



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GOMEZ"

237
al Hospital
70
2 ej



Detección de Anticuerpos Anti-Insulares en Niños Mexicanos con Diabétes Millitus Tipo I

TESIS DE POSGRADO QUE PARA OBTENER EL TITULO DE PEDIATRIA MEDICA

PRESENTA Dr. Roberto Jirón Castro



ASOCIACION DE ENSEÑANZA

asesor: Dr. Pedro Valencia Mayoral



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-INSULARES EN
NIÑOS MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO I

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

PEDIATRIA MEDICA

PRESENTA

DR. ROBERTO JIRON CASTRO

ASESOR

DR. PEDRO VALENCIA MAYORAL

CO-ASESOR

DR. LUIS M. DORANTES ALVAREZ

COLABORADOR

DR. MARTIN MARTINEZ

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO

“ FEDERICO GOMEZ “

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-INSULARES EN

NIÑOS CON DIABETES MELLITUS TIPO I

REALIZADO POR : DR. ROBERTO JIRON CASTRO

TUTOR : DR. PEDRO VALENCIA MAYORAL

DR. LUIS M. DORANTES ALVAREZ

" A MIS PADRES "

QUE FRENTE A LA ADVERSIDAD , EL EXILIO , HAN MANTENIDO SIEMPRE LA PERSPECTIVA DE LA VIDA Y ME HAN ENSEÑADO CON SU EJEMPLO A TENER FE, PERSEVERANCIA , Y CONTINUIDAD , PARA ELLOS MI ETERNO AGRADECIMIENTO.

" A MIS HERMANOS"

QUE EN TODO MOMENTO A PESAR DE LA DISTANCIA ESTUVIERON CONMIGO Y CREYERON EN ESTE PROYECTO .

" A TI SELENE "

POR QUE SIEMPRE ENCONTRE EN TI UNA SONRISA , PACIENCIA , Y AMOR .

"A USTED DR VALENCIA "

POR HABERME DEDICADO TIEMPO , DENTRO DE SUS LARGAS JORNADAS DE TRABAJO.

" A TI MEXICO "

QUE ATRAVES DE ESTOS AÑOS ME HAS DADO LA OPORTUNIDAD DE CONOCER A TU GENTE , Y FORMAR DENTRO DE GRANDES INSTITUCIONES MI PROFESION .

INDICE

INTRODUCCION	1
ETIOPATOGENIA	6
ANTECEDENTES	10
EPIDEMIOLOGIA	15
DISTRIBUCION DE LOS ANTICUERPOS.....	18
JUSTIFICACION	20
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y METODO	23
RESULTADOS	28
DISCUSION	30
BIBLIOGRAFIA	35

INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus es un síndrome caracterizado por alteración en la homeostásis energética, causado por deficiencia absoluta o relativa de insulina y sus acciones, y que da como resultado un metabolismo anormal en hidratos de carbono, proteínas, y lípidos, es el trastorno endócrino-metabólico más frecuente en niños y adolescentes (1,2). La morbilidad y la mortalidad depende de los cambios metabólicos y de las complicaciones que a largo plazo afectan los pequeños y grandes vasos, y cuya consecuencias pueden dar como resultado retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedad isquémica del corazón y taponamiento arterial (3,4). La diabetes mellitus no es una enfermedad única, sino un grupo de alteraciones con un patrón genético diferente y mecanismos fisiopatológicos diversos que conducen a deficiencia en la tolerancia a la glucosa (4).

En el año de 1978, un grupo internacional llamado International Data Group (NDDG) crearon una nomenclatura uniforme para la comunidad científica (5), clasificando a la diabetes de la siguiente manera :

Diabetes Mellitus

- a) Diabetes Insulino Dependiente (Tipo I)
- b) Diabetes No Insulino Dependiente (Tipo II)
- c) Otros tipos

Intolerancia Parcial a la Glucosa

Diabetes Gestacional

La diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) insulino-dependiente se manifiesta por una insulinopenia severa y dependencia al aporte exógeno de insulina para prevenir la cetosis. La historia natural de la enfermedad indica que existen fases de precetosis y no insulinodependencia, antes y después de efectuado el diagnóstico (6). La Tipo 1 se diferencia claramente por su asociación con frecuencia a determinados haplotipos del sistema HLA, presencia de anticuerpos contra el citoplasma y componentes de la superficie de las células de los islotes (enzima ácido glutámico descarboxilasa), anticuerpos contra la insulina, y una infiltración linfocítica de los islotes en la fase temprana de la enfermedad (4,6,7) La edad de aparición de los primeros síntomas se sitúa generalmente entre los 7 y 15 años siendo su mayor incidencia en la adolescencia (8), aunque es posible descubrir una diabetes desde los primeros días de vida . La mayoría de los niños se presentan con una historia de poliuria, polidipsia, y pérdida de peso, estos síntomas pueden estar presentes por días o semanas, pero aproximadamente en la mitad de los niños la duración es menor a un mes (4). La poliuria es secundaria a la diuresis osmótica ocasionada por glucosuria ; a veces se manifiesta como nicturia o incluso como enuresis secundaria . La pérdida de peso se produce por aumento del catabolismo (6), a diferencia del adulto la polifagia no suele ser tan marcada , y es mas frecuente la anorexia secundaria a cetosis. La astenia, disminución del rendimiento escolar y las alteraciones del comportamiento son síntomas llamativos. La tendencia a los vómitos no es rara, y las infecciones de la piel aunque poco comunes en ocasiones pueden presentarse como moniliasis vaginal en niñas adolescentes (4,6) .

A menudo el comienzo es brusco, en forma de un coma cetoacidótico, en algunas partes del mundo entre 1970 y 1980 hasta un 65% los niños diabéticos fueron diagnosticados al presentar un cuadro de cetoacidosis (4), y en años recientes este porcentaje se ha reducido a rangos de 10 y 30%, lo que indica que actualmente se hace un diagnóstico más precoz por mejor educación sanitaria. El dolor abdominal con leucocitosis, puede simular una apendicitis, es común en niños y en ocasiones puede asociarse con elevación de la amilasa sérica pero no necesariamente indica la existencia de pancreatitis (6).

En la diabetes mellitus tipo II (DM II), conocida como diabetes de inicio en la edad adulta, habitualmente no existe insulino-dependencia y es poco propensa al desarrollo de cetosis; sin embargo algunos pacientes llegan a requerir insulina para la corrección de la hiperglucemia, y cuando se presenta cetosis es bajo algunas circunstancias, como episodios de infección o estrés (4). En la mayoría de los casos el inicio es después de los 40 años, pero la DM II se sabe que puede ocurrir en todas las edades, incluyendo la pediátrica. Hasta un 60 a 90% de los sujetos son obesos. Esta forma de diabetes se manifiesta como una tolerancia anormal a hidratos de carbono, y resistencia a la insulina, aún cuando estos sujetos secretan cantidades considerables de insulina (4). Es importante señalar que no existen datos estadísticamente significativos que asocien este tipo de diabetes con el sistema HLA, autoinmunidad o anticuerpos anti-isletos (4).

En diversos estudios se ha encontrado una prevalencia de anticuerpos contra las células beta que varía entre 2 y 27% en pacientes con DM II (9), ésta es mayor a la encontrada en grupos no diabéticos, pero es considerablemente menor a la existente entre enfermos con DM I (9). Existe evidencia que demuestra que algunos pacientes con diabetes no insulino dependiente con anticuerpos contra el islóte pancreático tienen otras enfermedades asociadas (10).

Entre el grupo clasificado como "otros" se incluyen a la diabetes secundaria a entidades específicas, ejemplos son ; diabetes secundaria a enfermedades pancreáticas, como fibrosis quística o pancreatoclectomía, diabetes secundaria a enfermedades endócrinas como síndrome de Cushing, y diabetes secundaria a la administración de algunas drogas (4,6).

La intolerancia parcial a la glucosa, entidad conocida anteriormente como diabetes asintomática, diabetes química, diabetes subclínica, diabetes limitrofe o diabetes latente, puede representar un estado intermedio entre la DM I o DM 2, pero pocos de estos individuos desarrollan una diabetes verdadera (4).

La diabetes gestacional es una entidad que aparece de "novo" durante el embarazo en una mujer no previamente diabética y que habitualmente desaparece poco después del parto , es un proceso secundario , que se debe fundamentalmente al aumento en la resistencia periférica a la insulina como respuesta al aumento en sangre de sustancias de conocida acción anti-insulina. Freinkel y Metzger reportaron una prevalencia de anticuerpos anticitoplasmáticos contra las células beta de 11.3% entre 52 mujeres con diabetes gestacional, comparado contra 1.7 % de mujeres embarazadas normoglucémicas (11). Se considera que la presencia de estos anticuerpos en la diabetes gestacional representan sólo un grado del daño pancreático ya existente, y que el embarazo "per se" puede acelerar el desarrollo de diabetes en mujeres susceptibles (9).

ETIOPATOGENIA

Los factores que pueden desencadenar a la DM 1 son múltiples, actualmente se denominan "factores de agresión al medio ambiente " y entre ellos se encuentran algunas infecciones virales, como parotiditis, rubeola o por coxackie virus (12), éstos virus pueden actuar directamente sobre las células beta como una infección leve persistente que desencadena una respuesta inmunológica anormal y que paulatinamente va ocasionando una lesión pancreática con disminución consecuente en su capacidad de producir insulina (13 ,14,15). Los virus han recibido mucha atención, se ha demostrado en pancreas de pacientes fallecidos durante los primeros 6 meses de la enfermedad la presencia de una infiltración linfocitaria y alteraciones histológicas calificadas de "insulitis" (7); pero la existencia de una fase preclínica prolongada, de años, en la que aparecen anticuerpos anticélulas beta y la reducción progresiva de la capacidad de producir insulina (16) hace poco probable que el inicio de la enfermedad pueda atribuirse a una infección vírica aguda y citolítica de las células beta del páncreas , es probable que, las infecciones víricas sean desencadenantes de una situación metabólica ya inestable (6,17) .

Hasta ahora existe poca evidencia que asocie la prevalencia de anticuerpos anti-islole y la exposición a infecciones (18-20), de cualquier manera la teoría de que los virus puedan jugar un papel etiológico en la diabetes insulino-dependiente, con los anticuerpos anti-isloles como sus marcadores de inmunidad, continúa siendo importante.

Se han desarrollado modelos experimentales en los que se plantean los mecanismos hereditarios en esta enfermedad (21) aunque hasta el momento existe gran controversia relacionada al modo de transmisión de la DM 1 (22), se describe predisposición familiar pero no es tan estrecha como en la diabetes del adulto (6), sólo 10 % de los pacientes con DM 1 tienen familiares en primer grado afectados por la misma enfermedad (23 y 24). La predisposición esta relacionada con ciertos antígenos de histocompatibilidad del sistema HLA (25,26), y se ha encontrado que existe una asociación claramente positiva entre la DM 1 con los antígenos HLA-DR3 y DR4 y que la presencia simultánea de éstos dos antígenos tienen efecto aditivo (4,6). Por lo menos 90% de los pacientes blancos con DM 1 son DR3 o DR4 o DR3/DR4 positivo y el riesgo que tienen las personas DR3 /DR4 de padecer DM 1 es superior al de la población general. El riesgo de hermanos de un niño diabético de padecer la enfermedad depende de si comparten o no los mismos antígenos del sistema HLA (6), en cambio, los antígenos DR1, DR2 y en un grado menor DR5 parecen proteger contra el padecimiento (27).

El mecanismo mediante el cual los antígenos DR3 y DR4 facilitan la aparición de la DM 1 no está totalmente aclarado, las técnicas de restricción genética muestran que, en las personas con estos antígenos, existe en el cromosoma 6 un alelo especial en la cadena DQ B ; éste difiere del alelo común en que le falta un residuo aspártico en la posición 57 ; la ausencia de ácido aspártico en ambos alelos confiere riesgo de padecer DM 1 (6,28).

Con el progreso de la medicina se conocen mejor algunos de los mecanismos inmunológicos directamente relacionados con el desarrollo de este tipo de diabetes (29,30,31) y desde hace varios años ha existido gran interés por conocer la forma como estos mecanismos participan en la génesis de la enfermedad. El papel patogénico de la autoinmunidad se apoya en diversas pruebas de laboratorio como la inhibición de la migración de leucocitos, la transformación de linfocitos, que indican la sensibilización de linfocitos de diabéticos frente a antígenos pancreáticos (32). Gepts y cols demostraron una infiltración de los islotes de Langerhans por linfocitos en la fase temprana de la diabetes , además de que conforme progresaba la enfermedad desaparecían las células beta mientras que los islotes se hacían pequeños y atróficos (7).

Los mecanismos que llevan a la falla de estas células beta se han fundamentado en una teoría de destrucción autoinmune, y en diferentes estudios se ha confirmado la alta prevalencia de diabetes insulino-dependiente en personas con enfermedad de Addison, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, entidades en quienes la autoinmunidad se conoce dentro de su patogenia (33).

El conocimiento sobre autoanticuerpos que actúan contra las células beta ha mejorado el entendimiento etiológico de la enfermedad, previo a este descubrimiento se consideraba que la DM 1 iniciaba en forma abrupta, asociada a daño agudo del páncreas, pero la persistencia prolongada de los autoanticuerpos como respuesta inmune, pone en evidencia que la diabetes es un proceso de destrucción lento, con deterioro gradual a la tolerancia de la glucosa, y con una eventual y aguda hiperglucemia (34).

ANTECEDENTES

En 1974 dos grupos, Bottazzo y MacCuish con sus colaboradores reportaron por primera vez la presencia de anticuerpos circulantes contra el islóte pancreático humano en enfermos con DM 1 asociada a múltiples trastornos endócrinos (35,36), y se determinó que los anticuerpos anti-islote formaban parte del grupo de lipoproteínas microsomales órgano-específico, y que todos pertenecían exclusivamente a la clase IgG. En 1975 Maclaren y cols describieron por inmunofluorescencia indirecta la presencia de anticuerpos contra el islóte pancreático en una población exclusivamente con DM 1 (37). Se han reconocido a los diferentes autoanticuerpos como constituyentes proteicos producidos por las células beta (anticuerpos contra la insulina), y anticuerpos dirigidos contra proteínas de la membrana o el citoplasma de las células (9,35,36 ,37). Boehmn y cols detectaron dos antígenos por medio de la técnica de Western blot ; uno de estos mostró ser el blanco hacia el cual se dirigen los anticuerpos anti-citoplasma, se identificaron uno con peso molecular menor a 40,000 y el otro de 80,000-100,000 Kda (38).

Los anticuerpos que actúan contra la superficie de las células beta son funcional y estructuralmente diferentes a los dirigidos contra el citoplasma (9), con técnicas que utilizan anticuerpos monoclonales ha sido posible identificar a los anticuerpos antisuperficie como clase IgG e Ig M (39,42), y el blanco hacia el cual actúan éstos anticuerpos se identificó como una proteína con peso molecular de 64,000 kda, presente exclusivamente en las células beta y que en forma reciente se ha descrito como la enzima ácido glutámico descarboxilasa (43-45).

Gracias al mejor conocimiento sobre los autoanticuerpos ha sido posible confirmar su aparición antes de el inicio clínico de la enfermedad (4,6,9,16) y en base a éstos resultados se estima que la destrucción de las células beta es progresiva y se desarrolla a través de varios años (9,16). Hasta 80-90% de los pacientes con reciente diagnóstico de DM I tienen anticuerpos contra las células beta dirigidos a la superficie celular o a sus componentes citoplasmáticos (9, 37, 46-48); y su prevalencia disminuye con la progresión de la enfermedad (9). Es interesante la demostración que algunos investigadores han hecho en pacientes con DM 1 en quienes al realizar trasplante de páncreas reaparecen anticuerpos anti-islole en enfermos seronegativos previos al trasplante, estos hallazgos sugieren que la titulación de anticuerpos contra las células de los islotes desaparecen en la medida en que se destruye y se pierde la funcionalidad de las células beta y reaparecen al transplantar nuevos islotes (49).

El inicio de la destrucción de las células beta parece depender más de un mecanismo celular (células T citotóxicas y/o macrófagos) que de un mecanismo humoral (6) .En la respuesta inmune, además de activarse diversas células , se liberan factores solubles; linfoquinas o interleucinas, que actúan como un sistema endócrino que regula la respuesta inmune (6). Los anticuerpos anti-islole, aunque marcadores bien definidos de la enfermedad, parecen ser sólo testigos de ella, pero no su causa directa, aparecen en forma temprana, preceden, a veces durante muchos años al comienzo clínico de la enfermedad, son transitorios, y desaparecen conforme progresa la destrucción de las células beta (4,6,9,16) .

Los análisis inmunológicos que se utilizan para estudiar individuos en riesgo, identifican los diferentes autoanticuerpos. Ha sido difícil estandarizar los resultados de los métodos utilizados para detectar anticuerpos debido a la naturaleza de su procedimiento, en 1986 un grupo internacional propuso la estandarización de los anticuerpos en unidades JDF (Juvenile Diabetes Fundation) (50), y se determinó que los títulos altos de anticuerpos anti-islole (mayores a 80 JDF) confieren mayor riesgo de desarrollar DM 1 que títulos bajos (menor a 20 JDF) . Existe controversia en relación al sustrato que se utiliza, ya que el páncreas humano varía considerablemente en su antigenicidad (9).

En los primeros reportes sobre la existencia de anticuerpos contra las células beta se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (35,36), y hasta hoy éste procedimiento prevalece como prueba convencional (9), aunque se reconoce por todos los investigadores que su interpretación sigue siendo difícil ya que existen variabilidades importantes en el páncreas utilizado (51,52). Se han practicado diferentes modificaciones a ésta técnica, pero debido a que siempre se utiliza como sustrato páncreas humano, se tienen las mismas limitaciones que la prueba convencional (53,54).

Otros marcadores inmunológicos conocidos son los autoanticuerpos contra la insulina y los que actúan contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa. Por varios años los anticuerpos anti-insulina se han cuantificado por radioinmunoanálisis en fase líquida (RIA) y por el método de ELISA, con resultados controvertidos (55), y en acuerdo general se acepta que los anticuerpos contra la insulina encontrados en pacientes con DM 1 de reciente diagnóstico y en prediabéticos, únicamente pueden ser detectados en forma confiable por el método de RIA (55).

Los anticuerpos que actúan contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa según algunos investigadores son más confiables y tienen mayor poder predictivo (56), sin embargo el análisis para cuantificar éstos anticuerpos es complicado, y técnicamente difícil, como consecuencia sólo pocos investigadores están en capacidad para realizar esta prueba, además debe recordarse que estos anticuerpos se han detectado con más frecuencia en poblaciones no diabéticas, lo que disminuye su especificidad (9).

Los autoanticuerpos anti-isletos han sido utilizados con fines predictivos, en familiares en primer grado, no diabéticos, de pacientes con DM 1, el riesgo de desarrollar la enfermedad es mayor si tienen ambos auto-anticuerpos, anti células beta y anti-insulina, que aquéllos únicamente positivos para anticuerpos anticélulas beta (57) e igual que los anticuerpos anticélulas beta, los anti-insulina sólo con valores altos confieren mayor riesgo de desarrollar DM 1 que títulos bajos (57).

EPIDEMIOLOGIA

En diversas partes del mundo se ha demostrado la presencia de auto-anticuerpos anti-islole al inicio de la DM 1, encontrando diferentes grados de prevalencia según el método utilizado (58-61). En varios países, 80-90 % de los nuevos casos de DM 1 han resultado con anticuerpos anti-isloles, y en Holanda 11% de éstos pacientes después de 4 años de transcurrida la enfermedad, presentaban aún anticuerpos, esto contrasta con lo encontrado por Morrison y cols en Jamaica, en donde la prevalencia de autoanticuerpos en pacientes con DM 1 de evolución variable fue de 0 (9). En general los títulos más altos de anticuerpos se encuentran al inicio de la enfermedad y algunos autores mencionan que los dirigidos a la superficie de la célula beta, tienen mayor prevalencia que los que actúan contra el citoplasma (40,42,62) éstos resultados deben interpretarse con cuidado, ya que en Suecia por ejemplo, 67 % de los casos nuevos de DM 1 tuvieron anticuerpos anticitoplasma y 67% anticuerpos antiperficie, y hasta 90% presentaron por lo menos uno de los dos anticuerpos (63), en Bélgica se reportó una prevalencia diferente al relacionarlos con la edad, encontrando en un grupo con DM 1 menor de 30 años de edad una seroprevalencia de 94% de anticuerpos dirigidos contra la superficie de las células beta al momento del diagnóstico, y 12.5% en mayores de 30 (64).

Aún cuando se conoce mejor las características y prevalencia de los autoanticuerpos, los que actúan contra la superficie de las células beta tienen el inconveniente de encontrarse frecuentemente en grupos de personas sanas, por lo que su especificidad es menor para el grupo de pacientes con DM 1 (9).

Una vez que inicia la DM 1, el número de anticuerpos disminuye progresivamente y en los casos que persisten por mucho tiempo, sus títulos se encuentran bajos. Neufeld y cols demostraron disminución en la prevalencia de anticuerpos de 76% al momento del diagnóstico a 27% después de 10 años de enfermedad (65). Se sabe que la persistencia de autoanticuerpos por años después de iniciada la diabetes está condicionada a la presencia de células beta funcionales (39) y que una vez que los antígenos presentes en el páncreas son destruidos en su totalidad, los anticuerpos desaparecen, esto ha sido posible confirmarlo gracias a estudios de trasplantes pancreáticos en gemelos idénticos (49).

La presencia de autoanticuerpos años antes de que inicien las manifestaciones clínicas de la diabetes es de gran interés clínico. En el estudio realizado en la clínica Joslin se detectaron autoanticuerpos hasta 8 años antes del desarrollo de la DM 1 (66) y otros autores como Irvine y cols también documentaron que la presencia de los anticuerpos precedió a la aparición de la enfermedad (67). Estos hallazgos han entusiasmado a investigadores para identificar a familiares o sujetos sanos que se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad.

En grupos de personas sanas que han sido sometidas a escrutinio de autoanticuerpos anti-islole, la prevalencia ha sido baja, con resultados variables, en la mayoría de los estudios los rangos varían entre 0.5 % o menos (68,69), en Noruega la prevalencia fue de 0.24% y en España, Japón, y Florida de 0.3% (38, 59,70,71). En estudios prospectivos de familiares en primer grado de enfermos con DM 1, con edades entre 10 y 20 años, que no padecen diabetes, la presencia en ellos de anticuerpos anti-islole se ha asociado con un riesgo 13 veces mayor de desarrollar DM 1 que la población sana (72).

Muchos autores afirman que los anticuerpos contra las células beta de los islotes tiene mejor valor predictivo en jóvenes menores de 10 años, en familias con más de un individuo afectado y que además comparta antígenos del sistema HLA con el familiar diabético, en quienes los títulos de autoanticuerpos son altos, y cuando es posible obtener mediciones de la secreción de insulina con administración de glucosa intravenosa y en forma simultánea se miden los autoanticuerpos, la DM 1 puede predecirse con mayor certeza (9).

DISTRIBUCION DE LOS ANTICUERPOS

La DM 1 en general no aparece más en uno u otro sexo y de igual manera la presencia de anticuerpos anti-islole en personas diabéticas en la mayoría de las series no tiene relación con el sexo (59,73,74) . Es conocido ampliamente que el riesgo de desarrollar DM 1 es mayor en niños, y que alcanza su máxima incidencia en la adolescencia (8). Para sorpresa de investigadores no existe una asociación clara en relación a la presencia de anticuerpos anti-islole en diabéticos o sus familiares y la edad, esto difiere con los hallazgos de otros autoanticuerpos cuya prevalencia aumentan con los años (9).

Se ha considerado únicamente a la edad como factor importante entre personas no diabéticas con anticuerpos anti-islole positivos, los sujetos más jóvenes tienen mayor riesgo de desarrollar diabetes, Riley y cols demostraron durante un seguimiento de 6 años en 49 personas no diabéticas con anticuerpos anti-islole positivos, que en el grupo menor de 18 años de edad, hasta un 64% desarrollaron diabetes, mientras que en mayores de 18, el grado de conversión fue de sólo el 8% (75). La mayoría de los estudios para detectar autoanticuerpos se han realizado en países Europeos y ciudades norteamericanas, poblaciones que aparentemente tienen mayor riesgo de adquirir DM 1, y en general los resultados ha sido similares.

Neufeld y cols efectuaron un estudio en población negra encontrando una prevalencia considerablemente menor de autoanticuerpos al inicio de la enfermedad comparado con personas blancas (9), sin embargo en Sur-Africa un estudio en pacientes indios y negros con DM 1 mostró una prevalencia de autoanticuerpos de 65% al inicio de la diabetes, cifra que disminuyó al aumentar la duración de la enfermedad, coincidiendo esto con lo reportado en la mayoría de los centros de investigación, sugiriendo que no existe una asociación entre autoanticuerpos y la raza (9).

JUSTIFICACION

Los hallazgos sobre la autoinmunidad han cambiado la comprensión de la DM 1, ahora sabemos que los diabéticos insulino-dependientes son portadores de autoanticuerpos cuyas características cada día se conocen mejor y gracias a estos descubrimientos es posible identificar a grupos en riesgo .

Las investigaciones sobre un proceso autoinmune en la DM 1 se iniciaron en la década de los 70, y desde entonces se han determinado através de muchos años, en varios países, las características, el tipo, y la prevalencia de los diferentes autoanticuerpos en poblaciones con DM 1 así como en sus familiares cercanos y poblaciones no diabéticas . No existen en México reportes sobre anticuerpos que actúen contra las células beta pancreáticas en niños con DM 1 y aunque actualmente se han logrado avances específicos en el conocimiento sobre éstos autoanticuerpos y su relación con la DM 1, hemos diseñado la presente investigación en una población de niños mexicanos con diabetes insulino-dependiente diagnosticados en el hospital infantil de México (HIM) para determinar en ellos la presencia de anticuerpos anti-islole. y comparar si en nuestra población existen éstos marcadores inmunológicos detectados en poblaciones diabéticas de otras partes del mundo, conocer su comportamiento en relación al tiempo de evolución de la enfermedad y de esta manera dar inicio a futuros estudios relacionados con la inmunología de la DM1 en niños mexicanos .

OBJETIVO GENERAL

Detectar en el suero la presencia de anticuerpos IgG contra las células beta de los islotes pancreáticos en niños con DM 1 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta .

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Obtener suero de pacientes pediátricos con DM 1 .

Incubar el suero de pacientes con DM 1 en páncreas humano normal.

Formar grupos con los sueros de los pacientes de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad.

Detectar la presencia de anticuerpos que actúen contra el citoplasma de las células beta.

Describir edad, sexo, estado nutricional, forma de presentación, tiempo de evolución y la presencia de anticuerpos que actúan contra el citoplasma de las células beta del páncreas .

MATERIAL Y METODO

En colaboración con la Clínica de Diabetes Mellitus del Departamento de Endocrinología del Hospital Infantil de México, se realizó una investigación prospectiva en niños mexicanos con DM 1, provenientes del D.F., área metropolitana y diferentes estados de la República. Se dividieron en tres grupos de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad (A,B, y C), definiendo éste como el tiempo transcurrido entre la aparición de los primeros síntomas y la toma de la muestra del suero. Para fines de este estudio otros datos clínicos de interés fueron edad, sexo, antecedente familiar de DM 1, estado nutricional, y forma de presentación de la enfermedad .

Grupo A: pacientes con DM 1 de 0 a 11 meses de inicio de la enfermedad.

Grupo B: pacientes con DM 1 de 1 a 5 años de inicio de la enfermedad.

Grupo C: pacientes con DM 1 de más de 5 años de inicio de la enfermedad.

Grupo A

Criterios de inclusión

Pacientes con DM 1 con evolución de la enfermedad menor a 1 año, diagnosticados y controlados en el HIM .

Edad: entre 2 y 18 años .

Sexo : Ambos .

Sin enfermedad asociada a su padecimiento .

Criterios de exclusión

Pacientes con DM 1 de más de 1 año de evolución de la enfermedad .

Pacientes menores de 2 años o mayores a 18 .

Con enfermedad asociada a su padecimiento .

Grupo B

Criterios de inclusión

Pacientes con DM 1 con evolución de la enfermedad entre 1 y 5 años, diagnosticados y controlados en el HIM.

Edad: entre 2 y 18 años.

Sexo : Ambos .

Sin enfermedad asociada a su padecimiento .

Criterios de exclusión

Pacientes con DM 1 con evolución de la enfermedad menor a 1 año o mayor a 5 años .

Con edad menor a 2 años o mayor a 18 .

Con enfermedad asociada a su padecimiento .

Grupo C

Criterios de inclusión

Pacientes con DM 1 con evolución de la enfermedad mayor a 5 años, diagnósticos y controlados en el HIM .

Edad : Entre 2 y 18 años .

Sexo : Ambos .

Sin enfermedad asociada a su padecimiento

Criterios de exclusión

Pacientes con DM 1 con evolución menor a 5 años.

Con edad menor a 2 años o mayor a 18 .

Con enfermedad asociada a su padecimiento .

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIINSULARES:

Se tomaron en todos los pacientes 0.5 ml. de suero y se congelaron a una temperatura de -70 C. en viales de 100 microlitros .

INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA:

Se tomaron cortes de páncreas humano normal obtenido de pancreatomecía parcial por sospecha de nesidioblastosis ; en este caso no se demostraron alteraciones clínicas, bioquímicas o histológicas, primarias ni secundarias de éste órgano . Un fragmento de 0.7 x 0.6 x 0.5 cm de páncreas se depositó en medio de inclusión para congelación de tejidos (Tissue Teck, Miles) cubierto con papel aluminio, se colocó de inmediato en Nitrógeno líquido y se almacenó en un frasco cerrado hasta su procesamiento a -70 C. (Revco). Se tomaron cortes por congelación en un criostato (American Optical) a 5 micras de espesor y se incubaron con suero de los pacientes a temperatura ambiente por 30 minutos, posteriormente las laminillas se lavaron con solución amortiguada de fosfato con pH de 7.4 al 0.3 molar, se incubaron por 30 minutos con antisueros anti-IgG, y albúmina humana (Behring) como testigo , marcados con isotiocianato de fluoresceína, se contratiñeron con agua de Evan y se observaron en un microscopio de luz ultravioleta (Orthoplan, Leitz).

La intensidad de la fluorescencia se tabuló de 0 a +++ y cuándo fue posible se visualizó si la tinción era citoplásmica o de membrana.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 75 niños con diagnóstico de DM 1 durante el período 1990-1993, 45 (60%) correspondieron al sexo femenino, sus edades estuvieron entre 2 y 17 años, 15% fueron pre-escolares, 19% adolescentes y 66% escolares, gráficas 1 y 2. De los 75 niños, en 2.4% existió el antecedente familiar de DM 1, la forma como se presentó la enfermedad fue cetoacidosis en 50 (66%) y "clásica" (poliuria, polidipsia, pérdida de peso) en 25 (33.3%), en 30% se encontró algún grado de desnutrición, gráfica 3. En el grupo A, con menos de 1 año de evolución de la enfermedad, se analizaron 46 pacientes, 27 (58%) fueron del sexo femenino, sus edades estuvieron entre 2 y 17 años, 17% fueron pre-escolares, 63% escolares y 20% adolescentes, gráficas 4 y 5. En 31 (67%) la presentación clínica fue cetoacidosis y en 15 (33%) clásica, 13 (28%) presentaron desnutrición, y en 32 (70%) se encontraron autoanticuerpos anti-isloté, gráfica 6. En el grupo B, con enfermedad de evolución de 1 a 5 años, se analizaron 24 pacientes, 16 (66%) fueron del sexo femenino, sus edades estuvieron entre 3 y 16 años, 13% fueron pre-escolares, 70% escolares y 17% adolescentes, gráficas 7 y 8. En 13 (54%) la presentación clínica fue cetoacidosis y en 11 (46%) clásica, 29% presentaron desnutrición y en 13 (54%) se encontraron autoanticuerpos anti-isloté, gráfica 9.

En el grupo C, con enfermedad de evolución mayor a 5 años, se analizaron 5 pacientes, 3 (60%) fueron del sexo femenino, sus edades estuvieron entre 7 y 15 años, no hubo pre-escolares, 80% fueron escolares y 20% adolescentes, gráficas 10 y 11. En 4 (80%) la presentación clínica fue cetoacidosis, y en 1 clásica (20%), en 3 (60%) se encontró desnutrición y sólo en un paciente (20%) se encontraron autoanticuerpos anti-islole, gráfica 12. El porcentaje de anticuerpos anti-isloles según el tiempo de evolución de la enfermedad (grupo A, B, y C) se muestra en la gráfica 13. La intensidad y características de la inmunofluorescencia por grupos se describe en el cuadro 1, 2, y 3. Todos los anticuerpos pertenecieron a la clase Ig G.

SEXO	PORCENTAJE
FEMENINO	50%
MASCULINO	40%

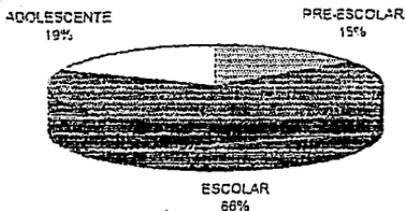
DISTRIBUCION DE LA POBLACION POR SEXO



GRAFICA 1

GRUPO DE EDAD	PORCENTAJE
PRE-ESCOLAR	15%
ESCOLAR	66%
ADOLESCENTE	19%
	100%

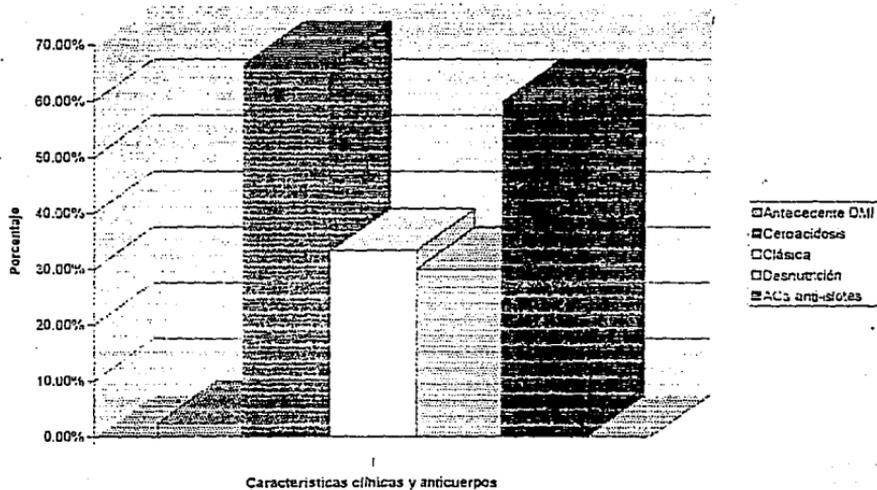
DISTRIBUCION DE LA POBLACION POR GRUPOS DE EDAD



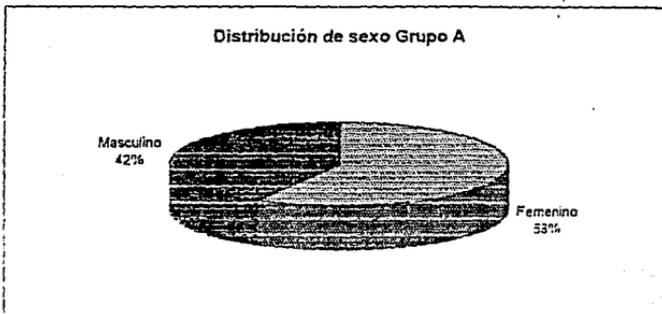
GRAFICA 2

Antecedente DMI	2.40%
Cetoacidosis	66.80%
Clásica	33.30%
Desnutrición	30%
ACs anti-isletos	60%

Descripción general del grupo (n=75)

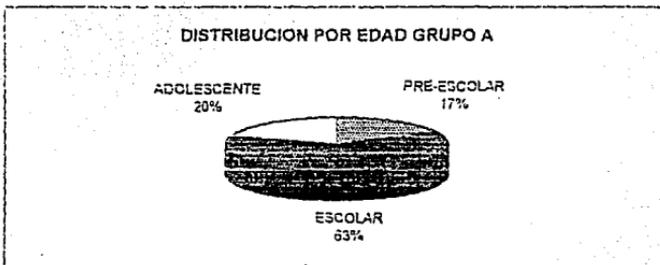


SEXO	PORCENTAJE
Femenino	58%
Masculino	42%



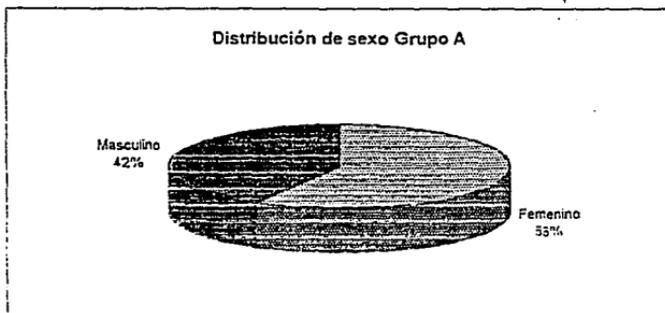
GRAFICA 4

GRUPO DE EDAD	PORCENTAJE
PRE-ESCOLAR	17%
ESCOLAR	83%
ADOLESCENTE	20%
	100%



GRAFICA 5

SEXO	PORCENTAJE
Femenino	58%
Masculino	42%



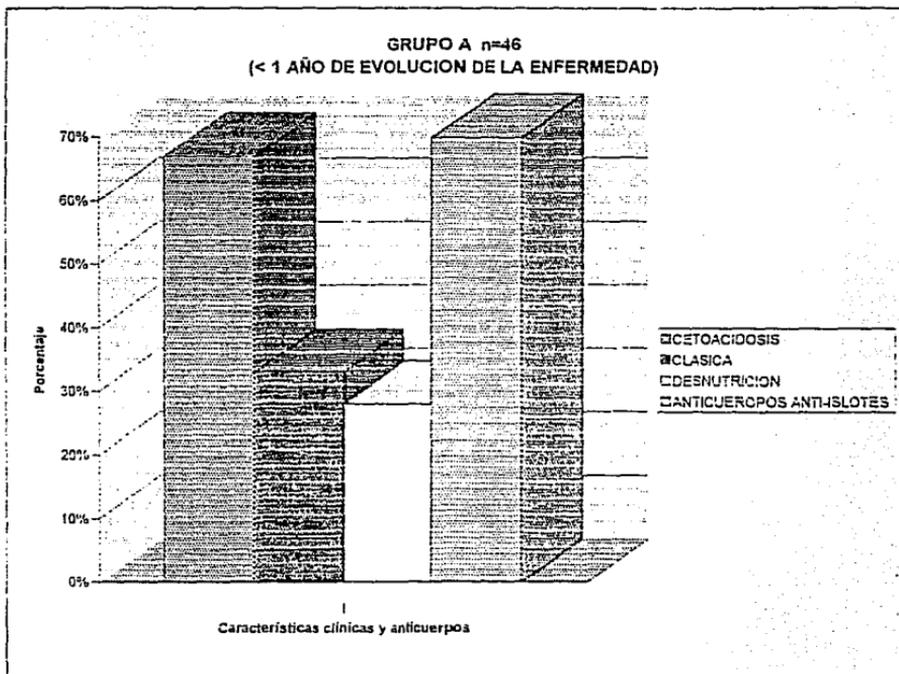
GRAFICA 4

GRUPO DE EDAD	PORCENTAJE
PRE-ESCOLAR	17%
ESCOLAR	63%
ADOLESCENTE	20%
	100%



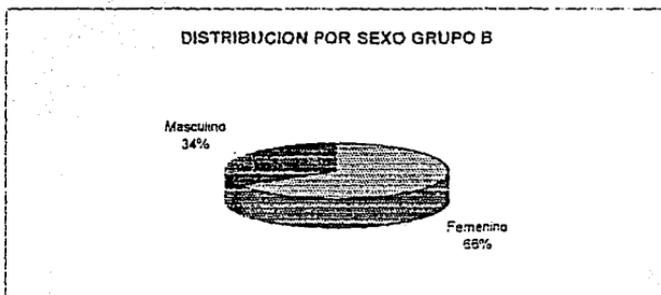
GRAFICA 5

CETOACIDOSIS	67%
CLASICA	33%
DESNUTRICION	28%
ANTICUEROS ANTI-ISLOTES	70%



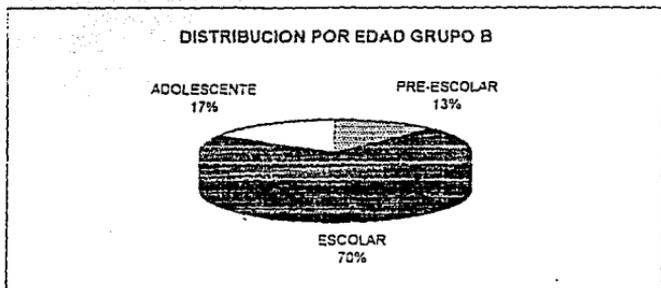
GRAFICA 8

SEXO	PORCENTAJE
Femenino	66%
Masculino	34%



GRAFICA 7

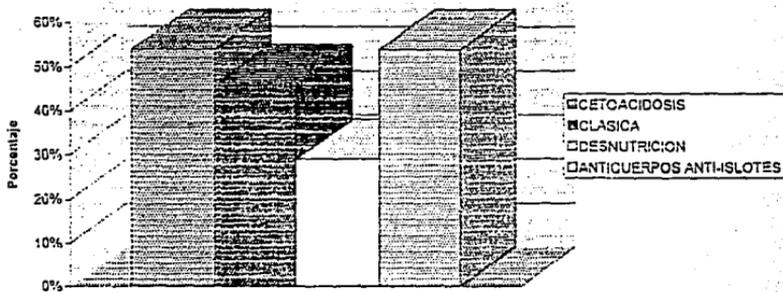
GRUPO DE EDAD	PORCENTAJE
PRE-ESCOLAR	12.5%
ESCOLAR	71.0%
ADOLESCENTE	16.5%
	100.0%



GRAFICA 8

CETOACIDOSIS	54%
CLASICA	46%
DESNUTRICION	29%
ANTICUERPOS ANTI-ISLOTES	54%

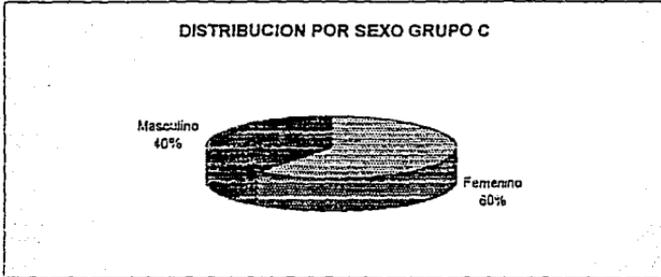
GRUPO B n=24
(1 A 5 AÑOS DE EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD)



Características clínicas y anticuerpos

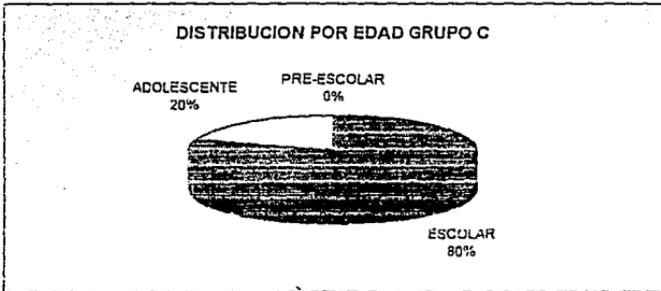
GRAFICA 9

SEXO	PORCENTAJE
Femenino	60%
Masculino	40%



GRAFICA 10

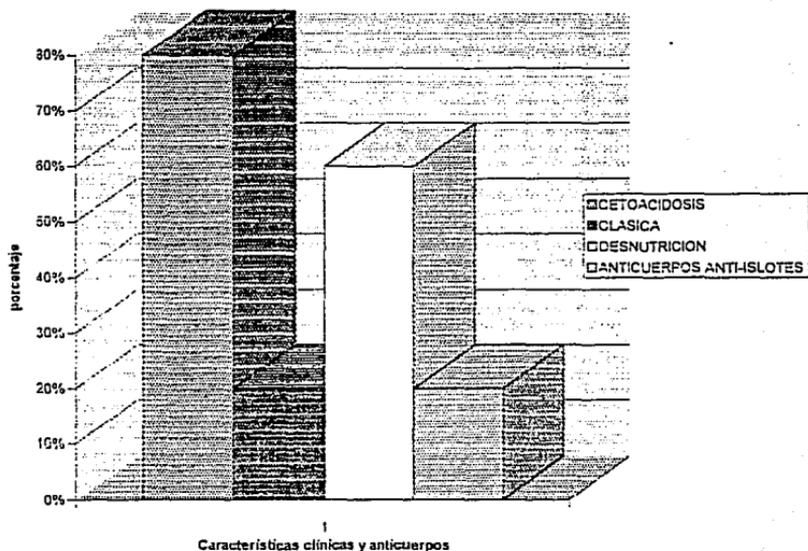
GRUPO DE EDAD	PORCENTAJE
PRE-ESCOLAR	0%
ESCOLAR	80%
ADOLESCENTE	20%
	100%



GRAFICA 11

CETOACIDOSIS	80%
CLASICA	20%
DESNUTRICION	60%
ANTICUERPOS ANTI-ISLOTES	20%

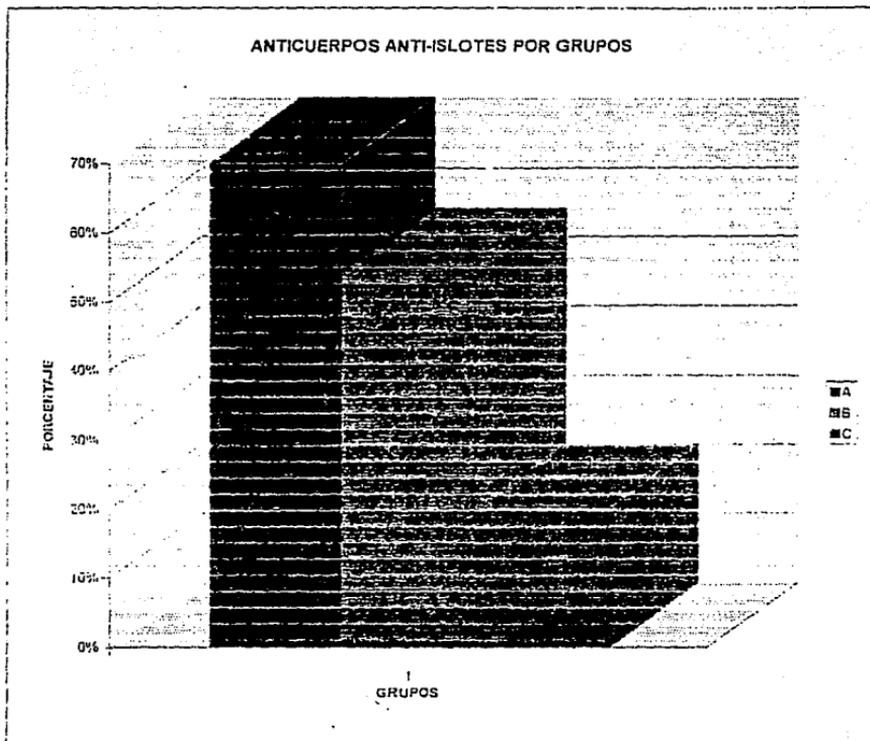
GRUPO C n=5
(EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD MAYOR A 5 AÑOS)



Características clínicas y anticuerpos

GRAFICA 12

GRUPOS	ANTICUERPOS (%)
A	70%
B	54%
C	20%



GRAFICA 13

INMUNOFLUORESCENCIA GRUPO A

ANTICUERPOS ANTI-ISLOTES

CUADRO 1

CASO	EVOLUCION (MESES)	INTENSIDAD	GRANULAR	CITOPLASMICO	MEMBRANOSO	LINEAL
1	10	+	escasos			
2	6	+	escasos			
3	6	+	escasos	+		
4	5	+	escasos			
5	2	+	escasos	+		
6	1	++	moderado	+	+	
7	1	+	escasos	+	+	
8	6	+	escasos	+		
9	4	+	escasos	+	+	+
10	1	+	escasos	+		
11	2	+	escasos	-	+	
12	2	+	escasos	+	+	
13	10	+	escasos	+		+
14	1	+	escasos	+		
15	2	+++	abundantes	+	+	+
16	11	+	escasos	-	+	
17	6	+	escasos	+		
18	1	+	escasos	+		
19	1	+	escasos	+		
20	3	+	escasos	+		
21	1	+	escasos	+		
22	6	+	escasos	+		
23	1	+	escasos	+		
24	2	+	escasos	+		
25	1	+	escasos	+		
26	1	+	escasos	+		
27	2	+	escasos	+		
28	4	+	escasos	+	+	+
29	2	+	escasos	+		
30	1	+	escasos	+		
31	2	+	escasos	+	+	
32	10	+	escasos	+		

INMUNOFLUORESCENCIA GRUPO B
 ANTICUERPOS ANTI-ISLOTES

CUADRO 2

CASO	EVOLUCION (MESES)	INTENSIDAD	GRANULAR	CITOPLASMICO	MEMBRANOSO	LINEAL
1	24	+	escasos			
2	12	++	moderado	+		
3	36	+	escasos	+		
4	12	+	escasos	+		
5	12	+	escasos	+		
6	12	+	escasos	-	-	
7	24	+	escasos	+		
8	48	-	escasos	+		
9	24	-	escasos	-	+	
10	12	-	escasos	-		
11	60	-	escasos	-		
12	48	-	escasos	+		
13	36	-	escasos	-		

INMUNOFLUORESCENCIA GRUPO C
 ANTICUERPOS ANTI-ISLOTES

CUADRO 3

CASO	EVOLUCION (MESES)	INTENSIDAD	GRANULAR	CITOPLASMICO	MEMBRANOSO	LINEAL
1	132	+	escasos	+		

DISCUSION

La DM 1 se diferencia claramente por su asociación con frecuencia a determinados haplotipos del sistema HLA, la presencia de anticuerpos contra el citoplasma y componentes de las células beta, anticuerpos contra la insulina, e infiltración linfocítica de los islotes en la fase temprana de la enfermedad (4,6,7,9). Aunque si existe predisposición familiar, no es tan estrecha como en la diabetes del adulto, Goldstein y otros autores señalan que sólo 10 % de los pacientes con DM 1 tienen el antecedente de un familiar afectado por la enfermedad (23,24), y este antecedente cuando se ha asociado con la coexistencia de antígenos DR3 o DR4 del sistema HLA y autoanticuerpos que actúan contra las células beta, tienen en conjunto un mejor valor predictivo (57). Nosotros encontramos el antecedente familiar en 2.4% del grupo, hallazgo que correlaciona con lo reportado por otros autores. La edad de aparición de los primeros síntomas en pacientes con DM1 se sitúa generalmente entre los 7 y 15 años (8), aunque puede presentarse a cualquier edad incluso en la lactancia, en nuestro grupo los síntomas iniciaron en la edad escolar hasta en 65% de los casos, lo que señala que también la aparición de la enfermedad predomina en este grupo etáreo en México.

Entre 1970 y 1980 en algunas partes del mundo la presentación clínica que predominó fue cetoacidosis, y actualmente en la mayoría de los enfermos se hace el diagnóstico al presentarse con una historia de poliuria, polidipsia, y pérdida de peso y sólo en un 10 a 30 % de los enfermos el inicio es abrupto en forma de cetoacidosis (4,6) es relevante la característica clínica encontrada por nosotros en relación a la forma de presentarse la DM 1 en niños mexicanos, similar a la reportada en otros países en la década de los 70, en nuestro estudio hasta un 66% iniciaron con cetoacidosis, esto obedece a un diagnóstico tardío debido probablemente a la falta de conocimiento de la enfermedad en la población, razón por la que acuden a consulta meses después de iniciados los síntomas y a la poca sensibilización que existe entre médicos para buscar y detectar la enfermedad en forma temprana.

Desde 1974 se conocen mejor los mecanismos inmunológicos que participan en la destrucción de las células beta, y por diversos métodos se han identificado diferentes autoanticuerpos (4,6,9,15,16,55-57,72), pero aún es controvertido determinar si una vez que se inicia este proceso, su evolución es progresiva y culmina siempre en la aparición de diabetes insulino-dependiente (9,57), o si este mecanismo no es un proceso constante y algunas veces entra en remisiones temporales o incluso permanentes (57). Eisenbarth y cols han propuesto que en la mayoría de los individuos el mecanismo de destrucción de las células beta es lineal (3), en contrapunto otros autores como Barts-Windsor han sugerido que el proceso en la DM 1 no siempre es progresivo (57).

El mecanismo de autoinmunidad se ha demostrado por diversas pruebas como la inhibición de la migración de leucocitos y la transformación de linfocitos (32), Gepts demostró la infiltración linfocitaria del páncreas al inicio de la enfermedad (7) y hasta la actualidad ha sido posible reconocer anticuerpos que actúan contra el citoplasma, otros se dirigen específicamente contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa que se ubica en la superficie de las células beta, y hay anticuerpos que actúan contra la insulina (4,6, 9,32, 34-37,56, 57,72). La mayoría de los investigadores han utilizado la medición de anticuerpos anticitoplasmáticos por inmunofluorescencia indirecta como método convencional (9,32,57), sin embargo se reconoce que por las características del procedimiento su interpretación sigue siendo difícil. Actualmente según algunos investigadores la detección de anticuerpos que actúan contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa es el método más confiable (56), pero su aplicación se realiza sólo en algunos centros de investigación, su técnica es complicada, y quizás lo que más ha limitado su utilización es su alta prevalencia en poblaciones no diabéticas (9). Los anticuerpos que actúan contra el citoplasma han sido los más estudiados en poblaciones con DM 1 en múltiples países (4,6,9,37,46-48,57,72) y se conoce que su prevalencia varía entre 60 a 90% al inicio de la enfermedad (4, 6 , 9 46-48), éstos valores disminuyen en forma progresiva y desaparecen por completo una vez que se han destruido todas las células beta (9, 49).

Nosotros utilizamos la medición de anticuerpos anticitoplasma mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta y páncreas humano como sustrato. Encontramos una prevalencia de anticuerpos anti-isletos de 70% en el grupo de menos de un año de iniciada la enfermedad (Grupo A), esto es similar a lo reportado en países europeos y ciudades norteamericanas (9) y reafirma la teoría de que al inicio de la DM 1 existen más células beta viables y por consiguiente es posible detectar mayor número de anticuerpos. Entre el grupo con evolución de 1 a 4 años (Grupo B), 54 % presentaron anticuerpos, lo que indica un descenso en su número probablemente secundario al proceso continuo de destrucción, estos valores están elevados en relación a otros autores (9), pero debe considerarse que por el tiempo variable de evolución dentro del grupo B, su prevalencia es mayor comparada con estudios en que analizaron un solo tiempo de evolución. En el grupo de más de 5 años de inicio (Grupo C), sólo 20 % presentaron anticuerpos, esto es similar a lo encontrado en otros países (9, 65) y aunque el número de pacientes es pequeño, parece indicar que una vez que la enfermedad ha progresado varios años, las células beta desaparecen casi en su totalidad. La presencia de estos autoanticuerpos en niños mexicanos con DM1 reafirma la teoría de un proceso autoinmune en la génesis de la enfermedad, situación que ha sido señalada por muchos autores.

Existen dos limitaciones importantes que deben ser consideradas al evaluarse el hallazgo de anticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos . Aún con procedimientos estandarizados para cuantificar a los anticuerpos (50) existen variaciones en cuánto a como deben de teñirse los anticuerpos, ésto resulta debido a que la antigenicidad de un páncreas varía en relación a otro (9) y otra limitación relacionada con la metodología es que la lectura de la inmunofluorescencia es subjetiva , el grupo Internacional Diabetes Workshop (IDW) y Juvenile Diabetes Fundation (JDF) han estandarizado la medición de los anticuerpos anticitoplasmáticos (50) , sin embargo se reconoce que debido a las limitaciones intrínsecas de los análisis, una cuantificación exacta es menos que ideal (57) .

En base a los resultados podemos concluir que algunos rasgos clínicos de nuestros niños con DM1 son similares a poblaciones diabéticas de otras partes del mundo . En México los niños con DM1 también son portadores de marcadores inmunológicos como los anticuerpos anti-islotes pancreáticos y según el tiempo de evolución de la enfermedad, al irse destruyendo sus células beta lentamente, sus anticuerpos desaparecen paulatinamente . Los hallazgos de el presente trabajo sustentan la teoría que afirma la participación de procesos autoinmunes en el desarrollo de la DM 1 .

BIBLIOGRAFIA

1. A.L. Drash. The classification of diabetes mellitus in children and adolescents. Act Paed Jap. 1987; 29:325-335.
2. Teshirogi et al. Classification of diabetes mellitus by studies of C peptide secretory capacity. Act Paed Jap. 1987;29:335-340.
3. Eisenbarth GS et al. Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease . N Eng J Med. 1986;314:1360-68.
4. Solomon A Kaplan. Clinical pediatric endocrinology, 1990 Philadelphia WB Saunders :127-164.
5. National Diabetes Criteria Data group .Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance .Diabetes 1979 ;28: 1039-57.
6. Cruz Hernandez Manuel. Tratado de pediatria. Séptima edición. Publicaciones médicas 1994 :809-823.
7. Gepts, W. Diabetes 1965,14,619.
8. Champsaur HF. Bottazzo GF, Bertrams J, et al. Virologic, inmunologic and genetic factors in insulin-dependent diabetes mellitus. J Pediatr 1982;100:15-20.

9. Lipton R, Laporte R. Epidemiology of islet cell antibodies. *Epidemiology Reviews* 1989;11:184-203.
10. Gleichmann H, Zorchr B, Greulich B, et al. Correlation of islet cell antibodies and HLA-DR phenotypes with diabetes mellitus in adults. *Diabetologia* 1984;27:90-2
11. Freinkel N, Metzger BE. Gestational diabetes: problems in classification and long range prognosis. *Adv Exp Med Biol* 1985; 189:47-61.
12. King ML, Bidwell D, Voler A, et al. Role of coxsackie B viruses in insulindependent diabetes mellitus. *Lancet* 1983;2:915-16.
13. Garner DF, et al. Prolonged action of regular insulin in diabetic patients. Lack of relationship to circulating insulin antibodies. *J Clin End and Med* 1986;62:621-27.
14. Masuoka LY, et al. Antibodies against the insulin receptor in paraneoplastic acantosis nigricans. *The Am J Med* 1987;82:1253-56.
15. Rabinowe SL, et al. Congenital Rubella . Monoclonal antibody-defined T Cell abnormalities in young adult. *Am J Med* 1986; 81:777-782.
16. Irvin WJ, Sawers JSA, Feek CM, Presscott RJ, Duncan LJP: The value of islet cell antibodies in predicting secondary failure of oral hypoglycemic agent therapy in diabetes mellitus. *J Clin Lab Immunol* 1979;2:23-26.
17. Botazzo GF. Death of a beta cell: Homicide or Suicide? *Diabetic Med.* 1986; 3:119-30.

18. Scherthaner G, Sherbaum W, Borkenstein M, et al. Coxsackie-b-virus specific IgM responses, complement-fixing islet cell antibodies- HLA DR antigens, and C-peptide secretion in insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1985;1:630-2.
19. Drash AL, Cavender D, Atchinson R, et al. Pittsburgh diabetes mellitus study: studies on the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus with special reference to viral infections. *Behring Inst Meet* 1984;75:58-72.
20. Bodansky HJ, Dean BM, Botazzo GF, et al. Islet-cell antibodies and insulin autoantibodies in association with common viral infections. *Lancet* 1986; 13:1351-53.
21. Rotter JJ. The modes of inheritance of insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Gen* 1980;33:835-851.
22. Rubinstein P, et al. Genetics of juvenile diabetes mellitus. A recessive gene closely linked to HLA -D and with 50% penetrance. *N Eng J Med* 1977;297:1030-1040.
23. Blom A, Hayes TM, Gamble DR: Register of newly diagnosed diabetic children. *Br Med J* 1975;ii:580-83.
24. Dahlquist G, Blom L, Holmgren G, Hagglof B, Larsson Y, Sterku G, Wall S: The epidemiology of diabetes in Swedish children 0-14 years: a six year prospective study. *Diabetologia* 1985;28:802-808.
25. Tiwari JL, Terasaki PL. HLA and disease associations. New York: Springer-Verlag, 1985:32-41.
26. Botazzo GF, Pujol-Borrell, Hanafusa T: Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983; 2:1115-18.

27. Todd JA, Bell JI, Mc Devitt HO. HLA-DQbeta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987;329:599-604.
28. Morel PA, Dorman JS, Toss JA, Mc Devitt HO, Trucco M: Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQbeta chain protects against type 1 diabetes: a family study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 8111-15.
29. Battersh H, et al. Insulin receptor antibodies in diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol.* 1988;71:85-90.
30. Jeffrey S, et al. Characterization of antibodies to the insulin receptor. *The J Clin Invest* 1976: 58:1442-49.
31. Gavin JR, et al. Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. USA.* 1972;69:747-51.
32. Nerup, J. Ortvad Anderson O, Bendixen G, et al. *Proc R Soc. Med* 1974; 67:506.
33. Bosi E, Becker F, Bonifacio E, et al: Progression to type 1 diabetes in autoimmune endocrine patients with islets cell antibodies. *Diabetes* 1991;40:977-84.
34. Eisenbarth G. Insulin dependent diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314:1360-77
35. Botazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;2:1279-82.
36. MacCuish AC, Jordan J, Campbell CJ, et al. Antibodies to pancreatic islet cells in insulin dependent diabetics with coexistent autoimmune diseases. *Lancet* 1974;2:1529-33.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

37. Maclaren NK , Huang SW . Antibody to cultured human insulinoma cells in insulin-dependent diabetes . *The Lancet* . 1975 ;3: 997-999.
38. Boehm BO , Rosak C , Sasse U , et al . Western blot analysis of islet antibodies in type 1 diabetes . (Abstract). *Diabetes* 1986 ;35(suppl 1):520
39. Mustonen A, Knip M , Huttunen N-P, et al . Evidence of delayed B-cell destruction type 1 diabetic patients with persisting complement-fixing cytoplasmic islet cell antibodies . *Diabetologia* 1984;27:421-36
40. Lernmark A, Freedman ZR, Hofmann C, et al . Islet cell surface antibodies in juvenile diabetes mellitus . *N Engl J Med* 1978 ;299:375-80
41. Maruyama S, Sugiura M, Nakazawa M , et al . Detection of islet cell surface antibodies by an indirect rosette assay , using islet cells and protein A-labeled sheep red blood cells . *J. Immunol Methods* 1984;74:173-80.
42. Toguchi Y, Ginsberg -Fellner F, Rubinstein P. Cytotoxic islet cell surface antibodies (ICSA) in patients with type 1 diabetes and their first degree relatives . *Diabetes* 1985;35:855-60.
43. Baekkeskov S, Aanstoot HJ , Christgau S, et al . Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990 (Lond) 347;151-156.
44. Baekkeskov S, Nielsen JH , Marnier B , et al . Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children precipitate human pancreatic islet cell proteins . *Nature* 1982 (Lond) 298 :167-69.

45. Atkinson MA, Maclaren NK, Scharp DW, Lacy PE, Riley WJ: 64,000M r autoantibodies as predictors of insulin dependent diabetes . *Lancet* 1990 335:1357-60.
46. Montana E, Fernandez CM ,Rosel P , et al . Age, sex , and ICA influence on beta-cell secretion during teh first year after the diagnosis of type 1 diabetes mellitus .*Diabete Metab (France)* 1991;17:460-8.
47. Elamin A,Omer MI ,Tuvemo T Islet-cell antibodies and endogenous insulin secretion in Sudanese diabetic children .*Diabetes Res Clin Pract (Netherlands)* 1992 ;16:91-6.
48. Armitage M ,Wilkin T,Scott-Morgan L , et al .On the relationship between islet cell antibodies and insulin autoantibodies in patients at risk from insulin dependent diabetes . *Autoimmunity (Switzerland)*1988;1:275-83.
49. Lendrum R, nelson PG, Pyke DA, et al Islet cell , thyroid , and gastric autoantibodies in diabetics identical twins. *Br Med J* 1976;1:553-5.
50. Bottazzo GF, Gleichmann H. *Immunology and Diabetes Workshop : report of the first international workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies .Diabetologia* 1986;29: 125-26.
51. Kolb H, Krugener G, Gries FA Islet cell autoantibodies : which method ?(Letter)*Lancet* 1983;1:479.
52. Mamer B, LermmarkA, Nerup J ,et al .Analysis of islet cell antibodies on frozen sections of human pancreas . *Diabetologia* 1983;25:93-6.
53. McCullogh DK, Benson EA, Klaff L, et al .Loss of ICA positivity is not correlated with changes in B-cell function in high risk siblings of type 1 diabetics . *Diabetes* 1987;36(suppl 1):82 .

54. Karp M, Rabizadeh A, Eisenbarth GS. Prolonged sera incubation to improve sensitivity of double-immunofluorescent monoclonal B12L-32 FITC-protein A assay. *Diabetes Care* 1987;10:535.
55. Greebaum JC, Palmer PJ, Kuglin B, et al. Insulin autoantibodies measured by Radioimmunoassay Methodology are more related to insulin dependent diabetes mellitus than those measured by Enzyme-Linked Immunosorbent assay: results of the Fourth International Workshop on the standardization of insulin autoantibody measurement. *J Clin Endocrinology and Metabolism*. 1992;74:1040-44.
56. Tuomilehto J, Zimmet P, Mackay R, et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet* 1994 ;343:1383-5.
57. Palmer P J, McCulloch KD. Perspectives in diabetes: Prediction and prevention of IDDM-1991. *Diabetes*;40:943-47.
58. Bottazzo GF, Mirakian R, Dean BM, et al. How immunology helps to define heterogeneity in diabetes mellitus. In: Kobberling J, Tattersall R, eds. *Serono Symposium no.47*, New York: Academic Press, 1982: 79-90.
59. Bruining GJ, Molenaar J, Tuck CW, et al. Clinical time course and characteristics of islet cell cytoplasmic antibodies in childhood diabetes. *Diabetologia* 1984;26:24-7.
60. Lendrum R, Walker G, Gamble DR. Islet-cell antibodies in juvenile diabetics of recent onset. *Lancet* 1975;1:880-3.

61. Irvine WJ , McCallum CJ , Gray RS , et al . Pancreatic islet -cell antibodies in diabetes mellitus correlated with teh duration and types of diabetes coexistent autoimmune disease , and HLA types . *Diabetes* 1977;26:138-41.
62. Kobayashi T , Sugimoto T , Itoh T , et al . The prevalence of islet cell antibodies in Japanese insulin -dependent and non-insulin-dependent diabetic patients studied by indirect immunofluorescence and by a new method . *Diabetes* 1986 ; 35:335-40 .
63. Lemmark A, Hagglof B , Freedman Z , et al . A prospective analysis of antibodies reacting with pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetic children . *Diabetologia* 1981;20:471-5.
64. Van De Winkel M , Smets G , Gepts W. et al . Islet cell surface antibodies from insulin-dependent diabetes bind specifically to pancreatic B-cells. *J Clin Invest* 1982;70: 41-9.
65. Neufeld M , Maclaren NK, Riley WJ , et al . Islet cell and other organ-specific antibodies en US Caucasians and blacks with insulin-dependent diabetes mellitus . *Diabetes* 1980;29:589-92.
66. Srikante S, ganda OP , Jackson RA , et al . Pretype 1 diabetes: common endocrinological course despite immunological and immunogenetic heterogeneity. *Diabetologia* 1984;27:146-8.
67. Irvine WJ , Gray RS , McCallun CJ . Pancreatic islet-cell antibody as a marker for asymptomatic and latent diabets and prediabetes . *Lancet* 1976;2:1097-1102 .
68. Betterle C, Zanette F , Pedini B , et al . Clinical and subclinical organ-specific autoimmune manifestations in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients and their first-degree relatives . *Diabetologia* 1984 ;26 :431-6.

69. Notsu K , Goto Y , Sakurami T , et al . A population study of pancreatic islet cell antibodies and antithyroid antibodies . *Tohoku J Exp Med* 1983 ;141(suppl):261-4.
70. Kolb H , Stroheker M , Biener J , et al . Analysis of the persistence of islet cell antibodies and islet cell type specific antibodies in type 1 diabetic children . In :Puchera A , Doniach D , Jenzi GF , et al , eds . *Autoimmune aspects of endocrine diseases* . London ;Academi press , 1980 :291-4.
71. Bottazzo GF , Doniach D . Islet cell antibodies in diabetes mellitus : evidence of autoantigen common to all cells in the islets of Langerhans . *Ric Clin Lab* 1978;3:29 .
72. Bingley JP , Bonifacio E , Shattock M , et al . Can islet cell antibodies predict IDDM in the general population ? . *Diabetes Care* ;16 :45-50 .
73. Bright GM , Blizzard RM , Kaiser DL , et al . Organ-specific autoantibodies in children with common endocrine diseases . *J Pediatr* 1982;100.8-14 .
74. Bottazzo GF , Mann JI , Thorogood M , et al . Autoimmunity in juvenile diabetics and their families . *Br med J* 1978 ; 2:165-8 .
75. Riley WJ , Spillar R , Waltz J , et al . Predictive value of islet cell autoantibodies :6 years experience . (Abstract) *Diabetes* 1986 ;35-44.