



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SUBDIVISIÓN DE PEDIATRÍA

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO

HOSPITAL REGIONAL "LIC. ADOLFO LÓPEZ MATEOS" DEL ISSSTE
CIUDAD DE MÉXICO

**DETECCIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS EN FAMILIARES SANOS DE PRIMER
GRADO DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 EN LA
POBLACIÓN MEXICANA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA:

DR. JORGE ECATZIN RETANA JÍMENEZ

ASESOR DE TESIS:

DRA. MARÍA CARMEN SÁNCHEZ TORRES

NÚMERO DE REGISTRO: 526.2016

CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**DETECCIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS EN FAMILIARES SANOS DE PRIMER
GRADO DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 EN LA
POBLACIÓN MEXICANA**

PRESENTA:

DR. JORGE ECATZIN RETANA JÍMENEZ

AUTORIZACIONES:

DR. DANIEL ANTONIO RODRIGUEZ ARAIZA
Coordinador de Enseñanza e Investigación.

DRA FLOR MARIA DE GUADALUPE AVIL FEMATT
Jefe de Enseñanza Médica.

DRA MARTHA EUNICE RODRIGUEZ ARELLANO
Jefe de Investigación.

CIUDAD DE MÉXICO, 2018

NÚMERO DE REGISTRO: 526.2016

**DETECCIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS EN FAMILIARES SANOS DE PRIMER
GRADO DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 EN LA
POBLACIÓN MEXICANA**

PRESENTA:

DR. JORGE ECATZIN RETANA JÍMENEZ

AUTORIZACIONES:

DRA. MARÍA CARMEN SÁNCHEZ TORRES

Asesor de Tesis.

DR. JORGE ARABI SALAS

Profesor Titular del Curso de Especialización en Pediatría

CIUDAD DE MÉXICO, 2018

NÚMERO DE REGISTRO: 526.2016

ÍNDICE

RESUMEN	5
SUMMARY	7
1. MARCO TEÓRICO	9
1.1. Introducción	9
1.2. Definición de la diabetes mellitus tipo 1.....	9
1.3. Epidemiología.....	11
1.4. Factores de riesgo.	11
1.5. Etiopatogenia.	12
1.6. Fase preclínica.....	14
1.7. Diagnóstico y valor pronóstico de los auto-anticuerpos.....	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. JUSTIFICACION	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo Principal	19
4.2. Objetivos Específicos.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Tipo de estudio.....	20
5.2. Diseño de la investigación del estudio.....	20
5.3. Muestra.....	20
5.4. Criterios de Selección (inclusión, exclusión y eliminación).....	21
5.5. Definición operativa.....	22
5.7. Cronograma.....	22
5.8. Consideraciones éticas.....	23
6. RESULTADOS	24
6.1. Características de los pacientes con DM1 y de sus familiares.....	24
6.2. Detección de auto-anticuerpos en pacientes con DM1.....	25
6.3. Concentración de auto-anticuerpos en pacientes con DM1 y familiares sanos.....	28
6.4. Detección de auto-anticuerpos en familiares de primer grado de pacientes con DM1.....	30
6.5. La prevalencia de auto-anticuerpos es mayor en los familiares del género femenino.....	32
6.6. Distribución de auto-anticuerpos por grupos de edad.....	33

7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIONES	36
9. BIBLIOGRAFIA.....	37

Detección de auto-anticuerpos en familiares sanos de primer grado de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 en la población mexicana

Autor: Retana Jiménez, Jorge Ecatzin

RESUMEN

Objetivo: Detectar la presencia de auto-anticuerpos frente a antígenos de los islotes pancreáticos en familiares sanos de primer grado (FDR) de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1), enfocándonos en su prevalencia de acuerdo con el grado de parentesco, género y edad.

Materiales y Métodos: Se reclutaron individuos de distintas sedes hospitalarias, 35 pacientes diagnosticados con DM1 en el Servicio de Endocrinología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos” del ISSSTE y 425 FDR de alrededor de 200 pacientes con DM1 en los Servicios de Endocrinología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos” y del Hospital de Especialidades “Antonio Fraga Mouret”, Centro Médico Nacional “La Raza” (IMSS). Se reclutaron también individuos control sin relación de parentesco con pacientes con DM1. Se obtuvieron muestras de sangre (5 ml) por punción venosa, de las cuales se extrajo el suero. Los auto-anticuerpos anti-insulina (IAA), anti-GAD65 (GADA) y anti-IA-2 (IA-2A) se evaluaron por la técnica de ELISA.

Resultados: Se evaluaron 35 pacientes con DM1, de los cuales 20 tenían 3 años o menos de evolución de la enfermedad (pacientes A) y 15 contaban con más de 3 años de evolución (pacientes B). La comparación de la concentración de auto-anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2 entre los dos grupos de pacientes no arrojó diferencias significativas. Se realizó la detección de auto-anticuerpos en 234 hermanos, 151 padres y 40 hijos de pacientes con DM1. Los pacientes con DM1 evaluados presentaron una concentración media de IAA, GADA e IA-2A significativamente superior a la de los FDR. El porcentaje de FDR que presentaron auto-anticuerpos alcanzó una media del 16.47%. La mayor prevalencia se encontró en los hermanos e hijos (19-25%), y la menor en los padres (9.9%). En los hermanos e hijos se detectaron niveles superiores de GADA con respecto a los padres, y sus títulos fueron significativamente más altos que los observados para IAA e IA-2A en los FDR que presentaron auto-anticuerpos, mientras que los IAA se detectaron con los títulos más bajos. No se encontraron correlaciones significativas entre los títulos de auto-

anticuerpos y la concentración de glucosa, colesterol, triglicéridos, hemoglobina glicosilada A1c, insulina o péptido C en plasma. En ninguno de los FDR se observó la presencia de los tres auto-anticuerpos; en el 54.9% se detectó la presencia de un auto-anticuerpo, y en el resto (45.1%) se detectaron dos simultáneamente. Los GADA fueron los auto-anticuerpos más prevalentes cuando los familiares presentaron un único auto-anticuerpo, y la combinación GADA/IA-2A fue la más prevalente en los FDR que presentaron dos auto-anticuerpos.

La mayor prevalencia de auto-anticuerpos se presentó en el grupo de edad de entre 11-30 años. De manera notable, la frecuencia de seropositividad en las mujeres fue mayor que en los hombres (significativamente en el grupo de hermanos). La frecuencia de mujeres que presentaron 2 auto-anticuerpos fue significativamente mayor que la de los hombres, mientras que la frecuencia de FDR que presentaron un auto-anticuerpo fue similar en los dos géneros.

Conclusiones: La prevalencia de auto-anticuerpos en FDR de pacientes con DM1 en población mexicana es alta, comparable e incluso superior a la reportada en países con la mayor incidencia de DM1 en el mundo como Finlandia e Italia (Cerdeña). En conjunto, estos datos indican que existe una tasa muy alta de FDR seropositivos de pacientes con DM1 en México, y sugieren la conveniencia de realizar un estrecho seguimiento clínico de los mismos. Los datos de prevalencia indican que los GADA y los IA-2A serían los auto-anticuerpos de elección para detectar las reacciones autoinmunes en los FDR, y que los grupos con mayor riesgo de desarrollar DM1 de acuerdo con la presencia de auto-anticuerpos serían los hermanos e hijos de pacientes con DM1, entre los 11-30 de edad, y de sexo femenino.

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo 1, auto-anticuerpos, familiares de primer grado.

Detection of autoantibodies in healthy first-degree relatives of patients with type 1 diabetes mellitus in the Mexican population.

Author: Retana Jiménez, Jorge Ecatzin

SUMMARY

Detection of auto-antibodies in healthy first-degree relatives of patients with type 1 diabetes mellitus in the Mexican population.

Authors: Retana Jiménez Jorge Ecatzin

Summary

Objective: To detect the presence of seropositivity for some autoantibody (auto-Ab), for the early diagnosis of type 1 diabetes mellitus (DM1) in healthy relatives of patients with this disease.

Material and Methods: Patients from different hospitals were enrolled, 35 patients diagnosed with DM1 in the Endocrinology Service of the Regional Hospital "Lic. Adolfo López Mateos" of the ISSSTE. We also recruited 426 first degree relatives (FDR) of about 200 patients with DM1 in the Endocrinology Services of the Regional Hospital "Lic. Adolfo López Mateos" and the Specialty Hospital "Antonio Fraga Mouret", National Medical Center "La Raza" (IMSS). Controlled controls without parental relationship with patients with DM1 have also been identified. Blood samples (5 ml) were obtained by venous puncture, from which the serum was extracted.

Results: Thirty-five patients with DM1 were evaluated, of whom 20 had 3 years or less of evolution of the disease (patients A) and 15 had more than 3 years of evolution (patients B). The comparison of AAB anti-insulin, anti-GAD65 and anti-IA-2 between the groups of patients did not show significant differences. AAB was detected in 426 FDR of patients with DM1, 235 siblings, 151 parents and 40 children. The patients with DM1 evaluated had a mean concentration of anti-insulin Ab, anti-GAD65 and anti-IA-2 significantly higher than that of the FDR. With respect to FDR, the average concentration of AAB IAA and IA-2A do not differ statistically with the degree of kinship, while siblings and children are the highest levels of GADA with respect to parents. There are no differences in differences between these groups of families with respect to the media of concentration of Ab anti-IA-2, although in the group of siblings they tended to be higher with respect to the group of parents

and children. The GADA titles were significantly higher than those observed for IAA and IA-2A in the FDR Aab +, while the IAA is ranked with the lowest titles.

The autonomous sensors detected in our country have exceeded those established in other international studies. In Mexico it was possible to detect up to 16.6% of autoantibodies compared with 11.8% in Sardinia, 8.3% in Finland, 8.1% in Brazil, 4.6% in the USA. UU / Canada

In none of the healthy relatives, he married the presence of the three Aab; in one group, the presence of one (54.9%) or two simultaneous ABA (45.1%) was detected. The GADAs were the most prevalent AABs when the relatives presented a single Aab, and the GADA / IA-2A combination was the most prevalent in the FDR that presents two Aab.

Conclusions: The detection of these autoantibodies and the clinical follow-up of the patient will be based on the basis of a study of type 1 diabetes mellitus in healthy family members with this broader epidemiological disease that allows for early diagnosis of the disease prior to the appearance of clinical diseases, as well as for timely medical advice.

Key words: Diabetes Mellitus type 1, Autoantibodies IAA, GADA, IA-2A.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Introducción

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune en la que se produce una destrucción de las células beta pancreáticas productoras de insulina. El inicio de la enfermedad y los signos clínicos vienen precedidos de una fase no clínica de duración muy variable, desde pocos meses hasta varios años. La aparición de los auto-anticuerpos es el primer signo detectable de la autoinmunidad emergente frente a las células beta. En un 85-95% de los casos los pacientes presentan anticuerpos anti-insulina (IAA), anti-antígenos citoplásmicos de las células de los islotes beta (ICA), anti-GAD65 (decarboxilasa del ácido glutámico, isoforma de 65 kDa, GADA), y anti-antígeno 2 de insulinoma (IA-2A), entre otros. Estos cuatro grupos de auto-anticuerpos son predictivos para el desarrollo de DM1 y, en estudios familiares, la positividad para 3-4 auto-anticuerpos se asocia con un riesgo de desarrollar DM1 en el rango de 60-100% durante los siguientes 5-10 años.

En trabajos realizados en otros países se ha detectado que la frecuencia de familiares de primer grado (FDR) de pacientes con DM1 seropositivos es muy variable, entre 3-12.6% según los distintos estudios, pero en México no se cuenta con este tipo de estadísticas.

1.2. Definición de la diabetes mellitus tipo 1.

La DM es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, consecuencia de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. La DM1 se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina y tendencia a la cetoacidosis. Para prevenir el aumento de la glucosa en sangre hasta niveles patológicos, los pacientes con DM1 tienen que recibir tratamiento con insulina exógena de por vida. El ataque autoinmune dirigido contra las células beta empieza varios años antes de la presentación clínica de la diabetes (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Incluso después del diagnóstico de diabetes existe todavía una función significativa de las células beta, lo cual explica por qué después del tratamiento de la presentación aguda puede haber un período de remisión clínica denominado fase de la “luna de miel” (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Desafortunadamente, la remisión es temporal, y la función de las células beta declina, por lo que los pacientes necesitan terapia de reemplazo con insulina de por vida.

En la otra categoría, mucho más prevalente se encuentra a la DM2, donde la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una respuesta secretora de la inhibición inadecuada de la insulina.

En términos generales la diabetes se clasifica en (1):

I. Diabetes tipo 1 (destrucción celular, que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina).

A. Mediada inmunológicamente

B. idiopático

II. Diabetes tipo 2 (puede variar desde resistencia a la insulina predominantemente con deficiencia relativa de insulina a un defecto secretor predominante con resistencia a la insulina).

III. Otros tipos específicos

A. Defectos genéticos de la función de la célula.

B. Defectos genéticos en la acción de la insulina

C. Enfermedades del páncreas exocrino

D. Endocrinopatías

F. Infecciones

G. Formas infrecuentes de diabetes inmunomediada

H. Otros síndromes genéticos a veces asociados con la diabetes

IV. Diabetes mellitus gestacional

Los criterios para el diagnóstico de la diabetes son (1):

- Hemoglobina glicosilada A1c mayor o igual a 6.5%. La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método que esté certificado por NGSP y esté estandarizado según el análisis DCCT.

- Glucosa en ayuno (FPG) mayor o igual a 126 mg/dl (7.0 mmol/l). El ayuno se define como una ingesta calórica mínima de 8 h.

- Glucosa en plasma posterior a 2 h: 200 mg/dl (11.1 mmol/l). La prueba debe ser realizada según lo descrito por la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa que contiene el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.
- En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, una concentración de glucosa en plasma mayor de 200 mg/dl (11.1 mmol/l).

1.3. Epidemiología.

La DM1 se diagnostica predominantemente en niños y adultos jóvenes, y se estima que afecta alrededor del 3% de la población menor de 14 años alrededor del mundo (3). La Organización Mundial de la Salud indica que 346 millones de personas padecen diabetes y, de ellos, 5-15% tienen DM1 (4). En México, las cifras muestran una incidencia de DM1 en el 2010 de 16.85 casos nuevos por cada 100,000 habitantes, con un incremento de 4.32 veces con respecto a la incidencia reportada en el año 2000 (5). Los casos de DM1 en México constituyen un serio problema de salud, ya que a pesar de la suplementación de insulina, los niveles variablemente elevados de glucosa en sangre incrementan el riesgo de complicaciones severas, como enfermedades cardiovasculares, nefropatías, neuropatías y retinopatías. Estos datos refuerzan la necesidad de diseñar nuevos tratamientos que curen la enfermedad, o al menos retrasen o prevengan su inicio, así como instrumentos para su diagnóstico temprano.

1.4. Factores de riesgo.

La etiología que conduce al desarrollo de DM1 es desconocida, y tanto factores ambientales como genéticos juegan un papel en la misma. Entre los genes que se han asociado a esta enfermedad se encuentra la región que codifica para el HLA, principalmente de clase II. Además, se han descrito más de 40 *loci* asociados con DM1 entre los que se encuentran el gen de la insulina, PTPN22, la cadena alfa del receptor de la interleucina (IL)-2 y CTLA-4 (6, 7). Existen personas con un riesgo genético incrementado de contraer DM1, entre las que se encuentran aquellas que presentan una historia familiar de la enfermedad. Individuos con alelos específicos de HLA DR/DQ [e.j., DRB1*03-DQB1*0201 (DR3-DQ2),

DRB1*04-DQA1*0301DQB1*0302 (DR4-DQ8)] tienen mayor riesgo de contraer DM1. Los genotipos asociados de mayor riesgo son los heterocigotos DR3-DQ2 y DR4-DQ8; así mismo, existen alelos protectores, como DQB1*0602 (8). No obstante, sólo una fracción de estas personas (<10%) iniciará la respuesta autoinmune contra las células beta pancreáticas. Los mediadores de la iniciación de esta respuesta se desconocen en la actualidad, pero se han involucrado factores ambientales, como la dieta (proteínas de la leche de vaca, del trigo, deficiencia de vitamina D) o infecciones virales (virus coxaquie B4, citomegalovirus, rotavirus y rubeola) (9, 10).

1.5. Etiopatogenia.

La patogénesis de la DM1 se puede dividir en tres etapas: 1, aparición de la autoinmunidad de las células beta, normoglucemia y ausencia de síntomas; 2, autoinmunidad de las células beta, disglucemia y ausencia de síntomas; y 3, autoinmunidad de células beta, disglucemia y síntomas de diabetes.

La patología de la DM1 viene dictada por la activación de clonas T autorreactivas de fenotipo efector/memoria, tanto CD4+ (Th1 y Th17) como CD8+, contra antígenos diabetogénicos, que contribuyen a la destrucción pancreática con anterioridad a las manifestaciones clínicas (desde meses hasta años) (11-14). Durante esta fase silenciosa de la enfermedad, así como alrededor del tiempo del diagnóstico, se produce el mayor grado de destrucción de los islotes beta (asociado con la caída drástica de los niveles de péptido C, un péptido resultante del procesamiento de la pro-insulina a insulina), y es importante desarrollar metodologías que nos permitan detectar estas etapas, ya que se ha descrito que dietas hipoglucémicas estrictas pueden retrasar esta destrucción (15). Durante el transcurso de esta fase asintomática, las células beta se van destruyendo (insulitis) y el páncreas va perdiendo progresivamente su capacidad para mantener la normoglicemia, hasta que se detectan anomalías metabólicas. Éstas progresan desde una respuesta de primera fase a la insulina (FPIR) alterada (en pruebas de tolerancia a glucosa intravenosa), hasta la ausencia de tolerancia a la glucosa en pruebas de administración oral, y finalmente hasta la diabetes. Se ha comprobado que la alteración de la FPIR y la presencia de anticuerpos frente a antígenos de los islotes están asociados con un riesgo mayor del 50% de progresión a diabetes dentro de los siguientes 5 años (16). En el

momento del diagnóstico, se ha estimado que sólo 10-20% de las células beta son funcionales. Sin embargo, los pacientes continúan produciendo el péptido C, lo cual evidencia la función de las células beta pancreáticas. Existen estudios que muestran que la producción continuada de este péptido se asocia con un menor número de eventos hipoglucémicos y con un riesgo disminuido de complicaciones por la enfermedad (15).

La destrucción de las células beta de los islotes pancreáticos está mediada esencialmente por componentes de la inmunidad celular: linfocitos T (LT), macrófagos y células dendríticas (DC). Los datos referentes a la respuesta inmune *in situ* en humanos con DM1 son limitados debido a la escasa disponibilidad de páncreas de los pacientes. Sin embargo, se ha demostrado que la insulinitis se caracteriza por una gran infiltración de células mononucleares, esencialmente LT CD8+, seguidos en número por macrófagos, LT CD4+, DC y linfocitos B (17). Si bien se desconoce el sitio inicial donde los LT son activados, se ha propuesto que éstos son estimulados por células presentadoras de Ag (APC) en los nódulos linfoides que drenan el páncreas, las cuales portan Ag derivados de los islotes pancreáticos. Se han descrito 155 epítomos derivados de Ag de las células beta que son reconocidos por los LT CD4+ humanos (derivados de GAD65, insulina, la tirosina fosfatasa IA-2, las proteínas choque térmico 60 y 70), y 22 para los LT CD8+ (GAD65, IA-2, insulina) (18).

Los datos más detallados acerca de la respuesta inmune celular en esta enfermedad se han obtenido de un modelo animal, el ratón NOD (non-obese diabetic). En estos animales, el inicio de la diabetes ocurre espontáneamente a las 12-14 semanas de vida. Desde las 3-4 semanas se puede observar un infiltrado de células mononucleares en el páncreas, esencialmente de macrófagos y DC, que se incrementa progresivamente e invade los islotes, hasta que a las 10 semanas se desarrolla una insulinitis severa. La composición de los infiltrados es compleja. La mayoría de las células son LT CD4+, y aunque en las lesiones se identifican también LT CD8+, células NK, linfocitos B, DC y macrófagos (19), el desarrollo de la diabetes es totalmente dependiente de la presencia de LT CD4+ y CD8+, ya que ambos son capaces de transferir la enfermedad, al contrario que los auto-Ab (20). Un caso análogo en humanos es el desarrollo de DM1 en recipientes de médula ósea procedente de donantes con DM1 (21). Los LT CD4+ son esenciales tanto en los eventos tempranos como tardíos del desarrollo del daño (22), y pueden mediar directamente la destrucción de los islotes. Sin embargo, los LT CD8+ promueven también la enfermedad. Se ha apuntado un papel fundamental de estos LT en eventos tempranos de la enfermedad, provocando

una destrucción importante de los islotes que favorecería una potente respuesta de LT CD4+ (23). Debido a las características de la respuesta inmune ya mencionadas, se cree que los perfiles Th1 y Th17 están asociados con la progresión de la enfermedad, y que las respuestas de tipo Th2 pueden colaborar con la supresión del desarrollo de DM1 (24).

La regulación inmunológica juega un papel esencial en el desarrollo de DM1. Existen una serie de datos que evidencian que la aparición de la diabetes puede detenerse por mecanismos que aún se desconocen. Por ejemplo, no todos los individuos que son seropositivos para antígenos diabetogénicos desarrollan la enfermedad. Se considera que las células T reguladoras naturales o inducidas (Treg) pueden ser importantes en el control de la progresión de DM1, así como otras células reguladoras del tipo Tr1 [productoras de interleucina 10], e incluso los linfocitos Th2. Algunos trabajos han demostrado una función o frecuencia anómala de estas células en el modelo del ratón NOD y en humanos con DM1 (25, 26).

1.6. Fase preclínica.

La duración del período preclínico asintomático que precede a la presentación de DM1 es altamente variable. En los lactantes y niños pequeños, un proceso agresivo de la enfermedad puede dar lugar a una enfermedad manifiesta unos meses después de la aparición de los primeros auto-anticuerpos asociados con la diabetes, mientras que en otros individuos, particularmente en sujetos mayores, la fase preclínica puede continuar durante más de 20 años. Knip *et al.* (27) reportaron que la duración promedio del período preclínico es de 30-36 meses en niños que presentan DM1 clínico antes de los 10 años de edad. La aparición de auto-anticuerpos asociados a la enfermedad es el primer signo fácilmente detectable de autoinmunidad de células beta (27). Los títulos de auto-anticuerpos son muy variables durante la fase preclínica, pero en muchos casos los títulos tienden a disminuir antes del diagnóstico. Sin embargo, se ha observado que en un 85-95% de los casos, los pacientes de diagnóstico reciente presentan anticuerpos ICA, IAA, GADA, o IA-2A, entre otros. Estos cuatro grupos de anticuerpos son predictivos para el desarrollo de DM1 (28) y, en estudios familiares, la positividad para 3-4 auto-anticuerpos se asocia con un riesgo de desarrollar DM1 en el rango de 60-100% durante los siguientes 5-10 años (29). Sin embargo, la frecuencia de familiares seropositivos es baja, entre 3-12.6% de acuerdo con estudios realizados en distintos países (30, 31). En algunos trabajos se ha demostrado que

en los familiares que presentan auto-anticuerpos el riesgo de desarrollar DM1 no se asocia con la edad ni con el tipo de parentesco con el paciente (hijos, hermanos o padres) (32). La sensibilidad de la determinación de auto-anticuerpos en los familiares que eventualmente desarrollan la enfermedad está entre el 67-83% cuando se evalúa un solo anticuerpo, y aumenta hasta el 96% si se evalúan GADA e IA-2A (32). La DM1 puede ocurrir, aunque rara vez, en ausencia de cualquier signo de autoinmunidad humoral en el momento del diagnóstico.

Como se ha mencionado anteriormente, existen varios antígenos frente a los que se generan auto-anticuerpos en los individuos con un alto riesgo genético de desarrollar DM1 y en los pacientes afectados por la enfermedad: insulina, GAD65, antígenos citoplásmicos de los islotes, IA-2, o el transportador de zinc Slc30A8. La diversificación de los epítomos tanto dentro de los auto-antígeno como entre un auto-antígeno y otro (“epitope spreading”) es un fenómeno típico que se produce durante la fase pre-clínica de la enfermedad (33). Por ejemplo, los primeros anticuerpos contra GAD65 se detectan en la región central de la molécula, y posteriormente se generan otros que reconocen la zona C-terminal. Prácticamente no se observan casos que produzcan auto-anticuerpos frente a la región N-terminal. Los IA-2A reconocen la región citoplásmica de IA-2; los primeros auto-anticuerpos que aparecen reconocen la región yuxtamenbranal (JM), y posteriormente se diversifican hacia múltiples epítomos en el dominio fosfatasa. La progresión hacia DM1 se ha asociado con la presencia de ambos tipos de anticuerpos, en especial contra la región JM (34, 35).

La respuesta humoral frente a todos estos auto-antígenos está determinada mayoritariamente por el isotipo IgG1, en algunos casos de manera prácticamente exclusiva (GADA, IA-2A), y en otros casos se añan (aunque en menor grado) con respuestas de IgG4 e IgG3 (IAA). IgG2 parece ser el isotipo menos frecuente. Estos datos, en conjunto, podrían asociarse con respuestas de tipo celular Th1, predominantes en DM1.

1.7. Diagnóstico y valor pronóstico de los auto-anticuerpos.

Los primeros datos sobre el valor predictivo de auto-anticuerpos para la DM1 se obtuvieron mediante el cribado de parientes de primer grado de pacientes afectados por anticuerpos ICA, que representan un grupo heterogéneo de anticuerpos contra una serie de antígenos

de islotes conocidos, incluyendo los auto-anticuerpos IA-2A y GADA, así como anticuerpos contra uno o más antígenos hasta ahora no identificados antígenos (28). Estudios más recientes han indicado que al identificar a los parientes de primer grado con un riesgo elevado de enfermedad, el cribado de ICA podría ser reemplazado por cribado de GADA e IA-2A (27), y por consiguiente las guías actuales para la prueba primaria de esta población recomiendan la medición de GADA junto con IA-2A o auto-anticuerpos contra la insulina (IAA) (28). Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado guías para la identificación de individuos en riesgo de la población general, aunque aproximadamente 90% de los nuevos casos con diabetes tipo 1 surgen de esa población (36).

En trabajos realizados en otros países se ha detectado que la frecuencia de familiares de pacientes con DM1 seropositivos es baja, entre 3-12.6% (30, 31, 36-39) según los distintos estudios, pero en México no se cuenta con este tipo de estadísticas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad crónico-degenerativa cuyas complicaciones impactan de manera importante en la población mexicana, lo que genera repercusiones negativas al estado de salud, con mal pronóstico a mediano y largo plazo.

Actualmente no se cuenta con un estudio epidemiológico que pueda utilizarse en el diagnóstico temprano de la enfermedad antes de que inicien las manifestaciones clínicas, por lo tanto no se pueden realizar acciones preventivas, acciones médicas tempranas al inicio de la enfermedad.

Debido a la estrecha relación entre la presencia de auto-anticuerpos en familiares de primer grado de pacientes con DM1 con la posible aparición de la enfermedad, en este estudio quisimos investigar la frecuencia de familiares seropositivos para tres auto-anticuerpos (IAA, GADA e IA-2A) en la población mexicana.

3. JUSTIFICACION

La diabetes mellitus de tipo 1 (DM1) cursa con una fase asintomática donde se produce una respuesta autoinmune frente a antígenos de los islotes beta del páncreas. Esta reacción autoinmune se puede detectar mediante el análisis de auto-anticuerpos frente a estos antígenos.

Los familiares de primer grado de pacientes con DM1 son susceptibles a desarrollar la enfermedad debido al componente genético de la misma. Estudios realizados en otros países demuestran que un porcentaje de estos familiares desarrollan una reacción autoinmune frente a antígenos pancreáticos, evidenciada por la presencia de auto-anticuerpos. La presencia en estos individuos de 2 o más tipos de auto-anticuerpos, junto con la de alelos de susceptibilidad del HLA, generan un alto riesgo de padecer la enfermedad.

En la población mexicana se desconoce el porcentaje de familiares de primer grado de pacientes con DM1 que están sanos pero que desarrollan estas respuestas autoinmunes. En este trabajo proponemos la evaluación de auto-anticuerpos en una cohorte de familiares de primer grado de pacientes con DM1.

Esta investigación es importante porque causará beneficios a nivel individual en la detección oportuna y el diagnóstico preclínico de la enfermedad. Además, permitirá implementar acciones médicas integrales para propiciar cambios en el estilo de vida de los individuos con auto-anticuerpos que podrían evitar el desarrollo de la enfermedad o retrasar su inicio.

A largo plazo, el tratar de forma oportuna y retrasar el desarrollo clínico de la enfermedad disminuirá las co-morbilidades propias de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Principal

Determinar la frecuencia de familiares sanos de primer grado de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 en la población mexicana que presentan auto-anticuerpos frente a antígenos de los islotes beta del páncreas.

4.2. Objetivos Específicos

1. Seleccionar familiares de primer grado sanos de pacientes con DM1, tanto padres, como hermanos e hijos.
2. Evaluar los títulos de auto-anticuerpos IAA, GADA e IA-2A en estos familiares y en individuos control.
3. Realizar analíticas que incluyan la detección del péptido C, la hemoglobina 1Ac, y niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos.
4. Correlacionar los títulos y número de auto-anticuerpos diferentes con las posibles manifestaciones clínicas de DM1 a lo largo del período del estudio y con los siguientes parámetros metabólicos: concentración de glucosa, colesterol, triglicéridos, péptido C y hemoglobina glicosilada 1Ac en sangre.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Tipo de estudio.

Descriptivo, transversal, prospectivo, no comparativo.

5.2. Diseño de la investigación del estudio.

Se reclutaron 35 pacientes diagnosticados con DM1 en los Servicios de Endocrinología y Pediatría del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos” del ISSSTE. La edad, sexo, y edad de inicio de la enfermedad se muestran en la Tabla 1.

Se reclutaron además 425 familiares de primer grado (FDR) de alrededor de 200 pacientes con DM1, de los cuales 234 fueron hermanos, 151 padres y 40 hijos de los pacientes (Tabla 2), en los Servicios de Endocrinología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos” y del Hospital de Especialidades “Antonio Fraga Mouret”, Centro Médico Nacional “La Raza” (IMSS). Se reclutaron también individuos control sin relación de parentesco con pacientes con DM1, en los mismos rangos de edad y género. Se obtuvieron muestras de sangre (5 ml) por punción venosa, de las cuales se extrajo el suero. Todos los individuos incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado.

5.3. Muestra.

Tipo: No aleatoria.

Representatividad: Representativa.

Precisión: 10%.

Nivel de confianza: 90.

Variabilidad: $p=0.5$ y $q=0.5$.

Tamaño de muestra: Se estudiaron 35 pacientes con DM1 y 425 familiares de primer grado (hermanos, hijos y padres) de pacientes con DM1.

5.4. Criterios de Selección (inclusión, exclusión y eliminación).

Los criterios de inclusión y exclusión para los FDR de pacientes con DM1 y controles:

Criterios de inclusión: Individuos de ambos sexos con edades entre los 3 y 60 años que tengan relación familiar de primer grado (hermanos, padres o hijos) con algún paciente con DM1, con consentimiento informado por escrito de ellos o de sus tutores legales. Para los controles, individuos sanos que no tengan relación familiar con pacientes con DM1 ni con antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes o atopias, en el mismo rango de edad y género que los FDR.

Criterios de exclusión: Individuos con diagnóstico de DM1, DM2, DM gestacional u otro tipo de diabetes, individuos con hiperglicemia, con alguna enfermedad autoinmune, con infecciones agudas o crónicas, o con sospecha o presencia de neoplasias.

Criterios de eliminación: Individuos de los cuales no se cuente con historia clínica completa, que no acudan a las citas para la toma de muestra sanguínea, que no firmen el consentimiento informado, o por petición del individuo.

Criterios para los pacientes con DM1:

Criterios de inclusión: Individuos de ambos sexos mayores de 10 años de edad que presenten DM1, independientemente de los años de evolución de la enfermedad, con consentimiento informado por escrito de ellos o de sus tutores legales.

Criterios de exclusión: Individuos con complicaciones severas como infección activa o crónica, presencia o sospecha de neoplasia, etc, embarazo, o tratamiento con inmunosupresores.

Criterios de eliminación: Pacientes de los cuales no se cuente con historia clínica completa, que no acudan a las citas para toma de muestra sanguínea, que no firmen el consentimiento informado, o por petición del paciente.

5.5. Definición operativa.

Evaluación de la concentración de auto-anticuerpos

La concentración de auto-anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2 se evaluó mediante la técnica de ELISA a partir de los sueros de los individuos. El kit de ELISA empleado para la detección de anticuerpos anti-insulina fue de BioSystems S.A. (Barcelona, España), y de Euroimmun (Lübeck, Alemania) para la detección de GADA e IA-2A. Los límites de detección fueron de 0.5 U/ml, 0.2 UI/ml y 0.7 UI/ml para insulina, GAD65, e IA-2, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de cada uno de los kit de ELISA fueron: 86.7% y 98.7% para insulina, 96% y 98% para GAD65, y 66% y 99% para IA-2, de acuerdo con los instructivos de las compañías. El límite superior del rango normal (punto de corte) recomendado por las diferentes casas comerciales fue de 10 U/ml para insulina y de 10 UI/ml para GAD65 e IA-2. Por lo tanto, se consideraron positivos los sueros cuyo valor para cada concentración de auto-anticuerpos fue ≥ 10 U (o UI)/ml.

5.6. Análisis estadístico.

La comparación entre las medias de dos grupos experimentales se realizó mediante la prueba *t* de Student no pareada. La prueba de Fisher se empleó para el análisis de las frecuencias de los grupos experimentales. Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

5.7. Cronograma.

En el cuadro 1 se muestra el cronograma de las actividades del estudio.

Cuadro 1

Etapa/actividad	Trimestres											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
• Etapa de planeación del proyecto												
• Marco teórico			X	X	X	X						
• Material y métodos					X	X	X					
• Registro y autorización del							X	X				
• Etapa de ejecución del proyecto												
• Recolección de datos			X	X	X	X	X	X				
• Almacenamiento de los datos			X	X	X	X	X	X				
• Análisis de los datos			X	X	X	X	X	X	X			
• Descripción de los resultados								X	X	X		
• Discusión de los resultados								X	X	X		
• Conclusiones del estudio									X	X		
• Integración y revisión final										X		
• Reporte final										X		
• Autorizaciones										X		
• Impresión del trabajo final											X	
• Solicitud de examen de tesis												X

5.8. Consideraciones éticas.

La investigación se apegó a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, de la cual se cumplen los puntos del 1 al 36, exceptuando 33 y 37 (40), así como a las normas medicas de la ética médica en sus enfoques racionales (41).

Igualmente se siguen los lineamientos contenidos en la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos en los artículos 1º al 28º (42).

Asimismo, en el Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud, se cumplen los lineamientos de los artículos 17-27 (43).

Además este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Regional “Lic. Adolfo Lopez Mateos” (Ref: 244.2012) y por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS (No. Registro: R-2015-785-044).

6. RESULTADOS

6.1. Características de los pacientes con DM1 y de sus familiares.

La edad, sexo, y edad de inicio de la enfermedad de los pacientes con DM1 reclutados se muestran en la Tabla 1. Se reclutaron 35 pacientes diagnosticados con DM1 en los Servicios de Pediatría y de Endocrinología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos”, además de 425 familiares de primer grado (FDR) de alrededor de 200 pacientes con DM1 en los Servicios de Endocrinología del Hospital Regional “Lic. Adolfo López Mateos” y del Hospital de Especialidades “Antonio Fraga Mouret”, Centro Médico Nacional “La Raza” (IMSS) (Tabla 2). Se reclutaron también individuos control sin relación de parentesco con pacientes con DM1, en los mismos rangos de edad y género. Se obtuvieron muestras de sangre (5 ml) por punción venosa, de las cuales se extrajo el suero.

Tabla 1. Características de los pacientes con DM1 evaluados en el estudio.

Pacientes	No.	Sexo ^{a)} (F:M)	Edad ^{b)} (media ± SD)	Rango de edad ^{b)}	Tiempo de diagnóstico ^{b)} (media ± SD)	Glucosa (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	HbA1c ^{c)}
Diagnóstico ≤ 3 años	20	2.3:1	14 ± 4.9***	9-33	1 ± 1.1***	275 ± 110**d)	257 ± 62*	10 ± 2.9*
Diagnóstico > 3 años	15	1.7:1	26 ± 11.9	16-58	10 ± 6.9	148 ± 50	190 ± 47	8 ± 1.3

a) F: Femenino; M: masculino.

b) Años.

c) Porcentaje de hemoglobina glicosilada A1c.

d) Estadística (prueba *t* de Student, diagnóstico ≤ 3 años vs diagnóstico > 3 años): *, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0005.

Tabla 2. Características de los familiares de pacientes con DM1 evaluados en el estudio.

	n	Edad ^{a)}	Rango ^{a)}	IAA+ (n)	GADA+ (n)	IA-2A+ (n)
HERMANOS	234	17.7±6.8		8	31	31
Hermanos	90	17.3±7	3-36	1	6	7
Hermanas	144	18.±6.65	3-50	7	25	24
HIJOS	40	18.6±9.9		0	7	4
Hijos	19	17.5±7.2	8-34	0	3	3
Hijas	21	19.4±11.7	6-57	0	4	1
PADRES	151	41.55±6.5		3	9	9
Padres	46	43.2±6.95	25-58	0	3	2
Madres	105	40.6±6.1	25±57	3	6	7

6.2. Detección de auto-anticuerpos en pacientes con DM1.

Se evaluaron 35 pacientes con DM1, de los cuales 20 tenían 3 años o menos de evolución de la enfermedad (pacientes A) y 15 contaban con más de 3 años de evolución (pacientes B). La comparación de la concentración de auto-anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2 entre los dos grupos de pacientes no arrojó diferencias significativas (Fig. 1). El porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-IA-2 fue superior en los dos grupos con respecto a los otros dos auto-anticuerpos (Fig. 2A). Se encontró un mayor porcentaje de pacientes que presentaban auto-anticuerpos anti-GAD65 entre los pacientes A con respecto a los B, mientras que un mayor porcentaje de éstos presentaron auto-anticuerpos anti-insulina (Fig. 2A). Con respecto al número de auto-anticuerpos detectados, los porcentajes de pacientes que no presentaron auto-anticuerpos fueron similares en los dos grupos. En este grupo se encontraron también los mayores porcentajes de sujetos con 1 y 3 auto-anticuerpos. Los pacientes del grupo A presentaron mayoritariamente 2 auto-anticuerpos (~60%), casi 6 veces más que el grupo B de pacientes (Fig. 2B).

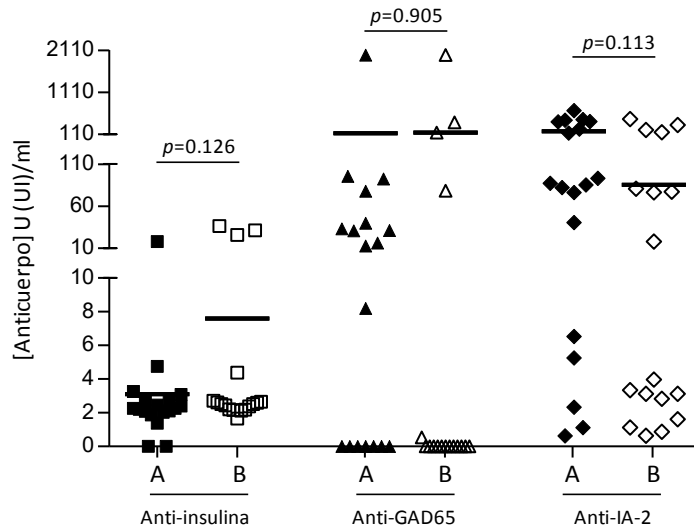


Figura 1. Comparación de la concentración de auto-anticuerpos entre pacientes con DM1 con distinto grado de evolución de la enfermedad. La concentración de anticuerpos anti-insulina (U/ml), anti-GAD65 y anti-IA-2 (UI/ml) en pacientes diagnosticados con DM1 con 3 años o menos de evolución (A) o con más de 3 años de evolución (B) de la enfermedad se evaluó por ELISA. Cada símbolo representa el resultado de un individuo, y las barras horizontales la media de los grupos de datos. La estadística se realizó con la prueba t de Student, y el valor de las p se representa en la gráfica.

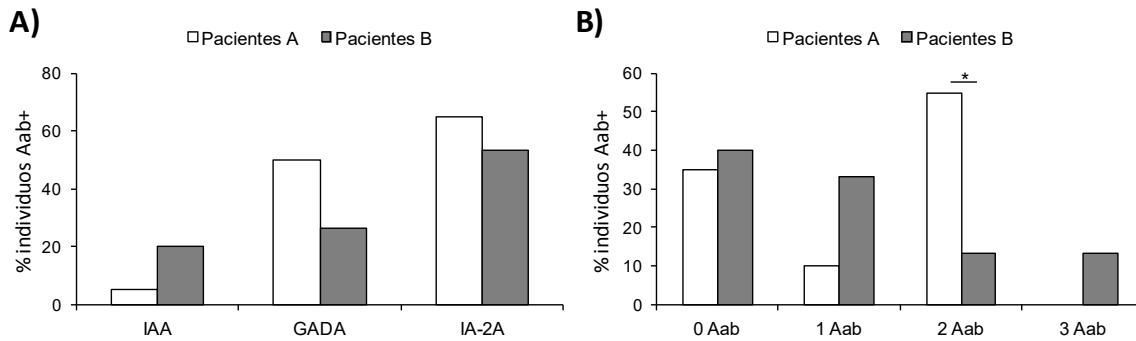


Figura 2. Porcentaje de pacientes con DM1 con distinto grado de evolución de la enfermedad que presentan auto-anticuerpos frente a antígenos diabéticos. A) Porcentaje de pacientes diagnosticados con DM1 con 3 años o menos de evolución (A, barras blancas) o con más de 3 años de evolución (B, barras grises) que presentan positividad para auto-anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 o anti-IA-2. B) Porcentaje de pacientes que no presentan positividad para ningún auto-anticuerpo (0 Ab), o para uno (1 Ab), dos (2 Ab) o tres (3 Ab) auto-anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 o anti-IA-2. La concentración de anticuerpos se evaluó por ELISA en 18 pacientes con 3 años o menos de evolución de la enfermedad y 17 pacientes con más de 3 años de evolución. La estadística se realizó con el test de Fisher. *, $p < 0.05$.

La evaluación de auto-anticuerpos fue realizada también en 425 FDR inicialmente no diabéticos, 234 hermanos, 40 hijos y 151 padres, de 197 pacientes con DM1. La proporción hombres:mujeres fue de 1:1.7 y la media de edad de 25 ± 13.3 años. La mayoría de los sujetos evaluados tenían solo un familiar con DM1. Los pacientes tenían una media de edad de 20.9 ± 11.3 años cuando sus familiares fueron enrolados en el estudio, y habían sido diagnosticados a una edad promedio de 11.9 ± 4.4 años. Más del 70% fueron mujeres.

Setenta individuos (16.47%) presentaron positividad para uno o más auto-anticuerpos. El grupo de hermanos (19.2%, n=45) y de hijos (25%, n=10) de pacientes con DM1 tuvieron una prevalencia de auto-anticuerpos significativamente mayor que el grupo de padres (9.9%, n=15) (Fig. 3). La prevalencia de auto-anticuerpos fue menor en los familiares que en los pacientes (Fig. 3). La edad media de los FDR seropositivos fue de 25.4 ± 11.6 años, y la proporción hombres:mujeres de 1:2.68. Cuarenta y siete FDR seropositivos participaron en el estudio durante un período de 3 años. Cuatro hermanos (8.5% de 47 FDR) debutaron con DM1 durante el estudio, 3 mujeres de 14, 18 y 50 años y un hombre de 19 años. Todos ellos fueron positivos para GADA e IA-2A, excepto el FDR masculino que presentó positividad para GADA e IAA. Las pruebas de laboratorio de este grupo de familiares se muestran en la Tabla 3. No se encontraron correlaciones significativas entre los títulos de auto-anticuerpos y la concentración de glucosa, colesterol, triglicéridos, hemoglobina glicosilada A1c, insulina o péptido C.

Tabla 3. Pruebas de laboratorio de los FDR seropositivos.

	n	Edad ^{†,‡}	Glucosa ^{‡,§}	Colesterol ^{‡,§}	Triglicéridos ^{‡,§}	HbA1c ^{‡,§}	Insulina ^{‡,§}	Péptido C ^{‡,§}
Hermanos	24	23.3±3.8	90.2±8.5 [¶]	173.5±32.6 [¶]	134.1±31 [¶]	5.18±0.7 [¶]	7.8±2.4 [¶]	2.08±1.03 [¶]
Hermanos	5	26±2.9	91.2±4.5	174.4±33.4	128.8±20.1	5.38±0.85	5.6±2.4	1.5±0.79
Hermanas	19	22.6±3.7	90±9.3	173.3±32.3	135.5±33.2	5.1±0.66	8.4±2	2.23±1.03
Hijos	10	22±8.3	90.7±7.5	171.1±35.1	142.5±54.5	5.13±0.57	6.3±2.3	1.6±0.78
Hijos	5	21.2±5.8	92.2±7.05	180.4±42.95	174.2±60.8	5.32±0.5	5.4±2.1	1.35±0.79
Hijas	5	22.8±10.2	89.2±7.65	161.8±21.1	110.8±15.2	4.94±0.5	7.2±2.2	1.85±0.68
Padres	8	45.7±5.1	93.7±7	198.3±31.9	160.1±28	5.3±0.66	9.7±2.6	2.72±0.91
Padres	3	46.6±0.9	96.3±6.3	216.6±30.9	157.6±10.4	5.1±0.89	9.6±2.5	3.19±0.78
Madres	5	45.2±6.4	92.2±6.9	187.4±27.1	161.6±34.4	5.4±0.43	9.8±2.75	2.45±0.88

†: años.

‡: media ± desviación estándar.

§: Rangos normales: glucosa (70-100 mg/dl), colesterol (50-200 mg/dl), triglicéridos (50-150 mg/dl), HbA1c (hemoglobina glicosilada A1c, 4-6%), insulina (5-14 IU/ml), Péptido C (0.56-3.73 nmol/l).

¶: Los valores fueron se obtuvieron de 19 hermanas y 4 hermanos que no mostraron síntomas de DM1 a lo largo del estudio.

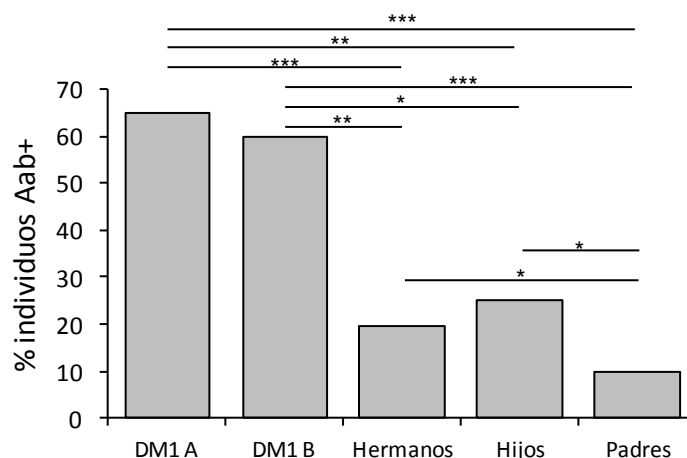


Figura 3. Porcentaje de pacientes con DM1 y familiares de primer grado sanos que presentan auto-anticuerpos frente a antígenos diabetogénicos. Porcentaje de pacientes con DM1 con 3 años o menos (DM1 A) o con más de 3 años de evolución de la enfermedad (DM1 B) y de familiares de pacientes con DM1 (hermanos, hijos y padres) que presentan seropositividad para los auto-anticuerpos (Aab) IAA, GADA y/o IA-2A. La estadística se realizó con el test de Fisher. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

6.3. Concentración de auto-anticuerpos en pacientes con DM1 y familiares sanos.

Los pacientes con DM1 evaluados presentaron una concentración media de anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2 significativamente superior a la de los FDR (Fig. 4, 5, 6). Con respecto a los FDR, el promedio de la concentración de auto-anticuerpos IAA e IA-2A no presentó diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con los grados de parentesco (Fig. 4 y 6), mientras que en los hermanos e hijos se detectaron niveles muy superiores de GADA con respecto a los padres (Fig. 5). No se encontraron diferencias significativas entre estos grupos de familiares con respecto a la media de la concentración de Ab anti-IA-2, aunque en el grupo de los hermanos tendió a ser más elevada con respecto al grupo de los padres y de los hijos.

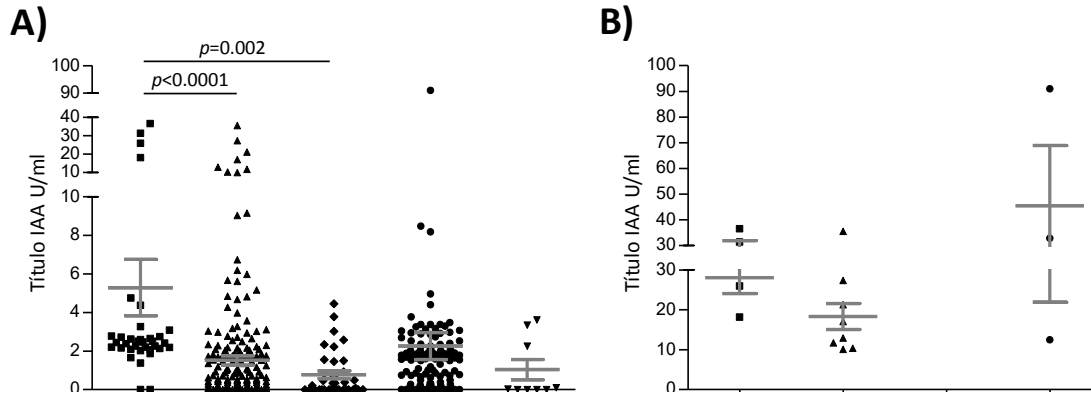


Figura 4. Concentración de anticuerpos anti-insulina en pacientes con DM1 y familiares de primer grado. La concentración de anticuerpos anti-insulina (U/ml) se evaluó por ELISA en 35 pacientes con DM1, 425 familiares (234 hermanos, 40 hijos y 151 padres) y 10 controles sanos. Cada símbolo representa el resultado de un individuo, y en color gris se muestra la media \pm SEM de los grupos de valores. Se muestran los valores de IAA obtenidos en todos los individuos evaluados (A) y en los sujetos IAA+ (B). La estadística se realizó con la prueba *t* de Student, y el valor de las *p* entre los grupos de familiares y pacientes se representa en la gráfica.

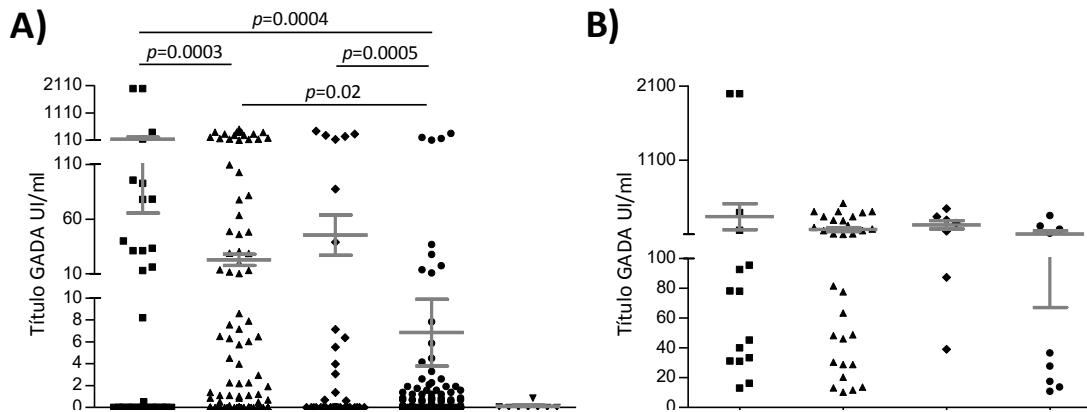


Figura 5. Concentración de anticuerpos anti-GAD65 en pacientes con DM1 y familiares de primer grado. La concentración de anticuerpos anti-GAD65 (UI/ml) se evaluó por ELISA en 35 pacientes con DM1, 425 familiares (234 hermanos, 40 hijos y 151 padres) y 10 controles sanos. Cada símbolo representa el resultado de un individuo, y en color gris se muestra la media \pm SEM de los grupos de valores. Se muestran los valores de GADA obtenidos en todos los individuos evaluados (A) y en los sujetos GADA+ (B). La estadística se realizó con la prueba *t* de Student, y el valor de las *p* entre los grupos de familiares y pacientes se muestra en la gráfica.

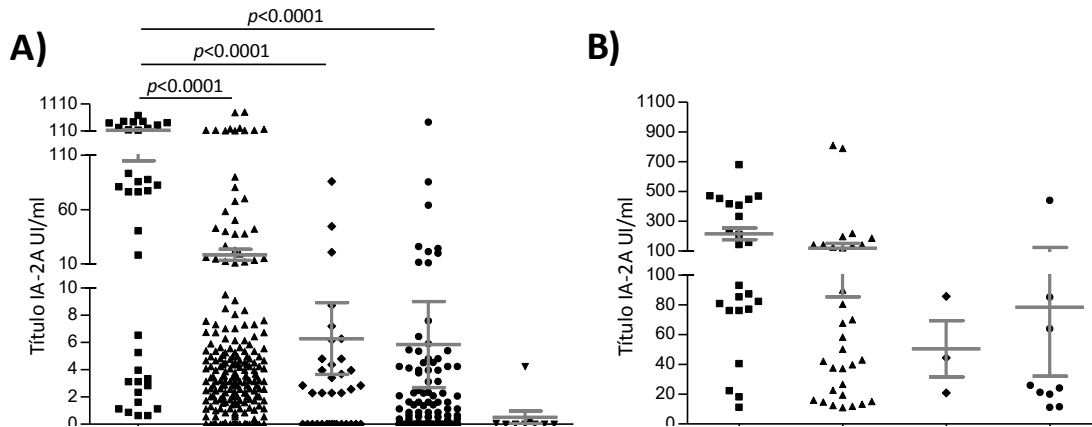


Figura 6. Concentración de anticuerpos anti-IA-2 en pacientes con DM1 y familiares de primer grado. La concentración de anticuerpos anti-IA-2 (UI/ml) se evaluó por ELISA en 35 pacientes con DM1, 425 familiares (234 hermanos, 40 hijos y 151 padres) y 10 controles sanos. Cada símbolo representa el resultado de un individuo, y en color gris se muestra la media \pm SEM de los grupos de valores. Se muestran los valores de IA-2A obtenidos en todos los individuos evaluados (A) y en los sujetos IA-2A+ (B). La estadística se realizó con la prueba *t* de Student, y el valor de las *p* entre los grupos de familiares y pacientes se muestra en la gráfica.

6.4. Detección de auto-anticuerpos en familiares de primer grado de pacientes con DM1.

Los títulos de GADA fueron significativamente más altos que los observados para IAA e IA-2A en los FDR que presentaron auto-anticuerpos, mientras que los IAA se detectaron con los títulos más bajos (Fig. 7B). Cuarenta y tres (61.4%) de los 70 FDR seropositivos presentaron títulos de auto-anticuerpos por encima de las 50 IU(U)/ml.

En ninguno de los FDR se observó la presencia de los tres auto-anticuerpos; en un grupo de FDR se detectó la presencia de uno (54.2%) o dos auto-anticuerpos simultáneamente (45.7%) (Fig. 7C). Los GADA fueron los auto-anticuerpos más prevalentes cuando los FDR presentaron un único auto-anticuerpo (51.2%, $n=20$), seguidos de los IA-2A (38.4%, $n=15$) y de los IAA (7.6%, $n=3$) (Fig. 7D). Esta distribución se mantuvo en el grupo de hermanos (Fig. 8). Los hijos de los pacientes con DM1 presentaron la mayor prevalencia de GADA (75%, $n=6$), y ninguno fue positivo para IAA (Fig. 8). El grupo de padres mostró una distribución de auto-anticuerpos ligeramente diferente, y no presentaron prevalencia de GADA sobre IA-2A (44.4% positivos para cada auto-anticuerpo $n=4$) (Fig. 8).

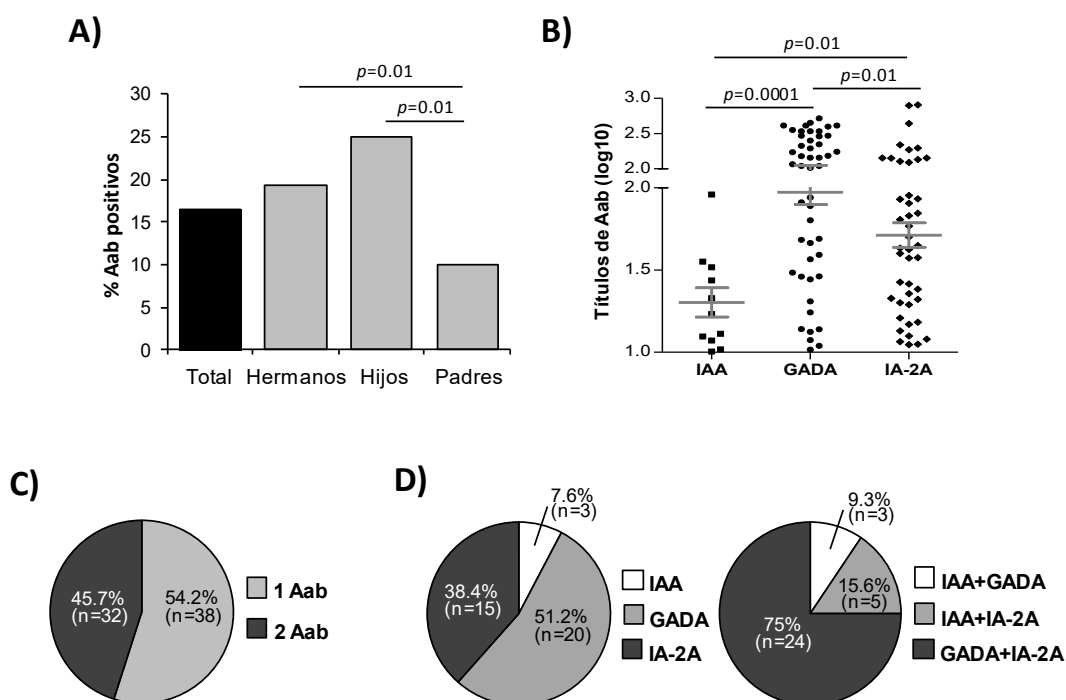


Figura 7. Los auto-anticuerpos anti-GAD65 son los de mayor prevalencia entre los familiares de pacientes con DM1. A) Prevalencia (%) de auto-anticuerpos en familiares de primer grado de pacientes con DM1. B) Títulos de IAA, GADA e IA-2A en 425 familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1, expresados en valores logarítmicos. Se muestran los títulos obtenidos en los 70 familiares seropositivos detectados. C) Prevalencia (%) de familiares positivos para 1 o 2 auto-anticuerpos. D) Distribución de los Aab IAA, GADA e IA-2A (%) entre los familiares que presentan 1 (izquierda) o 2 (derecha) auto-anticuerpos. La estadística en A) se realizó mediante la prueba de Fisher y en B) mediante la prueba *t* de Student.

La combinación GADA+IA-2A fue la más prevalente entre los FDR que presentaron dos auto-anticuerpos (75%, n=24), seguida de IAA+IA-2A (15.6%, n=5) y de IAA+GADA (9.4%, n=3) (Fig. 7D). Las pruebas de laboratorio resultaron similares entre los FDR positivos para uno o dos auto-anticuerpos, con la excepción de los niveles de colesterol cuya media se presentó incrementada en los FDR positivos para 2 auto-anticuerpos (165±35 vs 193±27 mg/dl, p=0.007).

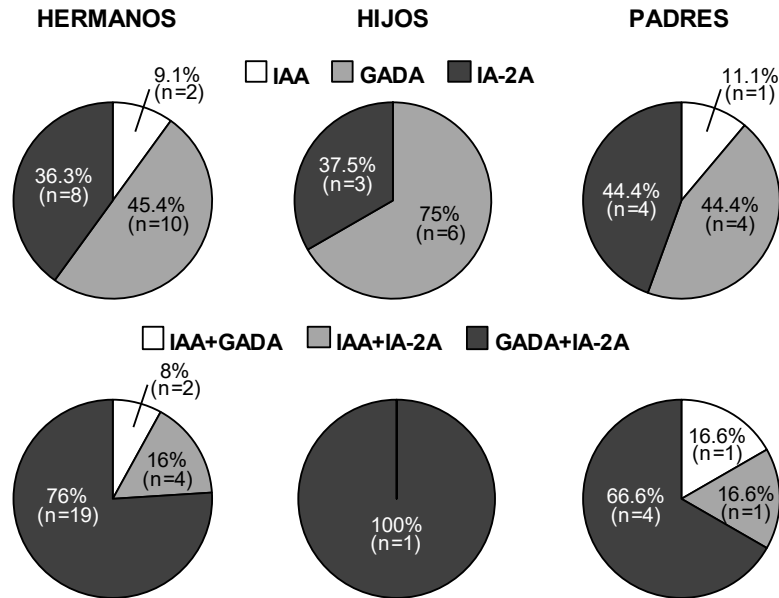


Figura 8. Prevalencia de auto-anticuerpos en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1 estratificados por grado de parentesco. Porcentaje de familiares que presentaron auto-anticuerpos (Aab) en diferentes combinaciones (1 Aab –panel superior–, 2 Aab –panel inferior–) en hermanos, hijos y padres de pacientes con DM1.

6.5. La prevalencia de auto-anticuerpos es mayor en los familiares del género femenino.

Cincuenta y uno de los 70 FDR que presentaron auto-anticuerpos fueron del sexo femenino, lo que representa alrededor del 18.9% de las mujeres reclutadas para el estudio, mientras que la frecuencia de hombres seropositivos fue del 12.8% (Fig. 9A, panel izquierdo). El grupo de hermanos presentó las diferencias de género más evidentes: 24.3% de las hermanas evaluadas presentaron auto-anticuerpos, frente al 11.1% de los hermanos ($p=0.01$). Las diferencias de género no se observaron en el grupo de hijos y en el de padres (Fig. 9A, panel derecho). Las frecuencias de IAA, GADA e IA-2A, así como los títulos de GADA e IA-2A, tendieron a ser mayores en las mujeres, aunque las diferencias no fueron significativas con respecto a los hombres evaluados (Fig. 9B panel izquierdo, Fig. 9C). De manera interesante, la positividad para 2 auto-anticuerpos fue más frecuente en las mujeres que en los hombres ($p=0.03$), mientras que el porcentaje de FDR positivos para 1 auto-anticuerpo fue similar en los hombres y en las mujeres (Fig. 9B, panel derecho). Los títulos de auto-anticuerpos fueron análogos en ambos géneros. En conjunto, estos datos sugieren

que los familiares del género femenino de los pacientes con DM1 mexicanos podrían ser considerados de mayor riesgo para desarrollar diabetes que los del género masculino.

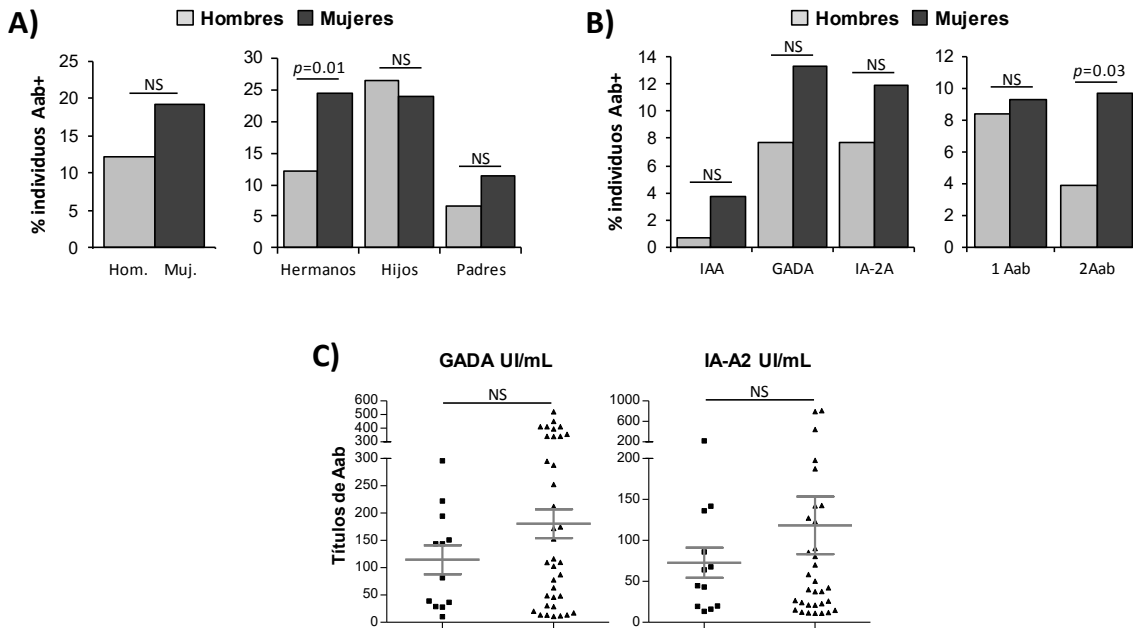


Figura 9. Los familiares de pacientes con DM1 de sexo femenino muestran una mayor prevalencia de auto-anticuerpos. A) Porcentaje de FDR positivos para auto-anticuerpos (Aab+) estratificados por género (izquierda, 155 hombres y 270 mujeres evaluadas) y estratificados por género y grado de parentesco (derecha). En la gráfica de la derecha los porcentajes se calcularon considerando como 100% el número de hombres y mujeres analizados en cada grupo: hermanos, 90 hombres y 144 mujeres; hijos, 19 hombres y 21 mujeres; padres, 46 hombres y 105 mujeres. B) Porcentaje de FDR Aab+ estratificados por género y tipo de Aab (izquierda) y por género y número de Aab detectados (derecha). Los porcentajes se calcularon considerando como 100% los 155 hombres y 270 mujeres analizadas. C) Títulos de los Aab GADA e IA-2A en FDR Aab+ separados por género. No se representan los datos de IAA porque sólo se detectó un hombre IAA+. La estadística en A) se realizó con la prueba de Fisher y en B) con la prueba *t* de Student. NS: no significativo.

6.6. Distribución de auto-anticuerpos por grupos de edad.

La positividad para auto-anticuerpos tuvo una distribución irregular dependiendo de los grupos de edad de los FDR. El grado mayor de prevalencia con 24.7% y 19.3% se presentó en los individuos entre 21-30 años ($n=77$) y entre 11-20 años ($n=150$), respectivamente (Fig. 10A). La prevalencia más baja se observó en el grupo entre 0-10 años (7.1%, $n=42$) y en el de 31-40 años (10%, $n=70$) (Fig. 10A). Sorprendentemente, el grupo de >50 años presenta

una alta frecuencia de positividad para auto-anticuerpos (~18%), pero el número de sujetos evaluado fue bajo (n=11) y no se pudieron detectar diferencias significativas con respecto a otros grupos de edad (Fig. 10A).

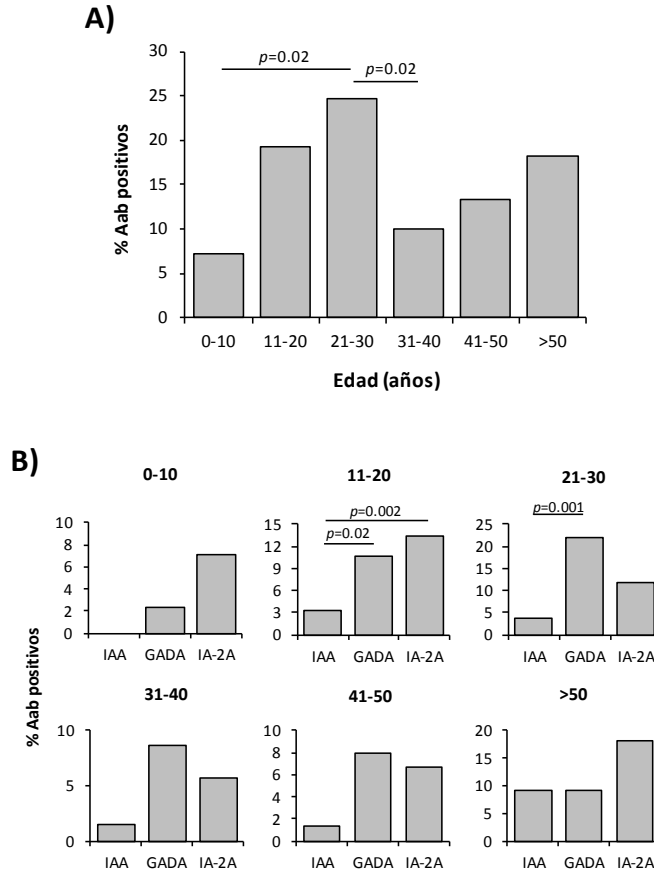


Figura 10. Los familiares de pacientes con DM1 presentan la mayor prevalencia de auto-anticuerpos en el grupo de 11-30 años de edad. A) Porcentaje de FDR positivos para auto-anticuerpos (Aab+) estratificados por los grupos de edad indicados. B) Porcentaje de FDR IAA+, GADA e IA-2A+ estratificados por los grupos de edad indicados. La estadística se realizó con la prueba de Fisher. Se muestran los valores de p de las comparaciones con diferencias significativas.

Los grupos de edad de 21-30 y de 31-40 años presentaron el mismo perfil de auto-anticuerpos. Los individuos de estos grupos mostraron una mayor frecuencia de GADA, seguido de IA-2A y de IAA (Fig. 10B). En contraste, los grupos de menor y de mayor edad (0-10 y >50 años) tuvieron una mayor prevalencia de IA-2A (Fig. 10B). Finalmente, los grupos de 11-20 y 41-50 años presentaron una alta frecuencia de GADA e IA-2A, que fue significativamente diferente a la frecuencia de IAA in en el primer grupo (Fig. 10B).

7. DISCUSIÓN

Con base a los resultados recabados en este estudio, los auto-anticuerpos detectados en FDR en nuestro país han superado los establecidos en otros estudios internacionales. En México se logró detectar hasta un 16.6% de auto-anticuerpos en FDR, estudios reportados por ejemplo en Cerdeña en quien la incidencia de la diabetes mellitus tipo 1 se encuentra entre las más altas del mundo, reportan positividad para anticuerpos en FDR de un 11.8%. comparados con, Finlandia (otro país de muy alta prevalencia de T1DM) 8.1% en Brasil, 4.6% en USA/Canadá. (44)

La prevalencia de autoanticuerpos en FDR de pacientes con DM1 en población mexicana fue muy alta (16.6%), más alta que en otras poblaciones de los Estados Unidos y Europa, incluso más alta que en población con alta prevalencia como Cerdeña y Finlandia.

Este estudio proporciona evidencia de alto riesgo de Diabetes Mellitus tipo 1 en FDR de pacientes con T1DM y proporciona las bases para el seguimiento longitudinal para estimar el riesgo de progresión a DM1 en poblaciones de alto riesgo.

La concentración de auto-anticuerpos IAA e IA-2A no presentó diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con los grados de parentesco, mientras que en los hermanos e hijos se detectaron niveles muy superiores de GADA con respecto a los padres. Con base en este estudio GADA se interpreta como el autoanticuerpo más sensible aunque es bien conocida su baja especificidad.

Con base en este estudio, el autoanticuerpo GADA es el que con mayor frecuencia se encuentra en familiares sanos, IAA se detectaron con los títulos más bajos.

En este estudio se evaluaron 35 pacientes con DM1, de los cuales 20 tenían 3 años o menos de evolución de la enfermedad y 15 contaban con más de 3 años de evolución. La comparación de la concentración de auto-anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2 entre los dos grupos de pacientes no arrojó diferencias significativas, por lo que con base en este estudio la evolución de la enfermedad no determina la concentración de auto anticuerpos.

Los pacientes con DM1 evaluados presentaron una concentración media de anticuerpos anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2 significativamente superior a la de los FDR, por lo que con base a este estudio, el diagnóstico establecido de DM1 es proporcional a la concentración de autoanticuerpos.

8. CONCLUSIONES

Gracias al estudio se logró detectar la seropositividad para algún auto-anticuerpo para el diagnóstico temprano de la diabetes mellitus de tipo 1, en familiares sanos con esta enfermedad, En ninguno de los familiares sanos, se observó la presencia de los tres auto-anticuerpos; en un grupo se detectó la presencia de uno (54.2%) o dos auto-anticuerpos simultáneamente (45.7%). Los GADA fueron los auto-anticuerpos más prevalentes cuando los familiares presentaron un único auto-anticuerpo, y la combinación GADA/IA-2A fue la más prevalente en los FDR que presentaron dos auto-anticuerpos.

En conclusión, este estudio proporciona evidencia de que hay una alta prevalencia de autoanticuerpos en FDR en población mexicana, comparadas con países de alta prevalencia de DM1, la detección oportuna de estos auto-anticuerpos más el seguimiento longitudinal de los pacientes identificados, sentará las bases de un estudio epidemiológico intencionado a intervenir sobre la identificación temprana de la enfermedad con anterioridad a la aparición de las manifestaciones clínicas, así como para dar consejo médico oportuno.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Gianani R, Eisenbarth GS. 2005. The stages of type 1A diabetes: *Immunol. Rev.* 204: 232-49.
2. Martin S, Pawlowski B, Greulich B, *et al.* 1992. Natural course of remission in IDDM during 1st yr after diagnosis. *Diabetes Care* 15: 66-74.
3. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G. 2007. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes* 8: 6-14.
4. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. 2012. World Health Organization. In *Diabetes*.
5. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. 2012. Anuarios de Morbilidad Epidemiologica. In *Salud Gobierno Federal*. CENAVECE, ed, Mexico.
6. Noble JA, Erlich HA. 2012. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a007732.
7. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91: 79-118.
8. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, *et al.* 2006. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 14074-9.
9. van der Werf N, Kroese FG, Rozing J *et al.* 2007. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23: 169-83.
10. Virtanen SM, Knip M. 2003. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 1053-67.
11. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, *et al.* 2009. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 155: 173-81.
12. Ou D, Jonsen LA, Metzger DL, *et al.* 1999. CD4+ and CD8+ T-cell clones from congenital rubella syndrome patients with IDDM recognize overlapping GAD65 protein epitopes. Implications for HLA class I and II allelic linkage to disease susceptibility. *Hum. Immunol.* 1999 60: 652-64.
13. Knip M, Siljander H. 2008. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 7: 550-7.

14. Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, *et al.* 2013. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia* 56: 1773-80.
15. Palmer JL. 2009. C-peptide in the natural history of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25: 325-8.
16. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, *et al.* 2005. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial - Type 1. *Diabetes Care* 28: 1068-76.
17. Roep BO. 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 46: 305-21.
18. Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. 2007. Translational mini-review series on type 1 diabetes: systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 148: 1-16.
19. Kikutani H, Makino S. 1992. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.* 51: 285-322.
20. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, *et al.* 1987. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J. Exp. Med.* 166: 823-32.
21. Lampeter EF, McCann SR, Kolb H. 1998. Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet.* 351: 568-569.
22. Shizuru JA, Taylor-Edwards C, *et al.* 1988. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 240: 659-62.
23. Wang B, Gonzalez A, Benoist C, *et al.* 1996. The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Immunol.* 26: 1762-69.
24. Rabinovitch A. 1994. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43: 613-21.
25. Anderson MS, Bluestone JA. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev Immunol.* 23: 447-85.
26. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, *et al.* 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-9.

27. Knip M, Siljander H, Ilonen J, *et al.* 2016: Role of humoral beta-cell autoimmunity in type 1 diabetes. *Pediat. Diab.* 17 (Suppl. 22): 17-24.
28. Knip M. 2002. Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes Care* 25: 623-5.
29. Siljander H, Veijola R, Reunanen A, *et al.* 2007. Prediction of type 1 diabetes among siblings of affected children and in the general population. *Diabetologia* 50:2272-5.
30. Colman PG, McNair PD, Gellert S, *et al.* 2002. Development of autoantibodies to islet antigens during childhood: implications for preclinical type 1 diabetes screening. *Pediatr. Diabetes* 3: 144-8.
31. Eskola V, Vähäsalo P, Akerblom HK, *et al.* 2003. Increased frequency of islet cell antibodies in unaffected brothers of children with type 1 diabetes. *Horm. Res.* 59: 195-200.
32. Dittler J, Seidel D, Schenker M, *et al.* 1998. GADIA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes* 47: 592-7.
33. Bonifacio E, Lampasona V, Bernasconi L, *et al.* 2000. Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes* 49: 202-8.
34. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, *et al.* 2004. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53: 384-92.
35. Hoppu S, Härkönen T, Ronkainen MS, *et al.* 2004. IA-2 antibody epitopes and isotypes during the prediabetic process in siblings of children with type 1 diabetes. *J. Autoimmun.* 23:361-70.
36. Siljander HT, Veijola R, Reunanen A, *et al.* 2007. Prediction of type 1 diabetes among siblings of affected children and in the general population. *Diabetologia* 50:2272-75.
37. Incani Serafini C, Satta C, *et al.* 2017. High prevalence of diabetes-specific autoimmunity in first-degree relatives of Sardinian patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 33:e2864.
38. Alves LI, Davini E, Correia MR, *et al.* 2012. Autoantibodies and high-risk HLA susceptibility markers in first-degree relatives of Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus: a progression to disease based study. *J. Clin. Immunol.* 32:778-85.

39. Yu L, Cuthbertson DD, Eisenbarth GS, *et al.* 2002. Diabetes Prevention Trial 1: prevalence of GAD and ICA512 (IA-2) autoantibodies by relationship to proband. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 958:254-8.
40. Asociación Médica Mundial (AMM). Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18ª. Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964. Última enmienda por la 64ª. Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013. Revisada mayo 2015.
41. Asociación Médica Mundial (AMM). Manual de Ética Médica. Cap. 5: La ética y la investigación Médica. Pás 94 – 111. 3ª. Edición, 2015.
42. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos. Aprobada por aclamación por la 33ª. Sesión de la Conferencia General de la UNESCO, octubre 2005.
43. Secretaría de Salud, México. Reglamento de la Ley General de salud en Materia de Investigación para la Salud. México, 1983.
44. Incani M, Serafini M, Et Al. High prevalence of diabetes-specific autoimmunity in first-degree relatives of Sardinian patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017;33:e2864.