



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Evaluación del empleo de células dendríticas para la detección
de linfocitos T auto-reactivos en familiares sanos seronegativos
de pacientes con diabetes mellitus tipo 1**

T E S I S

Que presenta

BIOL. KEITY JOHANNA FARFÁN PIRA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de la Tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Ciudad de México

AGOSTO, 2017

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, BAJO LA TUTORÍA DE LA DRA. MARIA CARMEN SÁNCHEZ TORRES, PROFESORA TITULAR DE DICHO DEPARTAMENTO.

COMITÉ TUTORIAL

Directora de la tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Asesores:

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

La Bióloga Keity Johanna Farfán Pira realizó esta tesis de Maestría con una beca otorgada por el CONACYT (No. 426644)

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por permitirme vivir esta experiencia maravillosa, lo cual me permite ser cada Día una mejor mujer.

A mis padres:

M. Cristina Pira y René L. Farfán...
Por inspirarme como ejemplo de vida, por ser un gran apoyo, por el ánimo brindado cada día, por representar un equilibrio en mi vida y por ser parte fundamental en mi formación.

A mi hermana:

Caterine Farfán... Por compartir conmigo los mejores momentos de mi vida, por su ayuda y por su motivación para anhelar siempre ser mejor.

A mi prometido:

Alberto Antonio Campos... Por darme la maravillosa oportunidad de conocerlo y poder compartir la vida con él. Gracias por cada enseñanza diaria, su motivación constante y su paciencia, pero sobre todo por su apoyo incondicional en momentos de dificultad y por hacer de mí, una mejor mujer.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que contribuyeron para el desarrollo exitoso de este trabajo:

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No.426644) para el desarrollo exitoso de mi proyecto de maestría.
- A la Dra. María Carmen Sánchez, por su valiosa asesoría y sus enseñanzas que permitieron la culminación de este trabajo.
- A la Dra. Norma Segovia, por su apoyo incondicional en este trabajo, su dedicación y su paciencia, las cuales contribuyeron en este trabajo.
- A los integrantes de mi comité, Dr. Vianney Ortiz y al Dr. Marco A. Meraz, por el apoyo, sus comentarios y reflexiones para avanzar adecuadamente en este proyecto.
- A la Dra. Rosaura Hernández Rivas, por permitir que esta experiencia en mi vida fuera llevada a cabo.
- Al M. en C. Víctor Rosales, por sus enseñanzas y colaboración con la asesoría del uso del citómetro de flujo.
- A mis compañeros de laboratorio, Rebeca Klimek, Angélica Girón, Eduardo Patiño y Adrián Duque, por su compañía, su apoyo, sus enseñanzas y por compartir conmigo esta experiencia profesional.
- A María de Jesús Maqueda, por apoyarme en todo el proceso secretarial que permitió facilitar los diversos trámites académicos requeridos en el departamento.
- A Julio Ramírez, nuestro técnico de laboratorio, porque gracias a su esfuerzo es posible el desarrollo adecuado del trabajo.
- A los profesores, miembros del departamento de Biomedicina Molecular, por su esfuerzo y dedicación para el crecimiento de mis conocimientos.
- A los médicos y personal del área de endocrinología del Centro Médico Nacional la Raza, porque gracias a ellos pude acceder a las muestras sanguíneas de los pacientes y sus familiares.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN EN ESPAÑOL	8
RESUMEN EN INGLÉS	10
INTRODUCCIÓN	12
Diabetes mellitus	12
Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 1.....	14
Etiología de la diabetes mellitus tipo 1	16
Patología de la diabetes mellitus tipo 1	18
Autoantígenos en la diabetes tipo 1	21
Ausencia de auto-anticuerpos y desarrollo de DM1	23
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Descripción general del estudio.....	28
Sujetos de estudio.....	28
Determinación de la presencia de Aab anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2	29
Purificación de las células	29
Diferenciación de monocitos hacia células dendríticas	30
Estimulación de los LT de memoria con las DC	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
Análisis de Aab en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1	32
Análisis de las respuestas celulares en los familiares seronegativos	33
Los linfocitos T de los FDR Aab-LT+ producen altos niveles de IL-2 en respuesta a insulina.....	36
DISCUSIÓN	38

Aab en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1.....	38
Respuestas celulares en familiares seronegativos	40
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	45
BIBLIOGRAFÍA	46

ABREVIATURAS

Aab	Auto-anticuerpo
Ag	Antígeno
APC	Célula Presentadora de Antígeno
CFSE	Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
CTLA-4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
DAISY	The Diabetes Autoimmunity Study in the Young
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DC	Célula dendrítica
DiMe	Childhood Diabetes in Finland Study
FDR	Familiares de primer grado
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GADA	Aab anti GAD65
GAD65	Descarboxilasa del ácido glutámico, isoforma de 65 kDa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos
HLA	Antígeno leucocitario humano
HSP	Proteínas de choque térmico
IA-2	Tirosina Fosfatasa IA-2
IA-2A	Aab anti-IA-2
IAA	Aab anti-insulina
ICA	Aab contra antígenos citoplásmicos de los islotes
IgG	Inmunoglobulina G
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
INS	Gen de insulina
LADA	Diabetes autoinmune latente del adulto

LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LT	Linfocitos T
LYP	Proteína tirosina fosfatasa linfoide
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MACS	Magnetic cell sorting
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 22
RER	Retículo endoplásmico rugoso
SN	Sobrenadante
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T cooperador
Treg	Linfocito T regulador

RESUMEN EN ESPAÑOL

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune dictada por el desarrollo de linfocitos T (LT) CD4+ y CD8+ auto-reactivos frente a las células beta del páncreas. La DM1 en México se debe considerar actualmente como un problema serio de salud debido al incremento de la incidencia en la población durante los últimos diez años. La calidad de vida de los pacientes con DM1 se puede ver alterada a largo plazo cuando se presentan complicaciones como cardiomiopatías, nefropatías y retinopatías, lo cual hace que sea absolutamente necesario el establecimiento de métodos de diagnóstico temprano que puedan contribuir a identificar y retrasar el desarrollo de la enfermedad. Los familiares de primer grado (FDR) de pacientes con DM1 constituyen individuos de riesgo de padecer la enfermedad debido al componente genético de la misma.

En el presente trabajo se analizó la presencia de los auto-anticuerpos (Aab) IAA, GADA e IA-2A en FDR de primer grado (hermanos, hijos y padres) de pacientes con DM1. El grupo de FDR seropositivos (Aab+) comprendió el 16.6% de los FDR analizados, datos que son equiparables a los observados en los países con mayor incidencia de DM1, y que sugieren que la población mexicana podría estar genéticamente predispuesta a padecer la enfermedad.

Estudios previos han demostrado que un porcentaje significativo de pacientes que debutan con DM1 no presentan Aab detectables, y algunos trabajos han indicado que FDR de pacientes con DM1 que son Aab- presentan respuestas auto-reactivas de LT. Por lo tanto, la ausencia de Aab en los FDR no está necesariamente asociada con la ausencia de respuestas autoinmunes. En este trabajo desarrollamos una nueva metodología para detectar LT auto-reactivos en FDR Aab-, empleando LT CD4+ de fenotipo efector/memoria como células respondedoras y células dendríticas (DC) autólogas derivadas de monocitos como células presentadoras de antígeno (Ag). En estos ensayos se evaluó la proliferación de los LT y su producción de IL-2 en respuesta a diversos Ag diabetogénicos. Con esta estrategia determinamos que el 33% de los FDR Aab- evaluados presentó reactividad de sus LT frente a insulina, GAD65 y/o IA-2. Las respuestas de proliferación de los LT frente a insulina siempre estuvieron acompañadas de un incremento en la secreción de IL-2, lo que evidenció la

especificidad de la respuesta. Las respuestas celulares positivas se presentaron mayoritariamente frente a un solo Ag, preferentemente insulina, y fueron más prevalentes en el grupo de padres evaluados que en el grupo de hermanos. La edad, las características antropométricas y la alta prevalencia de dislipidemias en los FDR Aab- con respuestas auto-reactivas de linfocitos T sugieren que una alta proporción de estos individuos podría estar en riesgo de desarrollar diabetes autoinmune latente del adulto (LADA). En resumen, nuestros datos indican que la evaluación de la reactividad de los LT CD4+ en FDR Aab- utilizando células con fenotipo efector/memoria y DC autólogas pulsadas con Ag diabetogénicos nos permite detectar la presencia de respuestas autoinmunes en un porcentaje importante de individuos teóricamente considerados de bajo riesgo de padecer DM1.

RESUMEN EN INGLÉS

The type 1 diabetes mellitus (DM1) is an autoimmune disease dictated by the development of autoreactive T lymphocytes (LT) CD4+ and CD8+ to pancreas beta cells. Currently, the DM1 in Mexico should be considered as a serious health problem for the increase of the incidence in the population during the last decade. The quality life of the patients with DM1 can be altered in a long-term when arise complications such as cardiomyopathy, nephropathy and retinopathy: therefore, is necessary establish early diagnostic methods for the identification and delay the disease development. The first degree relatives (FDR) of patients with DM1, are individuals with high risk of suffer the disease by the genetic component of the disease.

In the present work, it was analyzed the presence of auto-antibodies (Aab) IAA, GADA and IA-2A in first grade FDR (siblings, offspring and parents) of patients with DM1. The group of seropositive FDR (Aab+) represent a 16.6% of FDR analyzed, which is comparable to observed in countries with high incidence of DM1, and suggest that the Mexican population can be genetically predisposed to the disease.

Previous studies have shown that a significative percent of patients who debut with DM1 do not present detectable Aab, and some works indicate that Aab- FDR of patients with DM1 present LT autoreactive responses. Therefore, the Aab absence in FDR is not necessarily associated with the absence of autoimmune responses. In this work, we develop a new methodology to detect autoreactive LT in Aab- FDR, using CD4+ LT of phenotype effector/memory as responder cells and autologous dendritic cells (DC) derived from monocytes as antigen (Ag) presenting cells. In this assays the LT and the IL-2 production was assessed in response to diverse diabetogenic Ag. With this strategy we determined that a 33% of evaluated Aab- FDR presented LT reativity to insulin, GAD65 and/or IA-2. The proliferation responses of LT to insulin were always accompanied of an increase secretion of IL-2, evidencing the specificity of the response. The positive cellular responses were mainly to one Ag, insulin preferably, and were more prevalent in the parents group that in siblings group. The age, the anthropometric characteristics and dyslipidemia high prevalence in Aab- FDR with LT autoreactive responses, suggest that a high proportion of these individuals can be on risk to develop latent autoimmune diabetes of the adult (LADA). In summary, our data indicate that the

reactivity CD4+ LT evaluation in Aab- FDR using cells with phenotype effector/memory and autologous DC pulsed with diabetogenic Ag allows us detect the presence of autoimmune responses in an important percent of individuals theoretically considered low risk of suffering DM1.

INTRODUCCIÓN

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM), es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia (elevados niveles de glucosa en sangre), como resultado de defectos en la presencia y/o acción de la insulina. Entre sus síntomas clásicos se incluye la poliuria (orina excesiva), polidipsia (sed excesiva), polifagia (hambre excesiva) y pérdida de peso. De esta manera, se inician procesos fisiopatológicos que varían desde la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas hasta anormalidades que pueden desencadenar un proceso de resistencia a insulina. La hiperglicemia crónica se asocia con daño, disfunción y falla de varios órganos a largo plazo, y puede producir enfermedades como la retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica, con riesgo de afecciones en pies como úlceras o amputaciones, y neuropatía del sistema nervioso autónomo causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios, cardiovasculares y disfunción sexual [1].

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), también llamada insulino-dependiente, es una enfermedad crónica que se caracteriza por una deficiencia de insulina como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células beta de los islotes pancreáticos. Esta enfermedad se asocia con la aparición de auto-anticuerpos (Aab) como los Aab anti-GAD65 (descarboxilasa del ácido glutámico, isoforma de 65 kDa, GADA), ICA (Aab contra antígenos citoplásmicos de los islotes), anti-insulina (IAA) o anti-IA-2 (tirosina fosfatasa IA-2, IA-2A) meses o años antes de la aparición de los síntomas y del desarrollo clínico de la diabetes. En el momento del diagnóstico 10-20% de las células beta productoras de insulina continúan funcionando. La tasa de destrucción de las células beta es variable, pudiendo ser rápida en algunos individuos (principalmente niños e infantes), pero muy lenta en otros (principalmente adultos). A dichos Aab no se les ha atribuido un papel patogénico, pero se han utilizado como biomarcadores del desarrollo de la autoinmunidad, pudiendo predecir un futuro progreso de la enfermedad [2, 3]]. Algunos individuos pueden presentar cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad (**Fig. 1**), el cual es un estado en el que la deficiencia de insulina y los elevados niveles de azúcar dan paso al metabolismo de

los lípidos para la producción energética, generando así acumulación de ácidos en sangre que se denominan cetonas; estos eventos de cetoacidosis se presentan especialmente en niños menores de 4 años de edad [4], mientras que algunos aún poseen una función suficiente de las células beta para prevenir la aparición de la cetoacidosis durante años. Estos individuos pueden llegar a ser insulino-dependientes en caso de que exista poca o nula secreción de insulina, lo cual se manifiesta por niveles bajos (<0.5 ng/ml) o indetectables de péptido C en el plasma, el cual es un producto de la escisión de la pro-insulina para obtener insulina funcional. Los pacientes con DM1 también son propensos a otros desórdenes autoinmunes como tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, enfermedad celiaca, vitíligo, hepatitis autoinmune y anemia perniciosa [5].

La forma más prevalente de DM es la de tipo 2 (DM2). Se caracteriza por una deficiencia relativa de insulina causada por una disfunción de las células beta pancreáticas y una resistencia periférica a la insulina. La mayoría de los pacientes con DM2 no requieren tratamiento de insulina para su supervivencia. Su etiología no es conocida, y se ha reportado que no ocurre destrucción autoinmune de las células beta. La cetoacidosis ocurre raramente, pero cuando ocurre surge en asociación con procesos infecciosos. El estado de hiperglicemia se desarrolla gradualmente, lo cual hace que la enfermedad no se diagnostique en varios años. Esta enfermedad tiene un predominio racial (afroamericanos, indios americanos, latinos/hispanos y americanos asiáticos), una fuerte asociación con la obesidad, el sexo (predomina en mujeres), la edad avanzada y con la pérdida de aptitud física, además de una predisposición genética (aunque poco entendida), lo cual desencadena un proceso de resistencia a la insulina y a defectos en la actividad secretoria de las células beta [5-7].

La diabetes tipo LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*) también llamada diabetes tipo 1.5, es una forma de diabetes que se ha descrito en un subgrupo de individuos con fenotipo de DM2 con presencia de Aab como GADA, con asociaciones a HLA de alto riesgo y, como la DM1, este tipo de diabetes es considerada una enfermedad autoinmune mediada por células T auto-reactivas [8, 9].

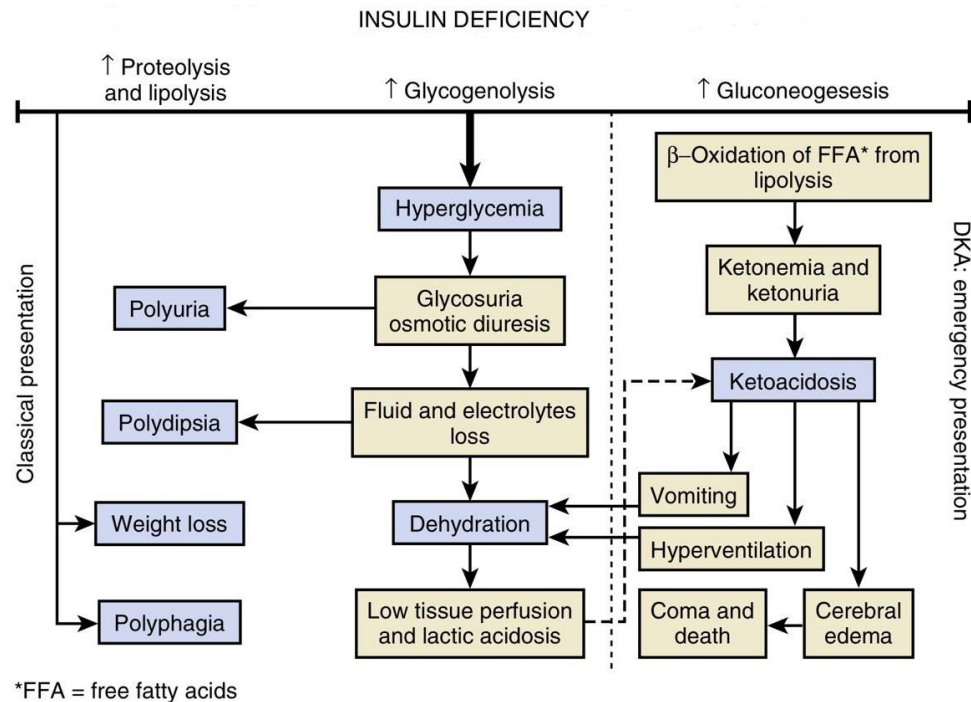


Figura 1. Presentaciones clínicas de la DM1. La presentación clínica de la enfermedad puede ocurrir de manera clásica, en la que se presentan los síntomas típicos, o puede desencadenarse un evento de cetoacidosis, de acuerdo al grado de deficiencia de insulina. Imagen tomada y modificada de [4].

Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 1

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen en el mundo 422 millones de personas con DM, de las cuales, un 5-15% padecen DM1 [10]. La DM1 es la forma más común de DM en la infancia (<15 años de edad), y según datos de la Federación Internacional de Diabetes más de 500.000 niños viven con esta condición en el mundo [11]. Aunque la enfermedad se ha considerado siempre como una enfermedad de la infancia, recientemente se ha sugerido que la incidencia es comparable en población adulta [2]. La incidencia de la DM1 se ha incrementado en todo el mundo y varía ampliamente entre países (**Fig. 2**), siendo la más alta en países escandinavos, especialmente en Finlandia y Suecia, seguido de países europeos, América del Norte y Australia. En México, de acuerdo con estimaciones de la Dirección de Prestaciones

Médicas del Seguro Social, entre los años 2000 y 2010 el número de casos nuevos con DM1 incrementó de 3.4 a 6.2 por cada 100.000 habitantes [12], mientras que para el año 2013 se reportó un aumento de la incidencia a 16.28 casos nuevos por cada 100,000 habitantes (**Fig. 3**) [13].

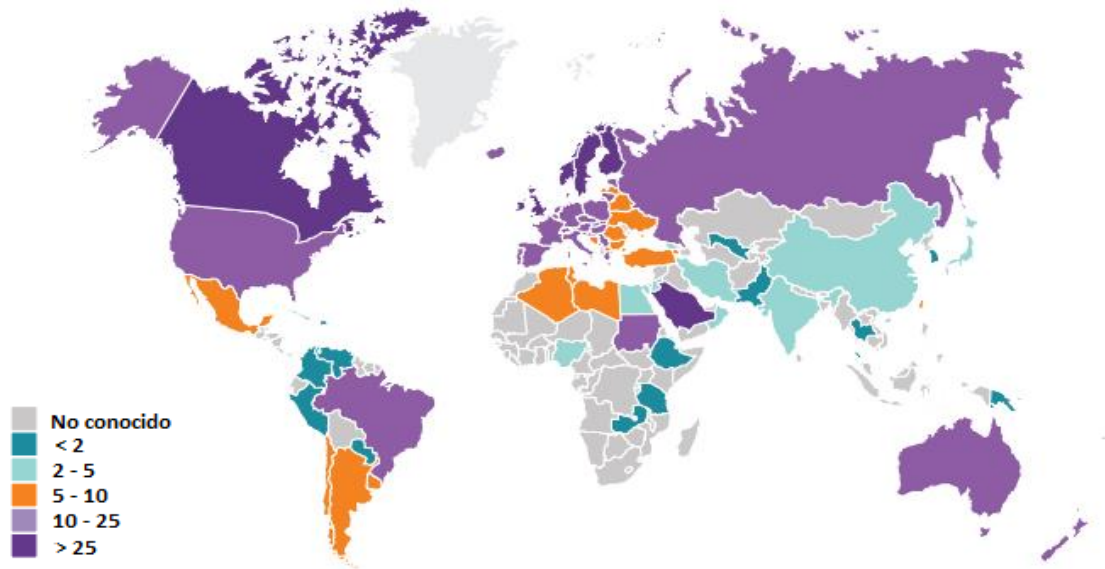


Figura 2. Nuevos casos estimados de diabetes tipo 1 (<15 de años de edad) por cada 100,000 individuos en 2015. Datos de la Federación internacional de Diabetes (<http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html>) [11].



Figura 3. Nuevos casos estimados de diabetes tipo 1 por cada 100,000 habitantes en 2010 en México. Datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía [14].

Etiología de la diabetes mellitus tipo 1

La etiología que conduce al desarrollo de DM1 es desconocida, sin embargo se sabe que algunos factores ambientales, así como la constitución genética, juegan un papel importante en el desarrollo de la misma. Diversos estudios realizados reportan la asociación de varios alelos o variantes genéticas con la enfermedad, como factor de riesgo o como factor protector. Así, existen diferentes genes de susceptibilidad para el desarrollo de la patología, y se han reportado más de 40 *loci* de susceptibilidad. Los genes del HLA de clase II en la región del cromosoma 6p21 es un *locus* crítico de susceptibilidad para muchas enfermedades autoinmunes humanas, incluyendo la DM1. Entre los *loci* genéticos de susceptibilidad que se han descrito se encuentran la región promotora del gen de la insulina, el gen PTPN22, que codifica una proteína tirosina fosfatasa linfocitaria (LYP) que es importante en la regulación negativa de la señalización de las células T, el gen que codifica la cadena α del receptor de interleucina (IL)-2, y la región promotora de CTLA-4 (antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos), la cual es una molécula vital para la correcta regulación negativa de las respuestas inmunes [15, 16]. El complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que en humanos se refiere a HLA (antígeno leucocitario humano), contiene un gran número de genes que se relacionan con la función del sistema inmune (**Fig. 4**).

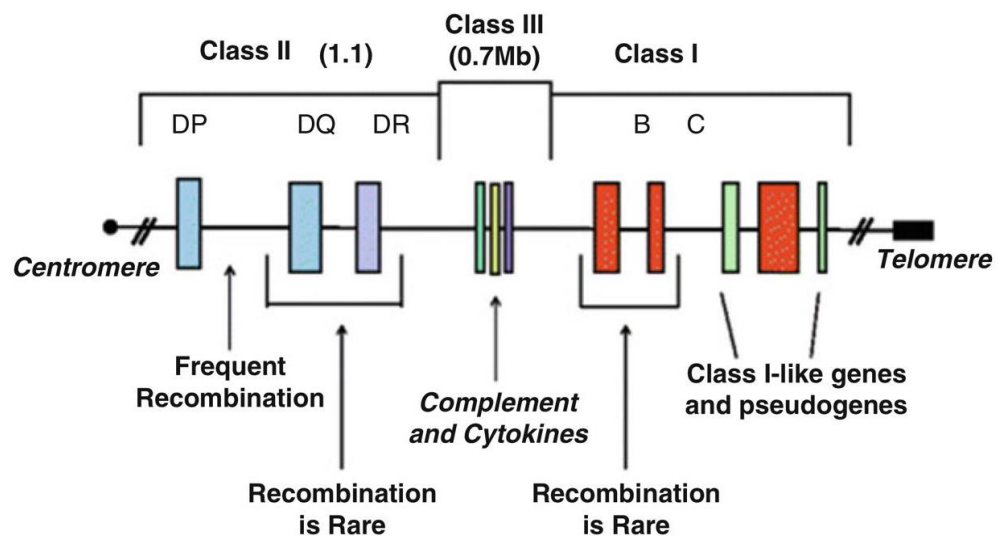


Figura 4. Complejo del antígeno leucocitario humano (6p21). Tomado de [17].

Los genes de clase II del HLA codifican antígenos que son expresados únicamente en ciertos tipos de células inmunes (células B, células dendríticas, macrófagos, y linfocitos T activados) e incluye los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR [17]. Existen personas con alto riesgo genético de contraer DM1, entre las que se encuentran aquellas que presentan una historia familiar de la enfermedad y alelos específicos de HLA DR/DQ como DRB1*03-DQB1*0201 (DR3), DRB1*04-DQB1*0302 (DR4), DQA1*0301, DQB1*0302 (DQ8). Se ha determinado que el genotipo asociado con el mayor riesgo de desarrollar DM1 es el genotipo heterocigoto DR3/4-DQ8. También existen alelos protectores como DQB1*0602, que se encuentra en <1% de los pacientes con DM1 [18]. No obstante, solo 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 las infecciones virales (algunos virus son capaces de infectar y destruir directamente las células beta, o algunos antígenos (Ag) virales comparten secuencias con Ag de las células beta -mimetismo molecular-). Los virus pueden incrementar el riesgo de desarrollar DM1 a través de mecanismos como la destrucción de un cierto número de células beta que provoca procesos inflamatorios, o directamente a través de la activación de células T auto-reactivas [4]. Los virus que más se han asociado con DM1 comprenden enterovirus, Rubella, rotavirus, parvovirus y citomegalovirus. Otro factor que probablemente contribuye al desencadenamiento de la enfermedad es la dieta, por efecto de las proteínas de la leche de la vaca, exposición al gluten o deficiencia de vitamina D [17] (**Fig. 5**). Durante el tiempo de disminución en el funcionamiento y en la masa de las células beta pancreáticas los Aab generados contra auto-Ag de las células beta aparecen en varios títulos y combinaciones, lo cual puede emplearse como un marcador de las respuestas autoinmunes y del riesgo de desarrollar la enfermedad. Así, el riesgo de la enfermedad incrementa con el número de Aab detectables, sabiendo que la presencia de dos o más de éstos indica un mayor riesgo de desarrollar DM1 dentro de los próximos 10 años.

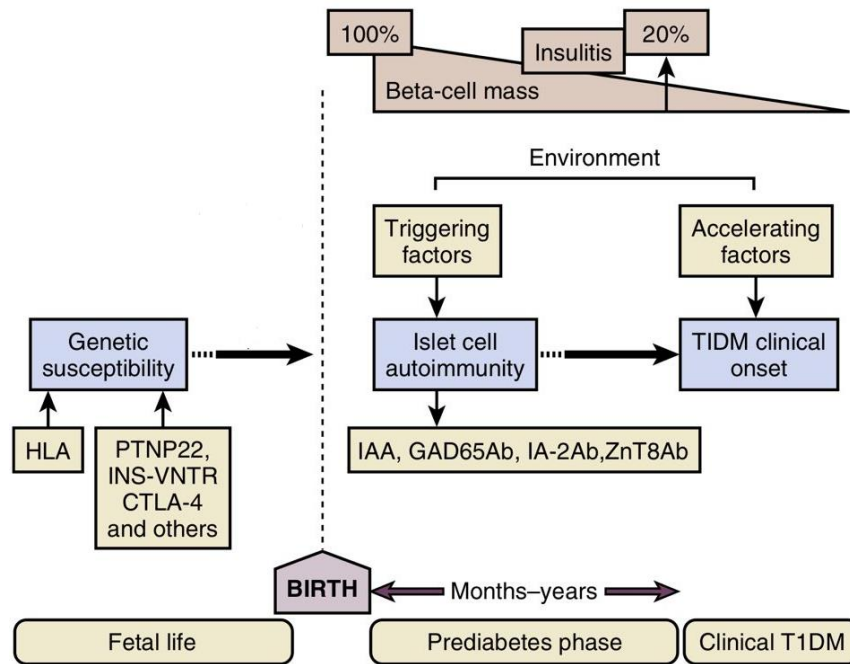


Figura 5. Etiología e historia natural de la DM1. Se cree que la influencia de factores ambientales y variables genéticas contribuyen al desarrollo de la enfermedad. La fase pre-diabética puede comprender desde meses hasta años, en la cual se pueden detectar los marcadores autoinmunes antes del inicio clínico de la enfermedad. Imagen tomada y modificada de [4].

Patología de la diabetes mellitus tipo 1

La DM1 es una enfermedad autoinmune en la cual se destruyen las células beta del páncreas debido a un evento inflamatorio en los islotes, así como el daño mediado por la insulinitis (infiltración leucocitaria). Dentro de este infiltrado se ha reportado la presencia de poblaciones heterogéneas como lo son: linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas (DC) y, de manera ocasional, células NK [19, 20] (**Fig. 6**). Lo anterior ocasiona la activación de linfocitos T (LT) auto-reactivos CD4+ del subtipo Th1 y Th17 y de LT CD8+, los cuales son capaces de destruir las células beta. La suma de estos factores da como resultado la pérdida progresiva de la función secretoria de la insulina. Esto se presenta con anterioridad a las manifestaciones clínicas de la enfermedad que pueden ir de meses a años (fase silenciosa de la enfermedad) [21-23]. Durante esta fase silenciosa y alrededor del tiempo de diagnóstico se produce el mayor grado de destrucción de las células beta, lo cual se ha asociado con la caída drástica de los

niveles de péptido C (**Fig. 7**). Es importante desarrollar metodologías que permitan detectar dichas etapas, ya que se ha descrito que la función residual de las células beta puede conservarse con un mejor control glicémico (dietas hipoglucémicas estrictas) [24].

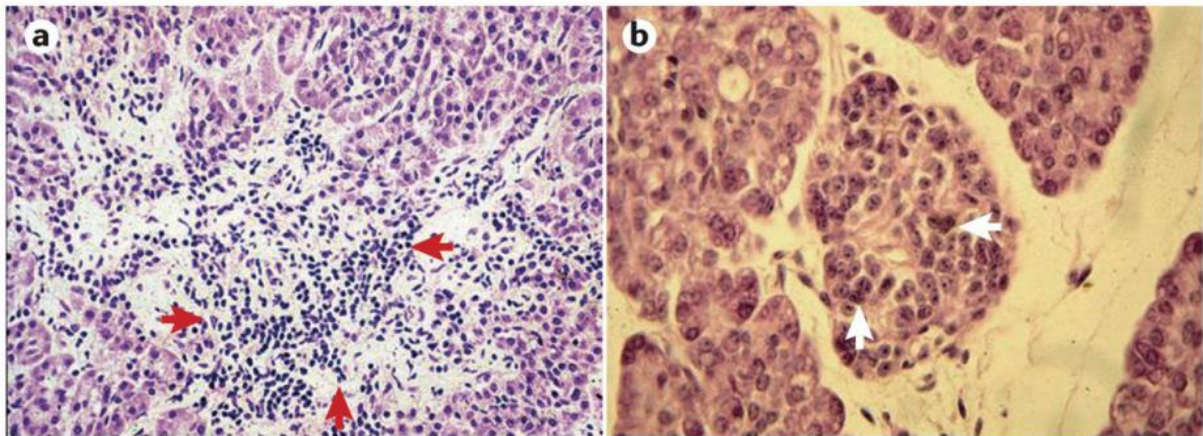


Figura 6. Proceso de insulitis en diabetes mellitus tipo 1. Corte histológico de tejido pancreático de un paciente con insulitis severa, con infiltrado masivo de células mononucleares (a) y de un paciente con insulitis menos severa (b). Imágenes obtenidas de [3].

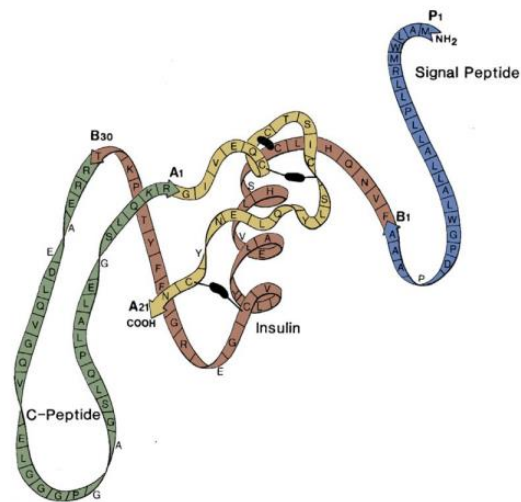


Figura 7. Estructura esquemática de la pre-proinsulina humana. Durante el procesamiento de la generación de insulina, en el RER (Retículo endoplásmico rugoso) se genera la pre-proinsulina, que luego pierde su péptido señal (azul) de 24 aminoácidos por medio de una escisión proteolítica, generando así la proinsulina, la cual es importada al aparato de Golgi, donde es enviada al interior de vesículas secretoras formando hexámeros. En este punto se produce otra escisión, generada por enzimas proteolíticas, específicamente las convertasas pro-hormonas produciendo el péptido C y la insulina libre conformada por las cadenas A (amarillo) y B (rojo), las cuales se encuentran unidas por enlaces disulfuro que estabilizan el dominio nativo de la insulina. Tomado de [25].

Se ha propuesto que los LT 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 alrededor de 155 epítomos derivados de Ag de las células beta que son reconocidos por LT CD4+ y CD8+ de pacientes con DM1 o por individuos de alto riesgo, entre los que se encuentran GAD65, insulina, IA-2 (comunes para LT CD4+ y CD8+) y las proteínas de choque térmico HSP60 y 70 (reconocidos por LT CD4+), lo que los sitúa como los mejores candidatos para monitorear la actividad autoinmune, con posibles intervenciones terapéuticas [26].

Las evidencias del papel patológico de los LT en la DM1 se han obtenido fundamentalmente en el ratón diabético no obeso (NOD), el cual desarrolla espontáneamente la enfermedad a las 12-14 semanas de vida. Desde la tercera a cuarta semana se observa un infiltrado de células mononucleares, compuesto principalmente por LT CD4+, además de LT CD8+, células NK, linfocitos B, DC y macrófagos. Así, se ha sugerido que los linfocitos tienen un papel crucial en la patogénesis de la DM1, ya que la enfermedad se desarrolla con la transferencia de esplenocitos de un ratón NOD a un ratón receptor, el cual desarrolla la enfermedad con una alta frecuencia y a una edad más joven, respecto a los ratones control [27]. Los LT CD4+ y CD8+ tienen diversos papeles en el inicio de la DM1. Los LT CD4+ (fenotipos Th1 y Th17) inician la respuesta inmune contra las células beta pancreáticas, además de inducir la activación de las células B, promoviendo la producción de Aab. Los LT citotóxicos CD8+ contribuyen directamente a la muerte celular de las células beta mediante la liberación de moléculas citotóxicas que incluyen perforinas y granzimas **(Fig. 8)** [28].

El proceso regulatorio inmunológico es de vital importancia en el desarrollo de DM1, y se considera que la DM1 se desarrolla cuando estos mecanismos reguladores se encuentran alterados. Entre las poblaciones de células que son capaces de suprimir las respuestas inmunitarias se encuentran los LT reguladores (Treg), los cuales actúan mediante la producción de citocinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10 o a través del contacto directo célula-célula. Se ha determinado que en pacientes con DM1 las células Treg se encuentran en menor cantidad y/o son menos efectivas, lo cual es un factor que contribuye al desarrollo de la enfermedad. Otra población a la cual se le ha atribuido un papel regulador son los linfocitos NKT, ya que sus mecanismos de acción

se han asociado con la inducción de respuestas celulares mediadas por linfocitos Th2 a través de la producción de IL-4, inhibiendo la respuesta pro-inflamatoria mediada por el fenotipo efector Th1. Así, en ratones NOD el número de células NKT es limitado, lo cual conlleva al desarrollo de la DM1 [28].

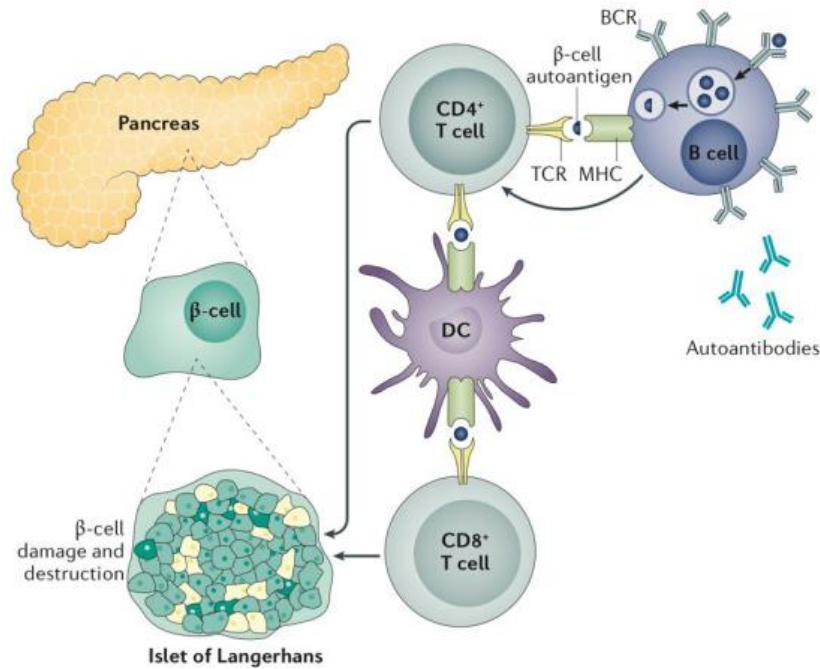


Figura 8. Proceso patológico desencadenado en la diabetes mellitus tipo 1. Se considera que un daño inicial en las células beta permite la liberación de antígenos diabetogénicos que son internalizados por las DC que residen en el páncreas. Estas DC viajan a los nódulos linfoides que drenan el órgano, permitiendo así la presentación del antígeno a células efectoras CD4+ y CD8+. Los LT CD4+ cooperan con la activación de las células B para la producción de Aab, los cuales son biomarcadores de la fase asintomática de la enfermedad. Tomado de [3].

Autoantígenos en la diabetes tipo 1

En el proceso de destrucción de la célula beta, principalmente durante el periodo asintomático, se puede determinar la presencia de Aab circulantes a los que se les ha atribuido un papel como marcadores de autoinmunidad humoral, aunque no tienen un papel activo en la destrucción de las células beta. Estos Aab, junto con parámetros metabólicos, permiten llevar un mejor seguimiento de individuos en fase pre-diabética

[29]. Estudios en ratón y en humano señalan que el riesgo de desarrollar la enfermedad en un determinado tiempo está dado por el número de Aab que se presenten [30]. Los primeros Aab que se asociaron con el desarrollo de la DM1 fueron los ICA, y posteriormente se determinó que a los ICA lo conforman un grupo de anticuerpos contra diferentes determinantes antigénicos (GADA e IA-2A). Otros Aab bien reconocidos en DM1 son GADA, IAA, IA-2A y Aab anti-transpotador de zinc 8 (ZnT8A). IAA es generalmente el primer Aab en aparecer en niños jóvenes en la fase preclínica, y se sabe que está fuertemente asociado con el HLA de alto riesgo, lo cual determina una mayor susceptibilidad a desarrollar DM1 [31]. Generalmente la presencia de más de un Aab es altamente predictivo en familiares de primer grado (FDR) y en la población abierta para el desarrollo de la patología, ya que pueden estar presentes años antes del desarrollo clínico de la enfermedad [12, 32-34]. Esto es de gran importancia, ya que FDR de pacientes con DM1 tienen un riesgo de desarrollar la enfermedad de aproximadamente un 5%. Además en hijos nacidos con ambos padres diabéticos el riesgo de desarrollar la enfermedad se incrementa a un 7%. De acuerdo a estudios realizados, la diversificación de epítomos (“epitope spreading”) de los Aab se evidencia en la fase preclínica, donde la respuesta inicial de los GADA se produce frente a epítomos de la porción media de GAD65, pero posteriormente se generan GADA dirigidos contra otras regiones de la molécula, como su región COOH-terminal. La reactividad frente a los epítomos de la región N-terminal es menos común y mucho más débil [35, 36]. Los IA-2A reconocen la región citoplásmica de IA-2 y los primeros Aab que aparecen reconocen la región yuxtamembranal, los cuales se asocian con un riesgo incrementado a la progresión de DM1; posteriormente se diversifican hacia múltiples epítomos en el dominio fosfatasa [37]. La respuesta humoral frente a estos auto-Ag está determinada mayoritariamente por el isotipo IgG1, en algunos casos de manera exclusiva (GADA, IA2A), y en otros casos en menor grado, con respuestas de IgG3 e IgG4 (IAA). IgG2 parece ser el isotipo menos frecuente. Estos datos, en conjunto, podrían asociarse con respuestas de tipo células Th1, predominantes en DM1.

Los pacientes que debutan con la enfermedad presentan mayoritariamente Aab, y 80-85% de los casos presentan ICA, GADA, IA-2A, o combinaciones de ellos. Así, estos tipos de Ab se asocian con la sensibilidad y el valor predictivo positivo para el desarrollo clínico de la DM1 [38]. Estudios en FDR han sugerido que el número total de tipos de

Aab y sus combinaciones establecen la sensibilidad del riesgo de padecer DM1, ya que cuando se emplea la presencia de un solo Aab el riesgo está representado en un 5-10%, mientras que si se evalúa más de 1 Aab (GADA e IA-2A, por ejemplo) el riesgo aumenta a un 67-83% [39, 40] (**Tabla 1**), lo que sugiere una relación directa entre los tipos y cantidad de Aab con el aumento en el riesgo de presentar la patología.

Tabla 1. Estudios en familiares sanos de pacientes con DM1. Se determina el riesgo desarrollar la enfermedad a 5 años de acuerdo al número y combinación de Aab.

Islet autoantibody status	5-year risk of developing type 1 diabetes (%)
ICA-negative	3.2
ICA alone	5.3
IAA alone	9.1
Any two islet autoantibodies	28.2
ICA-positive + one other islet autoantibody	50.3
IAA-positive + one other islet autoantibody	55.7
Any three or four islet autoantibodies	66.2

Ausencia de auto-anticuerpos y desarrollo de DM1

Se ha establecido ampliamente que la aparición de Aab en sangre precede el inicio clínico de la DM1 por muchos años. En diversos estudios realizados en FDR de pacientes con DM1 se ha determinado que diversos factores de riesgo como la presencia de alelos de HLA de alto riesgo, una historia familiar positiva, tipos y títulos elevados de Aab y una edad temprana de aparición de éstos, se asocian con estrechamente con el desarrollo de la enfermedad. También se sabe que el proceso de destrucción de las células beta está mediado por la inmunidad de tipo celular que involucra a los LT auto-reactivos, y que probablemente las células T reguladoras (Tregs) por medio de la secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β contribuyen al control de la destrucción.

Las respuestas celulares de LT frente a Ag diabetogénicos han sido bien estudiadas en pacientes diabéticos. Algunos trabajos han determinado que los FDR seropositivos (Aab+) presentan reactividad de sus células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frente a un amplio espectro de proteínas pancreáticas (ej: insulina, glucagón, GAD65 e IA-2), respuestas que en algunos trabajos se han reportado incrementadas con respecto a las encontradas en pacientes debutantes [41]. De manera similar a lo observado para los Aab, las respuestas de las PBMC frente a múltiples Ag diabetogénicos se han asociado con el riesgo de desarrollar DM1. Así, estudios con FPG1 Aab+ han mostrado que más del 50% de individuos que incrementaron el número de auto-Ag frente a los que respondieron sus PBMC desarrollaron DM1 dentro de los siguientes 30 meses [42].

La correlación entre las respuestas humorales y celulares frente a Ag como insulina, GAD65 e IA-2 no está bien establecida, y existen estudios que demuestran tanto correlaciones positivas como inversas, o una ausencia de correlación [40, 43, 44]. Los títulos de Aab también se pueden reducir con la edad del individuo, y se ha demostrado que mientras que los IAA desaparecen rápidamente durante el período preclínico, existe una correlación positiva entre las respuestas de PBMC frente a insulina y la edad de los individuos [45]. De esta manera, la ausencia de Aab en FDR no está necesariamente asociada con la ausencia de respuestas autoinmunes, y si bien se considera que los FDR que no han desarrollado Aab a la edad de 18 años tienen bajo riesgo de desarrollar DM1 [46], también está bien demostrado que alrededor del 20% de individuos que debutan con DM1 no presentan AAb [47]. La prevalencia de seronegatividad para Aab incrementa significativamente con la edad y entre grupos étnicos, siendo mucho mayor en individuos mayores de 14 años y en los grupos de hispanos y afroamericanos [47].

Existen muy pocos estudios que evalúen las respuestas auto-reactivas de LT en FDR seronegativos para Aab (Aab-) aunque, como se ha mencionado anteriormente, algunos de estos individuos pueden desarrollar la enfermedad. En algunos trabajos se ha demostrado la ausencia de proliferación de sus PBMC en respuesta a Ag diabetogénicos [49]. Sin embargo, otros autores han reportado que FDR Aab- que presentan de alelos de HLA de alto riesgo tienen respuestas de IFN- γ frente a IA-2 y a pro-insulina similares a las de sus familiares con DM1, pero sus respuestas de IL-10 se

encuentran incrementadas [50]. Con base en estos datos se ha postulado que los elevados niveles de IL-10 podrían constituir un factor protector para evitar el desarrollo de la enfermedad en FDR genéticamente predispuestos, a pesar de que presentan respuestas autoinmunes inflamatorias al mismo nivel de los pacientes.

JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 1 representa actualmente un serio problema de salud. Su incidencia se ha incrementado en la población mexicana en la última década, y los pacientes presentan un alto riesgo de padecer complicaciones severas, como enfermedades cardiovasculares, nefropatías, neuropatías, y retinopatías, por lo cual es de gran importancia establecer determinantes y/o diseño de métodos de diagnóstico temprano que puedan contribuir a identificar y retrasar un posible desarrollo de la enfermedad.

En este trabajo de investigación se pretende evaluar si las células dendríticas autólogas permiten detectar autoinmunidad frente a antígenos diabetogénicos en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1 que no presenten Aab. A largo plazo, los resultados que se obtengan permitirán evaluar si la detección de LT auto-reactivos en familiares sanos de pacientes con DM1 seronegativos puede representar un factor pronóstico para el desarrollo de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Las células dendríticas autólogas pueden ser utilizadas para detectar respuestas auto-reactivas de linfocitos T CD4+ frente a antígenos diabetogénicos en familiares sanos de pacientes con DM1 que no presentan auto-anticuerpos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de las células dendríticas autólogas para detectar respuestas de linfocitos auto-reactivos en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1 que no presentan auto-anticuerpos frente a antígenos diabetogénicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Reclutar familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1 (padres, hermanos o hijos) que no presenten auto-anticuerpos frente a insulina, GAD65 e IA-2, e individuos control.
2. Aislar linfocitos T CD4+ con fenotipo efector/memoria y monocitos de los individuos reclutados.
3. Evaluar la proliferación y producción de citocinas de los linfocitos T CD4+ en respuesta a células dendríticas autólogas derivadas de monocitos, pulsadas con insulina, GAD65 e IA-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción general del estudio

Se reclutaron pacientes con diagnóstico de DM1 del área de Endocrinología del Centro Médico Nacional la Raza, y se invitó a sus familiares de primer grado (hermanos, padres e hijos) a incorporarse al protocolo. Se reclutaron también individuos control sin relación de parentesco con pacientes con DM1. Tras firmar un consentimiento informado, se tomó una muestra de sangre de 5 ml a los participantes para determinar la presencia de los Aab. A los individuos seronegativos y a los controles se les realizó una segunda toma de sangre de 40-45 ml con la cual se realizó la purificación los LT CD4+CD45RA- y los monocitos. A partir de los monocitos se generaron DC y se valoró la inducción de proliferación y secreción de citocinas por los LT de memoria en respuesta a las DC que fueron previamente pulsadas con insulina, GAD65 e IA-2.

Sujetos de estudio

Se reclutaron pacientes de los servicios de Endocrinología del Centro Médico Nacional “La Raza” con diagnóstico de DM1, de acuerdo con los criterios de la OMS, y se incluyeron en el protocolo a sus familiares de primer grado que aceptaron firmar el consentimiento informado. En el servicio de Endocrinología se realizó la recolección de datos y la historia clínica de los familiares sanos, la firma del consentimiento informado para participar en el estudio, la extracción de sangre (5 ml) para el análisis inicial de la presencia de Aab frente a insulina, GAD65 e IA-2, y la extracción de sangre para los estudios celulares de los familiares seronegativos.

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 estudios celulares, familiares e individuos control no relacionados con pacientes con DM1 que sean seronegativos para IAA, GADA e IA-2A.

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.

Este protocolo fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con número de registro R-2105-785-044, así como por el Comité de Bioética para la Investigación en Seres Humanos del CINVESTAV-IPN (Folio 017/2014).

Determinación de la presencia de Aab anti-insulina, anti-GAD65 y anti-IA-2

La concentración de los Aab IAA, GADA e IA-2A se evaluó por medio de la técnica de ELISA a partir de los sueros de los individuos. El kit de ELISA que se empleó para la detección de IAA 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 U/ml y 0.7 U/ml para insulina, GAD65 e IA-2, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de cada uno de los kits de ELISA fue de 86.7% y 98.7% para IAA, 96% y 98% para GADA, y 66% y 99% para IA-2A, 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 Aab fuera ≥ 10 U(UI)/ml.

Purificación de las células

Las células se aislaron a partir de sangre total de FDR Aab- y de individuos control. La sangre fue sometida a un gradiente de Ficoll-Hypaque (Nycomed Pharma AS, densidad 1.077g/l). Tras ser centrifugada a 2,000 rpm durante 30 min las PBMC fueron separadas de la interfase entre el Ficoll y el plasma.

La población de monocitos CD14+ se purificó a partir de las PBMC por selección positiva mediante el sistema MACS (“Magnetic Cell Sorting”), utilizando un Ab anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas.

Los LT CD4+ se obtuvieron a partir de PBMC por selección negativa, por medio del sistema MACS. Una vez aislados los LT CD4+, estos fueron incubados con Ab anti-CD45RA conjugados con perlas magnéticas, con el fin de eliminar los LT vírgenes. Las células resultantes CD4+CD45RA- corresponden a los LT de memoria.

Diferenciación de monocitos hacia células dendríticas

La obtención de DC se realizó bajo las condiciones previamente estandarizadas en nuestro laboratorio. Los monocitos fueron cultivados a una densidad de 10^6 células/ml en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero humano autólogo descomplementado, L-glutamina 2 mM (Hyclone Laboratories), penicilina/estreptomina 1% y 2-mercaptoetanol 50 μ M (Gibco BRL). Las células fueron cultivadas en presencia de las citocinas humanas recombinantes, factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF, Probiomed, 1,000 U/ml) e IL-4 (R&D Systems, 120 U/ml) durante 6 días a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Cada dos días se cambió la mitad del medio de cultivo y se reconstituyó con la concentración de citocinas necesaria. Al sexto día se obtuvieron las DC inmaduras, las cuales se recolectaron y se sembraron a una concentración de 0.5×10^6 células/ml. En este momento se añadió el Ag (insulina, GAD65, IA-2 o candidina como control positivo) a una concentración de 0.1-0.2 μ g/ml, y 6 horas más tarde se adicionó el estímulo de maduración, lipopolisacárido bacteriano (LPS, Sigma-Aldrich, 0.1 μ g/ml). Las células se cultivaron durante 48 horas más en medio con GM-CSF e IL-4, y tras este tiempo se obtuvieron DC maduras.

Estimulación de los LT de memoria con las DC

Se realizaron co-cultivos de cada tipo de DC pulsadas con insulina, GAD65 o IA-2 con LT de memoria autólogos. Los LT fueron teñidos con carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE, Molecular Probes). Los co-cultivos con las DC se realizaron

en medio RPMI suplementado. Se utilizó una relación DC:LT de 1:10, y como control de proliferación inespecífica de Ag se utilizaron DC no pulsadas con Ag. Transcurridos 5 días de co-cultivo se recogieron los LT y se evaluó su proliferación mediante citometría de flujo por el método de dilución de CFSE. La proliferación celular se determinó restando el porcentaje de células proliferantes en presencia de Ag del porcentaje obtenido en ausencia de Ag. Se consideró una respuesta celular positiva frente a los Ag diabetogénicos cuando ésta fue mayor que la (media + 3 SD) obtenida en los individuos control.

En las respuestas autólogas de los LT de memoria con las DC se recogió parte del sobrenadante (SN) en el día 1 de cultivo y se congeló a -80°C hasta su análisis. Se determinó la concentración de IL-2 por la técnica de ELISA (BD Biosciences).

Análisis estadístico

La comparación entre las medias de dos grupos experimentales se realizó mediante la prueba *t* de Student de dos colas 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.

RESULTADOS

Análisis de Aab en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1

En un estudio realizado en el laboratorio, al cual he contribuido en mi tesis de maestría, se analizaron FDR sanos de pacientes con DM1, cuyas características se presentan en la **(Tabla 2)**. El análisis de presencia/ausencia de Aab se realizó en un total de 426 familiares, los cuales cumplieron con los criterios establecidos para la selección, como se describe en Materiales y Métodos. Se evaluaron 235 hermanos (91 hombres y 144 mujeres, media de edad 17.7 ± 6.8), 40 hijos (19 hombres y 21 mujeres, media de edad 18.6 ± 9.9), y 151 padres (46 hombres y 105 mujeres, media de edad 41.5 ± 6.5). Diecinueve hombres y 52 mujeres (16.6%) **(Fig. 9A)** resultaron positivos para uno (45.1%) o dos Aab (54.9%). Ningún FDR Aab+ presentó los tres Aab evaluados. De ellos, el 53.8% fue positivo para GADA, 38.4% para IA-2A y 7.6% para IAA. Tres FDR debutaron con DM1 con posterioridad a su análisis de Aab.

La mayor prevalencia de FDR Aab+ se encontró en los hijos de pacientes con DM1 (25%), seguido de los hermanos (19.6%), y de los padres (9.9%). Las frecuencias de FDR Aab+ en el grupo de hermanos e hijos fueron significativamente diferentes con respecto al grupo de padres. Los Aab en los que se detectaron títulos más altos fueron los GADA, seguido de los IA-2A y finalmente los IAA **(Fig. 9B)**. Las diferencias entre los títulos de GADA y los de IA-2A e IAA fueron estadísticamente significativos, así como las diferencias entre los títulos de IA-2A e IAA **(Fig. 9B)**.

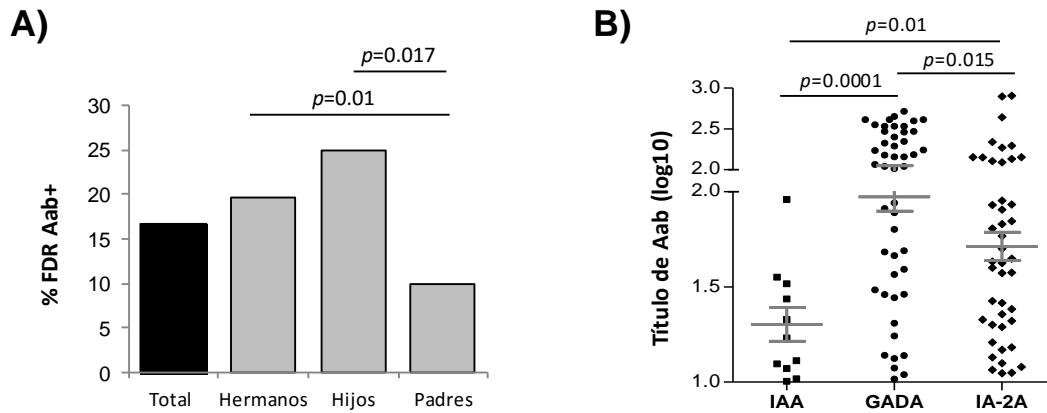


Figura 9. Prevalencia de auto-anticuerpos en familiares de primer grado de pacientes con DM1. A) Porcentaje de FDR Aab+ en el total de familiares analizados y estratificados de acuerdo a su grado de parentesco (hermanos, hijos y padres). B) Títulos de los Aab indicados que presentaron los FDR Aab+. Cada símbolo representa los datos de un individuo. Los datos se expresan en log10 y las barras horizontales representan la media \pm SEM de los títulos de cada Aab. El análisis estadístico en A) se realizó mediante la prueba de Fisher y en B) mediante la prueba *t* de Student.

Análisis de las respuestas celulares en los familiares seronegativos

Con el fin de determinar si los FDR Aab- presentaban respuestas autoinmunes de LT se realizaron co-cultivos de los LT CD4+CD45RA- de 12 FDR con DC autólogas pulsadas con Ag diabetogénicos. Como control se evaluaron 12 individuos sin relación de parentesco con pacientes con DM1. Las características de ambos grupos se muestran en la **(Tabla 2)**. El grupo de FDR seronegativos incluyó 2 madres, 2 padres, 3 hermanos y 5 hermanas. El total fue de 5 hombres (41.6%), con una media de edad de 34.6 ± 18 años, y 7 mujeres (58.3%), con una media de edad de 31.7 ± 12.1 años. En el grupo control se incluyeron igualmente 5 hombres (38.4%), con una media de edad de 31.4 ± 4.5 años, y 8 mujeres (61.5%) con una media de edad de 34.7 ± 11.1 años.

Los resultados correspondientes a la proliferación de los LT se muestran en la **(Fig. 10)**. Los LT de 3 FDR mostraron proliferación frente a insulina por encima de los niveles basales establecidos (definidos por los valores obtenidos en los individuos control, ver Materiales y Métodos), en 2 FDR se detectó proliferación frente a GAD65 y en 2 frente

a IA-2. La reactividad de los FDR y de los individuos control frente a candidina fue similar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de proliferación de los LT de los FDR y los controles para ningún Ag evaluado.

Tabla 2. Características de los individuos participantes en el estudio.

Individuos analizados	n	Edad ^{a)}	Rango ^{a)}	Sexo (F:M)	Glucosa ^{b)}	Colesterol ^{c)}	Triglicéridos ^{d)}	T/A diast. ^{e)}	T/A sist. ^{f)}
FDR Aab-	12	32.9 ± 14.9	17-58	1.4:1	89 ± 5	187 ± 19	183 ± 40	111 ± 12	73 ± 9
Controles	13	33.5 ± 9.3	24-55	1.6:1	86 ± 5.5	181.4 ± 15	138 ± 14.7	109 ± 6.2	77 ± 10

Los datos de edad, niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre y la tensión arterial diastólica y sistólica se presentan como la media ± SD del grupo evaluado.

- a) Años.
- b) Rango normal: 70-110 mg/dl.
- c) Rango normal: 136-200 mg/dl.
- d) Rango normal: 30-183 mg/dl.
- e) T/A diast.: Tensión arterial diastólica en mm Hg.
- f) T/A sist.: Tensión arterial sistólica en mm Hg.

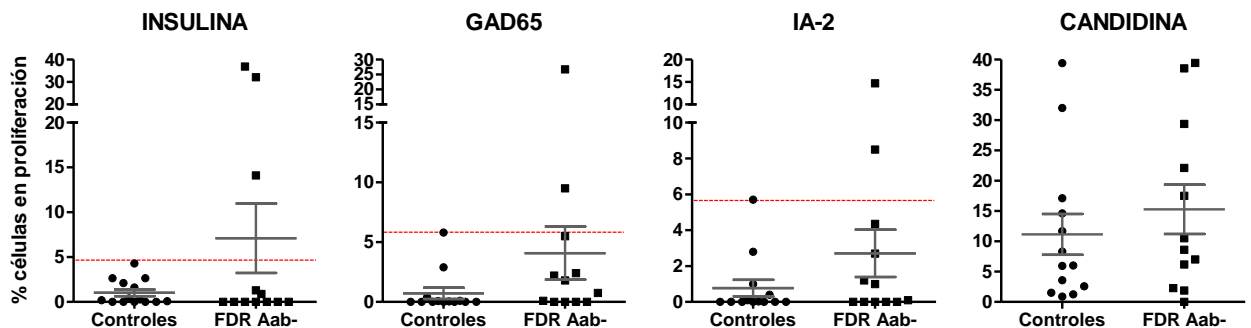


Figura 10. Respuestas celulares de FDR Aab- frente a antígenos diabotogénicos. Porcentaje de LT de memoria CD4+CD45RA- de individuos control y de FDR Aab- que proliferaron frente a insulina, GAD65, IA-2. Cada símbolo representa los datos de un individuo. Los porcentajes de LT que proliferaron específicamente frente a cada antígeno se obtuvieron sustrayendo los valores de proliferación de los LT co-cultivados con DC no pulsadas con antígeno. El punto de corte para definir una respuesta positiva (línea punteada roja) se definió como la media + 3 SD de los valores de proliferación obtenidos en los individuos control.

En la población de FDR Aab- analizada un total de 4 individuos (33%) mostraron respuestas de proliferación frente a algún Ag diabetogénico (**Fig. 11A**), 3 padres y un hermano (**Fig. 11B**). A este grupo de donantes lo denominamos FDR Aab-LT+. Este grupo incluyó 2 madres y un padre, y todos ellos presentaron sobrepeso. El único hermano en el que detectamos respuestas de proliferación es un individuo delgado, y sus LT respondieron específicamente a insulina. Los LT de 3 de los 4 FDR proliferaron en respuesta a insulina, 2 frente a GAD65 y 2 frente a IA-2 (**Fig. 12A**). En 2 FDR se encontraron respuestas frente a un solo Ag, que en ambos casos correspondió a insulina. Un FDR mostró reactividad frente a 2 Ag, GAD65 e IA-2, y el restante mostró reactividad frente a los 3 Ag evaluados (**Fig. 12B**). Por lo tanto, las respuestas frente a insulina y frente a un solo Ag fueron las más prevalentes entre los FDR Aab-LT+. Aunque el tamaño de la muestra que analizamos es muy pequeño y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, podemos sugerir que insulina es el auto-Ag más frecuentemente reconocido por los LT CD4+ de los FDR Aab- con respecto a los evaluados en este trabajo.

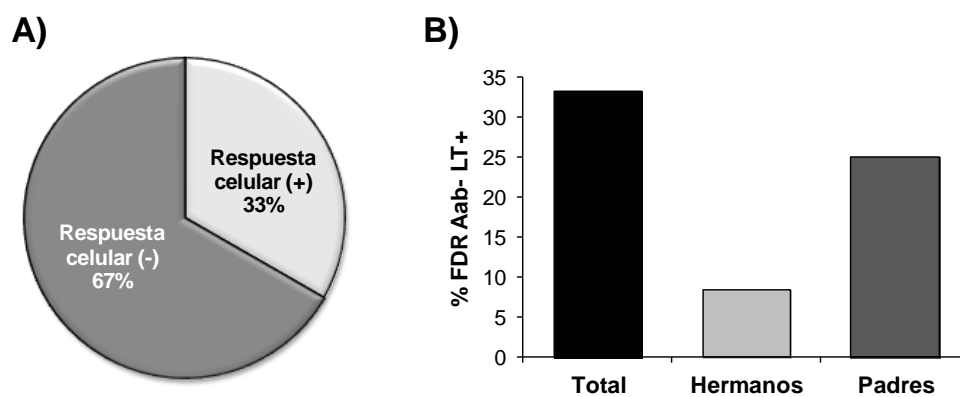


Figura 11. Respuestas celulares obtenidas en los FDR Aab- analizados. A) Representación de los porcentajes de FDR que presentaron respuestas positivas y negativas de LT frente a insulina, GAD65 o IA-2. B) Porcentaje de FDR con respuestas positivas de LT estratificados por su grado de parentesco con los pacientes con DM1. Análisis estadístico (prueba de Fisher), hermanos vs padres: $p=0.066$.

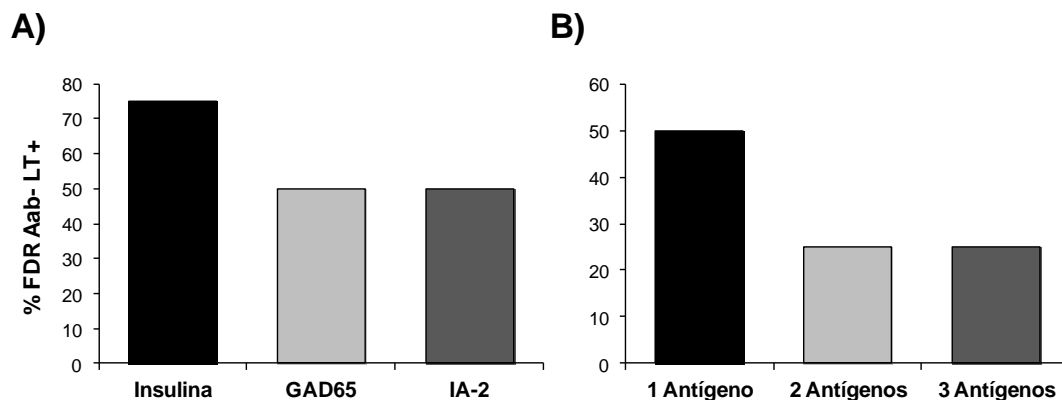


Figura 12. Las respuestas frente a insulina y frente a un solo antígeno son las más frecuentes en los FDR Aab-. A) Porcentaje de FDR Aab- cuyos LT proliferaron frente a insulina, GAD65 o IA-2, considerando el total de FDR Aab-LT+ como el 100%. B) Porcentaje de FDR Aab- cuyos LT proliferaron frente a 1, 2, o los 3 antígenos evaluados, considerando el total de FDR Aab-LT+ como el 100%. Análisis estadístico (prueba de Fisher), $p=1.000$ en cualquier comparación.

Los linfocitos T de los FDR Aab-LT+ producen altos niveles de IL-2 en respuesta a insulina

La producción de IL-2, el principal factor de crecimiento de los linfocitos T, está estrechamente ligada con el grado de proliferación de estas células. Con el fin de determinar el perfil de secreción de IL-2 secretada en los co-cultivos de los LT con las DC se analizaron los SN de cultivo tras 1 día de estimulación. Este tiempo fue establecido previamente en otros modelos de co-cultivo de LT con fenotipo efector/memoria y DC [51].

En general, los LT de los FDR Aab- secretaron mayores niveles de IL-2 en respuesta a insulina, GAD65 e IA-2, pero no en respuesta a candidina o cuando se cultivaron con DC en ausencia de Ag (**Fig. 13A**). Las diferencias encontradas en respuesta a insulina e IA-2 fueron estadísticamente significativas. Posteriormente se analizaron los FDR estratificados de acuerdo a la respuesta de proliferación de sus LT como LT+ y LT- (**Fig. 13B**). Este análisis indicó que los FDR Aab-LT- no secretaron IL-2 específicamente en respuesta a los auto-Ag, ya que no se detectaron diferencias significativas entre la IL-2 producida en ausencia o presencia de Ag (**Fig. 13B**). No obstante sí se detectaron ligeros aumentos en la producción de IL-2 en presencia de los Ag diabotogénicos. En contraste, los LT de los FDR Aab-LT+ secretaron significativamente mayores niveles

de IL-2 en respuesta a insulina con respecto a los valores obtenidos con las DC sin Ag (**Fig. 13B**), pero las respuestas frente a GAD65 o IA-2 no mostraron especificidad de Ag en términos de secreción de IL-2. Estos datos podrían estar relacionados con el grado de proliferación de los LT en respuesta a cada uno de los Ag, que fue especialmente elevado cuando los LT fueron estimulados con insulina.

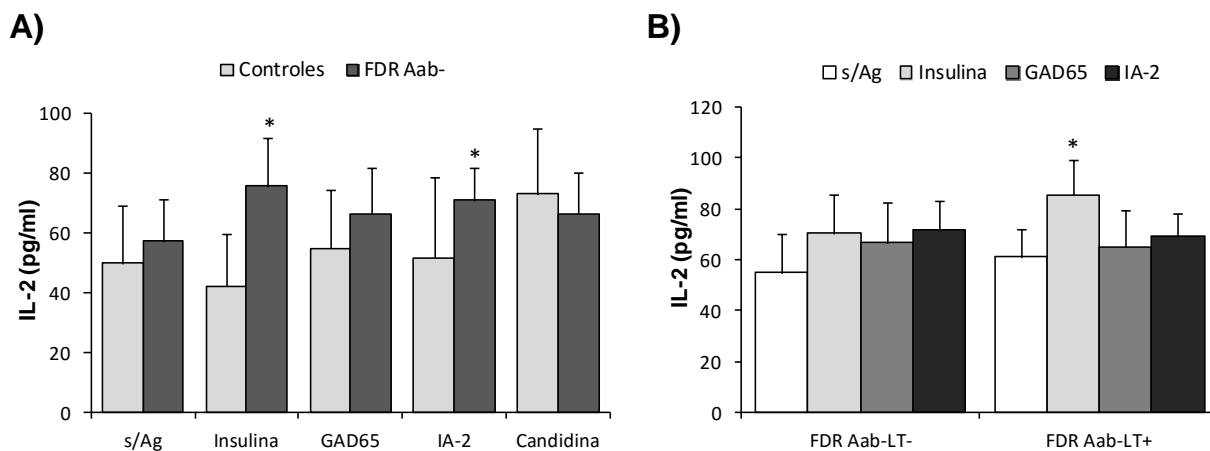


Figura 13. Producción de IL-2 por los linfocitos de los FDR Aab- en respuesta a antígenos diabotogénicos. Los sobrenadantes de los LT co-cultivados con DC pulsadas con los Ag indicados, o en ausencia de Ag (s/Ag), se colectaron en el día 1 de cultivo y se evaluó la concentración de IL-2 en los mismos. A) Producción de IL-2 por los LT de los individuos control y de los FDR Aab-. Se muestra la media \pm SD de los valores obtenidos. Análisis estadístico (prueba *t* de Student): controles vs FDR Aab-. Insulina, $p=0.00005$; IA-2, $p=0.039$. B) Producción de IL-2 por los LT de los FDR Aab- que no mostraron respuestas de proliferación de LT detectables (LT-) y de los FDR Aab- con respuestas de proliferación detectables (LT+). Se muestra la media \pm SD de los valores obtenidos. Análisis estadístico (prueba *t* de Student): concentración de IL-2 en presencia de los Ag vs concentración de IL-2 en ausencia de Ag. Insulina, $p=0.024$.

DISCUSIÓN

La DM1 es una enfermedad progresiva autoinmune crónica, caracterizada por el infiltrado de células mononucleares en los islotes pancreáticos y por la presencia de Aab frente a varios Ag, incluyendo IAA, GADA) e IA-2A, a los cuales se les ha atribuido un papel como marcadores de autoinmunidad humoral. Dicho infiltrado de células mononucleares desencadena una autoinmunidad celular, específicamente de las células T (CD4+ y CD8+), ya que se ha determinado que estas células y no los Aab pueden desarrollar la enfermedad, lo cual se ha demostrado en experimentos de transferencia en modelos murinos [27, 41, 42]. En la población mexicana, debido a que la diabetes en general constituye una de las principales causas de muerte en el país, es necesario incrementar el conocimiento en cuanto a la determinación de factores que evidencien el posible riesgo de desarrollo de la DM1 en los FDR sanos de los pacientes.

En el presente trabajo se analizó inicialmente la prevalencia de los Aab diabetogénicos IAA, GADA e IA-2A, característicos de la fase asintomática de la enfermedad, en FDR. Además, se evaluó la auto-reactividad de los LT mediante el uso de DC autólogas en FDR que presentaron seronegatividad frente a Ag diabetogénicos, con el fin de detectar autoinmunidad mediada por células.

Aab en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1

La prevalencia de FDR Aab+ obtenida en este trabajo fue el 16.6% del total de FDR analizados. Este fue un dato completamente inesperado al ser comparado con las prevalencias reportadas en otras poblaciones caracterizadas por tener altas incidencias de DM1 en el mundo, como lo es Cerdeña, con una prevalencia del 11.9% o Finlandia, con un 12.6%, lo cual se sustenta en parte por su estructura y flujo genético homogéneos, con un aislamiento particular que permite una distribución alélica estable [43, 44]. Sin embargo, al realizar un estudio detallado de los datos reportados para Cerdeña, Finlandia, Brasil, USA y Canadá pudimos comprobar que el grupo FDR de los padres siempre presenta una menor prevalencia de positividad para Aab y, en general, existen diferencias significativas con respecto al grupo de los hermanos [52, 54-57]. Por este motivo, cuando se considera la población de FDR en su totalidad, los porcentajes de seropositividad varían mucho entre los estudios dependiendo del número de padres

incluidos. Así, cuando evaluamos la prevalencia por grado de parentesco, los datos obtenidos en nuestro trabajo son muy similares a los reportados por Incani y col. para la población sarda [52], con un porcentaje de seropositividad de 18.5%, 29.4% y 7.2% en hermanos, hijos y padres, respectivamente. No obstante, los datos obtenidos en nuestro trabajo son muy altos para el grupo de hermanos e hijos. Como se ha mencionado anteriormente, trabajos muy rigurosos realizados en Finlandia, considerado el primer país en incidencia de DM1, indican que el porcentaje de hermanos Aab+ es del 8-12.6%, datos muy inferiores a los obtenidos en nuestro estudio en este grupo de FDR (19.6%). La composición genética de la población mexicana es compleja ya que, debido a la influencia de diversos factores (sociales, demográficos y económicos), la distribución alélica no es equitativa en la población y cambia de acuerdo a la región geográfica analizada [45]. De acuerdo a lo anterior, nuestros datos indican que la prevalencia de DM1 en México podría ir en aumento en zonas específicas, por lo cual es necesario dar continuidad a los estudios en la población abierta mexicana, ya que los reportes de prevalencia en nuestro país escasean y, por tanto, se hace necesario promover la ejecución de dichos estudios en poblaciones más amplias, además de dar un seguimiento adecuado a los FDR de pacientes diabéticos. A este respecto, un dato importante a considerar es que algunos alelos de riesgo del HLA de clase II asociados con DM1 se encuentran en una alta frecuencia en población abierta de mestizos mexicanos, como DQB1*0302 (23.7%), DRB1*04 (23%), DQB1*0201 (16.6%) o DRB1*03 (5%) [59], y este fondo genético podría ser en parte la base de los resultados que obtuvimos en nuestro estudio.

Los títulos y frecuencia más altos que encontramos entre el grupo de Aab analizados fueron los de GADA, mientras que los de IAA fueron los más bajos. Algunos estudios reportan que la frecuencia de GADA en FDR incrementa con la edad y persiste por muchos años, incluso después de la manifestación clínica de la enfermedad, siendo influenciado a su vez por genotipos particulares de HLA [46], lo cual nos sugiere que en próximos análisis que se realicen es importante determinar la relación entre genotipos de HLA y la frecuencia de GADA en FDR, lo cual podría redundar en una mayor efectividad de estos biomarcadores de autoinmunidad. Respecto a los IAA, los datos obtenidos pueden ser debido a que éstos suelen aparecer como primer Aab en niños y desaparecen con relativa rapidez [45]. Nuestra población de estudio presentó

una edad promedio de 25 ± 13 años, por lo que no podemos descartar que la prevalencia de FDR IAA+ podría incrementarse si se evaluaran individuos con menor edad.

GADA e IA-2A y ciertos alelos específicos de alto riesgo se han asociado como biomarcadores altamente sensibles característicos para determinar el riesgo de la DM1 únicamente en adultos [47-49]. Si bien la incidencia de la DM1 es mayor en niños que en adultos, recientemente se ha descrito que algunos individuos son diagnosticados en la edad adulta, donde los síntomas clínicos son menos pronunciados ya que la función residual de las células beta está mejor preservada. Esto hace que la presentación clínica de la enfermedad sea en ocasiones mal interpretada y clasificada como diabetes tipo 2 (DM2) y no como diabetes tipo 1.5 o LADA, ya que individuos con una historia familiar de DM1 tienen hasta seis veces más riesgo de desarrollar diabetes de este tipo [49-52]. Por lo tanto, los datos de seropositividad obtenidos en este trabajo en individuos adultos podrían asociarse no sólo con un posible desarrollo de DM1, sino también podrían constituir biomarcadores relacionados con el riesgo de desarrollar LADA.

Respuestas celulares en familiares seronegativos

Se considera que los LT CD4+ tienen un papel crítico en la patogénesis de la DM1 como actores principales del desencadenamiento de una respuesta inmune adaptativa y, por tanto, representan uno de los factores fundamentales para detectar procesos de autoinmunidad durante el periodo preclínico asintomático. Existen varios estudios que reportan la ausencia de Aab en individuos que debutan con DM1 [47, 67]; sin embargo, debido a las características de la enfermedad, es claro que estos pacientes presentan respuestas autoinmunes frente a las células beta pancreáticas. En este trabajo evidenciamos que entre los FDR analizados existe un grupo de familiares Aab- en los que se detectaron respuestas específicas de proliferación y de producción de IL-2 en LT CD4+CD45RA- cuando estos fueron activados con DC autólogas pulsadas con Ag diabetogénicos, lo cual es indicativo de un proceso de autoinmunidad.

Las estrategias más habituales para evaluar estas respuestas por distintos grupos de trabajo incluyen el empleo de PBMC totales como células respondedoras [49, 50], y en general no se han utilizado DC autólogas como APC, a pesar de ser consideradas las

células que inducen respuestas más potentes en los LT. El diseño de nuestro protocolo es muy novedoso, ya que además de las DC se utilizaron LT CD4+ efector/memoria como células respondedoras, lo que debería incrementar notablemente la sensibilidad de los ensayos ya que en este pool de LT se concentran las células que se han activado *in vivo* en respuesta a los auto-Ag.

Algunos reportes describen que las respuestas de LT frente a Ag diabetogénicos son muy prevalentes en FDR seropositivos [41, 42, 68], mientras que en los FDR seronegativos se evidencia una reactividad muy baja o nula [49]. En este trabajo, si bien tuvimos la oportunidad de analizar un número pequeño de FDR Aab-, detectamos auto-actividad de LT en el 33% de ellos. Como se mencionó anteriormente, nuestro estudio se realizó empleando LT CD4+CD45RA-, mientras que la mayoría de los trabajos utilizan PBMC como células respondedoras. Las PBMC de individuos sanos presentan tanto LT CD4+ como CD8+ reactivos frente a una gran variedad de auto-Ag diabetogénicos con frecuencias similares a las encontradas en los pacientes con DM1. Sin embargo, una diferencia clave entre los pacientes y los sujetos sanos es que en estos últimos los LT auto-activos suelen tener un fenotipo de células vírgenes, mientras que en los pacientes son LT de memoria [69-72]. Estas células presentan características de LT que proliferaron de manera específica de Ag, como un repertorio oligoclonal de sus TCR, acortamiento de sus telómeros, y un fenotipo de células terminalmente diferenciadas [70, 72]. Por estos motivos consideramos que nuestra estrategia de emplear LT de memoria para detectar respuestas autoinmunes en los FDR incrementó la sensibilidad del ensayo, y nos permitió poner de manifiesto individuos Aab-LT+ y que probablemente no hubieran sido detectados evaluando PBMC. Estos datos, aunados a que un porcentaje importante de FDR debuta con DM1 sin haber desarrollado Aab [47], determinan la importancia de evaluar la autoinmunidad celular en FDR Aab-. Consideramos entonces que esta metodología podría ser implementada para la detección de autoinmunidad celular con el propósito de intervenir adecuadamente a los FDR LT+.

Diversos estudios indican que en FDR Aab+ existe una relación inversa entre los títulos de IAA o GADA y la respuesta *in vitro* de los LT frente a estos Ag [44, 73], y se han asociado las respuestas positivas de PBMC frente a múltiples Ag diabetogénicos con una rápida presentación clínica de la enfermedad. Así, estudios con FDR Aab+ han

mostrado que más del 50% de individuos que incrementaron el número de auto-Ag frente a los que respondieron sus PBMC desarrollaron DM1 dentro de los siguientes 30 meses [42]. En este sentido, el 50% de los FDR Aab-LT+ que detectamos presentaron reactividad frente a un solo Ag de los tres evaluados, por lo que es posible que estos individuos tengan menor riesgo de desarrollar la enfermedad con respecto a los que reaccionaron frente a 2 o los 3 auto-Ag.

Un dato sorprendente obtenido en nuestro estudio fue la alta prevalencia de respuestas de LT en el grupo de FDR correspondiente a los padres (75%). Sólo en un individuo con parentesco de hermano (edad: 19 años) se detectó auto-reactividad celular. Este individuo era delgado (índice de masa corporal: 22.4) y no presentó valores alterados de glucosa, colesterol o triglicéridos en sangre. De manera interesante, todos los padres de pacientes con DM1 LT+ que analizamos tuvieron sobrepeso y presentaron dislipidemias (todos presentaron hipertrigliceridemia y el 66% hipercolesterolemia), aunque no hiperglicemia. Hasta el momento desconocemos si esta tendencia se confirmará cuando incrementemos el número de individuos evaluados pero, al igual que en el caso de los FDR Aab+ adultos, consideramos que una parte de los FDR LT+ positivos que detectamos podrían estar más relacionados con el desarrollo de LADA que de DM1. Se ha determinado que los individuos con LADA que desarrollan respuestas auto-reativas de LT frente a Ag de los islotes, independientemente de que presenten Aab, muestran una destrucción acelerada de las células beta que conduce a una dependencia rápida de insulina [74]. Debido a estos antecedentes, actualmente estos individuos están recibiendo consejo médico y siendo monitoreados en el Servicio de Endocrinología del CMN “La Raza”.

Otro dato interesante obtenido en este trabajo fue la especificidad antigénica que mostraron los LT de los FDR LT+. Tres de los 4 individuos respondieron a insulina (dos padres y un hermano), y mostraron valores significativamente superiores de IL-2 con respecto a los valores obtenidos en ausencia de Ag. Por el contrario, sólo uno de los 2 FDR cuyos LT proliferaron frente a IA-2 mostraron valores superiores de IL-2 con respecto a los valores obtenidos en ausencia de Ag, y ninguno en el caso de GAD65. Por lo tanto, no sólo la frecuencia de FDR LT+ reactivos frente a insulina fue la más alta comparada con la de los otros dos Ag, sino que la especificidad de esta respuesta se vio reflejada en los niveles incrementados de IL-2 que secretaron los LT auto-reativos.

Ya se ha descrito en un estudio que algunos FDR Aab- tienen linfocitos circulantes reactivos frente a pro-insulina [50]. Nuestros datos confirman los reportados en ese estudio y a su vez ponen de manifiesto que insulina podría ser un Ag candidato para la evaluación de las respuestas de LT auto-reactivas en FDR Aab-.

En resumen, en el presente trabajo hemos descrito una nueva metodología que nos permite detectar auto-reactividad de LT frente a Ag diabetogénicos en FDR Aab-, poniendo de manifiesto la existencia de procesos autoinmunes en individuos considerados de bajo riesgo para desarrollar DM1. Además, nuestros datos sugieren que insulina podría ser un Ag candidato para evaluar de manera eficiente la autoinmunidad de tipo celular en estos individuos.

CONCLUSIONES

1. La prevalencia de auto-anticuerpos en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1 en población mexicana es equiparable a la observada en los países con mayor incidencia de DM1 en el mundo. Este dato sugiere que la población mexicana podría estar genéticamente predispuesta a padecer la enfermedad.

2. La evaluación de las respuestas de linfocitos T CD4+ con fenotipo efector/memoria frente a Ag diabetogénicos utilizando células dendríticas autólogas permite detectar procesos autoinmunes en familiares sanos de primer grado de pacientes con DM1 (FDR) que no presentan auto-anticuerpos.

3. Los LT auto-reactivos específicos de insulina se observan con mayor frecuencia que los LT específicos de GAD65 o de IA-2 en los FDR seronegativos, por lo que la insulina podría considerarse como un auto-Ag relevante para la detección de autoinmunidad de tipo celular en esta población.

4. La edad, las características antropométricas y la alta prevalencia de dislipidemias en los FDR seronegativos con respuestas auto-reactivas de linfocitos T sugieren que una alta proporción de estos individuos podrían estar en riesgo de desarrollar LADA.

PERSPECTIVAS

1. Analizar las respuestas celulares de LT en un número mayor de FDR Aab-, con el fin de establecer con mayor precisión la prevalencia de respuestas autoinmunes en estos individuos.

2. Evaluar el tipo de respuesta de los FDR Aab-LT+ en términos de producción de citocinas, analizando la producción de IFN- γ , IL-17, IL-4 e IL-10, con el fin de determinar si en estos individuos predomina una respuesta auto-reactiva de tipo inflamatorio o regulador.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 27: S5-S10.
2. Anaya, Juan Manuel. 2005. Autoinmunidad y enfermedad Autoinmune. Colombia: CIB Corporación para investigaciones biológicas.
3. Katsarou A, Gudbjornsdottir S, Rawshani A, *et al.* 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3: 17016.
4. Delli, Ahmed. 2016. Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: Etiology, Pathogenesis, Prediction and Prevention, ed. W.B. Saunders, 672-690. Philadelphia.
5. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 40: S11-S24.
6. Smith, Charles. 2017. Family medicine: Principles and Practice. Diabetes Mellitus, ed. Paul Paulman, 1649-1668. Springer International Publishing.
7. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. 2017. Type 2 Diabetes. *Lancet* 389: 2239-2251.
8. Zimmet PZ. 1995. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity and demography. *Diabetes Care* 18: 1050-1064.
9. Mayer A, Fabien N, Gutowski MC, *et al.* 2007. Contrasting cellular and humoral autoimmunity associated with latent autoimmune diabetes in adults. *Eur. J. Endocrinol.* 157: 53-61.
10. World Health Organization. In *Diabetes*. 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
11. International Diabetes Federation. 2015. IDF Diabetes Atlas. 7.
12. Gómez-Díaz RA, Pérez-Pérez G, Hernández-Cuesta IT, *et al.* 2012. Incidence of Type 1 Diabetes in Mexico: Data from an Institutional Register 2000-2010. *Diabetes Care* 35: E77-E77.
13. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. 2012. Anuarios de Morbilidad Epidemiológica. In *Salud Gobierno Federal*. CENACEVE, ed, Mexico.
14. SUAVE/DGE/SALUD.SUIVE/INEGI. 2010. Incidencia de Diabetes Mellitus tipo 1 en México. In *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. INEGI, ed, Mexico.
15. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91: 79-118.
16. Noble JA, Erlich HA. 2012. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2: a007732.
17. Ali, Omar. 2015. Principles of Diabetes Mellitus: Type 1 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations. 1-25. USA: Medical College of Wisconsin.
18. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, *et al.* 2006. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14074-14079.
19. Tong Y, Li Z, Zhang H, *et al.* 2016. T cell repertoire diversity is decreased in type 1 diabetes patients. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 14: 338-348.
20. Roep BO. 2003. The Role of T- cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 46: 305-321.
21. Knip M, Siljander H. 2008. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 7: 550-557.
22. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, *et al.* 2009. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 155: 173-181.
23. Knip M. 2002. Natural course of preclinical type 1 diabetes. *Horm Res.* 57: 6-11.
24. Palmer JL. 2009. C-peptide in the natural history of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25: 325-328.
25. Steiner, Donald. 2016. Endocrinology: Adult and Pediatric: Biosynthesis, Processing, and Secretion of the Islet Hormones: Insulin, Islet Amyloid Polypeptide (Amylin), Glucagon

Somatostatin, and Pancreatic Polypeptide A2, ed. Leslie Groot, 527-545. Philadelphia: W.B. Saunders.

26. 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.
27. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. 1986. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes.* 35: 855-860.
28. Wallberg M, Cooke A. 2013. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol.* 34: 583-591.
29. Alba A, Verdaguer J, Vives P. 2004. Diabetes mellitus tipo 1: Autoinmunidad frente a la célula beta. *Endocrinol. Nutr.* 51: 121-125.
30. Morran MP, Omenn GS, Pietropaolo M. 2008. Immunology and genetics of type 1 diabetes. *Mt. Sinai J. Med.* 75: 314-327.
31. Knip M, Siljander H. 2008. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 7: 550-557.
32. Kahanovitz L, Sluss PM, Russel SJ. 2017. Type 1 diabetes – A Clinical Perspective. *Point of Care* 16: 37-40.
33. Knip M, Siljander H, Ilonen J, *et al.* 2016. Role of humoral beta-cell autoimmunity in type 1 diabetes. 17: 17-24.
34. Taplin CE, Barker JM. 2008. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmun.* 41: 11-18.
35. Venkatesha, Shivaprasad. 2015. Infection and Autoimmunity: Epitope Spreading in Autoimmune Diseases, ed. Nancy Agmon, 45-68. Amsterdam: Academic Press.
36. 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: 202-208.
37. 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: 361-370.
38. Knip M. 2002. Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes Care* 25: 623-625.
39. Winter WE, Harris N, Schatz D. 2002. Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune type 1A diabetes. *Clinical Diabetes* 20: 183-191.
40. 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: 592-597.
41. Durinovic-Bello I, Hummel M, Ziegler AG. 1996. Cellular immune response to diverse islet cell antigens. *Diabetes* 45: 795-800.
42. Brooks-Worrell B, Gersuk VH, Greenbaum C, *et al.* 2001. Intermolecular antigen spreading occurs during the preclinical period of human type 1 diabetes. *J. Immunol.* 166: 5265-5270.
43. Hummel M, Durinovic-Bello I, Ziegler AG. 1996. Relation between cellular and humoral immunity to islet cell antigens in type 1 diabetes. *J. Autoimmun.* 9: 427-430.
44. Dubois-LaForgue D, Carel JC, Bougnères PF, *et al.* 1999. T-cell response to proinsulin and insulin in type 1 and pretype 1 diabetes. *J. Clin. Immunol.* 19: 127-134.
45. Schloot NC, Roep BO, Wegmann D, *et al.* 1997. Altered immune response to insulin in newly diagnosed compared to insulin-treated diabetic patients and healthy control subjects. *Diabetologia* 40: 564-572.
46. Gardner SG, Gale EA, Williams AJ, *et al.* 1999. Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies. Is it inevitable? *Diabetes Care* 22: 2049-2054.
47. Wang J, Miao D, Babu S, *et al.* 2007. Prevalence of autoantibody-Negative Diabetes is not rare at all ages and increases with older age and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 88-92.
48. Atkinson MA, Maclaren NK. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 331: 1428-1436.

49. Ellis TM, Schatz DA, Ottendorfer EW, et al. 1998. The relationship between humoral and cellular immunity to IA-2 in IDDM. *Diabetes* 47: 566-569.
50. Petrich de Marquesini LG, Fu J, Connor KJ, et al. 2010. IFN- γ and IL-10 islet-antigen-specific T cell responses in autoantibody-negative first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 53: 1451-1460.
51. Segovia-Gamboa N, Rodríguez-Arellano ME, Rangel-Cruz R, et al. 2014. Tolerogenic dendritic cells induce antigen-specific hyporesponsiveness in insulin- and glutamic acid decarboxylase 65-antigen-reactive T lymphocytes from type 1 diabetic patients. *Clin. Immunol.* 154: 72-83.
52. Incani M, Serafini C, Satta C. 2017. High prevalence of diabetes-specific autoimmunity in first-degree relatives of Sardinian patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 33: 1-7.
53. Piazza A, Mayr WR, Contu L, et al. 1985. Genetic and population structure of four Sardinian villages. *Ann. Hum. Genet.* 49: 47-63.
54. 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: 2272-2275.
55. 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.
56. 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: 778-785.
57. 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: 254-258.
58. Guardado G, Meraz MA, Berumen J. 2008. Diversidad genética en la población mexicana: Utilización de marcadores de ADN. *Rev. Med. Hosp. Gen.* 71: 162-174.
59. Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM, Álvarez-León E, et al. 2007. MHC class II genes in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Exp. Mol. Pathol.* 82: 49-52.
60. Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, et al. 1992. Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 91: 350-356.
61. Vandewalle CL, Falorni A, Lenmark A, et al. 1997. Associations of GAD65- and IA-2 autoantibodies with genetic risk markers in new-onset IDDM patients and their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetes Care* 20: 1547-1552.
62. Ziegler AG, Nepom GT. 2010. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity* 32: 468-478.
63. Vandewalle CL, Falorni A, Svanholm S, et al. 1995. High diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in insulin-dependent diabetes mellitus with clinical onset between age 20 and 40 years. The Belgian Diabetes Registry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 846-851.
64. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. 2005. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. *Pediatr. Clin. North Am.* 52: 1553-1578.
65. Bruno G, Runzo C, Cavallo P, et al. 2005. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy. *Diabetes Care* 28: 2613-9.
66. Hjort R, Alfredsson L, Andersson T, et al. 2017. Family history of type 1 and type 2 diabetes and risk of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetes Metab.* 898: 1-7.
67. Tiberti C, Buzzetti R, Anastasi E, et al. 2000. Autoantibody negative new onset type 1 diabetic patients lacking high risk HLA alleles in a Caucasian population: are these type 1b diabetes cases? *Diabetes Metab. Res. Rev.* 16: 8-14.
68. Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, et al. 1992. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 339: 458-459.

69. Danke NA, Yang J, Greenbaum C, *et al.* 2005. Comparative study of GAD65-specific CD4+ T cells in healthy and type 1 diabetic subjects. *J. Autoimmun.* 25: 303-311.
70. Monti P, Scirpoli M, Rigamonti A, *et al.* 2007. Evidence for *in vivo* primed and expanded autoreactive T cells as a specific feature of patients with type 1 diabetes. *J. Immunol.* 179: 5785-5792.
71. Oling V, Reijonen H, Simell O, *et al.* 2012. Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to type 1 diabetes. *Cell. Immunol.* 273: 133-139.
72. Skowera A, Ladell K, McLaren JE, *et al.* 2015. β -cell-specific CD8 T cell phenotype in type 1 diabetes reflects chronic autoantigen exposure. *Diabetes* 64: 916-925.
73. Harrison LC, Honeyman MC, DeAizpurua HJ, *et al.* 1993. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 341: 1365-1369.
74. Brooks-Worrell BM, Reichow JL, Goel A, *et al.* 2011. Identification of autoantibody-negative autoimmune type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 34: 168-173.