditario con OR mayores para la DT1^[10,11] y están en relación directa con la fisiopatología autoinmune de la enfermedad. La gran diversidad de combinaciones de haplotipos del HLA, da trascendencia al estudio del fenómeno fisiopatológico de la DT1 en diferentes grupos étnicos.

La evidencia de la participación del HLA clase II en la fisiopatología ha sido también observada en el modelo murino, ya que estas moléculas participan en el complejo trimolecular que involucra a un péptido y al receptor de la célula T de células auto-reactivas que escapan del timo. Uno de los péptidos que reconocen es la molécula I-Ag-7 (una parte de la cadena B de la insulina) [12]

Aun cuando la asociación de los alelos y haplotipos del HLA es fuerte, estos loci representan menos del 50% de la contribución genética a la susceptibilidad de la enfermedad, esto se debe a que los alelos no son totalmente penetrantes, implicando que no todos quienes los heredan desarrollan la enfermedad. Esto ha empujado la investigación de la DT1 a nuevos horizontes inmunológicos y genéticos.

Los estudios ampliados del genoma además han puesto de manifiesto la asociación de otras regiones del genoma con la DT1, resaltando PTPN22, IFIH1, CTL4, IL2, IL21, BACH2, IL2RA, PPKCQ, INS, ERBB3, C12orf30, CTSH, CLEC16A, PTPN2, UBASH3A, C1QTNF6. Varios de estos loci tienen funciones relacionadas con la inmunidad (IFIH1, CTL4, IL2, IL21, IL2RA, C1QTNF6)[13]

Interacción inmunológica en la génesis de la Diabetes tipo 1.

Los fenómenos inmunológicos de la DT1 tienen evidencia histológica, la insulinitis es uno de los eventos que desencadena la destrucción de las células beta y consiste en la infiltración del páncreas por células inmunológicas efectoras de la destrucción.

La insulinitis a su vez, favorece la aparición anticuerpos contra proteínas del islote insulina/proinsulina, GAD65/67, IA-2/IA-2B, y ZnT8 [14-17]. Si bien, la existencia de éstos no se observa en todos los casos de DT1 (antiGAD65 del 60 a 80%, antiIA-2 60 a 80% y antiZnT8 en 60 a 70 % de los casos), tampoco todos los casos que presentan auto-anticuerpos desarrollan la enfermedad. La existencia de los auto anticuerpos tienen relación fuerte con el haplotipo DR4-DQ8[18]. El proceso destructivo de las células beta mediado por los anticuerpos es variable, pudiendo tardar décadas, o ser de rápida instalación[19].

La infiltración de macrófagos, linfocitos T productores de interferón gamma (respuesta inmunológica efectora, o Th1) son parte del proceso de lesión pancreática, y la sintonización de la acción de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ como efectores del proceso es un fenómeno descrito, sin embargo, los fenómenos iniciales que desencadenan la modulación de la respuesta inmune no se conocen del todo, podría tener participación el inmune innato [20].

Los esfuerzos por entender todo el proceso patológico generaron la descripción de un paradigma inmunológico-clínico del curso de la DT1 propuesto por Eisenbarth y sus colaboradores, dividiendo el fenómeno en estadios. El estadio I incluye a los sujetos con susceptibilidad genética, el estadio II involucra a aquellos expuestos a disparadores ambientales (ablactación temprana, uso temprano de leche de vaca o cereales, sitio de residencia, infecciones)[21]. El estadio III se incluye a los sujetos que desarrollan anticuerpos contra los antígenos de la célula beta. El estadio IV, se caracteriza por anomalías metabólicas sutiles, y es en el V que se rebasa el horizonte clínico y se observan síntomas de hipoglucemia, finalmente y en relación con la pérdida funcional absoluta de las células beta, el estadio VI está caracterizado por dependencia a la insulina[12].

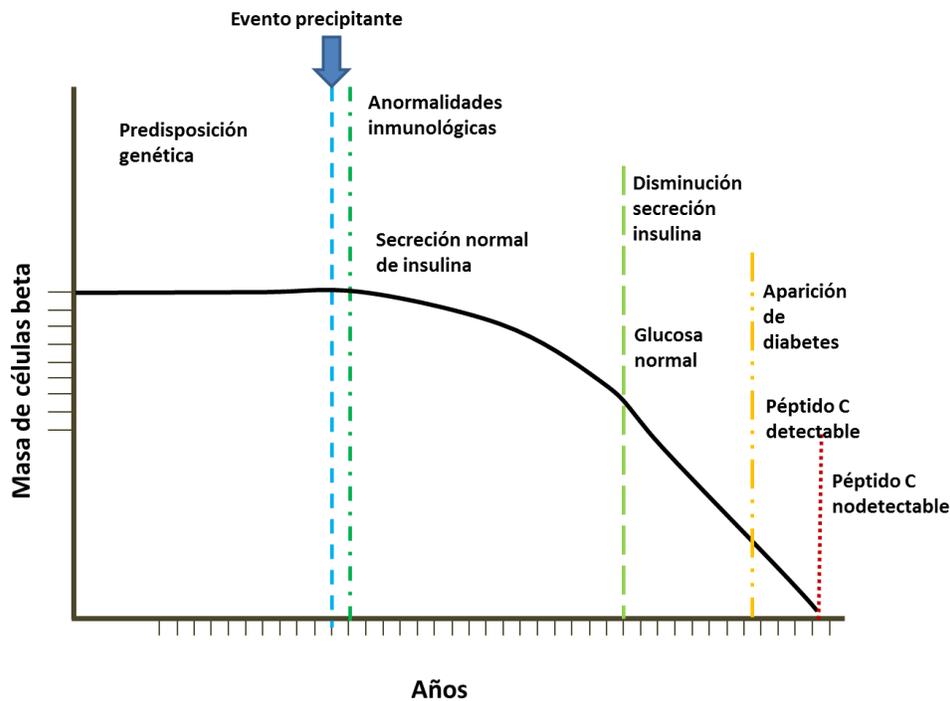


Figura 1. Paradigma inmunológico-clínico de la génesis de la Diabetes tipo 1.

La interacción del sistema inmune innato y adaptativo es definitiva en la génesis de la enfermedad. Las respuestas del sistema inmune son complejas y han evolucionado para proteger a los organismos multicelulares de sus agresores, la presión evolutiva ha especializado las funciones efectoras que también pueden dañar el tejido del organismo. El sistema inmune especializado en dos brazos, uno innato capaz de montar respuestas no específicas en forma rápida, y el adaptativo, capaz de promover respuestas más duraderas y específicas. La evolución ha dado lugar a células especializadas para llevar a cabo estas funciones. Existen algunas células que tienen capacidades mixtas, es decir del sistema innato y del adaptativo. Este grupo celular puede ser clave en entender la fisiopatología de varias enfermedades autoinmunes incluida la diabetes tipo 1. Comparten funciones y marcadores de superficie celular de ambos brazos del sistema, además su permanencia evolutiva entre las especies las convierte en un eslabón importante en la regulación homeostática del sistema inmune.

Papel de las células NKT en la fisiopatología de la Diabetes tipo 1.

Las células NKT pertenecen a un grupo celular heterogéneo que puede ser CD4⁺, o CD4⁻CD8⁻ (doble negativas) o bien CD8⁺; y expresan un re-arreglo de su receptor (TCR) que expresa V α 24-J α 18 y una cadena β que contiene V β -11^[22].

Las células NKT fueron descritas en 1987 en el ratón y en 1993-1994 en el humano, el receptor de células T (TCR) no interactúa con el complejo mayor de histocompatibilidad como los TCR de otras células T, en lugar de ello, reconoce glucolípidos que son presentados por CD1d, una molécula presentadora de antígeno no clásica. La rápida respuesta de las células NKT a sus antígenos es característica de la respuesta inmune innata y permite la polarización de citocinas que regula a la inmunidad adaptativa^[23].

La conservación evolutiva del TCR se evidencia cuando las células murinas NKT son capaces de reconocer del ligando humano CD1d más antígeno glucolípido y visceversa^[24]. Este receptor distingue a las células NKT de las células NK aun cuando comparten el marcador CD161 (NK1.1 en ratón). Su número absoluto carece de sentido, pues la población de linfocitos NKT varía de acuerdo al número absoluto de linfocitos, por lo que su medición se realiza como la proporción de linfocitos totales.

La proteína CD1d se expresa en diversos tejidos incluyendo el páncreas. La activación del receptor puede generar citocinas de respuesta Th1 (interferón gamma e interleucina 12) o Th2 (IL-4), dependiendo del ligando activador ^[25-27]; es decir, esta célula es capaz de auto-polarizar su respuesta hacia una acción reguladora o efectora, a su vez, es capaz de polarizar también la respuesta inmune sistémica^[28]. La familia de proteínas CD1 son miembro de glucoproteínas que presentan antígenos de base lipídica a las células T. El sitio de unión de antígeno de estas moléculas contiene sitios hidrofóbicos para la unión de antígenos lipídicos. La familia se clasifica según su capacidad de anclaje de antígenos en CD1a, CD1b y CD1c, la distribución de CD1d tiene una secuencia divergente de CD1a, b, y c, y su distribución es más extendida. La capacidad de presentar antígenos por CD1d está restringida a las células NKT con su TCR,

dentro de los antígenos que presenta existen varios que son antígenos como gangliosidos y algunos fosfolípidos.

Las funciones de las células NKT son ambivalentes pues protegen contra agentes patógenos, pero también limitan la destrucción, por lo que resguardan la homeostasis inmunológica. Las células NKT no sólo responden a auto antígenos presentados por CD1d, sino a una diversidad de éstos antígenos, como una evidencia de conservar su capacidad de responder en forma cruzada a diversos estímulos. La capacidad de las células NKT de no requerir un reconocimiento previo del antígeno es parte de su característica de inmunidad innata, además son capaces de montar respuestas adaptativas reconociendo antígenos extraños y propios. La reactividad antigénica de las células NKT incluye cardiolipina, esfingomielina, plasminogeno, fosfatidiletanolamina, mCII₇₀₇₋₇₀₂, etc. Las células NKT además expresan otras moléculas de superficie como CD25, PD1, ICOS, CD40-L, estas moléculas interactúan en la co-señalización para determinar el modo en que la célula responderá finalmente al estímulo^[29].

La célula NKT tienen una función determinante en la atenuación del insulto inmunológico independientemente de su origen. La lesión tisular derivada de la respuesta del sistema inmune desencadena la presentación masiva de antígenos nativos y moléculas co-estimuladoras, que en conjunto son señal para la activación de las células NKT. Según la combinación de estímulos presentados a la célula NKT, será la respuesta de la célula que puede dar lugar a continuar la respuesta inmune o establecer vías de regulación autoinmune. En el ámbito clínico se ha podido observar que en diversas enfermedades autoinmunes se han observado alteraciones numéricas de las células NKT que pueden ser parte de la interacción entre los tipos de respuesta inmune^[30]

Uno de los modelos biológicos para estudiar la diabetes tipo 1 es el ratón diabético no obeso (NOD), que desarrollan en forma espontánea diabetes por fenómeno de autoinmunidad, con parecido clínico e inmunológico con la DT1 del humano. Este modelo ha permitido observar que están alterados tanto el número como la función de las células NKT al compararse con ratones silvestres, y como parte de la evidencia funcional, la transferencia de poblaciones enriquecidas de células NKT a los ratones NOD, modifica la aparición y severidad de la enfermedad^[31-34].

Las células NKT del ratón NOD además producen menor cantidad de IL-4 al ser estimuladas, y sólo la sobre-estimulación de las células es capaz de aumentar la producción de esta interleucina y de prevenir la diabetes^[35], es decir, la inducción de la respuesta Th2 protegió contra el desarrollo de la enfermedad. Otro estudio además observó que la estimulación de las células NKT aumentó el número de células dendríticas mieloides en los ganglios linfáticos pancreáticos y la transferencia de estas células a ratones NOD previno la diabetes^[36]

Los estudios descriptivos en humanos han arrojado información contradictoria con observaciones de menor número de células NKT en enfermos que en sanos, números iguales o incluso, un número mayor de estas células que en sanos.^[37-40], quizá debido a variación en la metodología de selección de pacientes, y el estadio fisiopatológico en el que se incluyeron. Kukreja incluyó sujetos de reciente diagnóstico y observó un menor número de células NKT en sujetos con DT1 que en controles sanos, y también menor número de estas células en parientes de primer grado con características de riesgo que en los controles^[37]

La expresión de la respuesta Th1 promueve la DT1 en humanos y ratones, si bien la activación de esta respuesta por sí misma no es suficiente para determinar la DT1^[41,42], por otro lado, también se ha observado cantidades elevadas de IL-17 en ratones diabéticos y que la neutralización de esta vía inhibe la progresión de la enfermedad^[43-46], por lo que la respuesta Th-17 está implicada en el desarrollo de la enfermedad aunque no es un determinante absoluto de su aparición^[47].

Es reconocido que las células NKT son capaces de secretar IL-17, además de interleucinas de respuesta Th1 y Th2. La IL-17 juega un papel en el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos. Son las células T CD4 que se especializan en secretar IL-17 (llamadas células TH-17). Estas células T CD4 se diferencian en la periferia por la presencia de TGF- β , IL-6 e IL-1 β , las cuales se producen por células innatas. Se cree que las células NKT que secretan IL-17 pertenecen a un linaje distinto que se desarrolla en el timo, y son más inmaduras que las que producen IFN- γ e IL-4 ^[48]

Considerando que la DT1 es un continuo de procesos inmunológicos y ambientales, y que cada estadio de la enfermedad tendrá un comportamiento

biológico diferente, el objetivo de esta investigación fue describir en la población mexicana pediátrica con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico (menor o igual a tres meses), si existen diferencias en la cantidad de células NKT respecto dos grupos de comparación, uno de ellos sus hermanos (sujetos de riesgo) y otro, un grupo no emparentado similar en edad y género. Además otro objetivo fue relacionar la cantidad de células NKT con la expresión plasmática de moléculas de respuesta Th-1, Th2 y Th17.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, transversal, analítico y prospectivo, en el que se compararon tres grupos de sujetos: pacientes con diagnóstico reciente (tres meses) de diabetes tipo I, hermanos de los pacientes con DT1 (considerado un grupo de mayor riesgo para padecer diabetes tipo 1) y sujetos sanos similares en edad y género con los sujetos con DT1.

El muestreo para los sujetos con DT1 y sus hermanos inició en 2012, fue de casos consecutivos de la consulta externa de los servicios de Endocrinología Pediátrica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” .

El muestreo de los controles, se realizó en forma voluntaria y de casos consecutivos de los hijos de trabajadores de la “Unidad de Alta Especialidad Centro Médico Nacional Siglo XXI” que se incluyeron al aceptar su participación a través de una convocatoria impresa que se colocó en las áreas de investigación y enseñanza.

Los criterios de inclusión para los sujetos con DT1, fueron: diagnóstico de DT1 según los criterios de la ADA^[49], haber iniciado con la sintomatología aguda (polidipsia, polifagia, pérdida de peso, poliuria, cetoacidosis) y/o haber sido diagnosticados en un lapso no mayor de tres meses, estar en un rango de edad de más de dos años y menos de 17 años, y que en el momento de inclusión no tuvieran ningún tipo de infección clínicamente evidente. Se excluyeron sujetos con otros tipos de diabetes (tipo 2, MODY, neonatal, secundaria) y que tuviesen diagnóstico de otra patología autoinmune (Addison, hipotiroidismo, enfermedad celíaca, lupus y artritis reumatoide)

Se incluyeron a los hermanos de los sujetos con DT1 que cumplieron con no tener alguna infección aguda al momento de la inclusión en el estudio y que estuvieran exentos de padecer DT1 al momento de la inclusión.

Finalmente, el grupo de sujetos sanos carecía de diagnóstico clínico de enfermedades autoinmunes (interrogatorio y exploración física), fueron seleccionados de edad similar (+/-6 meses) y género que los sujetos con DT1 incluidos, sin antecedentes heredofamiliares ni personales de DT1 u otras enfermedades autoinmunes (hipo o hipertiroidismo, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome nefrótico, síndrome de Cushing, enfermedad celíaca), y que al momento de la inclusión no tuvieran ningún tipo de infección clínicamente evidente.

Se tomó como variable independiente el padecer DT1, y como dependiente el número relativo de células NKT, y la concentración de las interleucina 4, 10, 12, 17 e interferón gamma, interleucina 2, 6, 8, 1 β , 5, TNF α , y TNF β . Se describió la muestra por edad, sexo, peso, talla, índice de masa corporal, presión arterial, antecedente personal de diabetes, peso al nacer, lactancia materna, hemoglobina glucosilada, insulina, péptido C, anticuerpos contra epítropes de la célula beta (GAD65, AI-1 e insulina), haplotipo HLA clase II protectores y de riesgo, y tiempo de duración de la DT1. El antecedente de DT1, peso al nacer, antecedente de lactancia al seno materno sólo se obtuvo de los sujetos con DT1 y los controles.

La realización de esta investigación fue aprobada en el 2010 por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número de registro 2010-785-045. La toma de muestra y la obtención de datos clínico-patológicos se realizaron previo consentimiento informado.

Operacionalización de las variables.

1. Diabetes mellitus tipo 1

Definición conceptual: Subtipo de la diabetes caracterizada por deficiencia de insulina, manifestada por inicio de hiperglucemia, progresión a cetoacidosis diabética y muerte a menos de que se trate con insulina, puede ocurrir a cualquier edad y es más frecuente en la niñez y adolescencia. [49]

Definición operacional: Diagnóstico de diabetes tipo 1: De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes^[49], se realiza en base a manifestaciones clínicas (poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable, que puede o no debutar con cetoacidosis) y bioquímicamente (la determinación de glucemia plasmática de ayuno ≥ 126 mg/dl que debe confirmarse repitiendo el examen en un día diferente) o una glucemia plasmática en cualquier momento del día ≥ 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 de medición: Nominal Si/no

2. Número relativo de células NKT

Definición Conceptual: Las células NKT es una subpoblación de linfocitos que expresan el receptor para el antígeno de linfocitos T ($TCR\alpha\beta$) así como el marcador común de las células NK (NKRP1A CD161) en el humano.^[37]

Definición operacional: Se obtendrá el número relativo de células NKT, al relacionar el número absoluto que se cuantifique de células NKT obtenido del marcaje de linfocitos de sangre periférica con los marcadores CD3+ $V\alpha 24$ Y $V\beta 11$ en relación al total de linfocitos medidos por biometría hemática de sangre periférica, ambos medidos en la misma muestra por lo que se medirá en porcentaje

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: Porcentaje.

3. **Concentración de interleucinas de respuesta Th1 (IFN gamma)**

Definición Conceptual: El interferón gamma es un péptido producido por linfocitos T CD4+ estimulados, su actividad es inmunorreguladora y es marcador de la respuesta Th1^[50]

Definición operacional: Concentración sérica de IFN gamma medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

4. **Concentración de interleucinas de respuesta Th1 (IL-12p70)**

Definición Conceptual: Citocina heterodimérica de 70 kDa, producida principalmente por células dendríticas, estimula la respuesta Th1 de células T CD4+^[50].

Definición operacional: Concentración sérica de IL12 medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

5. **Concentración de interleucinas de respuesta Th2 (IL-4)**

Definición Conceptual: Citocina soluble producida por linfocitos T CD4+ activados induce la expresión de genes de MHC clase II, receptores del complemento en linfocitos B, y es marcador de respuesta Th2^[50]

Definición operacional: Concentración sérica de IL4 medida por citometría de flujo

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

6. Concentración de interleucinas de respuesta Th2 (IL-10)

Definición Conceptual: Citocina producida por varios tipos celulares incluidos los linfocitos T es inmunorreguladora y controla procesos de inflamación. Se combina en un homodimero para generar la forma activa^[50]

Definición operacional: Concentración sérica de IL10 medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

7. Concentración de interleucinas de respuesta Th17 (IL-17)

Definición Conceptual: Citocina proinflamatoria producida por linfocitos T CD4+ marca la respuesta inmune Th17 ^[50]

Definición operacional: Concentración sérica de IL17 medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

8. Concentración de interleucinas IL-2

Definición Conceptual: Citocina monomérica producida por células T CD4 y CD8, presentadoras de antígeno, NK y NKT, promueve la proliferación de células T y B efectoras^[50].

Definición operacional: Concentración sérica de IL-2 medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

9. Concentración de interleucinas IL-6

Definición Conceptual: Citocina homodimérica producida por células endoteliales, fibroblastos, monocitos y macrófagos. Favorece la síntesis hepática de reactantes de fase aguda, tráfico de leucocitos, activación de células T, diferenciación de célula B para producción de IgG, IgM e IgA^[50]

Definición operacional: Concentración sérica de IL6 medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

10. Concentración de interleucinas IL-8

Definición Conceptual: Citocina homodimérica producida por monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos, células endoteliales, fibroblastos, hepatocitos. Función quimioatrayente de neutrófilos, células NK, células T, basófilos, movilización de células hematopoyéticas, y angiogénesis^[50]

Definición operacional: Concentración sérica de IL8 medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

11. Concentración de interleucinas de respuesta Th-2 (IL-5)

Definición Conceptual: Citocina dimérica de respuesta Th2, se produce también por basófilos, eosinofilos, mastocitos, células NK, NKT. Promueve la diferenciación y función de células mieloides, aumenta la actividad quimioatrayente y capacidad adhesiva de eosinofilos^[50].

Definición operacional: Concentración sérica de IL5 medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

12. Concentración de interleucinas de respuesta Th (IL-1 β)

Definición Conceptual: Citocina heterodimérica producida por macrófagos, monocitos, linfocitos, microglia, neutrófilos. Induce proteínas proinflamatorias, hematopoyesis y la diferenciación de células TH17^[50]

Definición operacional: Concentración sérica de IL1 β medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

13. Concentración de interleucinas de respuesta Th (TNF- α)

Definición Conceptual: Interleucina producida principalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, responsable de choque séptico, además es secretado por células T y B, estimula la producción de IL-8

Definición operacional: Concentración sérica de TNF- α medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

14. Concentración de interleucinas de respuesta Th (TNF- β)

Definición Conceptual: También conocida como linfotoxina, es producida por linfocitos T, produce funciones similares a TNF α .

Definición operacional: Concentración sérica de TNF- β medida por citometría de flujo.

Tipo de Variable: Cuantitativa

Escala: Continua.

Unidad de Medición: mU/L.

15. Tiempo de diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1

Definición conceptual. Tiempo transcurrido desde el primer síntoma de diabetes detectado por los padres, y la inclusión al estudio

Definición operacional. Tiempo transcurrido desde el primer síntoma de diabetes detectado por los padres y la inclusión al estudio

Tipo de variable. Cualitativa

Escala. Ordinal

Unidades: no ha iniciado, menos de una semana, más de una semana y menos que un mes, más que un mes, y hasta dos meses, más de dos meses y hasta tres meses

16. Edad.

Definición conceptual: Transcurso de tiempo que ha vivido una persona^[51]

Definición operacional: Transcurso de tiempo medido en años que ha vivido el sujeto de interés para la investigación, desde su nacimiento hasta el momento de su inclusión al estudio.

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala de medición: Continua

Unidad de medida: años

17. Sexo

Definición conceptual: Condición orgánica, masculina o femenina, que está determinado por el fenotipo de los órganos sexuales^[51]

Definición operacional: Condición definida por el fenotipo de los órganos sexuales que reporten los padres de los participantes.

Tipo de variable: Cualitativa

Escala de medición: Dicotómica nominal

Unidad de medida: Masculino femenino

18. Peso

Definición conceptual: Medida de la masa corporal^[52]

Definición operacional: Será la lectura en kilogramos con tres decimales que se obtenga de la báscula estandarizada según la técnica descrita posteriormente

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala de medición: Continua

Unidad de medida: kilogramos

19. Talla

Definición conceptual: Medida del eje mayor el cuerpo^[52]

Definición operacional: Lectura en cm que se obtenga al comparar al sujeto con el estadiómetro, se leerá en metros con dos decimales. La técnica de medición se describe más adelante

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala de medición: Continua

Unidad de medida: metros

20. Índice de masa corporal

Definición conceptual: Relación que se obtiene cuando al peso corporal se divide entre la estatura elevada al cuadrado (kg/m^2)^[52].

Definición operacional: Será el resultado de dividir el peso en kilogramos sobre la talla en metros elevada al cuadrado y compararlo según la centila de las tablas de normalidad de CDC

Tipo de variable: Cuantitativa.

Escala de medición: Percentil

21. Presión arterial

Definición conceptual: La fuerza hidrostática de la sangre sobre las paredes arteriales, que resulta de la función de bombeo del corazón, volumen sanguíneo, resistencia de las arterias al flujo, y diámetro del lecho arterial ^[53].

Definición operacional: Medición a través de esfigmomanómetro de mercurio de la presión arterial, se marcará la sistólica al primer ruido de Korotkoff como

sistólica y el último como diastólico^[53] y comparación con tablas de normalidad de la Task Force^[54]

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala de medición: Percentil

22. Antecedente familiar de diabetes

Definición conceptual: Existencia en la historia familiar de algún familiar relacionado directamente con diagnóstico de diabetes tipo 1

Definición operacional: Por interrogatorio a los padres se le investigará en el momento de la consulta si tiene hay algún antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 1 en tres generaciones (abuelos, padres y hermanos)

Tipo de variable: Cualitativa

Escala: politómica

Unidad de medición: Si madre/Si padre/Si abuelo materno/Si abuelo paterno/Si abuela materna/Si abuela paterna/Si hermano/ No

23. Peso al nacer

Definición conceptual: Medida de la masa corporal obtenida de un sujeto en el momento de su nacimiento^[52]

Definición operacional: Se obtendrá por interrogatorio directo al incluir a cada sujeto al estudio.

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala: Continua

Unidad de medición: Kg

24. Antecedente de lactancia al seno materno

Definición conceptual: Historia personal de haberse expuesto al consumo por vía oral de leche materna durante los primeros meses de vida

Definición operacional: Por interrogatorio en el momento de incluirse en el estudio, preguntar si el sujeto de interés recibió leche materna en los primeros meses de vida

Tipo de variable: Cualitativa

Escala: Dicotómica.

Unidad de medición: Si/ No

25. Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)

Definición conceptual: Componente menor de la hemoglobina de eritrocitos humanos que incluye las fracciones A1a, A1b y A1c, con la característica de tener motivos de azúcar unidos covalentemente a la cadena beta de la hemoglobina. En la clínica se utiliza la fracción A1c como prueba diagnóstico en individuos en riesgo y en sujetos con diabetes para conocer el control que realiza éste sobre la enfermedad a largo plazo y para establecer diagnóstico de DM.

Definición operacional: Medición por técnica inmuno turbidimétrica con técnica certificada por NGSP a partir de 3 mL de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA y se procesan las muestras con el Aparato Modular PE de Roche.

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala: Continua

Unidad de medición: Porcentaje

26. Insulina

Definición conceptual: Hormona polipeptídica producida por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Mantiene la Concentración de glucosa en nuestra sangre. Se secreta en respuesta al nivel de glucosa. Su función es favorecer la absorción celular de la glucosa^[55].

Definición operacional: Las muestras de sangre tomadas se determinaron por medio de un Kit comercial de RIA para Insulina humana.

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala: Continua

Unidad de medición: mUI/mL

27. Péptido C

Definición conceptual: Subproducto que se crea cuando se produce la 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.^[49]

Definición operacional: Las muestras de sangre tomadas se determinaron por medio de un Kit comercial de RIA para Péptido C humano

Tipo de variable: Cuantitativa

Escala: Continua

Unidad de medición: pg/mL.

28. Anticuerpos contra epítopes de la célula beta (GAD65)

Definición conceptual: Anticuerpo dirigido contra la glutamato descarboxilasa que es una proteína que cataliza la descarboxilación del ácido glutámico, y se encuentra en el páncreas

Definición operacional: Presencia o ausencia del anticuerpo medido por técnica de ELISA tipo “sándwich”

Tipo de variable: Cualitativa

Escala: Nominal

Unidad de medición: Positivo / negativo

29. Anticuerpos contra epítopes de la célula beta (AI-1)

Definición conceptual: Anticuerpo dirigido contra la I fosfatasa de tirosina de islote tipo 2 que es una proteína específica del islote pancreático

Definición operacional: Presencia o ausencia del anticuerpo medido por técnica de ELISA tipo “sándwich”

Tipo de variable: Cualitativa

Escala: Nominal

Unidad de medición: Positivo / negativo

30. Anticuerpos contra epítopes de la célula beta (Insulina)

Definición conceptual: Anticuerpo dirigido contra la insulina

Definición operacional: Presencia o ausencia del anticuerpo medido por técnica de ELISA tipo “sándwich”

Tipo de variable: Cualitativa

Escala: Nominal

Unidad de medición: Positivo / negativo

31. Haplotipo del HLA clase II protectores

Definición conceptual: Conjunto de genes implicados en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario^[9], de acuerdo al reporte de Gorodezky y colaboradores los haplotipos DRB1*0501, DQA1*0102 y DQB1*0602 son protectores y DRB1*0405, DQA1*0301 y DQB1*0302 de riesgo ^[9]

Definición operacional: Se tipificará los alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) (moléculas clase II), en búsqueda del descrito para la población mexicana, haplotipo de protección (DRB1*0501-DQA1*0102-DQB1*0602) en los 3 grupos de estudio, generándose una variable dicotómica como presencia de uno o más alelos protectores, o ausencia

Tipo de variable: Cualitativa

Escala: Nominal (dicotómica)

Unidad de Medición: Protección (negativo)/Protección (positivo)

32. Haplotipo del HLA clase II de riesgo

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 II), en búsqueda del descrito para la población mexicana, haplotipo de riesgo (DRB1*0405, DQA1*0301, DQB1*0302) en los 3 grupos de estudio generándose una variable dicotómica como presencia de uno o más alelos protectores, o ausencia ^[9]

Tipo de variable: Cualitativa

Escala: Nominal (dicotómica)

Unidad de Medición: Haplotipo de riesgo si /Haplotipo de riesgo no

MÉTODOS.

Interrogatorio y exploración de los sujetos.

En un consultorio se citó a cada uno de los sujetos (casos) y sus familias completas, se explicó la naturaleza del estudio, se dio a leer la carta de consentimiento informado y de aceptar la participación se realizó un interrogatorio para obtener así los siguientes datos

1. Antecedente de diabetes en miembros de tres generaciones de inicio antes de los 25 años de edad
2. Edad
3. Sexo
4. Antecedente familiar de diabetes tipo 1
5. Peso al nacer
6. Antecedente de lactancia al seno materno

Posteriormente se realizó antropometría y medición de la presión arterial, por personal estandarizado de acuerdo al siguiente método^[56]

1. Peso
 - a. Se taró la báscula de la marca Seca, se dejó al paciente en ropa ligera, se colocó al paciente en bipedestación, se tomó entonces la lectura de la báscula en kilogramos y tres decimales
2. Talla
 - a. Se retiraron peinados o elementos decorativos de la cabeza o cabello, se colocó al sujeto en bipedestación, se corroboró que

estuvieran junto al estadímetro la cabeza, espalda, glúteos, pantorrillas y talones, los pies se colocaron juntos y planos, de ser necesario, el encargado de la medición corrigió la postura de las rodillas, se mantuvo la cabeza en el plano de Frankfurt a través de colocar la mano izquierda de quien tome la medición en la barbilla, se colocó el cartabón móvil sobre el cráneo sin presionar y se leyó en paralelo a la regla la talla del paciente

3. Índice de masa corporal
 - a. Se calculó al dividir el peso en kilogramos sobre el cuadrado de la talla en metros
4. Presión arterial^[53]

1. Aspectos generales:
 - a. La medición se efectuó después de por lo menos, cinco minutos en reposo.
 - b. El paciente se abstuvo de fumar, tomar café, productos cafeinados y refrescos de cola, por lo menos 30 minutos antes de la medición (ayuno de 8 horas).
2. Posición del paciente:
 - a. La P.A. se registró en posición de sentado con un buen soporte para la espalda, y con el brazo descubierto y flexionado a la altura del corazón.
3. Equipo y características:
 - a. Se utilizó un esfigmomanómetro mercurial calibrado.
 - b. El ancho del brazalete debió cubrir alrededor del 40% de la longitud del brazo y la cámara de aire del interior del brazalete tuvo una longitud que permita abarcar por lo menos 80% de la circunferencia del mismo.
4. Técnica:
 - a. El observador se situó de modo que su vista quedase a nivel del menisco de la columna de mercurio.
 - b. Se aseguró que el menisco coincida con el cero de la escala, antes de empezar a inflar.
 - c. Se colocó el brazalete, situando el manguito sobre la arteria humeral y colocando el borde inferior del mismo 2 cm por encima del pliegue del codo.
 - d. Mientras se palpaba la arteria humeral, se insufló rápidamente el manguito hasta que el pulso desapareció, a fin de determinar por palpación el nivel de la presión sistólica.
 - e. Se desinfló nuevamente el manguito y se colocó la cápsula del estetoscopio sobre la arteria humeral.
 - f. Se infló rápidamente el manguito hasta 30 o 40 mm de Hg por arriba del nivel palpatorio de la presión sistólica y se desinfló a una velocidad de aproximadamente 2 mm de Hg/seg.
 - g. La aparición del primer ruido de Korotkoff marcó el nivel de la presión sistólica y, el quinto, la presión diastólica.

Para la medición del resto de las variables se obtuvieron 12mL de sangre, que se conservaron de la siguiente manera 5mL en tubo heparinizado, 4 mL en dos tubo con EDTA 2mL en cada uno, 3 mL en tubo seco.

Medición de células NKT

Obtención de células mononucleares

Para la obtención de células mononucleares, necesarias para la citometría de flujo, se realizó la separación en un lapso de 2 horas para lograr aislar la mayor cantidad de células NKT.

En breve, de la muestra en tubo heparinizado, se diluyen en una relación 1:1 con solución buffer fosfato salino (PBS), posteriormente se agregará en tubos de 15 cm³ con Ficoll Hypaque en una relación 1:2 de muestra sanguínea/Ficoll. Se centrifugaron 30 min a 1600 rpm a temperatura ambiente. De las células mononucleares recuperadas de la interfase se realizó la fenotipificación de las poblaciones mediante citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-CD3, anti-V α 24, anti-V β 11.

Citometría de flujo.

Previo a la tinción con los anticuerpos específicos, las células mononucleares se incubaron con gammaglobulina humana en una relación de 30 mcg por cada 1 x 10⁶ células durante 20 min a 4 °C, posteriormente se distribuyeron con una cantidad de 2 x 10⁶ células en cada tubo para citometría. Se emplearan los anticuerpos anti-human-CD3 (BD Biosciences) y anti-V α 24 y anti-V β 11 (Beckman Coulter). Los anticuerpos se incubaron durante 30 min a 4 °C, y posteriormente el exceso de anticuerpo se eliminó lavando con PBS y centrifugando por 5 min a 1500 rpm a 4 °C.

Los números absolutos de la población NKT se calcularon utilizando el número de leucocitos y el porcentaje de linfocitos reportados en la citometría hemática tomada el mismo día que se realizará la citometría de flujo. Para el cálculo mencionado se utilizará la siguiente fórmula:

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

El citómetro de flujo se calibró semanalmente en el laboratorio de Biomedicina del Centro de Investigación y Estudios Avanzados CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional, los filtros de lectura tienen mantenimiento mensual.

Medición de interleucinas y anticuerpos

Se congelaron las muestras de suero a -70 grados hasta su análisis en lote. Se llevaron todas las muestras a temperatura ambiente. Se realizó la medición de las citocinas con el kit de medición múltiple “Bender MedSystems Human Th1/Th2 11plex FlowCytomix Multiplex Kit” de acuerdo con las especificaciones del proveedor. En breve, para distinguir las poblaciones de perlas que reaccionan con las citocinas, cada perla se distinguió por su tinción con uno de dos diferentes fluorocromos, y por el tamaño de la perla, primero el lector diferencia el tamaño de la perla y en segundo lugar el fluorocromo. Anticuerpos monoclonales específicos a cada citocina se conjugan en la superficie de cada perla, al unirse la citocina al anticuerpo, se añade un anticuerpo secundario y los fluorocromos de detección se conjugan permitiendo la detección de la citocina. Para obtener la lectura de concentración, se lleva a cabo una curva estándar a partir de cinco lecturas. El análisis se realizó en el programa FCAP para obtener la curva de recuperación de fluorescencia, el punto de corte se obtuvo al realizar una regresión lineal ajustada por la curva estándar, la cual se consideró adecuada con una R de 98%. Se incluyeron para el análisis las lecturas de las interleucinas de interés interferón gamma, IL12p70, IL4, IL10, IL17.

Medición de hemoglobina glucosilada.

Se midió a partir de las muestras tomadas con tubo con EDTA el mismo día de la extracción de la muestra a través del inmunoensayo turbidimétrico realizado con el kit comercial, en resumen se hemoliza la muestra con bromuro de tetradeciltrimetilamonio permitiendo la liberación de la hemoglobina y posteriormente la medición de la HbA1c y la de Hb en dos reacciones por separado. La primera reacción la HbA1c reacción con el anticuerpo específico anti-HbA1c formando complejos solubles, y dado que sólo posee un epítopo por

b globina, no se pueden formar redes de inmunocomplejos, se añade polihapteno que se une al exceso de anticuerpo de la primera reacción generando inmunocomplejos insolubles que se miden por turbidimetría a 340nm. Posteriormente se mide la Hb por espectrofotometría. El método que se utilizó es el del kit comercial de Roche HBA1C II Tina-quant, el cual está aceptado por la NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) como método adecuado para la medición de hemoglobina glucosilada. En la técnica se utiliza un control conocido de hemoglobina glucosilada para establecer la correcta realización de la técnica.

Medición de haplotipo HLA clase II protectores y de riesgo

Para la tipificación del HLA se realizó la extracción del DNA como se describe a continuación.

La extracción del DNA de sujetos se efectuó por la microtécnica de *salting-out*. Para esta técnica se utilizó de cada paciente 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA. En un tubo eppendorf de 2ml se colocó 1 ml de sangre total con 0.7 ml de TTS (Tris 10mM pH 7.4, Triton X-100 al 1%, Sacarosa 300mM), se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min y se decantó. Los 4 ml de sangre periférica restantes se guardaron a -70°C . El botón se resuspendió en 1ml de TTS y se centrifugó a las mismas condiciones anteriores. En total se realizaron 4 lavados. En el último lavado el botón se re-suspendió en 600 μl de NaCl 5mM, 30 μl de SDS al 10% y 200 μl de NaCl saturado. Se lisó el botón y centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se colocó en otro tubo eppendorf y se adicionó 1ml de SEVAG (Cloroformo-Alcohol Isoamílico 49:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. La fase superior se transfirió a otro tubo y se adicionó a éste 1 volumen de etanol absoluto, se mezcló suavemente y se guardó 30 min a -20°C . Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, decantó y adicionó 2 volúmenes de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se decantó. El botón de DNA se dejó secar y se resuspendió en 100 μl de agua bi-distilada. Por último el DNA se guardó a -70°C . La Concentración y calidad del DNA obtenido se evaluó mediante cuantificación espectrofotométrica. Las

muestras se llevaron a una concentración de 200 ng/μl y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Condiciones de PCR en la tipificación HLA-clase II

En la amplificación de HLA-DR se utilizó iniciadores específicos para cada loci marcados con biotina que amplificó el exon 2. La reacción de PCR se realizó a partir de 50 ng de DNA, 0.2 mM dNTPs y 16mM (NH₄)SO₄ de buffer PCR en volumen de 25 μl. La concentración de los iniciadores, MgCl₂ y Taq polimerasa variaron de acuerdo al locus que se amplificaron. Las condiciones de la amplificación fueron: 95°C/4 min; 33 ciclos de 95°C/30 seg, 65°C/50 seg y 72°C/30 seg.

Determinación de los alelos HLA-clase II por SSOP.

Los alelos HLA se determinaron con la técnica de SSOP en reversa con kits comerciales (One Lambda, USA). Después de realizar la PCR con iniciadores específicos marcados con biotina para cada locus que se desea estudiar, el producto de PCR se desnaturalizó y se hibridó con sondas específicas de cada alelo, estas sondas se encuentran unidas a microesferas. Si la hibridación fue específica, al adicionar la ficoeritrina se emitió fluorescencia que se detectó por el equipo LABScan™ 200 (One Lambda, USA), que utiliza el principio de Luminex xMAP. En HLA se analizarán cada locus en forma individual.

TAMAÑO DE MUESTRA

Se calculó un tamaño de muestra para diferencia de medias de número relativo de linfocitos NKT circulantes basados en la información de Kurkeja (0.38+/-0.02% entre sujetos con DT1 y sus hermanos y de 0.74+/-0.06% entre DT1 y controles emparejados), con poder de 80%, requiriéndose 29 sujetos en cada grupo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis preliminar en búsqueda de valores implausibles, improbables, datos ausentes, con el fin de depurar la base de datos.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis descriptivo de los datos aplicando a las variables cuantitativas la prueba de Shapiro Wilk para conocer la normalidad de las variables. De encontrar una distribución normal de los datos se realizó prueba de ANOVA y post-hoc de Bonferroni. De no haber una distribución normal, se usó a prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Con respecto a las concentraciones de cada una de las interleucinas que marcan la respuesta Th 1, Th2, y Th17, se llevó a cabo el mismo ejercicio de búsqueda de normalidad en los resultados para elegir entre ANOVA o Kruskal Wallis.

Finalmente, para buscar si existió correlación entre el número de células NKT y la concentración de cada una de las interleucinas de interés, se realizó la prueba de correlación de Pearson y regresión lineal.

Para todas las pruebas consideraremos significativo una $p < 0.05$

El paquete estadístico que se empleó para el análisis fue SPSS versión 16.0

RESULTADOS

Se analizaron los datos de 124 sujetos, distribuidos en tres grupos, 48 sujetos con DT1 (casos), el tiempo de evolución de la enfermedad fue de 44.92 ± 26.07 (0-95) días; 32 controles sanos, y 44 hermanos de sujetos con DT1 (hermanos). La distribución por sexo fue igual entre los grupos (hombres, 43.9% controles, 47.9% en los casos, y 43.2% en los hermanos, $p=0.365$), no hubo diferencia en las características antropométricas entre los grupos. El 6.3% (3/48) de los pacientes tienen antecedente heredofamiliar de diabetes tipo 1. Con respecto al peso al nacer no hubo diferencias entre casos [3162 ± 478 kg (2200-4070)] y controles [3241 ± 457 kg (2350-4050)] ($p=0.572$) y tampoco para el antecedente de la lactancia al seno materno (9.13 ± 7.89 (0-36) vs 8.58 (0-24)($p=0.811$) respectivamente.

La hemoglobina glucosilada fue mayor en los casos (7.71%) que en controles y hermanos (5.35% y 5.20% respectivamente $p=0.0001$), el péptido C fue menor (0.89, 2.01 y 1.64 en casos, controles y hermanos respectivamente, $p=0.00001$), y la presencia del anticuerpo GAD65 fue más frecuente en los casos que en los otros dos grupos (37.5%, 6.3% y 2.3% de casos, controles y hermanos, $p=0.0001$), del anticuerpo IA2 también fue más frecuente en los casos (35.4%, 3.1% y 11.4% en casos, controles y hermanos respectivamente, $p=0.0001$). La medición de la existencia de anticuerpo antiinsulina no fue posible en todo el grupo y aunque fue más frecuente en el grupo de los casos, no se observó diferencia estadística entre los grupos (43.8%, 40.6% y 34.1% en casos, controles y hermanos, $p=0.631$), finalmente, también hubo mayor frecuencia Ac positivos en los casos que en el resto de los grupos (37.5%, 0% y 4.5% en casos, controles y hermanos). Además la frecuencia de HLA de protección fue mayor en hermanos que en casos, aunque no hubo diferencia significativa estadísticamente .Tabla 1.

Tabla 1. Características antropométricas, clínicas, genéticas e inmunológicas				
VARIABLE	Pacientes con DT1	Controles Sanos	Hermanos de pacientes con DT1	Valor de p
n	48	32	44	
Edad (años)	9.30 ±3.85 (2-16)	9.56 ±4.72 (2-16)	13.61±6.78 (3-27)	<0.001 ‡
Sexo (M)	23 (47.9%)	14 (43.8%)	19 (43.2%)	0.365◇
Peso (sz)	0.106 ±1.04 (-3 -2.25)	0.11±1.05 (-1.88–2.21)	0.36 ±0.84 (-1.61-1.88)	0.343¥
Talla (sz)	-0.0030±1.09 (-2.44-3.93)	0.38±1.5 (-2.17 – 3.70)	0.032 ±1.31 (-3.23-4.18)	0.332¥
IMC (sz)	0.208±1.10 (-3-1.64)	-0.93±1.27 (-3 – 2)	0.31±1 (-2.97-1.81)	0.311¥
TAS (sz)	-1.36 ±0.63 (-2.65-0.60)	-1.32 ±1 (-4.18-1.64)	-1.23 ±0.66 (-3.06-0.08)	0.741¥
TAD (sz)	-0.16±0.63(-1.19-1.19)	-0.011±0.77 (-1.44–1.64)	0.10 ±0.500 (-0.91-1.27)	0.204¥
HbA1c (%)	7.65 ± 1.95 (4.1-13.3)	5.35±0.3898 (4.5-6.1)	5.20±0.88 (3.8-9.2)	<0.001 ‡
Insulina ng/mL	22.78 ±21 (5-112.6)	16.24±20.43 (2-107)	13.3±5.97 (5-29)	0.045‡
Péptido C ng/mL	0.89±0.781(0-3)	2.01±9.23 (0-50)	1.64±0.793 (0-4)	<0.001 ‡
GAD65 (casos +)	18/46 (37.5%)	2/31 (6.3%)	1/43 (2.3%)	<0.001 ◇
IA2 (casos +)	17/44(35.4%)	1/31 (3.1%)	5/38 (11.4%)	0.005◇
Anti-insulina (casos +)	21/27 (43.8%)	13/24 (40.6%)	15/29 (34.1%)	0.631◇
Dos o más anticuerpos	18/47 (37.5%)	0/32 (0%)	2/44 (4.5%)	<0.001 ◇
HLA II protector	9/46(19.6)	4/31(12.9)	14/44(31.8)	0.130
HLA II de riesgo	38/46(82.6)	26/31(83.9)	37/44(84.1)	0.980
%NKT	0.176±0.202 (0.029-0.917)	0.118 ±0.133 (0.018-0.616)	0.246 ±0.188 (0.010-0.830)	0.002‡
AHF: Antecedentes heredofamiliares. M: Masculino. sz: valor z de las tablas de la CDC. TAS: Tensión arterial sistólica. TAD: Tensión arterial diastólica. +: positivos. ¥:ANOVA. † :T de Student. ‡: Kruskal Wallis. ◇: Chi cuadrada				

El porcentaje de células NKT fue diferente entre los grupos, siendo menor en los controles que en los casos y los hermanos (0.165%, 0.118% y 0.246% en casos, controles y hermanos, $p=0.002$). Hubo diferencia en la concentración de diferentes citocinas como IFN gamma (134.19 vs 276.48 vs 46.05), IL8, IL12p70, e IL17. (Tabla 1 y gráfica 1)

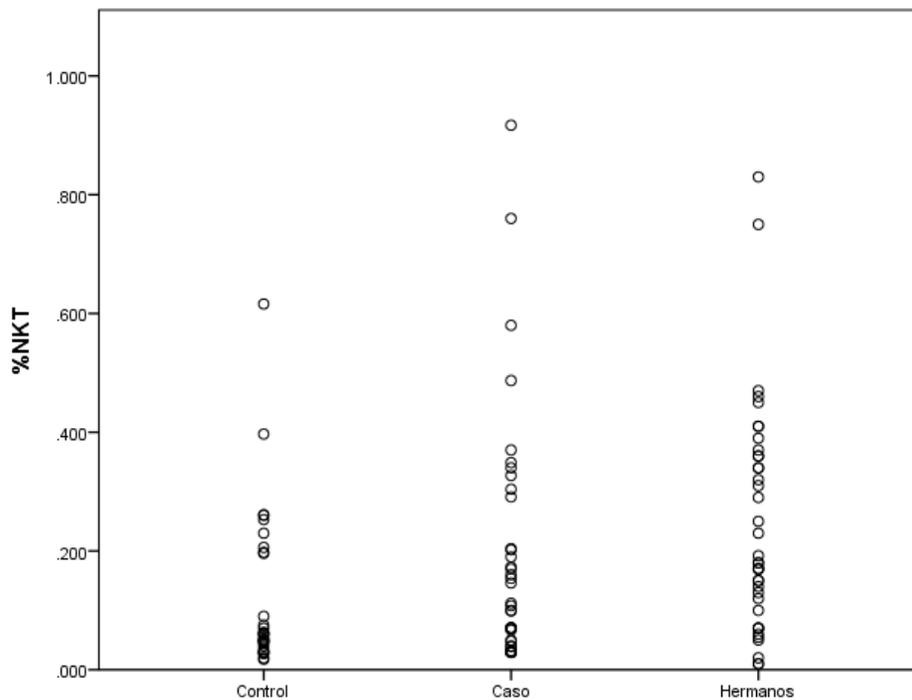


Gráfico 1. Porcentaje de células NKT en plasma en controles, casos y hermanos de casos.

El perfil de citocinas de los sujetos estudiados se describe en la tabla 1a, en ésta se puede observar que existió diferencia significativa entre los grupos para IFN gamma, IL8, IL12p70, IL17.

Tabla 1a. Descripción del perfil de citocinas de los sujetos estudiados				
VARIABLE	Pacientes con DT1	Controles	Hermanos	p
n	48	32	44	
IFN γ pg/mL	134.19 \pm 247.35 (0-1173.70)	276.48 \pm 693.65 (0-3228.12)	46.05 \pm 104.10 (0-505.93)	0.001‡
IL2 pg/mL	117.45 \pm 315.04 (0-1821.08)	132.29 \pm 296.90 (0-1396.70)	63.86 \pm 120.50 (0-601.002)	0.148‡
IL6 pg/mL	39.14 \pm 172.48 (0-1078.49)	3.15 \pm 11.01 (0-59.07)	14.44 \pm 46.57 (0-275.92)	0.478‡
IL8 pg/mL	138.09 \pm 245.39 (0-1247.78)	182.94 \pm 507.86 (0-2842.56)	45.45 \pm 81.63 (0-382.88)	0.016‡
IL10 pg/mL	91.47 \pm 267.49 (0-1634.63)	96.51 \pm 214.43 (0-1062.10)	49.25 \pm 74.04 (0-376.29)	0.415‡
IL12p70 pg/mL	140.20 \pm 382.89 (0-2483.82)	191.004 \pm 393.02 (0-1904.30)	43.57 \pm 147.98 (0-964.52)	<0.001‡
IL 4 pg/mL	141.61 \pm 262.16 (0-1173.78)	246.53 \pm 538.16 (0-2136.26)	60.58 \pm 99.76 (0-608.08)	0.645‡
IL5 pg/mL	76.80 \pm 202.07 (0-1216.82)	129.94 \pm 466.63 (0-2641.35)	61.06 \pm 97.07 (0-609.93)	0.243‡
IL 17 pg/mL	16.48 \pm 38.99 (0-252.97)	22.98 \pm 49.39 (0-252.97)	8.97 \pm 19.93 (0-108.83)	0.040‡
IL1 β pg/mL	117.93 \pm 371.16 (0-2509.84)	76.00 \pm 154.75 (0-864.17)	72.82 \pm 78.23 (0-420.22)	0.150‡
TNF α pg/mL	125.35 \pm 540.43 (0-3712.39)	100.96 \pm 232.85 (0-1057.71)	33.45 \pm 104.70 (0-642.49)	0.949‡
TNF β pg/mL	64.47 \pm 346.21 (0-2274.89)	203.71 \pm 863.51 (0-4523.33)	60.92 \pm 227.49 (0-1334.36)	0.871‡
‡ U Mann Whitney				

Se efectuó la comparación de las características generales por separado de los pacientes con DT1 vs controles, y de pacientes con DT1 con sus hermanos, y también de la concentración de citocinas. Tablas 2, 2a, 3 y 3a

Tabla 2. Características antropométricas, clínicas, genéticas e inmunológicas de pacientes y controles sanos.

VARIABLE	Pacientes con DT1	Controles	p
n	47	32	
Edad (años)	9.30 ±3.85 (2-16)	9.56 ±4.72 (2-16)	0.215‡
Sexo (M)	23 (47.9%)	14 (43.8%)	0.714◇
Peso (sz)	0.106 ±1.04 (-3 -2.25)	0.11±1.05 (-1.88 – 2.21)	0.969†
Talla (sz)	-0.0030±1.09 (-2.44-3.93)	0.38±1.5 (-2.17 – 3.70)	0.193†
IMC (sz)	0.208±1.10 (-3-1.64)	-0.93±1.27 (-3 – 2)	0.275†
TAS (sz)	-1.36 ±0.63 (-2.65-0.60)	-1.32 ±1 (-4.18-1.64)	0.896‡
TAD (sz)	-0.16±0.63 (-1.19-1.19)	-0.011±0.77 (-1.44 – 1.64)	0.364‡
AHF DT1	3/43 (6.3%)	1/26(3.1%)	0.074◇
Peso al nacer (g)	3162±478 (2200-4070)	3241 ±457 (2350-4050)	0.572†
Lactancia (m)	9.13 ±7.89 (0-36)	8.58 (0-24)	0.811†
HbA1c (%)	7.65 ± 1.95 (4.1-13.3)	5.35±0.3898 (4.5-6.1)	<0.001‡
Insulina	22.78 ±21 (5-112.6)	16.24±20.43 (2-107)	0.071‡
Péptido C ng/mL	0.89±0.781(0-3)	2.01±9.23 (0-50)	0.001‡
GAD65 (casos +)	18/46 (37.5%)	2/31 (6.3%)	0.002◇
IA2 (casos +)	17/44(35.4%)	1/31 (3.1%)	<0.001◇
Anti-insulina (casos +)	21/27 (43.8%)	13/24 (40.6%)	0.781◇
Dos o más anticuerpos	18/47 (37.5%)	0/32 (0%)	0.005◇
HLA clase II protector	9/46 (19.5%)	4/31 (12.9%)	0.444◇
HLa clase II de riesgo	38/46	26/31	0.885◇
%NKT	0.176±0.202(0.029-0.917)	0.118 ±0.133 (0.018-0.616)	0.250

AHF: Antecedentes heredofamiliares. M: Masculino. sz: valor z de las tablas de la CDC. TAS: Tensión arterial sistólica. TAD: Tensión arterial diastólica. +: positivos. † :T de Student. ‡: U Mann Whitney. ◇: Chi cuadrada

Tabla 2a. Descripción del perfil de citocinas de casos y controles			
VARIABLE	Pacientes con DT1	Controles	p
n	47	32	
IFN γ pg/mL	134.19 \pm 247.35 (0-1173.70)	276.48 \pm 693.65 (0-3228.12)	0.494‡
IL2 pg/mL	117.45 \pm 315.04 (0-1821.08)	132.29 \pm 296.90 (0-1396.70)	0.819‡
IL6 pg/mL	39.14 \pm 172.48 (0-1078.49)	3.15 \pm 11.01 (0-59.07)	0.848‡
IL8 pg/mL	138.09 \pm 245.39 (0-1247.78)	182.94 \pm 507.86 (0-2842.56)	0.819‡
IL10 pg/mL	91.47 \pm 267.49 (0-1634.63)	96.51 \pm 214.43 (0-1062.10)	0.819‡
IL12p70 pg/mL	140.20 \pm 382.89 (0-2483.82)	191.004 \pm 393.02 (0-1904.30)	0.819‡
IL 4 pg/mL	141.61 \pm 262.16 (0-1173.78)	246.53 \pm 538.16 (0-2136.26)	0.819‡
IL5 pg/mL	76.80 \pm 202.07 (0-1216.82)	129.94 \pm 466.63 (0-2641.35)	0.964‡
IL 17 pg/mL	16.48 \pm 38.99 (0-252.97)	22.98 \pm 49.39 (0-252.97)	0.819‡
IL1 β pg/mL	117.93 \pm 371.16 (0-2509.84)	76.00 \pm 154.75 (0-864.17)	0.819‡
TNF α pg/mL	125.35 \pm 540.43 (0-3712.39)	100.96 \pm 232.85 (0-1057.71)	0.963‡
TNF β pg/mL	64.47 \pm 346.21 (0-2274.89)	203.71 \pm 863.51 (0-4523.33)	0.637‡
‡ U Mann Whitney			

Tabla 3. Características antropométricas, clínicas, genéticas e inmunológicas de casos y hermanos.

Variable	Pacientes con dt1	Hermanos	p
n	48	44	
Edad (años)	9.30 ±3.85 (2-16)	13.61±6.78 (3-27)	<0.001‡
Sexo (M)	23 (47.9%)	19 (43.2%)	0.799◇
Peso (sz)	0.106 ±1.04 (-3 - 2.25)	0.36 ±0.84 (-1.61- 1.88)	0.249†
Talla (sz)	-0.0030±1.09 (- 2.44-3.93)	0.032 ±1.31 (-3.23- 4.18)	0.911†
IMC (sz)	0.208±1.10 (-3- 1.64)	0.31±1 (-2.97-1.81)	0.646†
TAS (sz)	-1.36 ±0.63 (-2.65- 0.60)	-1.23 ±0.66 (-3.06- 0.08)	0.979‡
TAD (sz)	-0.16±0.63 (-1.19-1.19)	0.10 ±0.500 (-0.91-1.27)	0.054‡
HbA1c (%)	7.65 ± 1.95 (4.1- 13.3)	5.20±0.88 (3.8-9.2)	<0.001‡
Insulina	22.78 ±21 (5- 112.6)	13.3±5.97 (5-29)	0.030‡
Péptido C ng/mL	0.89±0.781(0-3)	1.64±0.793 (0-4)	<0.001‡
GAD65 (casos +)	18/46 (37.5%)	1/43 (2.3%)	<0.001‡
IA2 (casos +)	17/44(35.4%)	5/38 (11.4%)	0.009‡
Anti-insulina (casos +)	21/27 (43.8%)	15/29 (34.1%)	0.049‡
Dos o más anticuerpos	18/47 (37.5%)	2/44 (4.5%)	0.001◇
HLA clase II protector	9/46 (19.56%)	14/44 (31.8)	0.183
HLA clase II de riesgo	38/46 (82.6%)	37/44 (84.09%)	0.850
%NKT	0.176±0.202 (0.029-0.917)	0.246 ±0.188 (0.010-0.830)	0.019‡
<p>AHF: Antecedentes hereditarios. M: Masculino. sz: valor z de las tablas de la CDC. TAS: Tensión arterial sistólica. TAD: Tensión arterial diastólica. +: positivos. † :T de Student. ‡: U Mann Whitney. ◇: Chi cuadrada</p>			

Tabla 3 a. Descripción del perfil de citocinas de casos y hermanos			
VARIABLE	Pacientes con DT1	Hermanos	p
n	48	44	
IFN γ (pg/mL)	134.19 \pm 247.35 (0-1173.70)	46.05 \pm 104.10 (0-505.93)	0.022‡
IL2 (pg/mL)	117.45 \pm 315.04 (0-1821.08)	63.86 \pm 120.50 (0-601.002)	0.835‡
IL6 (pg/mL)	39.14 \pm 172.48 (0-1078.49)	14.44 \pm 46.57 (0-275.92)	0.639‡
IL8 (pg/mL)	138.09 \pm 245.39 (0-1247.78)	45.45 \pm 81.63 (0-382.88)	0.006‡
IL10 (pg/mL)	91.47 \pm 267.49 (0-1634.63)	49.25 \pm 74.04 (0-376.29)	0.531‡
IL12p70 (pg/mL)	140.20 \pm 382.89 (0-2483.82)	43.57 \pm 147.98 (0-964.52)	0.022‡
IL 4 (pg/mL)	141.61 \pm 262.16 (0-1173.78)	60.58 \pm 99.76 (0-608.08)	0.835‡
IL5 (pg/mL)	76.80 \pm 202.07 (0-1216.82)	61.06 \pm 97.07 (0-609.93)	0.305‡
IL 17 (pg/mL)	16.48 \pm 38.99 (0-252.97)	8.97 \pm 19.93 (0-108.83)	0.144‡
IL1 β (pg/mL)	117.93 \pm 371.16 (0-2509.84)	72.82 \pm 78.23 (0-420.22)	0.007‡
TNF α (pg/mL)	125.35 \pm 540.43 (0-3712.39)	33.45 \pm 104.70 (0-642.49)	0.543‡
TNF β (pg/mL)	64.47 \pm 346.21 (0-2274.89)	60.92 \pm 227.49 (0-1334.36)	0.905‡
‡ U Mann Whitney			

Se observó correlación débil, pero estadísticamente significativa en el grupo de casos entre el porcentaje de células NKT y la concentración de las siguientes citocinas IL12p70 ($r=0.307$, $p=0.001$), IL10 ($r=0.411$, $p=0.005$), IL17 ($r=0.420$, $p=0.004$). IL2 ($r=0.470$, $p=0.001$), IL16 ($r=0.449$, $p=0.002$), IL1B ($r=0.494$,

p=0.001), IL5 (r=0.405, p=0.006) y TNF α (r=0.529, p=0.0001), que no se observó en el grupo de controles, ni hermanos. Tabla 4.

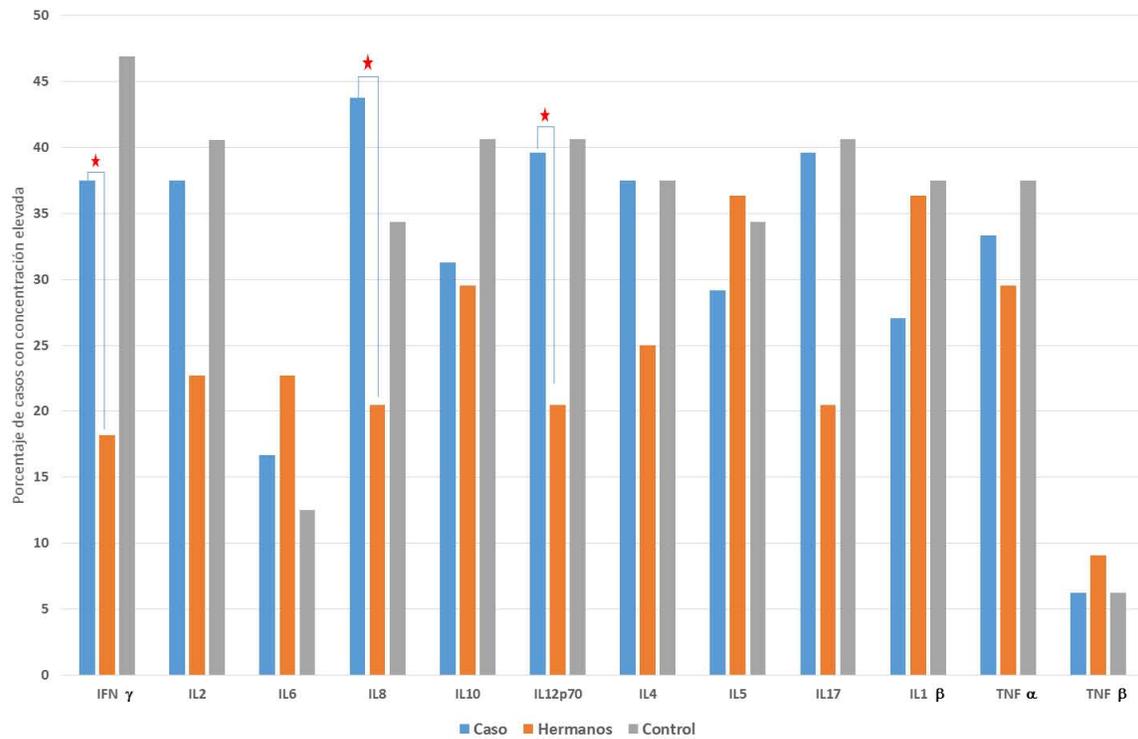
Tabla 4. Coeficiente de correlación de porcentaje de células NKT e interleucinas			
Correlación del % NKT	Pacientes DT1	CONTROLES	HERMANOS
	r(p)	r(p)	r(p)
IFN γ (pg/mL)	0.178 (0.242)	0.031 (0.869)	-0.165 (0.317)
IL12p70 (pg/mL)	0.460 (<0.001)	-0.178 (0.339)	-0.113 (0.494)
IL 4 (pg/mL)	0.307 (0.041)	-0.047 (0.803)	-0.150 (0.363)
IL 10 (pg/mL)	0.411 (0.005)	-0.030 (0.874)	0.055(0.741)
IL 17 (pg/mL)	0.420 (0.004)	-0.159 (0.394)	-0.111 (0.503)
IL2 (pg/mL)	0.470 (<0.001)	-0.027 (0.887)	-0.29 (0.860)
IL6 (pg/mL)	0.449 (0.002)	0.009 (0.961)	-0.71 (0.668)
IL8 (pg/mL)	-0.195 (0.199)	-0.105 (0.576)	0.032 (0.849)
IL10 (pg/mL)	0.411 (0.005)	-0.030 (0.874)	0.055 (0.741)
IL1 β (pg/mL)	0.494 (<0.001)	-0.117 (530)	0.104 (0.529)
IL5 (pg/mL)	0.405 (0.006)	0.139 (0.455)	0.040 (0.808)
TNF α (pg/mL)	0.529 (<0.001)	-202 (0.275)	0.064 (0.697)
TNF β (pg/mL)	-0.113 (0.461)	0.108 (0.562)	-0.117 (0.479)
Se utilizó coeficiente de Pearson			

Al categorizar la concentración de citocinas en concentración elevada (mayor del percentil 66) y baja (menor del percentil 66), se observó diferencias en la concentración de las siguientes citocinas: IFN gamma, IL12p70 y IL17.

Tabla 5. Frecuencia de sujetos con una concentración alta de citocinas (> percentil 66) en los tres grupos .

	Pacientes con DT1 n=48	Casos n=32	Hermanos n=44	p
IFN γ (pg/mL)	15 (46.9%)	18 (37.5%)	8 (18.2%)	0.007
IL2 (pg/mL)	13 (40.6)	18(37.5%)	10 (22.7%)	0.088
IL6 (pg/mL)	4 (12.5%)	8 (16.7%)	10 (22.7%)	0.273
IL8 (pg/mL)	11 (34.4%)	21 (43.8%)	9 (20.5%)	0.144
IL10 (pg/mL)	13 (40.6%)	15 (31.3%)	13 (29.5%)	0.332
IL12p70 (pg/mL)	13 (40%)	19 (39.6%)	9 (20.5%)	0.051
IL17 (pg/mL)	13 (40.6%)	19 (39.6%)	9 (20.5%)	0.051
IL1 β (pg/mL)	12 (37.5%)	13 (27.1%)	16 (36.4%)	0.994
IL4 (pg/mL)	12 (37.5%)	18 (37.5%)	11 (25%)	0.224
IL5 (pg/mL)	11 (34.4%)	14 (29.4%)	16 (36.4%)	0.801
TNF α (pg/mL)	12 (37.5%)	16 (33.3%)	16 (29.5%)	0.468
TNF β (pg/mL)	2 (6.3%)	3 (6.3%)	4 (9.1%)	0.616
Se utilizó prueba de chi cuadrada				

Frecuencia de sujetos con una concentración elevada de citocinas
(Concentración mayor del percentil 66)



DISCUSIÓN.

El fenómeno inmunológico que desencadena la diabetes tipo 1 es complejo, y si bien se ha reconocido hasta ahora como el mayor determinante de riesgo genético al complejo mayor de histocompatibilidad, éste elemento del sistema inmune no explica por sí mismo el desencadenamiento de la enfermedad.

Recientemente la interacción del sistema inmune innato y el adaptativo se han vuelto un foco importante en la investigación de las enfermedades autoinmunes, y aunque las observaciones de que en el modelo murino NOD para la DT1, la menor cantidad y función alterada de las células NKT han explicado parte del fenómeno inicial que desencadena la diabetes, las observaciones en humanos siguen arrojando datos contradictorios.

La selección de sujetos en estadios tempranos de la enfermedad, parece ser uno de los momentos más parecidos inmunológicamente, al momento del inicio de la cascada inmunológica pues aún queda tejido pancreático susceptible de ser atacado, y por otro lado, la población mayormente susceptible al desarrollo de la enfermedad son los hermanos de sujetos con DT1, por lo que la observación del comportamiento inmunológico de éstos es trascendente.

En este análisis encontramos que la cantidad de células NKT fue diferente entre los grupos de interés, y llama la atención que haya sido mayor en el grupo de los hermanos con DT1 que en el resto de los grupos. Contrario a lo reportado por Kukreja^[37], nosotros no encontramos diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de células NKT entre los pacientes y los controles sanos. Llama la atención la diferencia en la lectura del porcentaje total de células NKT observado entre Kukreja^[37] (En DT1 $0.38\% \pm 0.02\%$ y sanos de $0.74 \pm 0.06\%$) y nosotros ($0.0165 \pm 0.0199\%$ en DT1 y 0.118 ± 0.133 en los controles sanos). Las cifras

reportadas por este grupo no han podido reproducirse en otro estudio, y hasta ahora, es el que ha observado un comportamiento numérico similar del humano con el ratón NOD.

Los resultados que se observaron son más parecidos a los del Lee y sus colaboradores^[40] quienes como nosotros, encuentran una gran variabilidad de concentración de células NKT, habiendo desde lecturas mínimas, hasta muy elevadas en todos los grupos, llamando la atención que la cantidad de estas células fuese mayor en el grupo de los hermanos. Cabe mencionar que en el presente estudio, la edad de los hermanos fue mayor que ambos los casos y los controles, lo cual posiblemente influye en los resultados del porcentaje de NKT encontrado. En este sentido, resalta también la diferencia en la frecuencia de alelos HLA protectores, que fue mayor para éste grupo aunque no fue estadísticamente significativo ($p=0.183$). Finalmente, a diferencia de Oikawa³⁸, quien en una cohorte de sujetos japoneses, encuentra una diferencia contraria a la observada en el ratón NOD, pues ellos observan una mayor cantidad de células NKT en sujetos con DT1 independientemente del tiempo de evolución que en sujetos sin DT1 ($0.127\pm 0.015\%$ en DT1 vs $0.065 \pm 0.009\%$ que sujetos sanos).

Las diferencias de la lectura de células NKT en sujetos con DT1 mexicanos, americanos y asiáticos ($0.165\pm 0.199\%$, $0.030\pm 0.04\%$ y $0.127\pm 0.015\%$) pueden estar influidas por factores como la técnica de medición de las células (en nuestro caso y el caso japonés con selección con triple anticuerpo y en el de Lee con selección con tetrámero de CD1d y posterior tinción con triple anticuerpo),

o bien por la determinación genética de las células NKT, fenómeno que se ha considerado definitivo en el número de células NKT en el ratón NOD.

En el modelo murino se han estudiado diversos determinantes genéticos del número de células NKT. Algunos genes candidatos propuestos incluyen a CD132, que es la cadena común de las interleucinas 2, 4, 7 y 15, la mutación de CD132 provoca inmunodeficiencia severa combinada, que provoca una disminución casi total de células NKT en los tejidos periféricos, aunque conservada en el timo, debido a que las mutaciones de IL4 e IL7 no afectan el número de NKT, parece que esta deficiencia asociada a CD132 esta mediada por IL-2 o IL-15. En este sentido en este estudio sólo se pudo observar correlación entre el nivel de células NKT e IL-2 en el grupo de pacientes con DT1, una asociación que además fue débil^[57].

Esteban y colaboradores publicaron un estudio de análisis de ligamiento para encontrar elementos genéticos que controlan el número de células NKT en los ratones, encontrando dos loci asociados, el más significativo fue *Nkt1* localizado en la misma región de susceptibilidad a lupus, y genes que controlan la producción de anticuerpos antinucleares (*Sle1*, *Nba2* y *Lbw7*). Esta región es concordante con la región humana 1q23. La segunda región mejor asociada fue *Idd3*, un gen de susceptibilidad a diabetes del ratón NOD, aún no se determina si es la alteración de este gen en ratones NOD la que confiere el control del número de NKT totalmente^[58].

Existió diferencia significativa de la concentración de IFN γ , IL8, IL12p70 e IL17 entre los grupos estudiados. La concentración de interferón fue menor en sujetos con DT1 que los controles, pero mayor que los hermanos, el interferón juega un papel importante en la señalización de los procesos autoinmunes y su aumento es característica de este tipo de fenómenos. Se considera que la señalización

desencadenada por IFN gamma se da por las células T reguladoras a través de la vía de SOCS y de Foxp3+^[59]. Jörns y cols, observaron que la concentración de IFN gamma en el aspirado pancreático de sujetos con DT1 mostró concentraciones mayores que en sujetos sanos^[60]. Ante esta observación, consideramos que si bien el fenómeno microambiental pancreático tiene este patrón, quizá el patrón también se refleje en las concentraciones plasmáticas sistémicas de esta citocina, sugiriendo una polarización generalizada de la respuesta inmune y no sólo local como se observó entre sujetos con DT1 y sus hermanos.

La IL-8 y la IL-17 son parte de la respuesta inflamatoria TH17, la IL-8 también es clave en la función quimioatrayente de neutrófilos, su principal actividad es reclutar neutrófilos, células T, basófilos, sus concentraciones salivales son mayores en sujetos con DT1 que en sujetos sanos, sobre todo en condición de periodontitis^[61], en este análisis, los niveles plasmáticos fueron mayores en sujetos con DT1 que sus hermanos, pero menores que en los controles, en otros estudios, la elevación de la IL-8 se ha implicado en el fenómeno lesivo pancreático inducido por virus, fenómeno que nosotros no podemos descartar^[62].

Un estudio realizado en Taiwan que comparó el perfil de citocinas entre sujetos con diabetes tipo 1 y sus hermanos. Entre los hallazgos relevantes encontró que los niveles de IL-8 fue mayor en los sujetos con DT1 que sus hermanos, similar a lo observado en este estudio. En este sentido, la IL-8 se ha asociado a aumento del riesgo de macroangiopatía, pues es una citocina inflamatoria^[63]

En este estudio observamos una menor concentración de IL-17 en sujetos con diabetes que en controles, pero mayor que en sus hermanos. La IL-17 se produce por un linaje especializado de células CD4+ que participan en la defensa del

organismos y en desordenes autoinmunes, según el microambiente, las células Th17 pueden alterar su diferenciación, y en ratones NOD, contribuir a la aparición de la DT1, si bien su existencia no es indispensable para el desarrollo de la enfermedad. No siempre es posible observar IL-17 en los aspirados pancreáticos de sujetos con DT1, sugiriendo que las observaciones de un estado inmunológico integrado puede tener relevancia^[60].

El patrón inflamatorio de los sujetos con DT1 está alterado, la interleucina 12p70, se observa en mayor concentración que en sujetos sanos según el estudio de Rosa y colaboradores, contrario a lo observado en nuestro análisis^[64], otro grupo encuentra concentraciones similares entre los grupos⁶³.

Llama la atención que sólo pocas citocinas manifestaron diferencias significativas entre los pacientes y sus hermanos, estas observaciones son consistentes con el grupo Dannes, ellos estudiaron como nosotros un perfil amplio de citocinas, encontrando diferencias en el modelo ajustado sólo para TGF- β , con mayores concentraciones entre los diabéticos. Para el modelo no ajustado, encuentran diferencias en IL-1 β , IL12, IL10 e IL-4, con niveles mayores entre los niños más jóvenes, reforzando la evidencia de variaciones de las lecturas con la edad. En este estudio pudieron detectar variaciones significativas de la lectura de interleucina con la época del año, siendo más altas en verano para IL-1 β y TNF α , fenómeno que nuestro estudio no midió.

En cuanto a las diferencias de la lectura de citocinas entre el grupo de pacientes con diabetes tipo 1 y sus hermanos, se ha observado variabilidad generada por la edad, sobre todo cuando se utiliza como punto de corte 10 años, en nuestro estudio, la media de edad de pacientes fue de 9.3 años y los de sus hermanos de

13 años, elemento que puede contribuir a explicar la diferencias para las interleucina 12p70 y para IFN γ ^[66].

Sin embargo, esto no explica del todo los hallazgos. En consideración de la posible influencia de la edad sobre la lectura de las células NKT, realizamos una prueba de correlación entre la edad y el porcentaje de NKT, encontrando que existe una correlación significativa con $r=0.335$ y $p<0.001$ para todo el grupo. Sin embargo, al analizarlo por grupos se pierde la diferencia en el grupo de controles ($r=0.327$, $p=0.073$); ni en el grupo de DT1 ($r=0.263$, $p=0.097$); ni el de los hermanos ($r=0.276$, $p=0.089$) (datos no mostrados); por lo que existe la posibilidad de que no sea sólo la edad el elemento que influye en la diferencia de porcentaje de células NKT entre hermanos y DT1.

Es posible que los hermanos expresen un factor protector, sugerido por la presencia de haplotipos protectores de HLA, lo cual amerita seguimiento a largo plazo en la investigación de los probables mecanismos involucrados.

Las limitaciones en este estudio son: el tamaño de muestra, el hecho de que no se midieron los anticuerpos anti-insulina en todos los sujetos, y que los hermanos de los pacientes fueron mayores a los pacientes y a los controles. La diferencia en edades podría explicar las diferencias en los porcentajes de NKT y en las citocinas. El patrón de alelos protectores HLA fue más frecuente entre los hermanos, lo que pudiera ir en relación con las diferencias del patrón de citocinas observada y la concentración de células NKT.

Sin embargo, nuestros resultados demuestran un comportamiento que nos indica la importancia de los NKT y citocinas en diabetes. No puede descartarse un origen genético que determine el número de células NKT y que pudiera explicar las

diferencias entre los diversos grupos de investigación interesados en el tema. Se requiere un estudio profundo de los determinantes genéticos y ambientales sobre el porcentaje de células NKT, que pudiera estar detrás de este fenómeno inmunológico.

Conclusiones.

En pacientes con DT1 de reciente inicio es menor el porcentaje de células NKT y mayor la concentración de $IFN\gamma$, IL-8, IL-12p70 e IL17 que en hermanos.

Estos hallazgos sugieren que en las etapas tempranas de la diabetes tipo1 las diferencias en la expresión inmunológica mediada por citocinas entre estos pacientes y sus hermanos pueden deberse a factores protectores que habrá que investigar a través del seguimiento a largo plazo de los hermanos.

Bibliografía

1. Robles V, Cornejo B, Dorantes A, Gutierrez L, Magos C, Pérez Pasten E. Actualización del registro de diabetes mellitus tipo I Grupo Ciudad de México. 1989;
2. Rueda OA, Libman IM, Bustamante NA, Valdes CR, LaPorte RE. Low Incidence of IDDM in Children of Veracruz-Boca del Rio, Veracruz: Results of the first validated IDDM registry in Mexico. *Diabetes Care* 1998;21(8):1372–3.
3. CPIS. Formato de Registro de Atención Integral de la Salud, División de Epidemiología. 2008;
4. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* 1993;36(10):883–92.
5. Gómez-Díaz RA, Pérez-Pérez G, Hernández-Cuesta IT, Rodríguez-García JDC, Guerrero-López R, Aguilar-Salinas CA, Wachter NH. Incidence of type 1 diabetes in Mexico: data from an institutional register 2000-2010. *Diabetes Care* 2012;35(11):e77.
6. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Familial association between type 1 diabetes and other autoimmune and related diseases. *Diabetologia* 2009;52(9):1820–8.
7. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, Stengård J, Kesäniemi Y. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 1992;35(11):1060–7.
8. Lambert AP, Gillespie KM, Thomson G, Cordell HJ, Todd JA, Gale EAM, Bingley PJ. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(8):4037–43.
9. Gorodesky 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):395–408.
10. Baisch JM, Weeks T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra JD. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990;322(26):1836–41.
11. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj, JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, Moonsamy P. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 2008;57(4):1084–92.
12. Eisenbarth GS. Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. *Diabetes* 2010;59(4):759–74.
13. Grant SFA, Hakonarson H. Genome-wide association studies in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2009;9(2):157–63.
14. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vähäsalo P, Karjalainen J, Löppönen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest* 1998;101(2):327–36.
15. LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, Rowe RE, Monks S, Palmer JP, Nepom GT, McCulloch DK, Hagopian WA. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes Care* 2002;25(3):505–11.
16. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, Eisenbarth GS, Rewers M. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(8):3896–902.
17. Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, Winkler C, Pflüger M, Illig T, Bonifacio E, Ziegler AG. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* 2009;52(9):1881–8.
18. Ziegler AG, Standl E, Albert E, Mehnert H. HLA-associated insulin autoantibody formation in newly diagnosed type I diabetic patients. *Diabetes* 1991;40(9):1146–9.
19. Bonifacio E, Ziegler AG. Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(3):513–25.
20. Zhang Y, Bandala-Sanchez E, Harrison LC. Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19(4):271–8.
21. Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* 2010;10(7):501–13.

22. 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):1–16.
23. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000;21(11):573–83.
24. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, Kronenberg M. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 1998;188(8):1521–8.
25. Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, Taniguchi T, Taniguchi M, Bendelac A, Van Kaer L, Koezuka Y, Tsuji M. alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(15):8461–6.
26. Yang G, Schmiege J, Tsuji M, Franck RW. The C-glycoside analogue of the immunostimulant alpha-galactosylceramide (KRN7000): synthesis and striking enhancement of activity. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004;43(29):3818–22.
27. Brutkiewicz RR. CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly. *J Immunol Baltim Md* 1950 2006;177(2):769–75.
28. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):557–68.
29. Issazadeh-Navikas S. NKT cell self-reactivity: evolutionary master key of immune homeostasis? *J Mol Cell Biol* 2012;4(2):70–8.
30. Van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM. Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol* 2001;100(2):144–8.
31. 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):1047–56.
32. Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998;188(10):1831–9.
33. Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E, Sarvetnick N. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1999;190(7):963–72.
34. Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, Silveira P, Shepherd D, Naidenko OV, Godfrey DI, Baxter AG. Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int Immunol* 2001;13(7):887–96.
35. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001;7(9):1052–6.
36. Naumov YN, Bahjat KS, Gausling R, Abraham R, Exley MA, Koezuka Y, Balk SB, Strominger JL, Clare-Salzer M, Wilson SB. Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13838–43.
37. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109(1):131–40.
38. Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998;391(6663):177–81.
39. Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, Motohashi Y, Nakagawa Y, Irie J-I, Maruyama T, Saruta T. High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(10):1818–23.
40. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 2002;110(6):793–800.
41. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995;268(5214):1185–8.
42. Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 1994;43(5):613–21.

43. Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang Y-H, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009;39(1):216–24.
44. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2009;183(7):4432–9.
45. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee H-H, Yu P, Ellis J, Hoeman CM, Franklin CL, Zaghouani, H. Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med* 2008;205(1):207–18.
46. Emamullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009;58(6):1302–11.
47. Joseph J, Bittner S, Kaiser FMP, Wiendl H, Kissler S. IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;188(1):216–21.
48. Monteiro M, Almeida CF, Agua-Doce A, Graca L. Induced IL-17-producing invariant NKT cells require activation in presence of TGF- β and IL-1 β . *J Immunol* 2013;190(2):805–11.
49. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes--2013. *Diabetes Care* 2012;36(Supplement_1):S11–S66.
50. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Quaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):701–721.e1–70.
51. Diccionario médico biológico, histórico y etimológico [Internet]. Available from: <http://dicciomed.eusal.es/palabra/menopausia>
52. NORMA Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño.
53. NHANES - NHANES III - Anthropometric Procedure Videos [Internet]. Available from: http://www.cdc.gov/nchs/nhanes/nhanes3/anthropometric_videos.htm
54. Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program. National High Blood Pressure Education Program Working Group on Hypertension Control in Children and Adolescents. *Pediatrics* 1996;98(4 Pt 1):649–58.
55. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc Physicians India* 2007;55 Suppl:19–25.
56. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Mei Z, Wei R, Curtin LR, Roche AF, Johnson, CL . 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 2002;(246):1–190.
57. Lantz O, Sharara LI, Tilloy F, Andersson A, DiSanto JP. Lineage relationships and differentiation of natural killer (NK) T cells: intrathymic selection and interleukin (IL)-4 production in the absence of NKR-P1 and Ly49 molecules. *J Exp Med* 1997;185(8):1395–401.
58. Esteban LM, Tsoutsman T, Jordan MA, Roach D, Poulton LD, Brooks A, Naidenko OV, Sidobre S, Godfrey DI, Baxter AG. Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J Immunol* 2003;171(6):2873–8.
59. Larkin J, Ahmed CM, Wilson TD, Johnson HM. Regulation of Interferon Gamma Signaling by Suppressors of Cytokine Signaling and Regulatory T Cells. *Front Immunol* [Internet] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3866655/>
60. Jörns A, Arndt T, Meyer zu Vilsendorf A, Klempnauer J, Wedekind D, Hedrich H-J, Marselli L, Marchetti P, Harada N, Nakaya Y. Islet infiltration, cytokine expression and beta cell death in the NOD mouse, BB rat, Komeda rat, LEW.1AR1-iddm rat and humans with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2014;57(3):512–21.
61. Dakovic D, Colic M, Cakic S, Mileusnic I, Hajdukovic Z, Stamatovic N. Salivary interleukin-8 levels in children suffering from type 1 diabetes mellitus. *J Clin Pediatr Dent* 2013;37(4):377–80.
62. Schulte BM, Lanke KHW, Piganelli JD, Kers-Rebel ED, Bottino R, Trucco M, Huijbens RJF Radstake TRDJ, Engelse MA, de Koning EJP, Galama JM, Adema GJ, van Kuppeveld FJM . Cytokine and chemokine production by human pancreatic islets upon enterovirus infection. *Diabetes* 2012;61(8):2030–6.
63. Lo H-C, Lin S-C, Wang Y-M. The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2004;37(8):666–72.

64. Rosa JS, Oliver SR, Mitsuhashi M, Flores RL, Pontello AM, Zaldivar FP, Galassetti PR. Altered kinetics of interleukin-6 and other inflammatory mediators during exercise in children with type 1 diabetes. *J Investig Med* 2008;56(4):701–13.
65. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(5):1407–14.
66. Svensson J, Eising S, Hougaard DM, Mortensen HB, Skogstrand K, Simonsen LB, Carstensen B, Nilsson A, Lernmark A, Pociot F, Johannesen J. Few differences in cytokines between patients newly diagnosed with type 1 diabetes and their healthy siblings. *Hum Immunol* 2012;73(11):1116–26.



Sociedad Mexicana de Endocrinología Pediátrica, A.C.

Otorga la presente
Constancia

de
Segundo Lugar

a
Dra. Abril Adriana Arellano LLamas

Obtenido por la presentación del trabajo libre

El porcentaje de células NKT de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 de reciente diagnóstico y de sus familiares es menor que el de los controles sanos y sus familiares. Reporte preliminar

Coadyutores

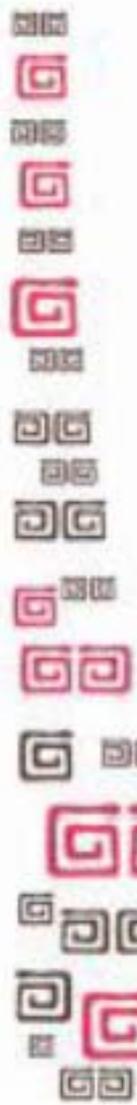
Dra. Rita A. Gómez Díaz, Biol. Mayra Vaal Aguilar, M.C. Nonentzin Beristáin Cobarrubias, Dr. Vianney Ortiz Nuvarrete, Dra. Rocío Herrera Márquez, Dra. Elisa Nishimura Meguro, Dra. Eulalia F. Garrido Magaña, Dr. Adán Valladares Salgado, M.C. Rafael Mondragón González, Dra. Carolina Bekker Méndez, Dr. Niels H. Wachter

en el marco del 14º Congreso anual,
Ixtapa, Gro., 28 al 31 de agosto del 2013

Dr. Carlos Robles Valdés
Vicepresidente

Dra. Elisa Nishimura Meguro
Presidenta

Dra. Margarita Torres Tamayo
Secretaria-Tesorera





INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

"2010 Año de la Patria. Bicentenario del Inicio de la Independencia y Centenario del Inicio de la Revolución"

02 de agosto de 2010

Ref. 09-B35-61-2800/201000-1299

Dra. Rita Angélica Gómez Díaz
Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica
UMAE Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Presente

Informo a usted que el protocolo titulado: **Frecuencia de células NKT y su expresión génica en pacientes pediátricos con diabetes tipo I**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: **2010-785-045**.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de Junio y Diciembre de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente,


Dr. Fabio Salamanca Gómez
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Dr. Carlos Freddy Cuevas García, Director de la UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- Dr. Adolfo Chávez Negrete, Director de Educación e Investigación en Salud, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI.


2010-053

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

Carretera Anticamión s/n. Cuernavaca, México 06720. 56276900 ext. 21210. comise@cis.gob.mx



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.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION DE ADULTOS EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACION

“FRECUENCIA DE CELULAS NKT Y SU EXPRESION GENICA EN SUJETOS PEDIATRICOS CON DIABETES TIPO 1”

Dra. Rita A. Gómez Díaz

México D.F. a ____ de _____ del año ____

En nuestro país la diabetes tipo 1 se ha incrementado en los últimos años. Se han reconocido marcadores que predicen la aparición de la enfermedad; ello permite identificar a la población en riesgo y tomar las medidas necesarias para retardar la presencia de diabetes tipo 1 en familiares de sujetos 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 presente la diabetes.

Usted y sus hijos han sido invitados a participar en el estudio debido a la presencia de diabetes tipo 1 de reciente inicio en uno de los integrantes de su familia.

El objetivo del estudio es conocer porcentaje de células capaces de destruir a las células productoras de insulina (llamadas células NKT) y los genes relacionados con las mismas y así poder comparar los hallazgos de sujetos con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado (papá, mamá, hermanos).

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

Beneficios: El voluntario sano, no recibirá ningún beneficio directo Los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento y brindarán información relevante para el mejor manejo de personas como con su mismo padecimiento. Además, los hallazgos en este estudio permitirán avances en el origen de la diabetes tipo 1 y su utilidad a futuro como posible marcador para la identificación temprana de los familiares de los sujetos con diabetes tipo 1 que puedan estar en riesgo de padecer dicha enfermedad.

Procedimientos: Su participación consistirá en una visita en donde se les realizará una historia clínica completa, donar y autorizar la toma de una muestra de sangre. Para poder realizarle la toma de muestra de sangre deberá presentarse en ayuno de 12 horas. Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 10-15 ml, para realizarle los estudios de laboratorio, tomarle la muestra de sangre dura aproximadamente 10 minutos. Los estudios de laboratorio que le realizaremos incluyen: la medición de su nivel de glucosa, anticuerpos (anti GAD65, anti IA2, anti-insulina, insulina, péptido C y porcentaje y células NKT). En ningún caso la cantidad de sangre obtenida será mayor de 10-15 ml para cada participante. En niños preescolares y/o con peso menor de 12 kg, la cantidad de sangre a obtener será de 1 ml/kg de peso, la medición de biometría hemática se realizará con microtubos con el fin de obtener la muestra mínima indispensable. El propósito de realizarle los estudios clínicos y de laboratorio es para saber más sobre sus condiciones generales de salud. Le entregaremos los resultados de sus estudios de laboratorio en aproximadamente 2 días. Con la muestra de sangre, aislaremos el DNA para realizar el estudio genético, el cual consiste en identificar las variaciones en la secuencia de DNA de genes, identificados en células NKT (locus Idd9; Idd6, Nkt1 y Nkt2) en las fases iniciales del proceso autoinmune. Su muestra será cuidadosamente resguardada en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica y su identidad estará protegida usando números de folios en lugar de su nombre. Quisiéramos solicitar su aprobación para realizar tanto los análisis necesarios para este estudio como conservar parte de la muestra durante 10 años con el fin de que en un futuro podamos emplear este material para probar nuevas hipótesis que pudieran surgir.

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

Por otra parte, la información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o (como su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado; así como los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad. El equipo de investigadores y su médico familiar y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos que usted así lo desee. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida.

Es nuestra responsabilidad aclararle sus dudas, mantener una vigilancia adecuada durante la realización de las pruebas y mantener la confidencialidad de los resultados. Toda persona que decida voluntariamente participar en el estudio es libre de rehusar participar al mismo cuando lo desee.

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.

Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 16:00 hrs, al teléfono: 56276900 ext 22292 y 21481 en el servicio de endocrinología de la UMAE Hospital de Pediatría y la Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica ubicada en el segundo piso del Hospital de Especialidades en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, ubicada en Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F. de lunes a viernes con las Dras. Rocio Herrera Márquez y Rita Gómez Díaz que es el investigador responsable del estudio.

Garantía de atención médica en caso necesario

En caso de presentarse una emergencia derivada del estudio, usted puede dirigirse a su clínica de adscripción y/o marcar al teléfono 56276900 ext 21481 y 22292 .

Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Declaración de consentimiento informado

Declaro que se me han informado los posibles riesgos como molestias de la venopunción, o un “moretón” y el beneficio principal consiste en saber mi composición genética de los genes relacionados con las células NKT y estado de salud actual.

El investigador principal y el equipo médico, se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento; así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán al cabo, los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Además, de informarme los resultados de la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que con ello afecte la atención médica que recibo del instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esto pudiera hacerme cambiar de opinión respecto de mi permanencia en el estudio.

Para el estudio de genes: por favor marque con una X una de las opciones que se presentan abajo (únicamente debe indicar la opción que corresponda).

No autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas

Sí autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas de este estudio y su empleo para estudios futuros.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

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 de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Firma de los testigos

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 con el participante

Firma del Testigo 1

Fecha

Dirección testigo 1

Nombre del Testigo 2

Parentesco con el participante

Firma del Testigo 2

Fecha

Dirección testigo 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN DE NIÑOS EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

México D.F. a ____ de _____ del año _____.

Por medio de la presente autorizo que mi Hijo (a): _____ participe en el protocolo de investigación titulado:

“FRECUENCIA DE CELULAS NKT Y SU EXPRESION GENICA EN SUJETOS PEDIATRICOS CON DIABETES TIPO 1”

registrado ante el Comité de la Comisión Nacional de Investigación Científica con el número:2010-785-045

El objetivo del estudio es: Comparar el porcentaje de células NKT y determinar la expresión de los genes IDD9 e IDD6 (locus Idd9; Idd6, Nkt1 y Nkt2) de células NKT aisladas de sujetos con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado (padres y hermanos) y la de sujetos de la misma edad y género y sus familiares

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Una visita en donde se me realizará una historia clínica completa, donar y autorizar la toma de una muestra de sangre. En ningún caso la cantidad de sangre obtenida será mayor de 10-15 ml para cada participante. En niños preescolares y/o con peso menor de 12 kg, la cantidad de sangre a obtener será de 1 ml/kg de peso, la medición de biometría hemática se realizará con microtubos con el fin de obtener la muestra mínima indispensable.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: las molestias de la venopunción, o un “moretón”. El investigador principal y el equipo médico, se ha comprometido a darme información oportuna a mi y a mi médico tratante, sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento; así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán al cabo, los riesgos y beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Además, de informarme los resultados de la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que con ello afecte la atención médica que recibo del instituto. El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial a través de un código alfanumérico que sólo conoce el investigador principal. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esto pudiera hacerme cambiar de opinión respecto de mi permanencia en el estudio. Para el estudio de genes: por favor marque con una X una de las opciones que se presentan abajo (únicamente debe indicar la opción que corresponda).

No autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas

Sí autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas de este estudio y su empleo para estudios futuros.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento, en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia de mi representado (a) en el mismo.

Nombre y firma de ambos padres o tutores o del representante legal

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable

En caso de emergencia y/o dudas y preguntas relacionadas con el estudio: de 8:00 a 16:00 hrs, al 56276900 ext 22292 en el servicio de endocrinología de la UMAE Hospital de Pediatría y 21481 a la Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica de lunes a viernes con las Dras. Rocio Herrera Márquez y Rita Gómez Díaz que es el investigador responsable del estudio.

1. Testigo _____

2. Testigo _____

GUIÓN DE ASENTIMIENTO PARA SUJETOS PEDIÁTRICOS – CASOS-

Hola (nombre del niño-a-), estamos invitando a niños con diabetes tipo 1 como tú a participar en un estudio para tratar de entender un poco más, cómo sucede la enfermedad aún antes de aparecer los síntomas y la necesidad de insulina.

Sería importante que participaras, pero no es obligatorio, tu participación consiste en contestar unas preguntas en conjunto con tus padres, pesarte, medirte, tomarte la presión arterial y tomar una muestra de sangre como en el laboratorio de análisis clínicos, que puede causar dolor y dejar un moretón, que son pasajeros.

¿Estás de acuerdo en participar?

GUIÓN DE ASENTIMIENTO PARA SUJETOS PEDIÁTRICOS – HERMANOS MENORES DE SUJETOS CON DT1-

Hola (nombre del niño-a-), estamos invitando a los hermanos de los niños con diabetes tipo 1 como tú a participar en un estudio para tratar de entender un poco más, cómo sucede la enfermedad aún antes de aparecer los síntomas y la necesidad de insulina.

Sería importante que participaras, pero no es obligatorio, tu participación consiste en contestar unas preguntas en conjunto con tus padres, pesarte, medirte, tomarte la presión arterial y en tomar una muestra de sangre como en el laboratorio de análisis clínicos, que puede causar dolor y dejar un moretón, que son pasajeros.

¿Estás de acuerdo en participar?

GUIÓN DE ASENTIMIENTO PARA SUJETOS PEDIÁTRICOS – CONTROLES-

Hola (nombre del niño-a-), estamos invitando niños que son sanos a participar en un estudio para tratar de entender un poco más por qué algunos niños desarrollan diabetes tipo 1 y cómo sucede la enfermedad aún antes de aparecer los síntomas y la necesidad de insulina.

Sería importante que participaras, pero no es obligatorio, tu participación consiste en contestar unas preguntas en conjunto con tus padres, pesarte, medirte, tomarte la presión arterial y en tomar una muestra de sangre como en el laboratorio de análisis clínicos, que puede causar dolor y dejar un moretón, que son pasajeros.

¿Estás de acuerdo en participar?