

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Factores genéticos e inmunológicos en la diabetes mellitus
tipo I (insulino-dependiente) : estudio de marcadores
predictores de la enfermedad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juan Manuel Guerra Vales

Madrid, 2015

R.36.470

DE 618.579-008.74
80E

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

TA 1569

FACTORES GENETICOS E INMUNOLOGICOS EN LA DIABETES
MELLITUS TIPO I (INSULINO-DEPENDIENTE).
ESTUDIO DE MARCADORES PREDICTORES DE LA ENFERMEDAD

TESIS DOCTORAL

JUAN MANUEL GUERRA VALES

MADRID, ABRIL 1992



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5311807892

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. A. Damiano Rivero, Jefe del Departamento de Medicina, por su constante estímulo y sugerencias realizadas a lo largo de la elaboración de esta tesis.

Al Dr. G. Lledó Valera, Jefe de la Sección de Endocrinología del Departamento de Pediatría, por su valiosa y desinteresada ayuda.

A la Dra. L. Larrodera López, del Servicio de Bioquímica-Sección de Hormonas y a los Dres. A. Arnaiz Villena y J.M. Martín Villa, del Servicio de Inmunología, quienes con su colaboración hicieron posible la realización de este trabajo.

A R. Madero Jarabo, matemático de la Sección de Bioestadística del Hospital "La Paz", por su cooperación en el análisis estadístico de los resultados.

A los Dres. F. Alonso Navas, J.L. Aranda Arcas y V. Guillén Camargo, del Servicio de Medicina Interna, quienes con su generosa ayuda en el trabajo diario facilitaron la realización de esta tesis.

Al Dr. C. Guijarro Herraiz, médico residente del Servicio de Medicina Interna, por su colaboración en la preparación de la iconografía.

A Yolanda Esteban Cano, secretaria del Departamento de Medicina, por su paciencia e inestimable ayuda en la transcripción del manuscrito.

A todas las personas, que de una u otra forma, han hecho posible la conclusión de este trabajo.

INDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
1. Generalidades	2
2. Genética	10
3. Autoinmunidad	20
4. Factores ambientales	39
II. OBJETIVOS	48
III. MATERIAL Y METODOS	51
1. Sujetos	52
2. Test de tolerancia oral a la glucosa	54
3. Determinación del fenotipo HLA	55
3.1. HLA -A, -B, -C, -Bw4, -Bw6	56
3.2. HLA-DR y DQ	58
4. Determinación de los anticuerpos frente al islote de Langerhans (<u>I</u> sl <u>e</u> t <u>C</u> ell <u>A</u> ntibodies, ICA)	61
4.1. Obtención del substrato	61
4.2. Corte de las piezas de páncreas	62
4.3. Obtención de muestras	63
4.4. Determinación de la presencia de ICA en los sueros problema.	63

5. Detección de anticuerpos fijadores de complemento frente al islote de Langerhans (<u>C</u> omplement <u>F</u> ixing <u>I</u> slet <u>C</u> ell <u>A</u> ntibodies, CF-ICA).	64
6. Anticuerpos antiinsulina	68
7. Anticuerpos antitiroideos	69
8. Determinaciones de glucosa, insulina y péptido C	70
8.1. Determinación de glucosa	70
8.2. Determinaciones de insulina y péptido C	70
8.2.1. Insulina	71
8.2.2. Péptido C	71
9. Métodos estadísticos	72
9.1. Descripción de las poblaciones	72
9.2. Comparación de las poblaciones dos a dos	72
9.3. Dentro de cada población	73
9.4. Estudio de la curva de glucosa, insulina y péptido C	73
9.5. Transmisión preferencial	74
IV. RESULTADOS	75
1. Población general	76
2. Familiares de primer grado no diabéticos	81
2.1. Descripción	81
2.2. Correlaciones dentro de la población no diabética	84
2.3. Función pancreática	85
2.4. Progresión a diabetes mellitus insulino dependiente	92

3. Población con diabetes mellitus insulino-dependiente	97
3.1. Descripción	97
3.2. Correlaciones dentro de la población con DMID	100
4. Transmisión de los alelos diabetogénicos HLA	101
V. DISCUSION	105
VI. CONCLUSIONES	138
VII. RESUMEN	146
VIII. BIBLIOGRAFIA	152

INDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1. Estadios en el desarrollo de diabetes mellitus	6
Figura 2. Mapa parcial del brazo corto del cromosoma 6, mostrando la organización molecular de la banda 6p21.3, con los loci del complejo principal de histocompatibilidad	13
Figura 3. Secuencia de sucesos en un islote en la diabetes tipo I	23
Figura 4. Anticuerpos antiislotes de Langerhans (ICA) detectados por inmunofluorescencia indirecta en secciones de páncreas humano grupo 0	65
Figura 5. Anticuerpos antiislotes de Langerhans fijadores de complemento (CF-ICA) detectados por inmunofluorescencia indirecta en secciones de páncreas humano grupo 0	67
Figura 6. Características generales de la población seleccionada	77
Figura 7. Distribución de los alelos HLA en las diferentes poblaciones	78
Figura 8. Prevalencia de anticuerpos anticélulas de los islotes de Langerhans (ICA) y de ICA fijadores de complemento (CF-ICA) en las diferentes poblaciones	80
Figura 9. Prevalencia de anticuerpos antitiroideos en las distintas poblaciones	82
Figura 10. Promedios (\pm desviación estándar) de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de familiares de primer grado no diabéticos	86

Figura 11. Promedios (\pm desviación estándar) de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de hermanos no diabéticos	87
Figura 12. Areas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de familiares de primer grado no diabéticos ICA+ e ICA-	89
Figura 13. Areas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de familiares de primer grado no diabéticos	91
Figura 14. Promedios (\pm desviación estándar) de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de hermanos no diabéticos ICA+ e ICA- (correspondientes a las mismas familias)	93
Figura 15. Area bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de hermanos no diabéticos ICA+ e ICA- de pacientes con DMID (correspondientes a las mismas familias)	94
Figura 16. Niveles de anticuerpos anticélula de los islotes (ICA), a lo largo del seguimiento, de 5 niños no diabéticos ICA+ (hermanos de propósitos con DMID)	96
Figura 17. Prevalencia de anticuerpos anticélulas de los islotes de Langerhans (ICA) según el tiempo de evolución de la DMID	99

INDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla I. Antisueros anti HLA-A, -B, -C, -Bw4, -Bw6 utilizados	57
Tabla II. Antisueros anti HLA-DR y DQ utilizados	60
Tabla III. Transmisión de los alelos HLA-DR3 de padres y madres a sus descendientes	102
Tabla IV. Transmisión de los alelos HLA-DR4 de padres y madres a sus descendientes	104

CLAVE DE ABREVIATURAS

AAI	Anticuerpos antiinsulina
ACSB	Anticuerpos citotóxicos contra la superficie de las células f
AECI	Anticuerpos estimuladores de las células insulares
CF-ICA	Anticuerpos antiislotes de Langerhans fijadores de complemento
DMID	Diabetes mellitus insulínodpendiente
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
ICA	Anticuerpos anticélulas de los islotes de Langerhans
ICI	Islotes que contienen insulina
ICSA	Anticuerpos antiperficie celular de las células insulares
IDI	Islotes deficientes en insulina
IRI	Insulina inmuno-reactiva
JDF	Juvenile Diabetes Fondation
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
RIA	Radioinmunoanálisis
TTOG	Test de tolerancia oral a la glucosa

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES.-

La diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente (DMID) es todavía en el momento actual una causa importante de morbilidad y mortalidad.

La incidencia y prevalencia varía en los distintos países¹, predominando en el Norte de Europa cuya incidencia media anual (por 100.000) oscila entre 28,6 y 14,0, en niños de 0 a 14 años, y su prevalencia² entre 191 y 83. El estudio epidemiológico de Lorenzi et al³. muestra una incidencia anual de diabetes tipo I, en sujetos de 0 a 19 años, de 7,3 casos/100.000, sin diferencias estadísticas entre los sexos, y con diferencias significativas entre los distintos grupos étnicos (mayor en caucásicos y menor de lo esperado en mejicanos, negros y orientales). Esto es compatible con la mayor incidencia de diabetes juvenil en los países nórdicos europeos, los cuales están caracterizados por población caucásica estable y no migratoria⁴⁻⁷.

La curva de edad de presentación es bimodal, con un pico en la pubertad y el otro en la quinta década de la vida, con características distintas en cada grupo⁸.

En los últimos años hemos asistido a un notable incremento en los conocimientos de la etiología de la DMID, sin embargo los mecanismos patogénicos no están todavía aclarados⁹⁻²⁶.

Existen evidencias de que la DMID es una enfermedad de comienzo juvenil, asociada a ciertos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), en la que se ha demostrado la presencia de diversos anticuerpos circulantes.

La mayor parte de los autores están de acuerdo en que la DMID es una entidad heterogénea²⁷⁻³⁴ de patogenia multifactorial. En la mayoría de los casos parece estar causada por un desencadenante ambiental³⁵, tal vez un virus, que puede conducir a una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas en personas con susceptibilidad genética^{36,37}. La naturaleza autoinmune de la DMID parece ser un hecho claramente demostrado en el momento actual^{13,38,39}.

La heterogeneidad racial de la DMID es vista en la menor frecuencia de HLA-DR3 y/o DR4 (75 %) y anticuerpos anticélulas de los islotes de Langerhans (ICA) (40 % al diagnóstico) en negros americanos con diabetes de comienzo en la juventud. La frecuencia de DMID en negros es más baja que en blancos⁴⁰.

Todavía no están aclarados los factores genéticos y ambientales que causan las diferencias regionales en su

incidencia, y la importancia de cada uno de ellos⁴¹⁻⁴⁴. En Japón que tiene la incidencia más baja, el 83 % de éstos pacientes tienen antígenos HLA MT3 y DR8. En la población caucasiana, aproximadamente el 90 % de los pacientes portan antígenos HLA-DR3 y/o DR4. Sin embargo en la población judía de Israel, la cual tiene una incidencia mucho más baja, la DMID está también asociada con los tipos HLA-DR3 y DR4. Estos resultados indican que la presencia de antígenos HLA asociados con un alto riesgo de DMID es insuficiente, y que otros factores genéticos y ambientales deberán investigarse para tratar de explicar las diferencias geográficas⁴⁵.

El comienzo y progresión de la DMID es variable. Algunos pacientes desarrollan la enfermedad precozmente en la vida con una muy corta duración de los síntomas y otros llegan a ser insulino dependientes después de años de tolerancia anormal a la glucosa⁴⁶.

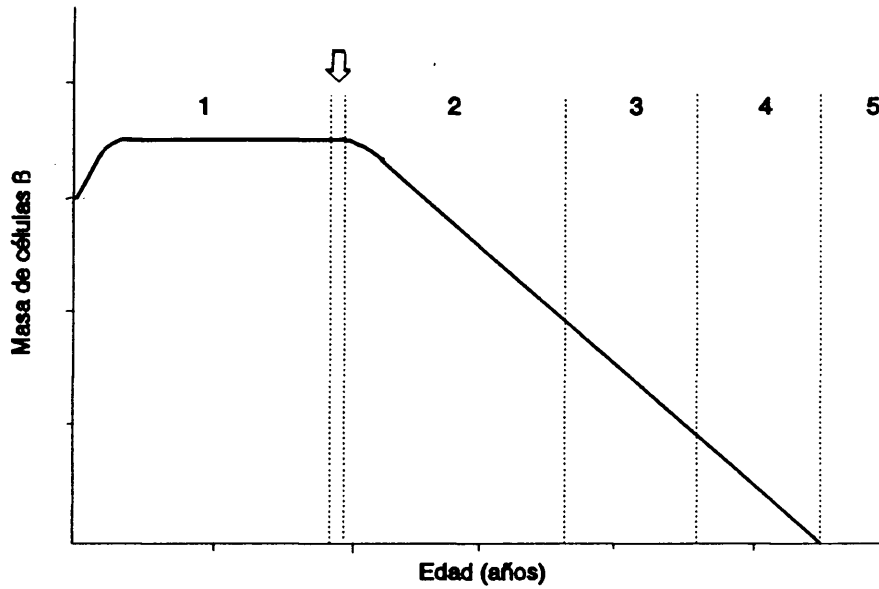
Tradicionalmente se pensaba que la DMID se presentaba agudamente, especialmente en la infancia, con una característica aparición repentina de las anomalías metabólicas en personas previamente "sanas". Estudios más recientes demuestran que el comienzo de la DMID va precedido por un largo período prodrómico, a menudo de años, caracterizado por la presencia de anticuerpos anticélula de los islotes pancreáticos⁴⁷⁻⁵⁰ y anomalías de la inmunidad mediada por células⁵¹. Otro hecho de este período es la

pérdida progresiva de la respuesta de la primera fase de la insulina a la glucosa intravenosa⁵².

Estas observaciones sugieren la existencia de un proceso lentamente progresivo de destrucción de las células β del páncreas iniciado años antes. La aparente presentación clínica "aguda" comúnmente vista en la DMID puede representar la descompensación terminal de las células β , cuya masa total ha disminuido lenta y progresivamente en los años precedentes^{52,53}.

Para Eisenbarth³⁸ el desarrollo de la diabetes tipo I puede conceptualmente dividirse en seis estadios, comenzando con la susceptibilidad genética y finalizando con la destrucción completa de la célula β (Fig. 1). Algunos sujetos genéticamente susceptibles (estadio I) sufren la acción de un hipotético agente desencadenante (estadio II) desarrollando autoinmunidad activa (estadio III). Estos pacientes, inicialmente tienen todavía una secreción normal de insulina. Durante el estadio IV, las anormalidades inmunológicas persisten pero se detecta una pérdida progresiva de la secreción de insulina estimulada por glucosa, a pesar de los niveles normales de glucemia.

En el estadio V, cuando la diabetes es manifiesta y reconocida clínicamente, permanece alguna secreción de insulina, pero es seguida por una completa destrucción de las células β (estadio VI). Al comienzo de la DMID, al menos un 10 % de las células β permanecen conservadas, siendo destruidas todas las



1. Predisposición genética.
- ⇩ Acontecimiento desencadenante (?).
2. Alteraciones inmunológicas manifiestas.
Liberación normal de insulina.
3. Pérdida progresiva de liberación de insulina.
Glucemia normal.
4. Diabetes manifiesta. Presencia de Péptido C.
5. Ausencia de Péptido C.

Figura 1. Estadios en el desarrollo de diabetes mellitus⁵⁴.

células B al cabo de varios años del desarrollo de la diabetes manifiesta.

En el momento del diagnóstico este tipo de pacientes diabéticos muestra alteraciones inmunológicas en sangre periférica, en especial niveles considerablemente elevados de linfocitos T activados y autoanticuerpos contra las células de los islotes y la insulina^{38,55}. Estos cambios inmunológicos y la presencia de células inflamatorias en los islotes pancreáticos han conducido a la sugerencia de que la lesión de las células B está mediada por un proceso autoinmune⁵⁶. Otra explicación sería que las alteraciones inmunológicas fueran consecuencia, y no causa, de la lesión celular. La lesión de las células B podría estar mediada por virus capaces de activar los linfocitos y, en determinadas circunstancias desencadenar la producción de autoanticuerpos. En cualquier caso, la lesión de las células de los islotes se asociaría a alteraciones inmunitarias susceptibles de tratamiento inmunosupresor⁵⁷.

Un tratamiento etiológico antes de llegar a la fase irreversible podría controlar la agresión a las células B y evitar o retrasar la aparición de la enfermedad clínica⁵⁸. Sutherland et al⁵⁹. realizaron transplantes de segmentos de páncreas procedentes de gemelos idénticos discordantes para la DMID. Debido a que eran gemelos monocigotos, no se efectuó inmunosupresión. En un principio, los segmentos pancreáticos transplantados lograron remitir la diabetes. En ausencia de un

tratamiento inmunosupresor, apareció una insulinitis y una destrucción específica de las células β a las cuatro-ocho semanas del trasplante, mientras que en otro gemelo en el que se efectuó un tratamiento inmunosupresor, no había recurrido la diabetes. La recurrencia de la diabetes en estos sujetos cuando los receptores no fueron inmunosuprimidos sugiere que el tratamiento inmunosupresor de la DMID puede ser necesario indefinidamente para mantener la remisión metabólica^{59,60}.

Varias intervenciones inmunes no específicas, incluyendo suero antilinfocítico, ciclosporina A, sílice (elimina macrófagos), timectomía neonatal, transfusiones repetidas de sangre completa, y la creación de quimeras estables por radiación, pueden efectivamente reducir la tasa de diabetes en ratas BB y ratón NOD⁶¹.

Los resultados de los intentos preliminares usando esteroides, suero antilinfocítico, azatioprina o plasmaféresis no fueron definitivos⁶². Los efectos más notables se han conseguido con la ciclosporina, observándose que aproximadamente la mitad de los pacientes tratados han logrado una fase de remisión prolongada sin tratamiento insulínico⁶³⁻⁶⁶, acelerado también la disminución en la prevalencia y títulos medios de ICA⁶⁷.

La ciclosporina es un potente inmunosupresor que actúa principalmente sobre la inmunidad mediada por células T, en

especial sobre la producción de linfocinas, como la interleucina-2; por consiguiente representa un buen candidato para la inmunoterapia de la DMID^{68,69}.

En nuestro país, Moncada et al⁷⁰. realizaron un ensayo terapéutico con hormona tímica más azatioprina en 16 diabéticos tipo I durante un año, observando que la incidencia de remisión, así como los requerimientos de insulina en los casos de reciente diagnóstico, son claramente diferentes de los observados en los controles.

La intervención terapéutica temprana, en un momento en que la masa de células β no se encuentra completamente destruida, representa indudablemente un factor de gran importancia para el éxito de la remisión clínica⁶⁸. No obstante, la supresión de la ciclosporina después de un año de tratamiento conduce a una rápida recurrencia de la diabetes clínica⁶³.

Los regímenes inmunosupresores en uso para la DMID resultan en mantener la función de las células β , con prolongación de la fase de "luna de miel" de la DMID. Si ésta preservación parcial de la producción de insulina residual previene o retrasa las complicaciones microvasculares es desconocida⁷¹.

Pese a estos alentadores resultados, el empleo de la inmunosupresión en la diabetes tipo I no puede ser recomendada

de una forma indiscriminada, debiendo permanecer en un marco experimental hasta que se definan mejor los verdaderos riesgos y beneficios de dicho tratamiento⁷²⁻⁷⁷.

Por consiguiente, es necesario conocer mejor los mecanismos subyacentes al proceso autoinmune tanto para predecir y diagnosticar precozmente la DMID, como para abordar el objetivo a largo plazo de prevenir la enfermedad mediante una inmunoterapia racional⁷⁸.

2. GENETICA.-

La presentación familiar de la DMID está bien reconocida⁷⁹. Varios estudios indican una concordancia del 30-50% entre gemelos idénticos^{80,81}. Si la enfermedad fuese el resultado de solo factores genéticos, la tasa de concordancia esperada sería del 100%. Esto sugiere que otros factores, probablemente ambientales, pueden contribuir a su desarrollo⁴⁴.

El concepto de susceptibilidad genética está también apoyado por la fuerte asociación de la enfermedad con ciertos antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en particular HLA-B8, B15, B18, DR3, DR4 y factor B de la properdina⁵⁶. Se cree que la asociación de los antígenos de histocompatibilidad de clase I es secundaria a un desequilibrio

de asociación entre B8 y DR3 y entre B15 y DR4 respectivamente^{56,82}.

El 95% de los individuos blancos con DMID expresan los alelos de histocompatibilidad DR3 y/o DR4, mientras que estos alelos son expresados únicamente en el 40% de la población blanca general^{61,83-87}.

Entre los diabéticos tipo I se aprecia una disminución del HLA-DR2 (4%), en comparación con los individuos normales (24%). Una sustitución de un aminoácido en la posición 57 de la cadena β DQ por ácido aspártico parece ser la clave de esta protección⁸⁸, así la presencia del antígeno DQw1.2 es fuertemente protector de desarrollo de DMID⁸⁹. También se ha encontrado una disminución de la frecuencia de HLA-B7, DR5 y DR7 en pacientes con DMID^{86,90,91}.

Los estudios de herencia de los antígenos de histocompatibilidad de clase II en familias con al menos un hijo diabético demuestran la importancia de éstos. Así el riesgo de diabetes en los hermanos está relacionado con el número de haplotipos HLA que el hermano comparte con el probando diabético^{84,92-94}.

En los hermanos que son HLA idénticos al hermano diabético, el riesgo de diabetes es aproximadamente de un 10 a

20%. Si son haploidénticos es de un 2-5% y si no comparten ningún haplotipo es del 0-1%^{1,84,92,93}.

Una comparación entre los antígenos HLA-D, que son definidos por test de cultivo mixto de linfocitos, y HLA-DR, definidos por test serológicos, revela que las especificidades HLA-DR3 y/o DR4 están mas frecuentemente relacionadas con la DMID que los correspondientes tipos HLA-D⁸⁴. Sin embargo, no está claro si los genes HLA-DR por sí mismo u otros genes ligados a HLA-DR son los responsables de la susceptibilidad para la enfermedad.

La tasa de concordancia en gemelos idénticos es más alta (70%) en sujetos con HLA-DR3/4 que en aquellos con DR4 o DR3 solo (42% y 38% respectivamente)⁹⁰. Estas diferencias sugieren que DR3 y DR4 juntos confieren un mayor grado de predisposición que la posesión de cualquier antígeno solo. Los estudios realizados por Serrano Rios et al⁹⁵. confirman estos hallazgos.

El riesgo de que un gemelo no afecto desarrolle una DMID es máximo durante los 5 años siguientes al diagnóstico en el gemelo afecto, pero a partir de los 15 años solo el 3% tiene posibilidades de convertirse en diabético⁸⁰.

Se desconoce en que forma influyen los genes de la región de histocompatibilidad localizados en el brazo corto del cromosoma 6⁹⁶ (Fig. 2) sobre la susceptibilidad para adquirir la

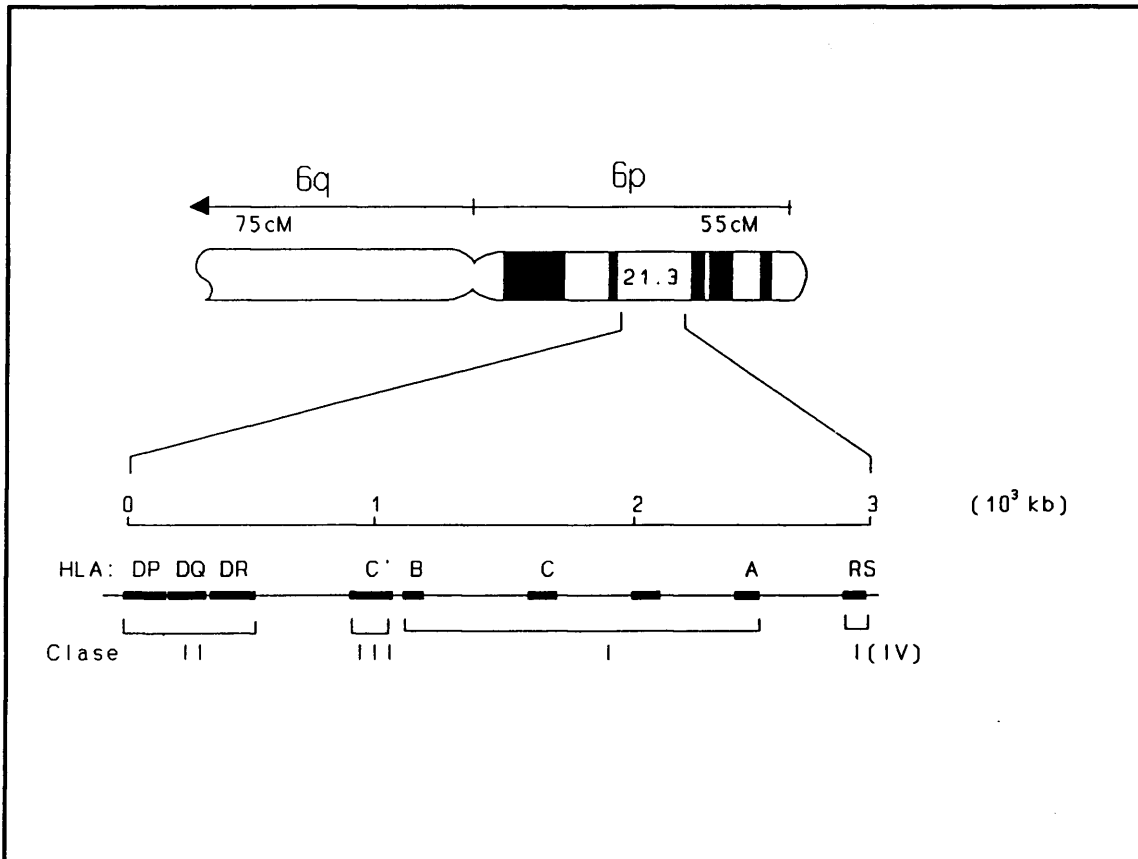


Figura 2. Mapa parcial del brazo corto del cromosoma 6, mostrando la organización molecular de la banda 6p21.3, con los loci del complejo principal de histocompatibilidad.

diabetes⁹⁷⁻⁹⁹. La expresión de DR3 y/o DR4 podría ser un marcador de genes de susceptibilidad asociados. Se piensa que al menos dos genes (uno de los cuales es recesivo) localizados en la región HLA (asociados a DR3 y DR4) son necesarios pero no suficientes para desarrollar diabetes^{90,100}. Además, probablemente exista un gen independiente fuera del complejo mayor de histocompatibilidad. La localización de este gen no ligado al HLA es desconocida, aunque estudios recientes sugieren que puede estar en el cromosoma 11 (segmento DNA en la región variable, región 5', próximo al gen de la insulina)^{38,101-103}. Otros genes implicados, además del de la insulina¹⁰⁴, serían los del grupo sanguíneo Kidd en el cromosoma 18, alotipos (Gm) de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ y la cadena β del receptor de las células T en el cromosoma 7⁴³.

Recientemente las técnicas de secuenciación de DNA han permitido demostrar que algunas variantes polimórficas de las cadenas HLA-DQ β son un marcador genético de alta especificidad para padecer DMID⁸⁸, incrementando considerablemente el riesgo para desarrollar la enfermedad en los individuos portadores de dichos genes¹⁰⁸.

Estudios de los polimorfismos en longitud de los fragmentos de restricción del DNA en la región HLA-D (clase II) sugieren que hay diferencias a nivel del DNA entre diabéticos y no diabéticos, aún cuando compartan el mismo tipo serológico^{32,109}. Las variaciones en la región β DQ puede estar más fuertemente

asociada con riesgo para DMID que variaciones en la región DR, al menos estimado por la susceptibilidad asociada a HLA-DR4. Varios grupos han descrito una variante de HLA-DR4, definida por la variación en la región β DQ, que ocurre con frecuencia aumentada en pacientes con DMID⁸⁸. Esta variante, denominada DQw3.2, ocurre en el 90-95% de aquellos pacientes que tienen el alelo HLA-DR4 y en el 60-75% de los controles no diabéticos con DR4.

Los haplotipos de alto riesgo, incluyendo DR4/ β DQw3.2 (alanina en posición 57), DR3/ β DQw2 (alanina en posición 57), DR1/ β DQw1.1 (valina en posición 57) y DR2/ β DQw1.AZH (serina en posición 57), estaban asociados con otros residuos distintos al ácido aspártico (Asp) en posición 57. Una observación similar fue admitida en el ratón NOD⁸⁸. Estos hallazgos condujeron a concluir que este residuo específico de la molécula HLA-DQ era el principal determinante para la DMID. Owerbach et al¹¹⁰. encontraron que otros residuos de aminoácidos (distintos que el residuo 57 de la cadena β DQ) son importantes para la susceptibilidad a la DMID, implicando al gen α DQ en dicha susceptibilidad.

Otras asociaciones encontradas relacionadas con la susceptibilidad a la DMID son: con el alelo Bf F1 (del factor B de la properdina)¹¹¹⁻¹¹⁹, descenso de los niveles de C4^{120,121} y polimorfismos del complemento¹²²⁻¹²⁴ y enzima glicosidasa de los glóbulos rojos¹²⁴.

Sheehy et al¹²⁵. describen un subtipo menor de HLA-DR3 (DR3 B01') y HLA-DR4 (DR4 S) que está aumentado en los pacientes con diabetes mellitus tipo I confiriendo un mayor riesgo para la enfermedad.

Los antígenos HLA-DR3 y DR4 no son patognomónicos de DMID; cerca de la mitad de la población USA tiene o DR3 o DR4 (solo 1%-3% tiene ambos), y solo un pequeño porcentaje (alrededor del 0,5%) de estos individuos desarrollan DMID. Sin embargo, si uno de los hermanos tiene DMID, el riesgo de un individuo DR3 o DR4 de desarrollar DMID aumenta al 12-14%⁴³.

La variabilidad entre distintos grupos étnicos¹²⁶ puede ser secundaria a factores genéticos y ambientales, pero puede también indicar la presencia de heterogeneidad genética. Así el patrón de distribución HLA en diabéticos nigerianos es diferente al descrito en otros grupos raciales. La asociación positiva entre HLA-B8, B15 y DMID encontrada en caucasianos no ha sido observada en poblaciones negras. Además la asociación negativa de HLA-B7 con DMID vista en caucasianos no fué demostrada en negros¹²⁷.

La susceptibilidad a la diabetes tipo I en nigerianos es similar a la de negros caucasianos y americanos, observándose un aumento en el número de individuos DR3 positivos (53% versus 30% de controles) y una disminución del número DR2 positivos (21%

versus 46% de controles)¹²⁸. Sin embargo no fué demostrada una asociación positiva con DR4 en los diabéticos negros nigerianos.

El modo o modos de herencia de la DMID permanece controvertido¹²⁹⁻¹³¹, con investigadores que proponen heterogeneidad en la región HLA y aún la existencia de genes de susceptibilidad no ligados a HLA, y otros que mantienen que un gen autosómico recesivo ligado a HLA con reducida penetrancia es una explicación adecuada¹³²⁻¹³⁴.

Otros modos de herencia propuestos para la susceptibilidad a la DMID incluyen un modelo simple autosómico dominante ligado a HLA, un modelo mixto de formas recesiva y dominante, modelo de tres alelos¹³⁵ y uno de dos locus o multilocus. Sin embargo, la mayoría de los genetistas piensan que la diabetes tiene un modo de herencia multifactorial¹³⁶.

Estudios realizados en familias, con un padre y uno o más descendientes con diabetes tipo I, demuestran que el alelo DR4 es transmitido desde el padre diabético al descendiente con la enfermedad en cerca del 80% de las familias. El alelo DR3 fué transmitido por el padre diabético en solo el 10%. La alta tasa de transmisión de DR4 por los padres diabéticos sugiere que la susceptibilidad a la diabetes tipo I es dominante asociada a DR4¹²⁸.

Como hemos visto existen datos que muestran que los genes HLA-asociados no son suficientes para que un individuo llegue a ser diabético tipo I: a) La tasa de concordancia de DMID en parejas de gemelos idénticos es solo del 50%⁸¹, b) solo el 12 a 15% de los pacientes con DMID refieren una historia familiar positiva para DMID en parientes de primer grado^{1.100.137} y c) el riesgo empírico de DMID es sorprendentemente bajo (solo el 5% de hijos de probandos con DMID llegan a ser pacientes con DMID a la edad de 30 años¹³⁸).

Warram et al¹³⁹. estudiando la incidencia de DMID en los descendientes de pacientes con la enfermedad, demostraron que la DMID es transmitida menos frecuentemente a los descendientes de madres diabéticas que a aquellos de padres diabéticos, aunque hijas e hijos son igualmente afectados. Para Köbberling y Brüggeboess¹⁴⁰ el riesgo de que descendientes de madres insulino dependientes desarrollen diabetes es muy bajo. La prevalencia de DMID entre los hijos de madres con la enfermedad es del 1,5% a la edad de 25 años.

Un mecanismo exacto por el cual un rasgo genético es transmitido preferencialmente por el padre pero tiene igual expresión en hijos e hijas es desconocido. Las explicaciones para esta observación son oscuras y especulativas, pero una posibilidad podría ser debida a una mayor frecuencia de recombinación entre asociaciones de locus en la mujer que en el varón durante la gametogénesis^{141.142}.

Si la DMID es la expresión de una combinación de diversos alelos en la región HLA, es más probable que una combinación específica sea recibida intacta desde un padre afectado que desde una madre. Otro posible mecanismo sería dependiente de la íntima relación entre la madre y el feto. Así, los fetos que transportan la susceptibilidad a la DMID pueden ser selectivamente perdidos en el útero o, alternativamente, protegidos de la DMID por exposición a una madre diabética durante la gestación. La tasa de mortalidad infantil para niños de madres diabéticas es mayor que para niños de madres no diabéticas¹⁴³. Por lo tanto, una posible causa de un efecto "protector" en los niños de madres diabéticas es que la pérdida de descendientes diabéticos lo fueran preferencialmente a través de la muerte perinatal o a través de fracasos de implantación o abortos espontáneos, tal vez por un mecanismo inmunológico o por razones metabólicas. De todas formas, son necesarios más datos para determinar si la diferencia de sexo en la transmisión de la DMID desde padres a descendientes es debida a un mecanismo genético o a algún aspecto ambiental intrauterino¹³⁹.

Vadheim et al¹⁴⁴. observaron que los alelos DR4 del padre, pero no de la madre, y ambos, DR3 paternos y maternos eran transmitidos preferencialmente a sus hijos, diabéticos y no diabéticos, postulando que la distorsión de la transmisión DR podría ser explicada por una selectiva ventaja de los gametos que contienen alelos DR4 y DR3, o bien por una selección intrauterina de los cigotos con alelos no DR3 o DR4. Estudios preliminares

realizados por nuestro grupo, no han confirmado dichos hallazgos¹⁴⁵.

3. AUTOINMUNIDAD.-

La evidencia de que la DMID es una enfermedad autoinmune viene apoyada¹⁴⁶ por: a) la existencia de lesiones características de insulitis autoinmune observadas en el curso temprano de la enfermedad¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, b) la detección de múltiples autoanticuerpos específicos a los diferentes antígenos de los islotes en una gran proporción de sujetos diabéticos tipo I en el momento del diagnóstico¹⁵⁰, c) el hallazgo de anomalías específicas de los linfocitos T presentes en la diabetes tipo I en fase precoz¹⁵¹⁻¹⁵³, d) la asociación clínica de la DMID con síndromes poliendocrinos autoinmunes¹⁵⁴, e) la asociación de DMID con HLA-B8, DR3 y B15, DR4, de los cuales los antígenos HLA-B8, DR3 están fuertemente asociados con una serie de enfermedades autoinmunes^{84,119,155-157}.

La infiltración de células mononucleares es la característica del proceso histológico que afecta a los islotes pancreáticos en la DMID. La insulitis florida ha sido detectada principalmente en la diabetes tipo I de reciente comienzo, y su descripción^{147,148} sugiere un posible papel para la autoinmunidad en el ataque y destrucción de las células productoras de insulina¹⁵⁸.

Bottazzo et al¹⁵⁹. demostraron depósitos de inmunoglobulinas en las células de los islotes y caracterizaron la infiltración linfocítica detectada en el páncreas de una niña de 12 años que falleció en las 24 horas siguientes al diagnóstico, observando que la mayoría de los linfocitos que infiltraban el páncreas era del fenotipo T citotóxico/supresor, aunque otras subpoblaciones de células T estaban presentes. Algunas de las células T estaban "activadas" (positivas para antígeno HLA-DR, y el receptor de la interleucina-2). Los inmunocitos productores de IgG estaban dispersos en la glándula, y los anticuerpos IgG fijadores de complemento estaban depositados en algunos islotes. Se observó una expresión aumentada de moléculas de clase I (HLA-A, B y C) en las células de los islotes afectados, y en los islotes dañados aparecía escasa infiltración linfocítica; algunas células β (todavía produciendo insulina) fueron HLA-DR positivas, al contrario que las células productoras de glucagón o somatostatina¹⁵⁸.

Hay todo un espectro de lesiones encontradas en el páncreas de sujetos fallecidos con DMID, según el tiempo de evolución. Así, el examen del páncreas de un paciente con diabetes de varios años de evolución muestra que la mayoría de los islotes están atróficos y con reducción del número de células β por encima del 90% y la insulitis está ausente¹⁴⁸.

Por otro lado, en las muestras de páncreas de pacientes con DMID que murieron en el primer año del comienzo de los

síntomas se observaron tres poblaciones de islotes¹⁶⁰, existiendo islotes deficientes en insulina, que caracteriza el páncreas de la diabetes tipo I de larga evolución; hay islotes donde las células β llegan a ser selectivamente destruidas por un infiltrado de células inflamatorias crónicas, y hay islotes donde este proceso no ha comenzado. Probablemente, estas tres poblaciones de islotes representen el cambio continuo desde los islotes "prediabéticos" a "diabéticos", existiendo evidencia de que la destrucción de las células β , en la mayoría de los casos, puede durar un tiempo, incluso años.

La secuencia propuesta de sucesos en un islote en la diabetes tipo I¹⁶¹ es como sigue: La anomalía más precoz demostrada parece ser la hiperexpresión de MHC de clase I. Esta puede afectar todos los islotes en los que la destrucción de las células β tendrá lugar. La insulitis es el proceso por el que las células β son destruidas y todos los islotes inflamados que contienen insulina hiperexpresan MHC de clase I. La expresión de MHC de clase II en las células β puede no ser necesariamente un pre-requisito para que estas células sean destruidas, puesto que se encontraron islotes con insulitis donde este fenómeno estaba ausente. Así la hiperexpresión de MHC de clase I en un islote puede ser seguido directamente por insulitis, o por expresión aberrante de MHC de clase II en algunas células β y después por insulitis (Fig. 3).

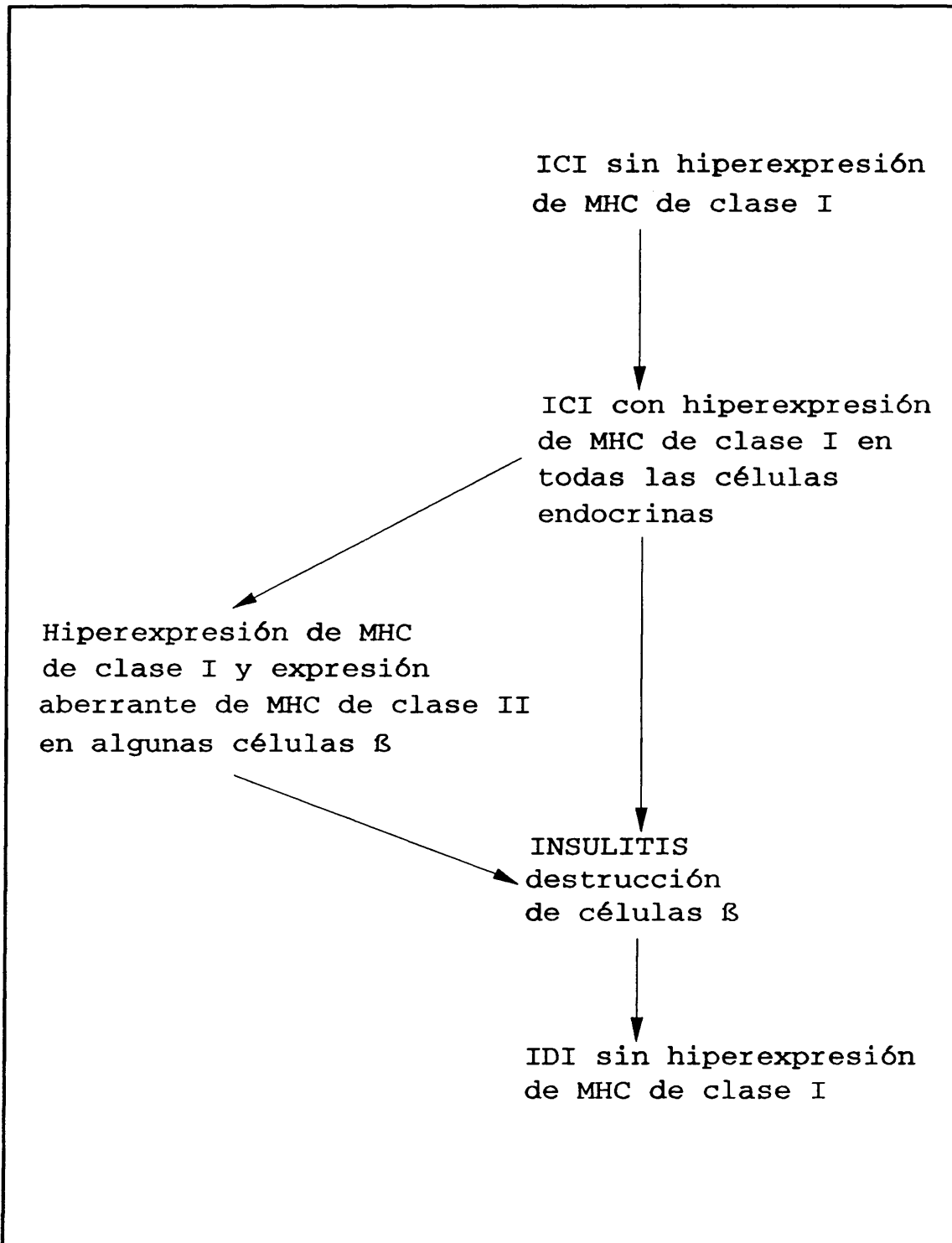


Figura 3. Secuencia de sucesos en un islote en la diabetes tipo I¹⁶¹.
ICI = islotes que contienen insulina.
IDI = islotes deficientes en insulina.

Un aspecto intrigante del fenómeno de hiperexpresión de MHC de clase I en los islotes que contienen insulina fué que las células que secretan glucagón y somatostatina también hiperexpresan éstas moléculas. Una posible explicación para ello es que las células β en los islotes en los que se observa hiperexpresión de clase I secretan alguna sustancia (como interferón α y β) que tiene un efecto paracrino sobre las células adyacentes secretoras de glucagón y somatostatina, causando en ellas también hiperexpresión de MHC clase I. Una infección viral podría ser el estímulo para liberar estas sustancias desde las células del tejido epitelial y conectivo. También una infección viral no citopática específica de las células β podría ser un posible candidato para causar la expresión aberrante de MHC de clase II por estas células en un huésped genéticamente predispuesto (DR3 y/o DR4).

La hiperexpresión de MHC de clase I puede no ser por sí mismo un suficiente estímulo para iniciar una reacción autoinmune a las células β , puesto que con posterioridad podría ser requerida la expresión MHC de clase II por éstas células para presentar antígenos a los linfocitos T "helper". Así la inducción de la autoinmunidad en la diabetes tipo I sería un proceso en el cual el acontecimiento clave, pero no necesariamente el primero, es la expresión aberrante de MHC de clase II por las células β ¹⁶¹.

El comienzo clínico de la DMID está caracterizado por cambios en la inmunidad celular y humoral. Estos cambios incluyen

aumento del número de linfocitos T activados expresando el antígeno HLA-DR en su superficie celular¹⁶² y alteraciones en el número y función inmunorreguladora de los linfocitos T y células "Killer"¹⁶³, así como producción de autoanticuerpos anticélulas de los islotes y antiinsulina¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

En 1974, Bottazzo et al¹⁶⁷. detectan los anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos (ICA) en un grupo de pacientes afectados de insuficiencia endocrina pluriglandular, con lo cual la hipótesis autoinmune de la diabetes empezó a adquirir consistencia.

Actualmente la importancia patogénica de los ICA sigue siendo objeto de controversia¹⁶⁸, pero lo que es indudable es su valor como marcador de individuos con alto riesgo de desarrollar diabetes. Los ICA reaccionan contra un componente citoplasmático común a los distintos tipos de células insulares¹⁶⁷. Si bien su falta de especificidad para las células B hacen improbable que tengan un papel patogénico directo¹⁶⁹. Se ha descrito que el antígeno diana de los anticuerpos anticélulas de los islotes "citoplásmicos" es un sialoglicoconjugado¹⁷⁰.

Los ICA están presentes en la mayoría de los pacientes con diabetes tipo I recién diagnosticada (70-80%)^{38,87,171} y pueden ser detectados muchos años antes del comienzo clínico de la diabetes⁵⁰. El seguimiento de personas sanas con ICA positivos ha demostrado que muchas pueden llegar a ser diabéticas^{172,173}.

Los ICA son transitorios en la mayoría de los diabéticos pero persisten hasta dos a tres años en sólo el 15-20% de los casos¹⁷¹.

La presencia de ICA en el suero de pacientes varios años antes de la presentación clínica de la diabetes tipo I ha sugerido que la destrucción de las células B puede tener lugar insidiosamente durante este tiempo⁴⁷.

Diversos estudios confirman un aumento de frecuencia de ICA en parientes de primer grado de pacientes con DMID, oscilando entre el 0,9-21%¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Algunos de estos individuos ICA positivos tienen un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) anormal¹⁷⁴ o disminución de la primera fase de secreción de la insulina usando test de tolerancia a la glucosa intravenosa¹⁷⁷.

La prevalencia de ICA en la población general oscila entre el 0,25 y 0,8%¹⁷⁸, incrementandose hasta el 7,6% en los pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune¹⁷⁹, de los cuales el 83% padece DMID. Los sujetos positivos suelen ser portadores de HLA-DR3 y/o DR4 o tener historia familiar u otra enfermedad autoinmune organoespecífica¹⁷⁸, habiendose descrito una correlación negativa entre HLA Cw7 y la presencia de ICA en sujetos con DMID¹⁸⁰.

En 1978, Lernmark et al¹⁸¹. detectan en el suero de enfermos diabéticos anticuerpos que reaccionan con la superficie celular de las células insulares (ICSA). Su determinación es más difícil y menos reproducible que la de los ICA. Al igual que estos últimos tenían su máxima prevalencia en el momento del diagnóstico y podían preceder a éste¹⁸².

Dobersen et al¹⁸³. demostraron que el suero de pacientes ICSA positivos era citotóxico frente a las células de los islotes.

El desencadenante de la producción de ICSA citotóxico es desconocido, pero existen varias posibilidades¹⁸³: a) que los ICSA no sean la causa sino el resultado de la injuria de las células β , tal vez secundario a estímulos ambientales (virus o químicos). b) Otra posibilidad es que los ICSA sean la respuesta inmune del huésped a antígenos extraños que reaccionan cruzadamente con antígenos de superficie de las células β (una forma de mimetismo molecular). c) Una tercera posibilidad es que los ICSA precedan al desarrollo de diabetes y sea el resultado de un desorden de inmunorregulación genéticamente condicionado o inducido ambientalmente, o ambos. In vivo estos autoanticuerpos pueden requerir la cooperación de otras células (por ejemplo células "Killer") para ejercer la citotoxicidad¹⁸⁴.

La presencia de ICSA citotóxicos en parientes no diabéticos, junto con la observación de que no todos los

pacientes con DMID tienen ICSA citotóxicos, argumentan que la simple presencia de ICSA no es suficiente para producir diabetes. Los ICSA citotóxicos pueden ser un marcador predictivo útil para identificar personas que tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes¹⁸³.

Los ICSA están presentes en el 32-35% de los pacientes con DMID^{181,185} comparados con solo el 2% de los controles sanos¹⁸⁵. Entre los familiares no diabéticos de pacientes con DMID, el 5% de los padres y el 14% de los hermanos tenían ICSA. Los ICSA estuvieron presentes más frecuentemente en pacientes dentro de los dos años del comienzo (45%) que en aquellos con enfermedad de más de dos años de evolución (27%).

Un 18-38% de los diabéticos tipo I presentan anticuerpos antiinsulina en el momento del diagnóstico, antes de haberse iniciado el tratamiento con insulina^{146,165,166,186-189}, pero el papel de estos anticuerpos en la patogénesis de la DMID es desconocido. Del mismo modo, la posibilidad de asociación entre anticuerpos antiinsulina e ICA en la manifestación clínica de la DMID es todavía controvertido¹⁹⁰, así hay autores que encuentran asociación entre ICA y anticuerpos antiinsulina^{189,191,192}, mientras que otros estudios han fracasado en demostrar tal asociación^{146,165,188}.

Los sujetos con anticuerpos antiinsulina positivos se caracterizan, según Karjalainen et al¹⁸⁸., por una edad de

comienzo de la enfermedad más joven, concentraciones más bajas de péptido C sérico y un aumento de la frecuencia de HLA-Dw4. Los resultados de estos autores sugieren que los anticuerpos antiinsulina desarrollados antes del diagnóstico sirven como un indicador de la heterogeneidad clínica y genética de la DMID más que como un marcador de la destrucción autoinmune de las células β .

Los títulos de anticuerpos antiinsulina están inversamente relacionados con la edad, así niveles muy altos se encuentran en niños que debutan con DMID por debajo de los cinco años de edad¹⁹³.

Diversos investigadores habían señalado la existencia de altos títulos de anticuerpos antiinsulina asociados a diferentes tipos HLA. Fue sugerido que la presencia de HLA-DR3 se asociaba con títulos más bajos de anticuerpos antiinsulina. En contraste, pacientes que expresan HLA-DR4 o HLA-DR7 tienden a tener un título elevado de anticuerpos antiinsulina¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. McEvoy et al¹⁹⁷. no encuentran dicha correlación con HLA-DR4, sugiriendo que la producción de anticuerpos antiinsulina está controlada por un gen dominante en desequilibrio de ligamiento con HLA-DR3.

En un estudio reciente de Bonifacio et al¹⁹⁸. se determinó la sensibilidad y el valor predictivo de los ICA para el desarrollo de DMID en 719 familiares de primer grado de

pacientes afectos de DMID. Se detectaron ICA en el 3,3% de los familiares estudiados en comparación con el 2,2% de los controles. Desarrollaron DMID el 73% de los familiares con niveles elevados de ICA entre 20 y 80 unidades Juvenile Diabetes Fondation (JDF) tras diez años de seguimiento, mientras que solo lo hicieron el 18% de los que tenían niveles máximos de ICA entre 4 y 20 unidades JDF. Así, el valor predictivo positivo de los ICA para el desarrollo de DMID a los diez años fué del 100% con un umbral de 80 unidades JDF, en comparación con el 40% con un umbral de 4 unidades JDF, mientras que la sensibilidad de la determinación de ICA para identificar a los familiares que desarrollarían DMID fue solo del 31% con un umbral de 80 unidades JDF, aumentando hasta el 88% con un umbral de 4 unidades JDF. En el estudio de Riley et al¹⁹⁹. desarrolló DMID el 47% de los parientes que tenían títulos de ICA iguales o superiores a 40 unidades JDF.

Existen datos sugerentes de que los ICA fijadores de complemento (CF-ICA) son marcadores de mayor predicción, que los ICA convencionales, de la destrucción progresiva de las células β antes del diagnóstico^{92.200}. En general, los CF-ICA aparecen en la circulación más tarde que los ICA-IgG, y desaparecen más pronto después de establecida la diabetes clínica, pudiendo presentar fluctuaciones¹⁶⁴.

Se han suscitado múltiples controversias sobre si los CF-ICA representan una diferencia cualitativa, o son solamente

un fenómeno que ocurre a títulos elevados de anticuerpos ICA-IgG. Para Riley et al²⁰¹. los CF-ICA indican más la presencia de altos títulos de ICA que un nuevo tipo de anticuerpos.

En el estudio familiar del Bart's-Windsor²⁰² de 719 familiares de primer grado sanos de niños con DMID, un 3,3% mostraron CF-ICA, de los cuales el 54% desarrolló DMID tras ocho años de seguimiento. Bruining et al²⁰³. encuentran un 0,24% de CF-ICA en una población de 4.806 niños escolares sin antecedentes de DMID, desarrollando DMID un 50% al cabo de diez años. La sensibilidad de los ICA para predecir DMID fué del 57% y la especificidad del 99,8%, mientras que la probabilidad para no desarrollar DMID de un sujeto ICA negativo fue del 99,9%. Otros autores habían señalado prevalencias de CF-ICA del 0,35%²⁰⁴ y 0,41%¹⁷⁸ en niños escolares.

Los ICA están presentes en un bajo porcentaje de parientes de primer grado con una frecuencia que depende de los métodos utilizados para su detección. Las reacciones débilmente positivas son habitualmente artefactos de limitado valor predictivo, mientras que altos títulos de ICA que coinciden con las propiedades de fijación de complemento tienen excelente valor predictivo⁶¹. Después de tres "workshops" internacionales, ha sido posible que la mayoría de los laboratorios estandarizaran las pruebas de ICA y los títulos sean expresados en términos de unidades JDF²⁰⁵⁻²⁰⁷.

En estudios de seguimiento de 5-8 años de duración, el riesgo acumulado de DMID en parientes sin ICA es solo aproximadamente de un 1%, mientras que en el 40 al 70% de aquellos con ICA (dependiendo del título) se ha observado el progreso a DMID^{50.202}.

Ultimamente, el hallazgo de autoanticuerpos a una proteína de membrana de las células β de 64.000 M_r (64 KA) abre nuevas esperanzas como marcador predictivo de DMID²⁰⁸⁻²¹¹.

Se cree que el antígeno primario de las células β en la DMID es una glucoproteína dimérica con un peso molecular aproximado de 64 kD²¹², identificada en el hombre y en las ratas BB²¹³ y los ratones NOD²¹⁰. Se han descrito anticuerpos frente a este antígeno tanto en pacientes con un diagnóstico reciente de DMID como varios años antes del inicio de la enfermedad²⁰⁸.

Recientemente se ha identificado el autoantígeno de 64 K como la enzima descarboxilasa del ácido glutámico, que interviene en la síntesis del neurotransmisor GABA (ácido gamma-aminobutírico)²¹⁴, y que se encuentra en ciertas subpoblaciones de neuronas del sistema nervioso central y en las células β pancreáticas.

Jones et al²¹⁵. sugieren que la proteína 65 del shock por calor podría ser el antígeno de 64 kD de las células β y que

la auto-reactividad frente a un epitopo de dicha proteína 65 podría inducir susceptibilidad para desarrollar DMID.

En 1983, Maron et al²¹⁶. describieron la existencia de anticuerpos anti-receptor de la insulina de clase IgM en el suero de 10 de 22 pacientes con DMID obtenido antes del tratamiento con insulina exógena. Además, dos de cinco pacientes con DMID que inicialmente eran negativos desarrollaron anticuerpos anti-receptor de la insulina durante el tratamiento con insulina humana o porcina. Estos hallazgos sugieren que la autoinmunidad frente al receptor de la insulina puede contribuir a la patofisiología de la DMID.

Tras las descripciones de los anticuerpos dirigidos contra el citoplasma de las células β (ICA)^{167,217} y posteriormente frente al producto de las células β (antiinsulina)¹⁶⁶, Wilkin et al²¹⁸. en 1988, comunican la existencia de autoanticuerpos contra un supuesto receptor de las células β , en pacientes con DMID o con hipoglucemia espontánea documentada, que estimulan la liberación de insulina tanto en roedores como en el hombre y que probablemente son similares a los anticuerpos estimuladores del tiroides responsables del hipertiroidismo de la enfermedad de Basedow. El descubrimiento de los anticuerpos estimuladores de las células insulares (AECI) completa a nivel de los islotes la triada de autoanticuerpos (anticitoplasma, antiproducción y anti-receptor) descritos anteriormente en patología tiroidea autoinmune.

Existe una amplia evidencia de que los mecanismos inmunes mediados por células son de gran importancia en la iniciación de la DMID, incluyendo una anormal inhibición de la migración leucocitaria, aumento de la actividad de los linfocitos T Killer^{184.219}, citotoxicidad de los linfocitos¹⁵¹, disminución de la función supresora estimulada por concavalina A²²⁰. También se han descrito anomalías de los linfocitos T activados, inhibición de la liberación de insulina por linfocitos²²¹, aumento de células T Ia positivas circulantes³⁸.

Mandrup-Poulsen et al²²². encontraron que la interleuquina-1 (IL-1), producida por macrófagos, ejerce citotoxicidad directa sobre las células de los islotes, sugiriendo que el mecanismo de destrucción de las células β puede estar mediado por linfoquinas²²³. Asimismo los pacientes con diabetes tipo I tienen un defecto en la producción de interleuquina-2, el cual persiste años después del comienzo de la enfermedad. No se conoce cuando se desarrolla este déficit (genéticamente determinado, defecto adquirido o secundario a desordenes metabólicos de la diabetes manifiesta), aunque parece desarrollarse después de la diabetes manifiesta, sugiriendo que el déficit de interleuquina sea adquirido²²⁴.

Otros autores han demostrado un defecto en la producción de interleuquina-1 (IL-1) en la DMID que puede reflejar un defecto en la función de los monocitos. Sin embargo, aunque la producción basal de IL-2 está disminuida en la DMID

cuando se estimulan los linfocitos T (con concanavalina A y phorbolmyristate acetate), la producción de linfoquinas (IL-2 e IL-3) no estaban alteradas²²⁵.

Por otro lado, cuando se exponen a antígenos de los islotes in vitro, los linfocitos de pacientes con DMID liberan cantidades aumentadas de la linfoquina factor inhibidor de los macrófagos²²¹.

Bottazzo et al²²⁶. consideran la existencia de dos tipos de diabetes tipo I: a) la diabetes tipo Ia en la que los fenómenos autoinmunes (ICA, inhibición anómala de la migración leucocitaria y niveles elevados de células K) tienden a ser transitorios y pueden ser secundarios a la lesión de los islotes y b) la diabetes tipo Ib, de inicio más tardío, "autoinmune primaria", en la que existe un predominio femenino y una tendencia a que los fenómenos autoinmunes celulares y humorales persistan por más tiempo.

La asociación de diabetes tipo I y la presencia de otros autoanticuerpos orgánicos específicos (tiroideos, gástricos y corticosuprarrenales) e incluso con otras enfermedades endocrinas autoinmunes¹⁵⁴ (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, insuficiencia adrenal primaria y anemia perniciosa) es conocida desde hace tiempo, habiéndose descrito también la existencia de complejos inmunes circulantes²²⁷ y anticuerpos no organoespecíficos (antinucleares, antimúsculo liso,

antimitocondriales etc.) en los diabéticos tipo I con mayor frecuencia que en la población general.

Aproximadamente el 25% de pacientes con DMID tienen autoanticuerpos antitiroideos microsomales y/o anticélulas parietales gástricas (autoinmunidad tirogástrica)⁸⁷, estando presentes habitualmente en el momento del diagnóstico²²⁸.

Betterle et al²²⁹. estudiaron 367 pacientes diabéticos tipo I y 243 de sus parientes de primer grado, encontrando una o más enfermedades autoinmunes organoespecíficas (tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, gastritis atrófica, vitíligo, anemia hemolítica autoinmune) en el 7,3% de los pacientes diabéticos y en el 4,5% de sus parientes. Los anticuerpos antitiroideos (microsomales y/o tiroglobulina) y/o anticélulas parietales gástricas y/o antiadrenales, en ausencia de evidencia clínica de la respectiva enfermedad autoinmune, estuvieron presentes en el 17,6% de los pacientes diabéticos. Dichos autoanticuerpos organoespecíficos fueron detectados en el 21,8% de los parientes de primer grado. Se realizaron test funcionales glandulares (TRH, ACTH) y biopsias gástricas en pacientes diabéticos y sus parientes, en base a la respectiva positividad de los autoanticuerpos, demostrándose hipotiroidismo idiopático subclínico, enfermedad de Addison latente y gastritis atrófica latente en el 28,3%, 25% y 71,4% de los sujetos investigados,

resaltando la importancia del estudio familiar de pacientes diabéticos tipo I.

Maclaren y Riley²²⁸ siguieron 117 niños y jóvenes adultos con DMID y anticuerpos antitiroideos microsomales positivos durante 5 años observando que en el estudio inicial 8 (7%) tenían hipertiroidismo mientras 45 (38%) tenían hipotiroidismo (clínicamente manifiesto ó "químico" diagnosticado en base a TSH elevada y disminución de T4 L en plasma). En aquellos sujetos con hipertiroidismo, éste había precedido o coincidido con la aparición de DMID. En contraste, el comienzo del hipotiroidismo fué variable con respecto al inicio de la DMID, aunque a menudo ocurre después del diagnóstico de la DMID²³⁰.

En los sujetos control, los anticuerpos antitiroideos y gástricos fueron más frecuentes a medida que aumentaba la edad. Entre los pacientes con DMID y autoanticuerpos antitiroideos y gástricos, estos autoanticuerpos aparecieron al comienzo de la DMID en la gran mayoría de los casos, sin embargo fueron más comunes entre pacientes con edades más tardías de comienzo de la DMID.

Otros autores han referido porcentajes diferentes de pacientes diabéticos con anticuerpos antitiroideos positivos, oscilando entre un 8%²³¹ y un 44%²³².

Riley et al²³⁰. encontraron una frecuencia aumentada de anticuerpos antimicrosomales tiroideos (17,6%) pero no de anticuerpos antitiroglobulina en pacientes con DMID. Los anticuerpos antimicrosomales predominaron en pacientes blancos (20,1%) sobre negros (5,5%), con una razón mujer/varón de cerca de 2/1. En estos pacientes con anticuerpos antitiroideos microsomales fué más frecuente la presencia de anticuerpos anticélulas parietales gástricas (16,8%) y antiadrenales (5,1%).

Los autoanticuerpos anticélulas parietales gástricas fueron encontrados más frecuentemente en pacientes con DMID (9%) que entre controles no diabéticos (2%)²³³, mientras que los anticuerpos antiadrenales se detectaron en el 2% de los pacientes con DMID y de ellos el 25% tenían enfermedad de Addison²³⁴.

Cacciari et al²³⁵. detectaron anticuerpos antigliadina (AAG) en el suero de 9 pacientes (6,2%) entre 146 niños con DMID sin síntomas gastrointestinales. Cinco de ellos (3,4%) mostraron cambios en la mucosa yeyunal típicos de enfermedad celiaca. Estos anticuerpos pueden considerarse como una expresión de la alteración inmunológica que afecta a los pacientes diabéticos al inicio de su enfermedad con producción de diversos tipos de anticuerpos^{171, 236} organoespecíficos y no organoespecíficos. Se ha considerado que algunas personas estarían predispuestas genéticamente a una enfermedad que afectaría a diversos órganos endocrinos tales como el páncreas. Esta hipótesis está sostenida por el hallazgo de HLA-B8 Dw3 en muchos de estos pacientes. Este

haplotipo se encuentra también en algunos pacientes con enfermedad celiaca, la cual se asocia a DMID²³².

Mirakian et al²³⁷. comunicaron la presencia de anticuerpos contra las células hipofisarias en el 2% de pacientes con diabetes de larga evolución, en el 16,6% de pacientes con diabetes de inicio reciente y en el 36,6% de familiares genéticamente predispuestos que poseían anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos (7 de ellos se volvieron diabéticos en un periodo de seguimiento de 3 años, y 4 presentaron reactividad frente a las células hipofisarias durante 1-3 años antes del inicio de la diabetes). Los anticuerpos hipofisarios tienden a desaparecer tras el inicio de los síntomas.

Como se puede ver tras el análisis detallado de todas estas observaciones, existen datos que sugieren una alteración mas amplia de los órganos del sistema endocrino en la patogénesis de la DMID.

4. FACTORES AMBIENTALES.-

Diversas observaciones clínicas han puesto de manifiesto que algunas infecciones virales pueden preceder el comienzo de la DMID, sugiriendo que un agente ambiental puede ser importante en el desencadenamiento de algunos casos^{56,238-241}.

La hipótesis viral está apoyada por el caso clínico de un niño de 10 años que tras una enfermedad aguda tipo influenza desarrolló una DMID de evolución fatal²⁴². El cultivo del homogeneizado de páncreas condujo al aislamiento del virus coxsackie B4, y la inoculación de este virus al ratón produjo hiperglucemia. El examen postmortem mostró infiltración linfocítica de los islotes de Langerhans y necrosis de las células β .

Las diferencias geográficas existentes²⁴³, la variación estacional²⁴⁴ y una baja tasa de concordancia en gemelos idénticos^{80,81}, sugieren que las infecciones víricas²⁴² u otros factores ambientales²⁴⁵ puedan tener importancia en la etiología.

Es necesario investigar la posibilidad de que la exposición a un agente infeccioso juegue un papel etiológico en la DMID, mas que servir como un simple desencadenante de la enfermedad. Es posible, incluso, que la exposición al agente ambiental, pueda haber ocurrido en el útero o en la infancia temprana²⁴⁶. Sin embargo, en vista del largo periodo prodrómico²⁴⁷ detectado, parece probable que la enfermedad viral pueda actuar precipitando mas que iniciando el proceso de destrucción de las células β ²⁴⁸.

Se ha demostrado una variación estacional con un pico de mayor incidencia en los meses de otoño e invierno^{42,243}. Weinberg et al²⁴⁹. encontraron una heterogeneidad en los patrones

estacionales de la DMID HLA-relacionados. De este modo, los casos DR3 positivos muestran un patrón estacional al diagnóstico que no depende de la edad, mientras que los casos DR3 negativos muestran un patrón estacional edad-dependiente. Estas diferencias pueden reflejar el predominio de diferentes mecanismos etiológicos en estos dos grupos genéticos.

Se han encontrado títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra antígenos virales pancreatotropos (coxsackie, parotiditis, encefalomiocarditis, citomegalovirus...) en el suero de pacientes diabéticos poco tiempo después del diagnóstico²⁵⁰⁻²⁵⁵. Aproximadamente el 30% de los niños recién diagnosticados muestran aumento de anticuerpos IgM monotípicos a coxsackie frente al 5% de los controles²⁵⁶.

Un 20% de los niños afectados por rubeola congénita desarrollan diabetes tipo I al cabo de varios años, asociados a HLA-DR3 y/o DR4 y a otras manifestaciones de autoinmunidad (anticuerpos anticélulas de los islotes positivos)²⁵⁷.

Otro hecho de interés es la observación de diferencias de incidencia de DMID en grupos étnicos asociados a migraciones de poblaciones. Así, poblaciones racialmente idénticas que emigran a otros países muestran distinta susceptibilidad para padecer DMID, adquiriendo un riesgo próximo al de la población adoptiva²⁵⁸.

Pak et al²⁵⁹. describen la presencia de citomegalovirus (CMV) en el DNA de células mononucleares sanguíneas en el 22% de 59 pacientes diabéticos jóvenes de reciente diagnóstico. Harrison y Campbell²⁶⁰ han demostrado que el cultivo de células insulares humanas en monocapa puede infectarse con reovirus 1 ó 3 y con virus coxsackie B y que la infección conduce a la hiperexpresión de proteínas de MHC clase I en las células β . Así pues la hiperexpresión de proteínas de MHC de clase I inducida por infección vírica puede tener un efecto nocivo directo sobre la función de las células β y proceder al desarrollo de la autoinmunidad.

Los datos de Nigro et al²⁶¹. apoyan la sugerencia de que la infección persistente por CMV puede desempeñar un papel etiológico en la diabetes tipo I, quizás al desencadenar una enfermedad autoinmune específica de las células β , tal como se ha sugerido para otros virus.

La evidencia de que los virus pueden ser una posible causa de DMID viene dada por experimentos en animales, pero diversos estudios en humanos también apuntan a los virus como desencadenantes de la enfermedad en algunos casos. El virus de la encefalomiocarditis (EMC), mengovirus (2T), y virus coxsackie B4 infectan y destruyen las células β pancreáticas cuando se inoculan al ratón. Esto resulta en hipoinsulinemia e hiperglucemia. El desarrollo de diabetes inducida por el virus de la EMC y por el virus coxsackie B4 está influenciado por un

fondo genético del huésped. Por el contrario, la diabetes inducida por mengovirus no es dependiente del fondo genético del huésped²⁶².

Sigue sin haberse establecido el papel exacto de los virus comunes como causa directa de la lesión de las células β , pero parece improbable que actúen de forma aguda²⁶³, habiéndose descrito la existencia de un largo periodo prodrómico prediabético en los individuos susceptibles. Además, cuando la diabetes aparece tras la parotiditis, los anticuerpos anticélulas de los islotes preceden a la infección vírica²⁶⁴, lo que sugiere que ésta puede actuar precipitando una descompensación metabólica en individuos con lesión preexistente de las células β mediada inmunológicamente, sin iniciar directamente la lesión²⁴⁸.

Helmke et al²⁶⁵. estudiaron 127 niños no diabéticos con infección por el virus de la parotiditis encontrando que 21 eran ICA positivos. En 44 muestras de suero de pacientes que sufrieron otras infecciones virales tal como coxsackie, sarampión, rubeola y adenovirus, los ICA fueron indetectables. El único niño que desarrolló diabetes tres semanas después de la infección por el virus de la parotiditis fué el único que mostró persistencia de ICA durante 9 meses. Parece altamente improbable que el comienzo de la diabetes sea primariamente debida a la infección vírica reciente o vacunación activa. Una infección vírica, sin embargo, podría ser el insulto final del sistema inmune o a los islotes que están experimentando un proceso de destrucción autoinmune

conduciendo al comienzo de la diabetes clínica^{265,266}. En este sentido Asplin et al⁴⁹. detectaron anticuerpos anticélulas de los islotes e infección por el virus coxsackie B4 en un niño tres años antes de la diabetes manifiesta y Champsaur et al²⁶⁷. describen el caso de una niña de 16 meses que presentó una infección por virus coxsackie B5 e ICA antes del comienzo clínico de la DMID.

Los resultados de los estudios de Bruserud et al²⁶⁸. sugieren que elementos en las moléculas DR3 y DR4 pueden controlar la respuesta de los linfocitos T a los virus de la parotiditis y coxsackie B4. Así, estos estudios demuestran una frecuencia disminuida de la reactividad de los linfocitos T al virus de la parotiditis cuando el antígeno viral es reconocido junto con HLA-DR3 en las células presentadoras de antígenos. En contraste, se evidenció un aumento en la frecuencia de la reactividad de los linfocitos T DR4-restringida a la parotiditis y ninguna hipo o hiperrespuesta DR asociada a la varicela-zóster o derivado proteico purificado de la tuberculina.

Los trabajos de Jenson et al²⁶⁹. proporcionan evidencia de que algunos virus pueden infectar y dañar las células B humanas. El estudio del páncreas de 250 niños con infección fatal por diferentes virus mostró destrucción de células B e infiltrados inflamatorios agudos y crónicos en los islotes de casos con infección por virus coxsackie B, mientras que en casos

de infección por citomegalovirus y varicela-zóster se observaron cuerpos de inclusión característicos en los islotes.

Tal vez, las fluctuaciones en los niveles de ICA observadas en familias diabéticas²⁷⁰, sean debidas a infecciones asintomáticas por virus con un posible tropismo por las células β , caso de los virus coxsackie B²⁵⁰.

Los mecanismos a través de los cuales los virus pueden desencadenar respuestas autoinmunes han sido revisados por Notkins et al^{271,272}. Los virus pueden hacer que las células infectadas o alguno de sus componentes resulten "extraños" al huésped, o desencadenar mecanismos autoinmunes al actuar sobre el sistema de inmunorregulación. La autoinmunidad podría inducirse por medio de anticuerpos antiidiotipo o bien los epitopos víricos podrían tener determinantes comunes con antígenos presentes en las células β de algunos pacientes.

Para Yoon et al²⁷³. el desarrollo de diabetes mellitus en ratones inducida por la variante D del virus de la encefalomiocarditis (EMC-D) es debido a la destrucción directa de las células β por el virus y la contribución de la respuesta inmune a la patogénesis de esta enfermedad es menor.

Pak et al²⁵⁹. encontraron una intensa correlación entre la presencia de genoma de citomegalovirus y anticuerpos contra las células de los islotes (ICA) y anticuerpos citotóxicos contra

la superficie de las células B (ACSB) en pacientes diabéticos tipo I recién diagnosticados, sugiriendo que las infecciones persistentes por CMV pueden ser importantes en la patogenia de algunos casos de diabetes tipo I.

Vaandrager et al²⁷⁴., al contrario que otros autores^{265,275}, no encontraron ningún suero ICA positivo en pacientes con infección demostrada por el virus de la parotiditis, mientras que Helmke et al²⁶⁵. encontraron ICSA en el 62% de niños con infección por parotiditis y Ratzmann²⁶⁶ detectó ICSA en el 36% de niños y 62% de pacientes mayores de 16 años tras la infección por parotiditis.

Por otro lado, se han implicado otros agentes químicos ambientales, en el inicio de la enfermedad, capaces de actuar sobre la célula B: la aloxana, la estreptozotocina y el rodenticida Vacor pueden inducir cetoacidosis diabética²⁴⁵.

En ratas, dosis altas de estreptozotocina producen una destrucción directa de células B, pero dosis bajas y repetidas inducen una diabetes autoinmune²⁷⁶.

En Islandia se ha demostrado un riesgo aumentado de diabetes insulín dependiente en hijos de mujeres que habían consumido cordero ahumado (alto contenido en compuestos nitrosos) al principio del embarazo^{56,277}.

El grupo de Eisenbarth³⁸ está realizando una experiencia para determinar si eliminando proteínas de la dieta (y sustituyendo aminoácidos) podrían alterar la autoinmunidad de la diabetes tipo I, como en estudios de ratas Biodreeding hechos por Elliott y Martin²⁷⁸.

II. OBJETIVOS

A pesar de los progresos realizados en la última década sobre la patogénesis de la DMID³⁸, la mortalidad y morbilidad de la enfermedad continúa siendo superior a la de la población general no diabética²⁷⁹, e incluso su incidencia parece haber aumentado en los últimos años⁷.

Un tratamiento etiológico realizado antes de llegar a la fase irreversible de la enfermedad podría controlar la agresión a las células β y evitar o retrasar la aparición de la enfermedad clínica.

Bajo estos aspectos, la predicción de la DMID es un objetivo lógico. Esto conllevaría la identificación de los pacientes que se beneficiarían del tratamiento y la identificación de los agentes etiológicos y mecanismos de producción de la enfermedad.

En base a todo ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Estudio de los factores de riesgo de la diabetes tipo I: genéticos e inmunológicos.
- 2.- Identificar la población susceptible o predispuesta a padecer la enfermedad.

- 3.- Seguimiento de los individuos de alto riesgo dirigido hacia el reconocimiento de alteraciones genéticas, inmunológicas y metabólicas antes del diagnóstico de la enfermedad con el fin de poder llegar a realizar una intervención terapéutica.
- 4.- Analizar si los niños con DMID son distintos, genética e inmunológicamente, de sus parientes de primer grado.
- 5.- Determinar si existe o no transmisión preferencial de los alelos HLA-DR3 y/o HLA-DR4 en familias con al menos un hijo afecto de DMID.
- 6.- Establecer la utilidad del test de tolerancia oral a la glucosa para la detección precoz y monitorización de la disfunción de las células β en fase preclínica.

III. MATERIAL Y METODOS

1. SUJETOS.-

Se seleccionaron aleatoriamente, en el período comprendido entre Enero de 1985 y Noviembre de 1986, 54 familias que tenían al menos un hijo con diabetes mellitus tipo I diagnosticada antes de los 15 años de edad. Los propósitos procedían de la Unidad de Diabetología-Sección de Endocrinología del Departamento de Pediatría del Hospital "12 de Octubre" de Madrid.

La población objeto del estudio estaba formada por 260 sujetos, de los cuales 54 (20,8%) eran propósitos con DMID, 108 (41,5%) progenitores y 98 hermanos (37,7%). De estos últimos 5 padecían DMID.

Entre las familias con "pedigrí" múltiple el propósito fue identificado como el primer miembro que contrajo DMID antes de los 15 años de edad (excepto en uno de los casos).

La edad se definió a partir de la extracción de la primera muestra de sangre para tipaje HLA y estudio de autoanticuerpos.

Todos los sujetos fueron seguidos cada 6-12 meses, realizándose en cada entrevista extracción de sangre para determinación de ICA.

La duración del seguimiento osciló entre 5 y 6 años.

A todos los miembros se les practicó tipaje HLA-A, B, C, Bw4, Bw6, DR, DQ, determinación de anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos, anticuerpos fijadores de complemento frente a los islotes de Langerhans y anticuerpos antitiroideos (antimicrosomales y antitiroglobulina).

Asimismo, se realizó en los parientes de primer grado determinación de anticuerpos antiinsulina y en aquellos que no se conocían diabéticos una sobrecarga oral de glucosa con determinaciones de glucemia, insulina y péptido C a los 0 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 180 minutos.

La diabetes mellitus e intolerancia a la glucosa fué definida de acuerdo con los criterios diagnósticos del National Diabetes Data Group²⁸⁰.

A los sujetos con ICA positivos se les realizó un seguimiento más estricto, con evaluaciones periódicas de perfiles glucémicos consistentes en determinaciones de la glucemia antes del desayuno y comida, dos horas después de comer, antes de cenar y a medianoche.

Para el análisis del modo de herencia de los alelos diabetogénicos HLA-DR3 y HLA-DR4 se excluyeron los padres

homocigotos para el alelo DR3/3 y DR4/4 respectivamente según se estudiase la transmisión de uno u otro, analizando exclusivamente aquellas familias en las que se pudo determinar con claridad el genotipo HLA.

2. TEST DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA.-

La sobrecarga oral de glucosa se realizó después de un ayuno nocturno de 10-14 horas. La primera muestra se extrajo en ayunas, después de la cual el paciente ingirió 100 gr de glucosa, para adultos, ó 1,75 gr/Kg de peso corporal hasta un máximo de 100 gr para niños, a una concentración de 25 gr%, en agua, debiendo beberse en 5 minutos. El tiempo 0 empezó a contarse a partir del comienzo de beber esta solución.

No se aconsejó una dieta especial, a no ser que la dieta seguida por el paciente contuviese menos de 125 gr de carbohidratos por día. En tales sujetos se indicó que al menos durante tres días la dieta contuviese 150 gr/día de carbohidratos, realizando una actividad física normal.

Durante la realización del test el paciente estuvo en reposo, no permitiendosele fumar²⁸¹.

La obtención de muestras se obtuvieron tras la colocación de un "butterfly" en una vena antecubital.

3. DETERMINACION DEL FENOTIPO HLA.-

Los antígenos HLA se determinaron sobre linfocitos aislados de sangre periférica desfibrinada. La sangre se extrajo al vacío (sistema Venoject, Terumo, Tokio) en tubos de vidrio de 10 ml provistos de 40-50 perlas de poliestireno de 1 ml de diámetro. La desfibrinación se realizó mediante agitación (10 minutos) de los tubos, que induce la formación del coágulo de fibrina alrededor de las perlas. La sangre se decantó, se diluyó 1/2 en medio Hanks (Flow, Reino Unido). Se añadieron cuidadosamente 4 ml de sangre diluida sobre 2 ml de Lymphoprep (d= 1.077 gr/ml, Nyegaard, Noruega) procurando que no se mezclaran las fases, y se centrifugaron a 1.800 rpm durante 40 minutos. Los linfocitos se recogieron de la interfase con una pipeta Pasteur, y después de lavarlo tres veces con medio de Hanks (10 ml, 10 minutos, 1.200 rpm), se resuspendieron en medio apropiado y a la concentración adecuada. El rendimiento es de 1×10^6 linfocitos/ml de sangre periférica. El recuento de linfocitos se realizó en una cámara de Neubauer mediante un microscopio con contraste de fase (Nikon, Japón).

Todos los medios utilizados para el aislamiento de linfocitos contenían antibióticos (Gentamicina, 40 µg/ml, Ampicilina, 125 µg/ml, Cloxacilina, 125 µg/ml) y se ajustaron a pH 7,3 con NaHCO_3 7,5% (Flow, Reino Unido).

3.1. HLA -A, -B, -C, -Bw4, -Bw6.

La determinación de estos antígenos se llevó a cabo por microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos totales²⁸², utilizando una batería de antisueros (Tabla I). El ensayo se basa en la especificidad de los antisueros empleados, que reconocen y se fijan a los antígenos HLA sobre los linfocitos que presentan, provocando su lisis al añadir complemento (reacción positiva). Esta reacción no tiene lugar cuando los linfocitos en estudio no presentan los antígenos HLA que reconocen los antisueros (reacción negativa).

Los antisueros, incluyendo un control positivo (suero antilinfocítico OTWH 02/03, Behring, Alemania) y un control negativo (Suero humano AB Rh+), se dispusieron en placas especiales para tipajes (de Terasaki, Sterilin, Reino Unido) provistas de 60 pocillos de 15 μ l de volumen (1 μ l de antisuero por pocillo), se recubrieron de parafina líquida (Merck, Alemania) para evitar la evaporación y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Los linfocitos totales, obtenidos como se indica en el apartado 3, se resuspendieron en medio Hanks a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. Con una microjeringa (Hamilton, Nevada) provista de dispensador automático se añadió 1 ml de la suspensión de linfocitos a cada uno de los pocillos de la placa

<u>Antisuero</u>	<u>HLA</u>	<u>Antisuero</u>	<u>HLA</u>
ZA-63	A1	FRE 8046	B13
CLB 15.6	A1, Aw36	PC260	B13
PC-213	A2	PC47	B13, B17
ZA-67	A2	FGR 1013	B14
M-41-B	A3	SEVI 90	B14
FGR-300	A3	C-598	B14
FRE 8415	A23	FE-105	B15
B10-120678	A23	BIO 15069	B15
ZA-62	A9, +	CLB 76	B15, Bw57,
PC-178	A9		Bw46, Bw77,
TORP-2664	A24	WOMA	B15, Bw70,
GRER POOL	A25		Bw50, B35
OSHI	A10, AB4	WEIN	Bw62
Fe 166	A10, Aw66	BIG 161022	B16
Sevi 120	A10	FRE 8242	B16
Bio 110899	A25	DEWI POOL	B38
PC-252	A25, A26	FRE 8288	B17
PC-45	A11	VLC-112	Bw57 (Bw77)
PC-118	A11, A3	L1144.1	Bw57 (Bw58)
Fe 67	A28, w69	FRE 7907	B18
Bio 520012	A28, A2	Fe 31	B18
76.3.16	A28, A2	7775/78	B21
FRE 7896	A29	FGR 54	B49 (A24)
Bio 114549	A29	BIO M70	B49, B5
LOOKE	A30, A31	TMP 1249	Bw22
FRE 8426	A30, A31	CJC 506	Bw22
Bio 130829	A31	BIO 110908	B27
Bio 111829	A31	BIO 120451	B27
Q0058	A32	B-34-B	B35, Bw53
CATA 1	A32, A25	SAMAC	B37
FE-88	Aw33	CLB 232	B37
Bio 320284	Aw33, w34, w68	BIO 111790	B40
M-37-B	Aw33, B14	VERMER	B40, B13,
	(B8, Aw34)		Bw70
M-58-B	B5	Bio 113623	Bw60
BwOSYT 04/05	B51	CLB 196	Bw41
FRE-8249	B51, Bw70	Bio 121187	Bw4
CJC-118	B5, B52, Bw70	VR 34486	Bw4, B35
PC-15	B5 (Bw53)	TORP 2635	Bw4; AG
M-48-B	B5, B35	VR 57281	Bw6
B + 131	B51, B35,	VR 46031	Bw6
	Bw53	TORP 594	Bw6
PC 122	B5, B49	Fe 124	Cw1
	(B17, B38)	MO 10w 512	Cw1
DRYNESS	B7, B48	M-7-B	Cw2 (B7)
M-13-B	B7	FRE 7519	Cw2 (B7)
PC-254	B7, B13	FRE 8268	Cw3
PC-257	B7, B13,	Bio 113649	Cw3
	B40, Bw47	Bio 110665	Cw4
TFSCM-65	B8	Bio 820840	Cw4
CLB 70.2	B8, Bw59	VR 520007	Cw4, Cw6
PF 061 RN	B8	ANDERSON	Cw5
M-4-B	B12	Fe 82	Cw5, A30
PC-123	B44	Mue 23928	Cw6
PLA-1387	B44, B57, B63	CLB 147.2	Cw7, Bw22
MUS 22289	B45, B15		

Tabla I. Antisueros anti HLA-A, -B, -C, -Bw4, -Bw6 utilizados.

de Terasaki. Estas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, añadiéndose después 5 µl por pocillo de complemento de conejo (Behring, Alemania) e incubándose 60 minutos más. Las reacciones positivas y negativas se determinaron inmediatamente después en cada pocillo mediante un microscopio invertido con contraste de fase (Nikon, Japón). EL fenotipo HLA -A, -B, -C, -Bw4, -Bw6 se dedujo de las especificidades de los antisueros con reacción positiva. La cuantificación de las reacciones se hizo de acuerdo con la siguiente nomenclatura utilizada internacionalmente: 8 = más del 80% de linfocitos muertos; 6 = 60%-80% de linfocitos muertos; 4 = 40%-60% de linfocitos muertos; 2 = 20%-40% de linfocitos muertos; 1 = menos del 20% de linfocitos muertos; 0 = reacción no valorable. Se consideraron positivos los pocillos con reacciones de 8 ó 6, dudosos con reacciones de 4 y negativos con reacciones de 2 ó 1.

3.2. HLA-DR y DQ.

La determinación de los antígenos HLA-DR y DQ se llevó a cabo por microlinfocitotoxicidad sobre linfocitos B purificados²⁸³, ya que estos antígenos están presentes en linfocitos B pero no en linfocitos T. Los linfocitos B constituyen un 10% de los linfocitos totales de sangre periférica. Para su aislamiento se prepararon microcolumnas de plástico (0.6x19.5 cm Winkler, California) con 60 mg de lana de fibra de nylon (Fenwall, Illinois) suavemente empaquetada (15

mg/cm) y sumergida en medio RPMI 1640 (Flow, Reino Unido), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal descomplementado (Flow, Reino Unido). Las microcolumnas se sellaron al fuego en cuña por un extremo y se taparon con Nescofilm (Nesco, Japón) por el otro, conservándose a -80°C hasta su utilización.

Los linfocitos totales obtenidos como se indicó en el apartado 3 se resuspendieron a una concentración de 80×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 más 10% de suero de ternera fetal ("medio Fetal") calentado a 37°C . La suspensión se introdujo por la parte superior de la microcolumna, que se había lavado e incubado previamente con medio Fetal 30 minutos a 37°C , se selló con Nescofilm por ambos extremos cuando hubo empapado de lana de nylon y se incubó 30 minutos a 37°C . Los linfocitos T se eluyeron haciendo pasar 20 ml de medio Fetal a 37°C a través de la lana de nylon. Los linfocitos B se extrajeron comprimiendo de arriba a abajo la lana de nylon empapada en medio Fetal a 37°C y lavado repetidas veces con dicho medio hasta completar 10 ml. Los linfocitos B se lavaron dos veces (10 ml, 10 minutos, 1.200 rpm) con medio Fetal antes de su utilización. El rendimiento de la técnica fue del 10% de linfocitos B respecto a los linfocitos totales iniciales, y la pureza de la preparación del 90%. Los antisueros utilizados (Tabla II), se prepararon como se indica en el apartado 3.1. Los linfocitos B purificados se resuspendieron en medio Fetal a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. Se añadió 1 μl de esta suspensión a cada antisuero

<u>Antisuero</u>	<u>HLA</u>	<u>Antisuero</u>	<u>HLA</u>
M-54-B	DR1	BI-114	DR7
VR 72646	DR1	M-68-B	DR7
M-56-B	DR1	FGR-108	DR7
PC-253	DR1	DSO44RN	DRw8, DR5
EB-32	DR2 (DR1)	HILL 1114.4	DRw8
PC-251	DR2	BRULE	DR9
CTM-4	DRw15	XIV 145.8	DR9, DRw52
PC-254	DRw16, DRw14	FRE 7608	DRw10
MUR 849	DR3	CATHELINE 5496	DRw10
PL 1501	DR3	TORP 156	DRw52
M-49-B	DR3 (DRw6)	PC 255	DRw52
EB-63	DR3 (DRw6)	GARIN 553	DRw52
LH-1208	DR4	TORP 2732	DRw53
LEBORGNE	DR4	PC 191	DRw53
SEVI 157	DR4 (DR7, DR9)	PC-106	DQw1
TORP 942	DR4, DR5 (DQw2)	M-27-B	DQw1
VR 550746	DR4, DR5	PC-122	DQw1
FERDERER	DR5	M-33-B	DQw1
HELB 5870	DR5	4.1. MoAb	DQw5
Cw PPLA 5361	DR5	SEVI-89	DQw2
PC 178	DR5, DQw7 (DR4, DR6)	SEVI 46	DQw2
VR 71200.4	DR5	MP1	DQw2
VR 72605.3	DR5, DR4, DRw8	PC-261	DQw3
VR 62424.1	DRw11	QOO47	DQw3
KERO 5090	DRw6, DR3 (DR5)	PLM 12	DQw3
PETERSON	DRw13 (DR14)	PLM 2	DQw7
VR 65413	DRw13, DR5		

Tabla II. Antisueros anti HLA-DR y DQ utilizados.

y se incubó la mezcla 50 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 µl por pocillo de complemento de conejo y se incubó la mezcla 100 minutos más. Las placas se tñeron con eosina (Merck, Alemania) al 5% (5 µl/pocillo) y se fijaron con 10 µl por pocillo de formol (Merck, Alemania) y se conservaron a 4°C hasta su lectura. Las reacciones positivas (linfocitos rojo oscuro) y negativas (linfocitos refringentes), se determinaron mediante un microscopio invertido con contraste de fase (Nikon, Japón). El tipaje HLA-DR y DQ se dedujo de las especificidades de los antisueros con reacción positiva. Las reacciones se cuantificaron como se indicó anteriormente (apartado 3.1): 8 ó 6 = reacción positiva; 4 = reacción dudosa; 2 ó 1 = reacción negativa; 0 = reacción no valorable.

4. DETERMINACION DE LOS ANTICUERPOS FRENTE AL ISLOTE DE LANGERHANS (Islet Cell Antibodies, ICA).-

La determinación de los anticuerpos frente al islote de Langerhans, (ICA), se realizó mediante una técnica estándar de inmunofluorescencia indirecta²⁰⁵.

4.1. OBTENCION DEL SUBSTRATO.

El substrato utilizado es páncreas humano, obtenido de un donante de riñón grupo 0 para evitar inmunofluorescencia

inespecífica. El páncreas, inmediatamente después de extraído, se troceó en fragmentos de aproximadamente 1 mm³ y se congeló rápidamente en un recipiente que contenía n-isopentano (Fluka, Alemania) enfriado en un baño con acetona (Quimigranel, España) y nieve carbónica. Los fragmentos, una vez congelados, se guardaron en nitrógeno líquido hasta su utilización. Las zonas del páncreas mas adecuadas son el cuerpo y la cola del mismo debido al gran número de islotes existentes.

4.2. CORTE DE LAS PIEZAS DE PANCREAS.

Se extraían las piezas del nitrógeno líquido y se llevaban al criostato (Minotome) donde se efectuaban cortes de 4 µ de grosor, que se transferían a portaobjetos de 8 pocillos de 6 mm de diámetro por simple contacto con el tejido. La pieza de páncreas se adhería a la platina mediante una resina especial (OTC compound).

Para fijar los tejidos de los portaobjetos se secaban durante 30 minutos debajo de una corriente de aire. Una vez fijados, los portaobjetos se guardaban en cajas a -20°C hasta su uso.

4.3. OBTENCION DE MUESTRAS.

La sangre se extrajo al vacío (Sistema Venoject, Terumo, Japón) en tubos de vidrio seco. Se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. El suero se decantó y se fraccionó en alícuotas de 200 µl y 1 ml.

Se congelaron inmediatamente en la fase gaseosa de nitrógeno líquido, manteniéndose a -20°C hasta su utilización.

4.4. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE ICA EN LOS SUEROS PROBLEMA.

Se descongelaron las muestras de suero y se dejó que los portaobjetos con los cortes de páncreas adquirieran la temperatura ambiente antes de su utilización.

Se introdujeron en una cámara húmeda oscura y se situó encima de cada corte 30 ml de suero neto. Se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron luego durante 15 minutos, sin agitación, con PBS (Phosphate Buffered Saline, 0.015 M pH 7.2). Después del lavado, se secó bien el espacio entre los pocillos del portaobjetos, y se incubaron, en cámara húmeda y oscura los tejidos con 30 ml de anti IgG humano obtenido en conejo, conjugado con isotiocinato de fluoresceína (DAKO,

Dinamarca), diluido 1/20 con PBS. Después de 20 minutos, se lavaron durante otros 15 minutos sin agitación, con PBS. Al cabo de esos 15 minutos se dejaron secar y se les añadió 3 gotas de medio de montaje tapándoles con un cubreobjetos. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio de fluorescencia con lámpara halógena (Nikon, Japón).

En aquellos sueros en los que se detectó la presencia de ICA (Fig. 4) se procedió a la titulación de los anticuerpos, haciendo diluciones seriadas (1/2, 1/4...) con PBS, dando como título la última dilución en la que se detectaba la presencia de ICA, expresando el resultado en unidades internacionales JDF.

En cada análisis se incluía un suero control positivo, homologado en el First International Workshop on ICA Standardisation, (Mónaco, 1985).

5. DETECCION DE ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO FRENTE AL ISLOTE DE LANGERHANS (Complement Fixing Islet Cell Antibodies, CF-ICA).

En aquellos sueros en los que se detectaron ICA, se procedió a determinar la presencia de anticuerpos fijadores de complemento.



Figura 4. Anticuerpos antiislotes de Langerhans (ICA) detectados por inmunofluorescencia indirecta en secciones de páncreas humano grupo 0.

Se descongeló una muestra de suero y se dejó que los portaobjetos con la secciones de páncreas alcanzaran la temperatura ambiente.

En una cámara húmeda oscura se incubaron 30 ml del suero problema neto con el páncreas durante 20 minutos. Después de lavar las secciones de tejido con PBS sin agitación durante 15 minutos, se incubaron con 30 ml de suero humano normal, en el que previamente se había confirmado la ausencia de ICA. Esta incubación tiene como objeto suministrar una fuente de complemento. Al cabo de esos 20 minutos, se hace un segundo lavado con PBS sin agitación, durante 15 minutos. Después de secar bien el espacio entre los pocillos, se incubaron las secciones de páncreas con 30 ml de suero anti C3c humano, hecho en conejo y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (DAKO, Dinamarca). La incubación fué de 20 minutos en cámara húmeda y oscura, para después lavar durante 15 minutos con PBS sin agitación. Después se dejaron secar y se añadió en cada portaobjeto 3 gotas de medio de montaje (Diaza bicido atano, Sigma USA, PBS, pH 7.2, gliceral) y se taparon con un cubreobjetos. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio de fluorescencia con lámpara halógena (Nikon, Japón).

En aquellos sueros en los que se detectó la presencia de CF-ICA (Fig. 5), se procedió a la titulación de los anticuerpos haciendo diluciones seriadas (1/2, 1/4, etc...) con

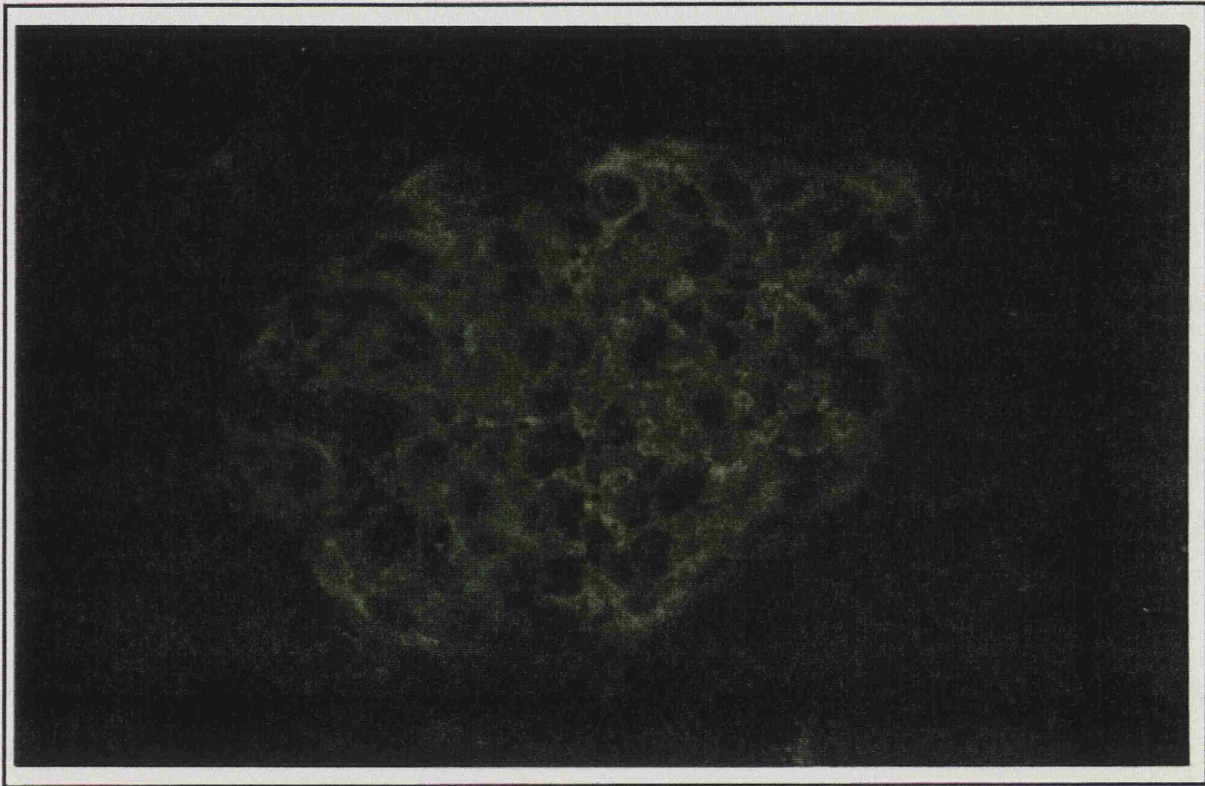


Figura 5. Anticuerpos antiislotes de Langerhans fijadores de complemento (CF-ICA) detectados por inmunofluorescencia indirecta en secciones de páncreas humano grupo 0.

PBS, dando como título la última dilución en la que se detectó la presencia de CF-ICA, expresando el resultado en unidades internacionales JDF.

En cada análisis se incluía un suero control positivo, homologado en First International Workshop on ICA Standardisation (Mónaco, 1985).

6. ANTICUERPOS ANTIINSULINA.-

Los anticuerpos antiinsulina (AAI) se determinaron mediante el empleo de un método microELISA. Se incubaron a 40°C durante 18 horas 0.1 µg de insulina humana altamente purificada (Novo Industries) diluidos en 100 µl de tampón carbonato-bicarbonato 0.05 M pH 9.6. La placa fué lavada 3 veces con tampón PBS 0.15 M- Tween 20 0.1% y dejada vacía. Los pocillos fueron rellenados con muestras duplicadas de 200 µl de suero diluido 1:50 en tampón PBS-Tween 20 5%-caseína 1%, e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados de nuevo, rellenados con 100 µl de conjugado de peroxidasa-anti IgG humana diluido 1:2000 en tampón PBS-Tween 5%-caseína 1% y dejados durante 1 hora más a temperatura ambiente.

El sustrato fué preparado colocando 34 mg de o-fenilendiamina en una botella de cristal y añadiendo 100 ml de tampón citrato-fosfato 0.15 M pH 5.0, seguidos por 100 µl de

peróxido de hidrógeno al 30% (peso/volumen). La placa fué vaciada y bajo luz tenue se añadieron 100 µl de sustrato. La placa fué incubada en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente y la reacción fué detenida por la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 4 M a cada pocillo. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de placas a una longitud de onda de 420 nm, tomando como blanco los pocillos no usados rellenos de 200 µl de PBS. El punto de corte fué calculado como el valor medio obtenido a partir de 134 individuos sanos no emparentados + 2 desviaciones estándar.

7. ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS.

Los anticuerpos antitiroideos (antimicrosomales y antitiroglobulina) se realizaron por un método ELISA comercial (Bioscot Ltd, U.K.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pipetearon en los pocillos apropiados 200 µl de muestras estándar, controles y muestras diluidas, y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces, se añadieron 200 µl del conjugado enzimático diluido y se incubaron durante otros 60 minutos a temperatura ambiente. Después de otro ciclo de lavado, se añadieron 200 µl de solución sustrato, se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se detuvo la reacción añadiendo 40 µl de NaOH 2 M. La absorbancia de los pocillos fué leída a 405 nm. Después de dibujar la curva patrón con las

lecturas estándar, se calcularon los valores de las muestras y los controles a partir de la misma.

Para determinar el punto de corte, fueron utilizados sueros de 97 individuos sanos no emparentados.

8. DETERMINACIONES DE GLUCOSA, INSULINA Y PEPTIDO C.-

8.1. DETERMINACION DE GLUCOSA.

La glucosa sérica se determinó por métodos automáticos utilizando un aparato TECHNICON™ modelo SMAC™.

8.2. DETERMINACIONES DE INSULINA Y PEPTIDO C.

Las cuantificaciones de insulina inmuno-reactiva (IRI) y péptido C se han llevado a cabo utilizando técnicas de radioinmunoanálisis (RIA). Estos procedimientos basados en los descubrimientos de Berson y Yalow²⁸⁴ se fundan en la competición del antígeno contenido en el suero o antígeno frío y otro marcado, habitualmente con I¹²⁵, o antígeno caliente que se utiliza como trazador, por los lugares activos del anticuerpo obtenido previamente frente a la hormona objeto de la determinación.

8.2.1. INSULINA.

En el RIA utilizado en la cuantificación de IRI se empleó anticuerpo obtenido en cobaya frente a insulina porcina. En la determinación de la curva estándar se utilizaron sueros porcinos que se calibraron frente a la unidad WHO 66/304 de insulina humana.

Como medio de separación de las fracciones libres y ligadas al anticuerpo se empleó polietilenglicol.

La sensibilidad del método se estima en 5 μ U/ml y cumple todas las especificaciones de la Comisión de Control de Calidad de la Sociedad Europea de Bioquímica Clínica (SEBC).

8.2.2. PEPTIDO C.

En el RIA utilizado en la cuantificación del péptido C se ha empleado anticuerpo obtenido en cabra frente a péptido C humano, como han sido también humanos los sueros valorados que se han procesado en la determinación de la curva estándar en la que se valoran los sueros desconocidos por interpolación.

Para separar las fracciones hormonales libres y ligadas al anticuerpo se ha usado polietilenglicol 20%.

La sensibilidad del método se ha estimado en 0,3 ng/ml con un 95% de certeza.

La técnica fue evaluada previamente según los criterios de la Comisión de Control de Calidad de la SEBC.

9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.-

Los datos se procesaron en un ordenador IBM PS/2 modelo 50 Z. El análisis estadístico se realizó con el paquete de programas estadístico BMDP (Statistical Software).

9.1. DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES.

- * Variables cuantitativas: Se presentan como media \pm desviación estándar ($m \pm DE$).
- * Variables cualitativas: Se presentan en forma de porcentajes (%).

9.2. COMPARACIÓN DE LAS POBLACIONES DOS A DOS.

- * Variables cuantitativas: Se utilizó el test de la t-Student como test paramétrico y la U de Man-Whitney como test no paramétrico.

- * Variables cualitativas: Se aplicó el test de la Chi-cuadrado (χ^2), la χ^2 usando la corrección de Yates, o el test de Fisher, según las condiciones de los datos.

9.3. DENTRO DE CADA POBLACION.

- * Correlación entre variables cuantitativas: Se usó el coeficiente de correlación de Pearson como paramétrico y la correlación de Spearman como no paramétrico.
- * Las relaciones entre las variables cualitativas: Se hizo con la χ^2 , χ^2 con corrección de Yates ó el test de Fisher según las condiciones de los datos.

9.4. ESTUDIO DE LA CURVA DE GLUCOSA, INSULINA Y PEPTIDO C.

Se valoró como respuesta a la sobrecarga oral de glucosa el área bajo la curva, calculando dicha área como la suma de las áreas de los trapecios (aproximación de Simpson).

9.5. TRANSMISION PREFERENCIAL.

Se ha utilizado el test de Chi-cuadrado (2x2) y un test de comparación de proporciones a través de la aproximación normal Z (una observada, una teórica).

IV. RESULTADOS

1. POBLACION GENERAL.-

La población general está constituida por 260 sujetos, de los cuales 54 (20,8%) son propósitos con DMID, a través de quienes se ha seleccionado esta población, 108 (41,5%) padres (99 sanos, 6 con intolerancia a la sobrecarga oral de glucosa y 3 con diabetes mellitus tipo II) y 98 (37,7%) hermanos (93 de ellos sanos y 5 con DMID). En total 192 (73,8%) eran "sanos", 6 (2,3%) con intolerancia a la sobrecarga oral de glucosa y 62 con diabetes mellitus (59 con DMID y 3 con diabetes mellitus tipo II).

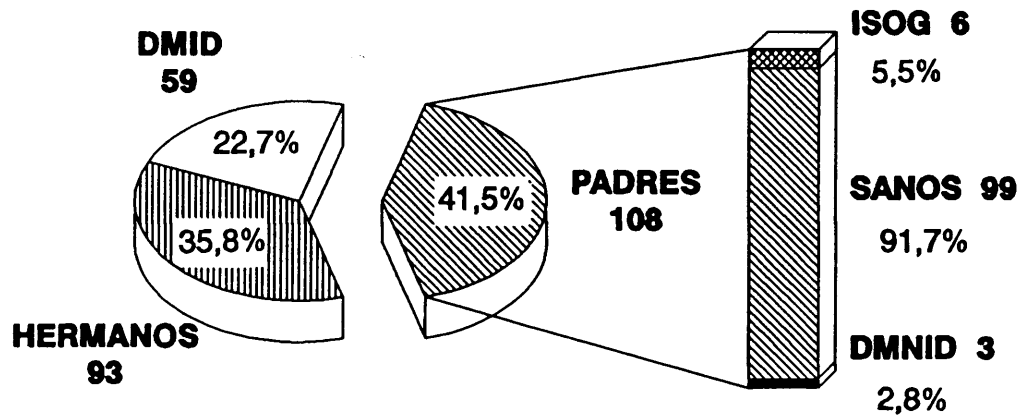
La edad media fué de 23,14 años con una desviación estándar de 14,95 años.

En cuanto al sexo, 130 (50%) eran varones y 130 (50%) mujeres (Fig. 6).

Cuatro familias (7,4%) eran múltiples.

En 84 casos (32,3%) se detectó HLA-DR3; 77 (29,6%) HLA-DR4; 51 (19,6%) HLA-DR3, DR4 y en 48 sujetos (18,5%) HLA no DR3 no DR4. Por tanto el 81,5% de los sujetos tenían HLA-DR3 y/o DR4.

Los alelos HLA-DR3 y/o DR4 fueron mas frecuentes en los pacientes con DMID que en sus parientes de primer grado no diabéticos, $p < 0,0001$ (Fig. 7).



	Población general	DMID	Hermanos sanos	Padres sanos
Número	200	59	93	99
Edad media \pm DE (años)	23,14 \pm 14,95	11,25 \pm 3,96	11,91 \pm 7,26	36,76 \pm 6,45
Sexo: varones (%)	130 (50)	33 (55,9)	43 (46,2)	50 (50,5)
mujeres (%)	130 (50)	26 (44,1)	50 (53,8)	49 (49,5)

Figura 6. Características generales de la población seleccionada.

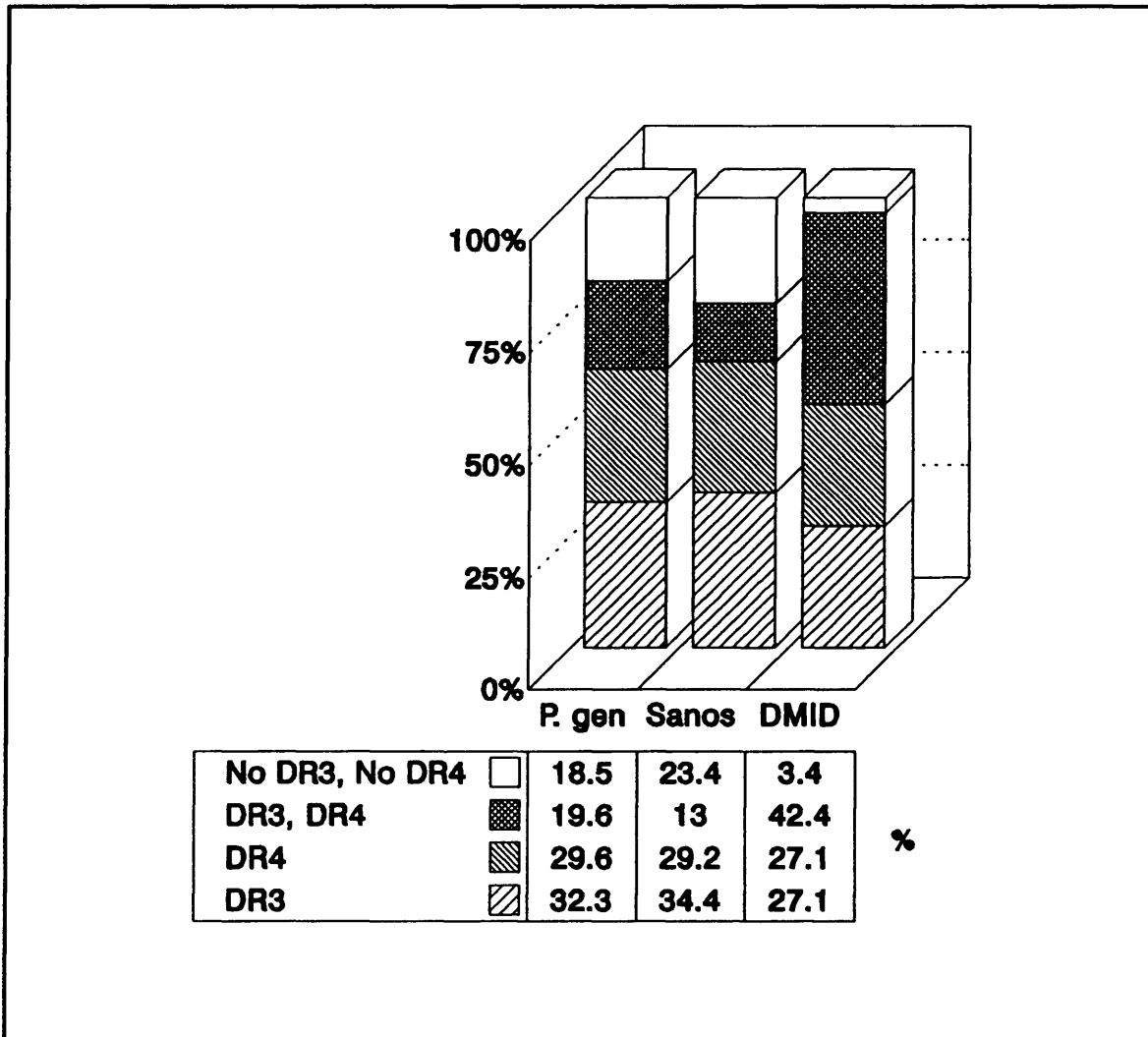


Figura 7. Distribución de los alelos HLA en las diferentes poblaciones. El porcentaje de pacientes con DMID portadores de los alelos HLA-DR3 y/o DR4 fue superior al de sus familiares sanos ($p < 0.0001$).

Los ICA fueron detectados en 26 (10,1%) de los individuos en la primera muestra, mientras que solo 10 de ellos (38,46%) fueron CF-ICA positivos. Además dos casos que inicialmente eran ICA negativos se positivizaron transitoriamente a títulos bajos (5 unidades JDF) con posterior negativización.

De los 26 casos con ICA positivos, 16 (61,5%) lo eran a título medio (20-40 unidades JDF), 6 (23,1%) a título alto (80 o más unidades JDF) y 4 (15,4%) a título bajo (5-10 unidades JDF).

Los ICA y CF-ICA se encontraron con mayor frecuencia en los sujetos con DMID que en sus parientes de primer grado no diabéticos, $p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente, (Fig. 8).

Se encontró asociación entre la presencia de valores de ICA iguales o mayores a 20 unidades JDF y la positividad de los CF-ICA ($p < 0,001$).

Solo 4 individuos (2,02%) poseían anticuerpos antiinsulina positivos y todos ellos tenían el test de la sobrecarga oral de glucosa normal. Tres eran progenitores (2 madres y 1 padre) y uno era una hermana con ICA positivos simultáneamente. Dos de los sujetos con AAI positivos pertenecían a una misma familia y otro de ellos a una familia múltiple.

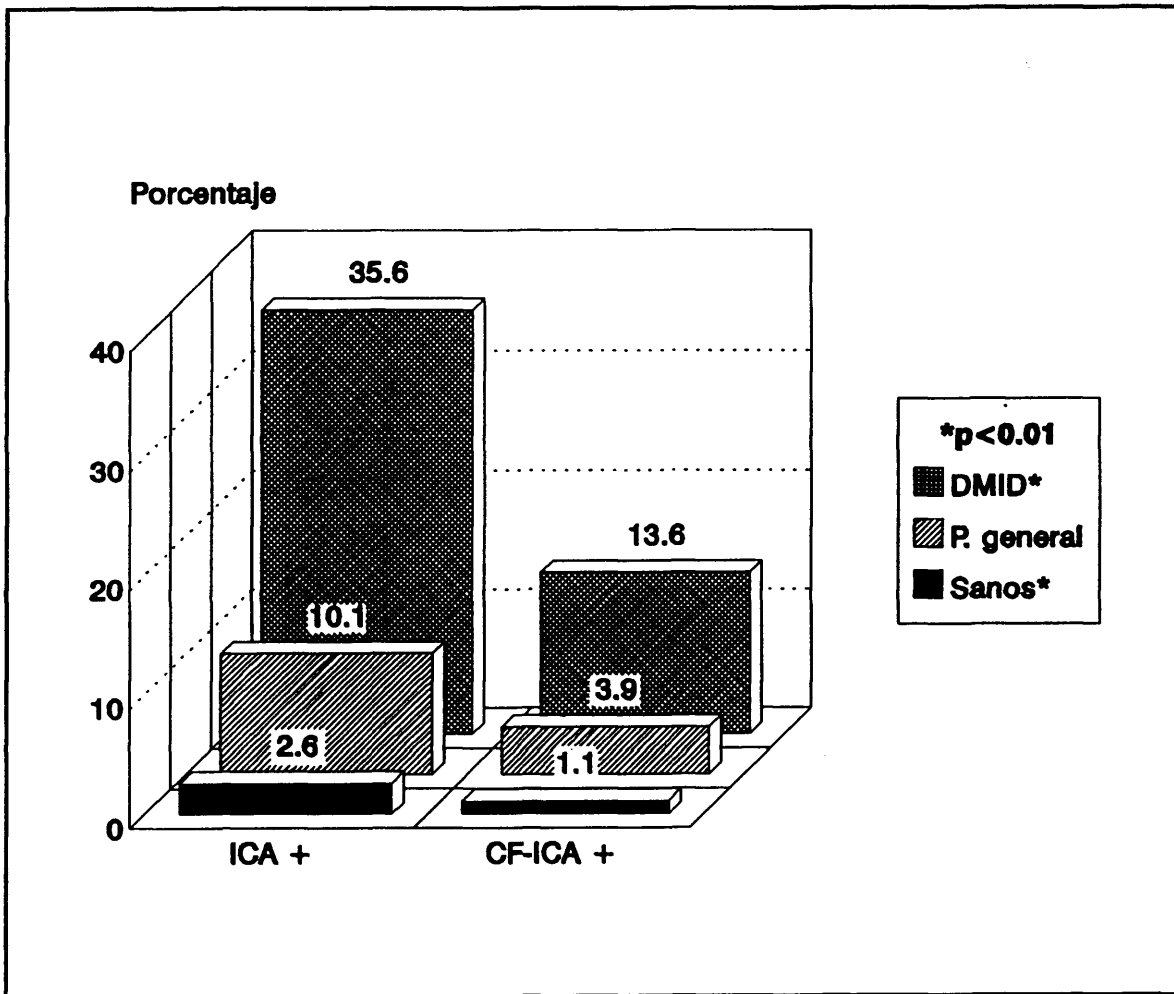


Figura 8. Prevalencia de anticuerpos anticélulas de los islotes de Langerhans (ICA) y de ICA fijadores de complemento (CF-ICA) en las diferentes poblaciones.

Se detectaron anticuerpos antitiroideos en 36 sujetos (15,9%), 31 (13,7%) eran antimicrosomales positivos y 12 (5,3%) antitiroglobulina, con predominio en mujeres con respecto a hombres (22,4% versus 9%) $p < 0,01$ (Fig. 9).

No se encontró diferencia significativa en la prevalencia de los anticuerpos antitiroideos entre los pacientes con DMID y sus familiares de primer grado no diabéticos, si bien, fueron más frecuentes en los primeros.

2. FAMILIARES DE PRIMER GRADO NO DIABETICOS.-

2.1. DESCRIPCION.

La población no diabética está formada por 198 sujetos, excluyéndose a efectos del análisis estadístico 6 casos que presentaban intolerancia a la sobrecarga oral de glucosa, quedando constituida por 192 sujetos, con una edad media de 25,91 años y una desviación estándar de 15,08 años. De ellos 99 (51,6%) eran padres y 93 (48,4%) hermanos.

La distribución por sexos fué de 93 varones (48,4%) y 99 mujeres (51,6%).

En 66 casos (34,4%) se detectó el alelo HLA-DR3, en 56 (29,2%) HLA-DR4, en 25 (13%) HLA-DR3, DR4 y en 45 (23,4%) otros

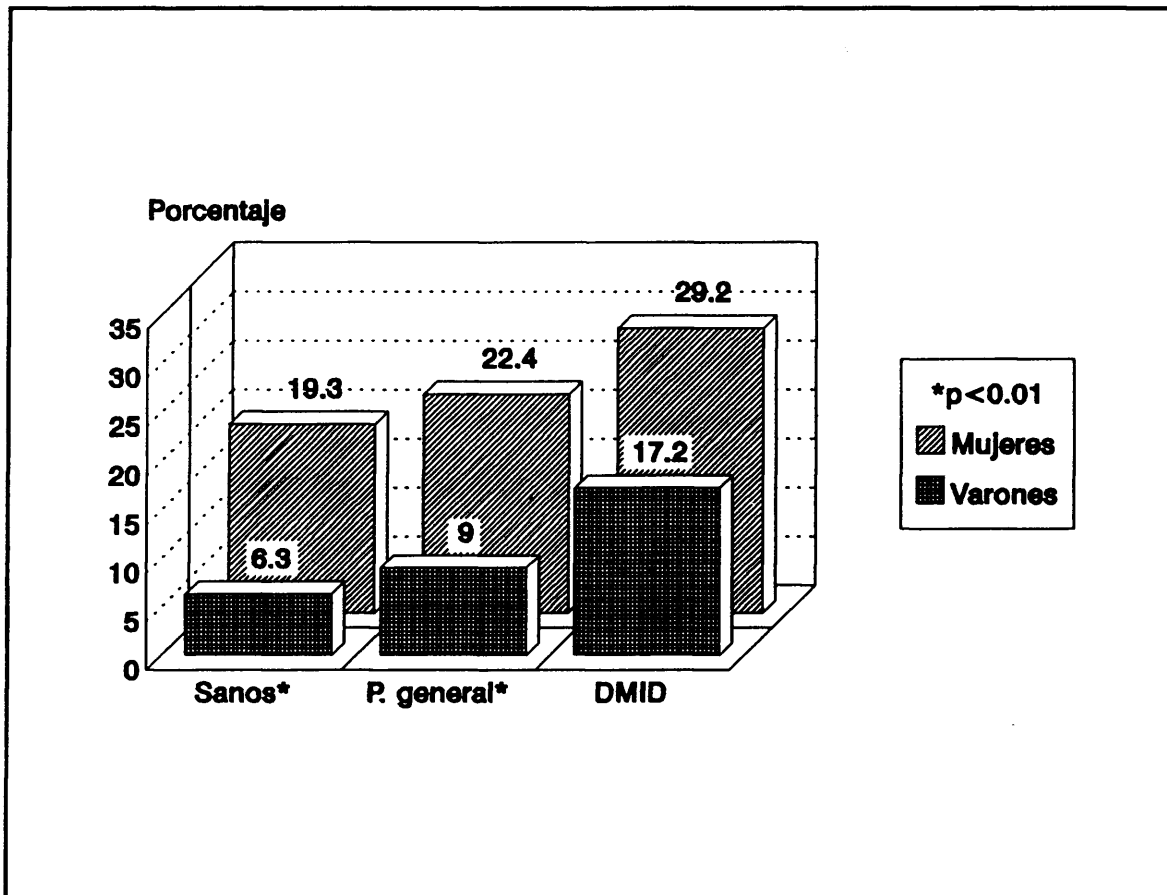


Figura 9. Prevalencia de anticuerpos antitiroideos en las distintas poblaciones. La frecuencia de anticuerpos antitiroideos fue mayor en mujeres que en varones (población general y familiares sanos $p<0.01$; DMID $p=0.31$).

alelos distintos a HLA-DR3 ó DR4. El 76,6% fué HLA-DR3 y/o DR4 (Fig. 7).

Los ICA fueron positivos en 5 casos (2,6%) (Fig. 8). Todos eran hermanos de los propósitos con una edad media de 10,40 ± 3,84 años, y de ellos 4 eran mujeres y 1 varon. Ninguno pertenecía a familias múltiples. El 80% (4 casos) fué HLA-DR3, DR4 y el 20% (1 caso) HLA-DR4. No hubo ningún caso con ICA positivo que no fuese HLA-DR3 y/o DR4. De los 5 sujetos, 3 (60%) fueron ICA positivo a título medio, 1 (20%) a título bajo y 1 (20%) a título alto. Sólo uno (20%) fué simultáneamente AAI positivo, coexistiendo con anticuerpos antimicrosomales también positivos y 2 (40%) tenían también anticuerpos antimicrosomales positivos. Los 3 casos eran portadores de HLA-DR3, DR4.

Dos casos (1,1%) fueron CF-ICA positivos (Fig. 8).

Los AAI fueron positivos en 4 casos (2,1%), de ellos 3 fueron progenitores y 1 hermano que además fué ICA positivo. Los 4 casos son HLA-DR3 y/o DR4 (1 DR3, 2 DR4 y 1 DR3,DR4). Ninguno de los hermanos ICA negativo fué AAI positivo. Dos sujetos con AAI tuvieron simultáneamente anticuerpos antitiroideos positivos (1 antimicrosomales y 1 antitiroglobulina).

Los anticuerpos antitiroideos fueron positivos en 22 casos (13,2%), 20 (12%) eran antimicrosomales positivos y 7 (4,2%) antitiroglobulina.

2.2. CORRELACIONES DENTRO DE LA POBLACION NO DIABETICA.

Los sujetos sanos con ICA positivos tienen menor edad que los ICA negativos ($10,40 \pm 3,84$ y $26,29 \pm 15,04$ años respectivamente) $p= 0,0001$.

La edad de los sujetos con anticuerpos antitiroideos positivos tiende a ser mayor que la de los negativos sin alcanzar el grado de significación.

La prevalencia de anticuerpos antitiroideos está aumentada en los familiares de primer grado no diabéticos del sexo femenino con respecto al masculino (19,3% versus 6,3%) $p < 0,01$ (Fig. 9). Si consideramos por separado los distintos tipos de anticuerpos, vemos que, dicha significación se mantenía con respecto a los anticuerpos antimicrosomales ($p < 0,01$), mientras que, aunque existía un predominio de anticuerpos antitiroglobulina en el sexo femenino, no alcanzaba el grado de significación.

No se encontró relación significativa entre la positividad de los ICA y la de los AAI ni anticuerpos antitiroideos.

Tampoco existió relación entre la positividad de los AAI y la de los anticuerpos antitiroideos, ni entre el tipo HLA (DR3 y/o DR4 versus no DR3 no DR4) y la positividad de los ICA, AAI o anticuerpos antitiroideos. Sin embargo los 5 sujetos con ICA positivos y los 4 con AAI positivos eran HLA-DR3 y/o DR4.

2.3. FUNCION PANCREATICA.

La glucemia basal y los promedios de glucosa en los distintos puntos de la curva en el TTOG fueron más elevados en la población no diabética con ICA positivos que en la ICA negativos, llegando a ser estadísticamente significativo para la glucemia basal ($88 \pm 10,98$ mg/dl versus $76,99 \pm 8,68$ mg/dl) $p=0,0137$ (Fig. 10). Resultados similares obtenemos si comparamos estos parametros entre la población de hermanos no diabéticos con ICA positivos con los hermanos no diabéticos ICA negativos, encontrando valores de glucemia basal y a los 90 minutos de la sobrecarga oral de glucosa significativamente más elevados en los hermanos no diabéticos con ICA positivos ($88 \pm 10,98$ mg/dl versus $75,50 \pm 8,44$ mg/dl y $134,50 \pm 45,34$ mg/dl versus $100,94 \pm 26,89$ mg/dl) $p=0,0055$ y $0,0209$ respectivamente (Fig. 11).

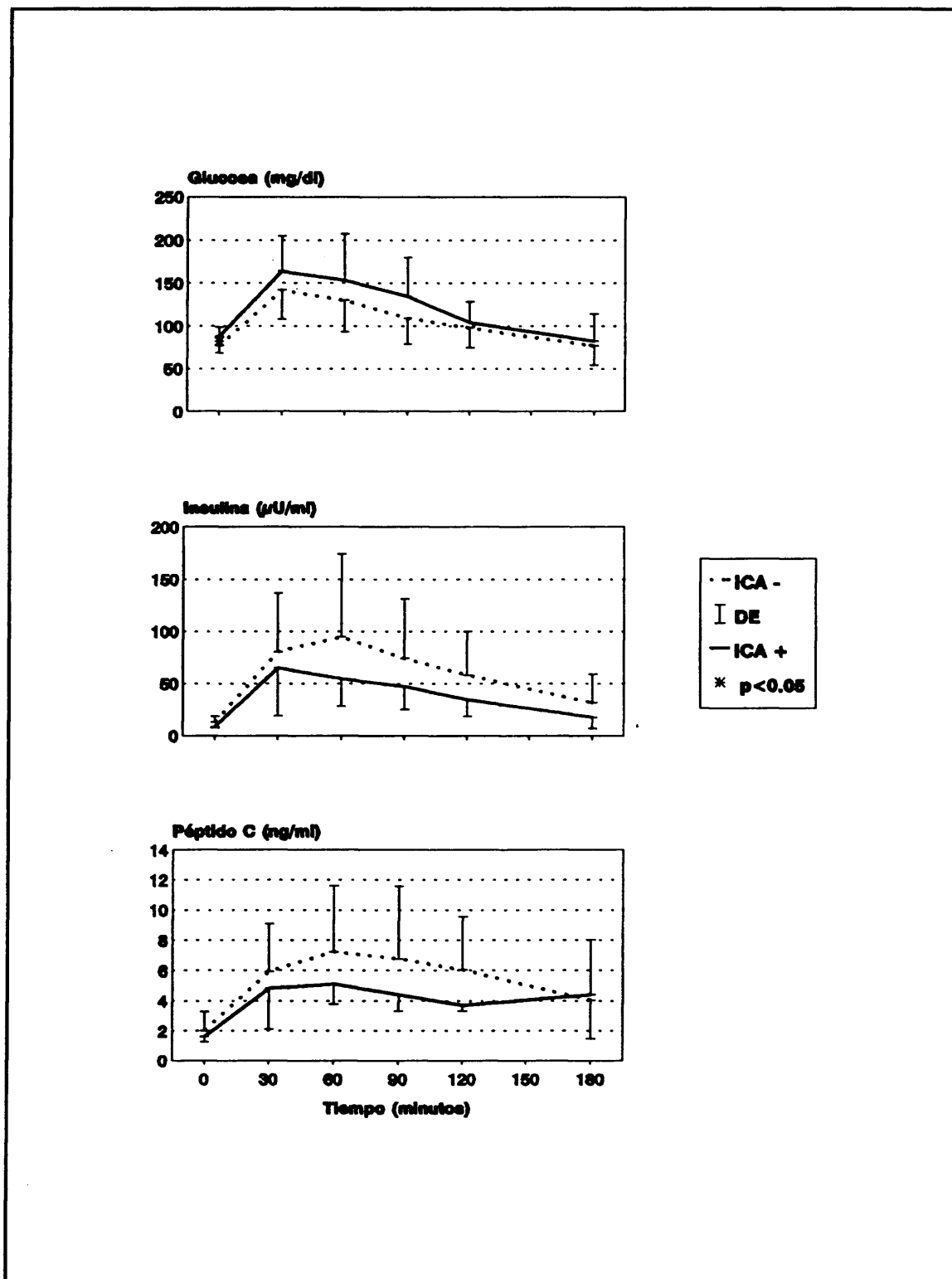


Figura 10. Promedios (\pm desviación estándar) de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de familiares de primer grado no diabéticos.

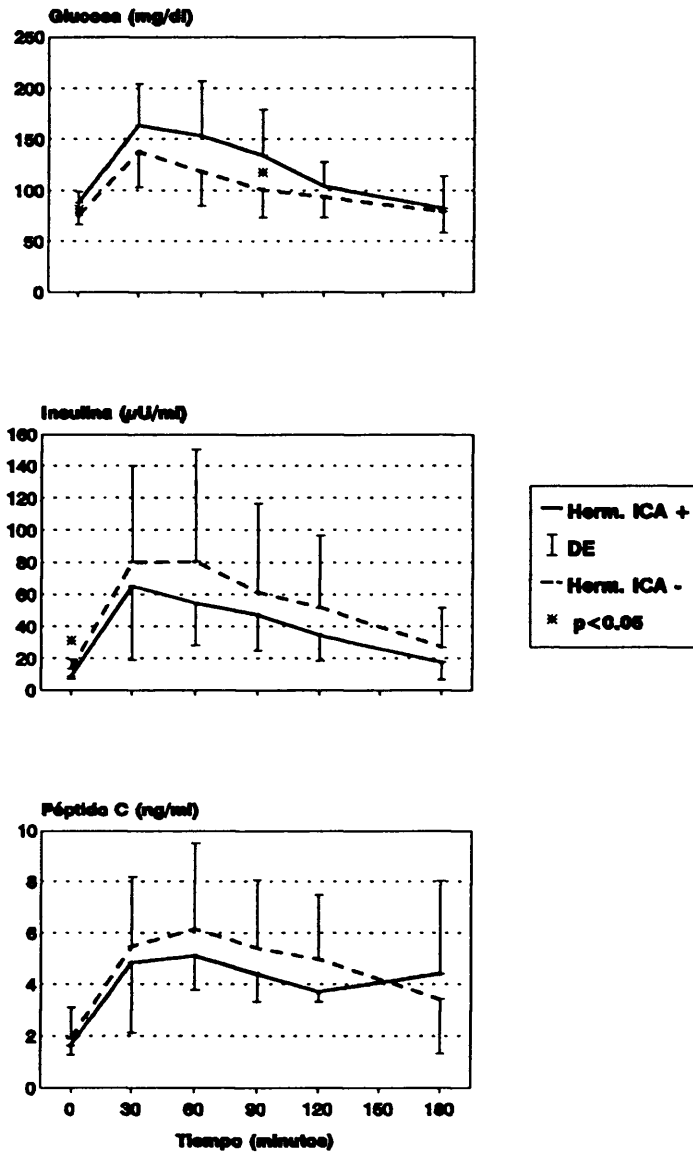


Figura 11. Promedios (\pm desviación estándar) de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de hermanos no diabéticos.

Los valores de insulinemia y péptido C basal, y los promedios de insulina y péptido C en los distintos puntos de la curva fueron más bajos en la población no diabética con ICA positivos con respecto a la población no diabética con ICA negativos (a excepción del péptido C a los 180 minutos) sin llegar al nivel de significación (Fig. 10).

Sin embargo al comparar la insulinemia basal de los hermanos no diabéticos con ICA positivos con los hermanos no diabéticos ICA negativos se alcanza la significación estadística ($8,52 \pm 1,21 \mu\text{U/ml}$ versus $13,43 \pm 6,04 \mu\text{U/ml}$) $p= 0,0001$ (Fig. 11).

No existe diferencia significativa cuando se compara la población de sujetos no diabéticos con ICA negativos e ICA positivos entre el área bajo la curva de glucosa ($5449,99 \pm 3277,08$ versus $6210 \pm 3177,52$), área bajo la curva de insulina ($8809,36 \pm 6084,52$ versus $5669,62 \pm 2362,99$) y área bajo la curva del péptido C ($657,83 \pm 411,12$ versus $459,37 \pm 181,37$). Sin embargo, existe una tendencia a presentar valores más elevados del área bajo la curva de glucosa y más bajos del área bajo la curva de insulina y péptido C en la población no diabética con ICA positivos (Fig. 12).

Existe diferencia significativa entre los niveles de glucemia basal y áreas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C entre la población no diabética de padres y la

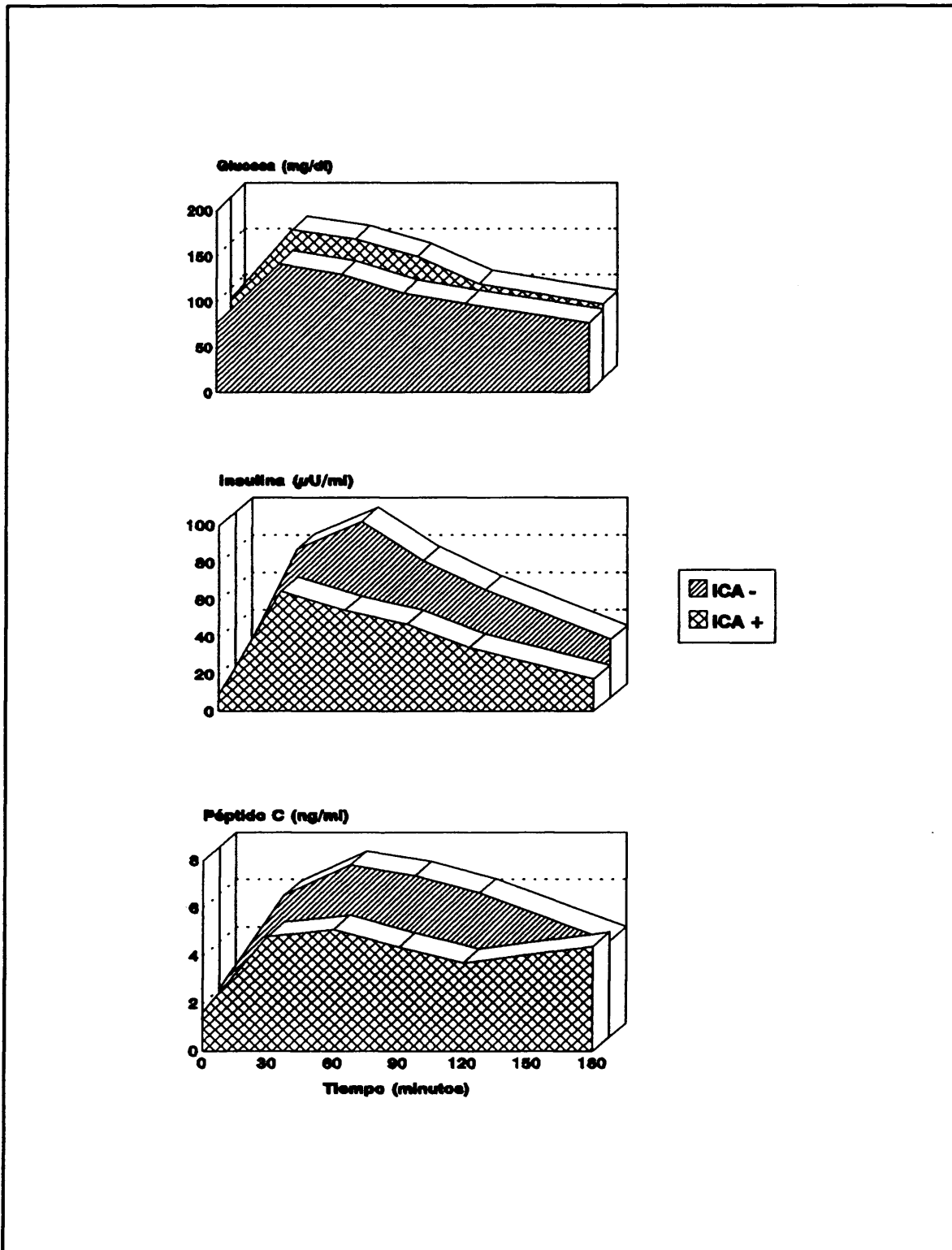


Figura 12. Areas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de familiares de primer grado no diabéticos ICA + e ICA -.

población no diabética de hermanos con ICA negativos. De tal forma que la población no diabética de padres tiene cifras de glucemia basal, área bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C más elevadas que la de hermanos con ICA negativos ($78,31 \pm 8,75$ mg/dl versus $75,5 \pm 8,44$ mg/dl) $p= 0,0370$, ($6036,53 \pm 3383,26$ versus $4870,44 \pm 3053,79$) $p= 0,0221$, ($10052,48 \pm 5919,82$ versus $7513,52 \pm 6024,35$) $p= 0,0084$ y ($790,40 \pm 471,59$ versus $526,69 \pm 280,46$) $p < 0,0001$ respectivamente (Fig. 13).

Sin embargo, si comparamos la población de hermanos no diabéticos con ICA positivos con la de padres encontramos que los niveles de glucemia basal son más elevados ($88 \pm 10,98$ mg/dl versus $78,31 \pm 8,75$ mg/dl respectivamente) y la insulinemia basal ($8,52 \pm 1,21$ μ U/ml versus $12,88 \pm 4,74$ μ U/ml respectivamente) y péptido C ($1,62 \pm 0,35$ ng/ml versus $2,16 \pm 1,27$ ng/ml) más bajos en los hermanos no diabéticos con ICA positivos, estando en el límite de la significación estadística las dos primeras determinaciones. Del mismo modo, los valores del área bajo la curva de glucosa fueron mayores y los del área bajo la curva de insulina y péptido C menores en la población no diabética de hermanos con ICA positivos que en la de padres, estando próximo a la significación estadística en ésta última determinación (Fig. 13).

Cuando comparamos los hermanos no diabéticos con ICA positivos con sus propios hermanos (correspondientes a las mismas familias) con ICA negativos encontramos que la insulinemia basal

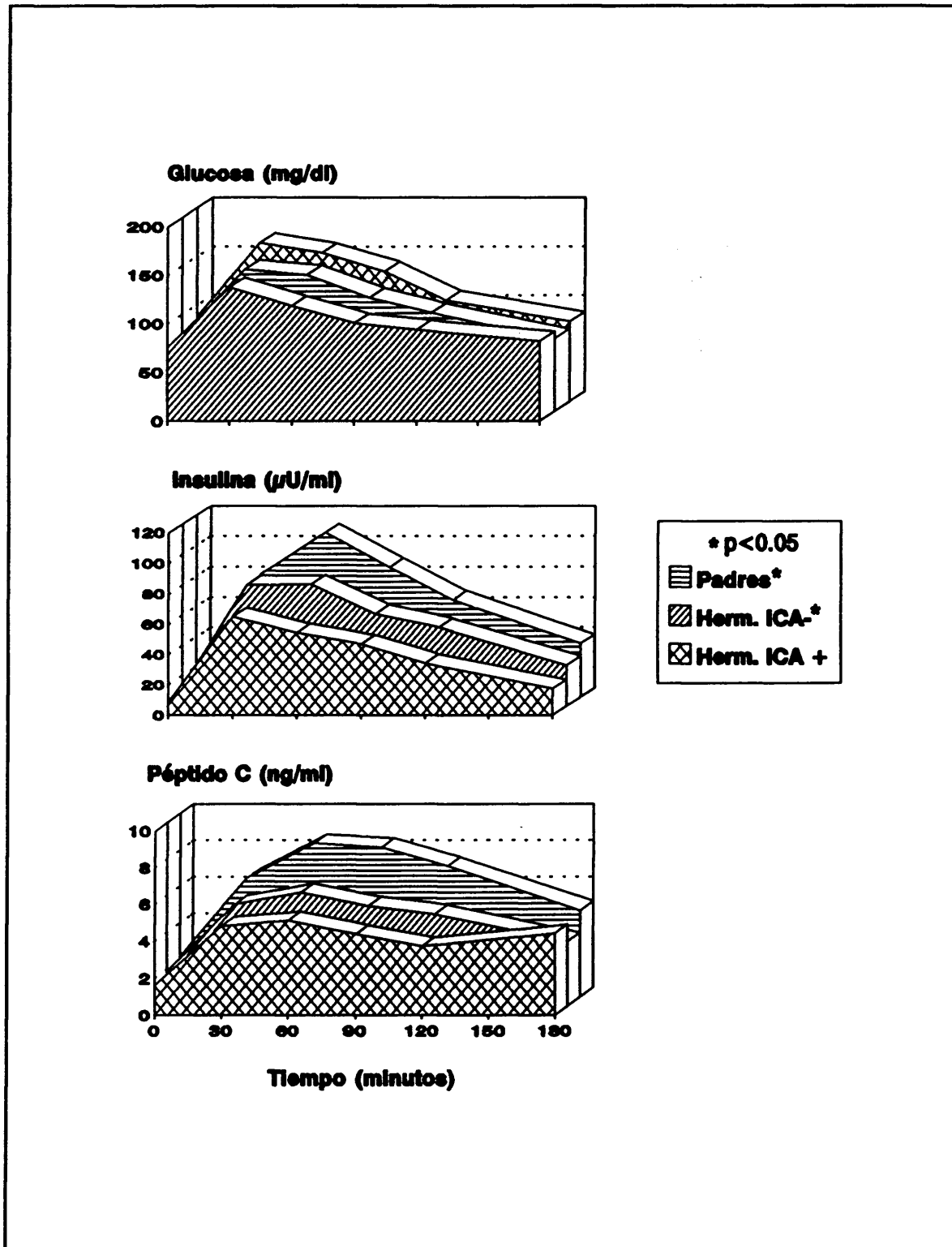


Figura 13. Areas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de familiares de primer grado no diabéticos.

($p= 0,0104$) y el péptido C a los 60 minutos ($p= 0,0325$) y 120 minutos ($p= 0,0367$) estaban significativamente más bajos en los primeros, mientras que las áreas bajo la curva de insulina y péptido C, aunque eran menores en los hermanos no diabéticos con ICA positivos, no llegaban al nivel de significación (Fig. 14 y Fig. 15).

No se encontró diferencia significativa entre la glucemia, insulina y péptido C basal ni entre las áreas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C con respecto a la positividad o negatividad de los AAI.

No se encontró diferencia significativa entre los distintos tipos HLA y la glucemia, insulina y péptido C basal ni con las áreas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C. Sin embargo dentro de la población no diabética, los hermanos con ICA negativos, de los propósitos con DMID, portadores de HLA-DR3 tienen niveles de insulinemia basal más elevados que los que poseen HLA-DR3, DR4 ($15,30 \pm 4,56 \mu\text{U/ml}$ versus $11,23 \pm 5,20 \mu\text{U/ml}$) $p=0,0267$.

2.4. PROGRESION A DIABETES MELLITUS INSULINODEPENDIENTE.

De los 5 sujetos con ICA positivos, dos desarrollaron DMID a lo largo de su seguimiento. Uno era varón y otro mujer, de 15 y 9,9 años de edad respectivamente. Los dos eran HLA-DR3,

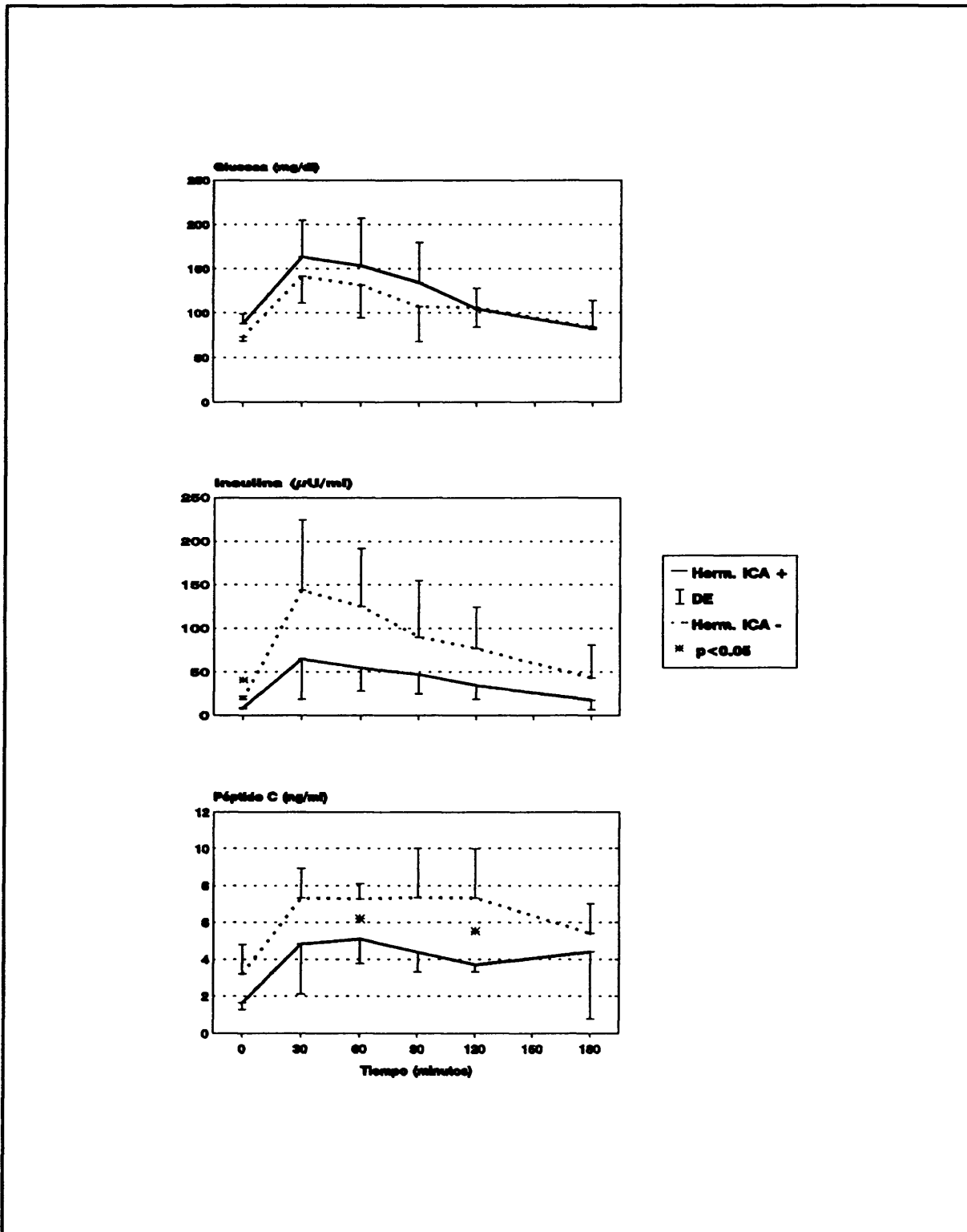


Figura 14. Promedios (\pm desviación estándar) de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de hermanos no diabéticos ICA+ e ICA- (correspondientes a las mismas familias).

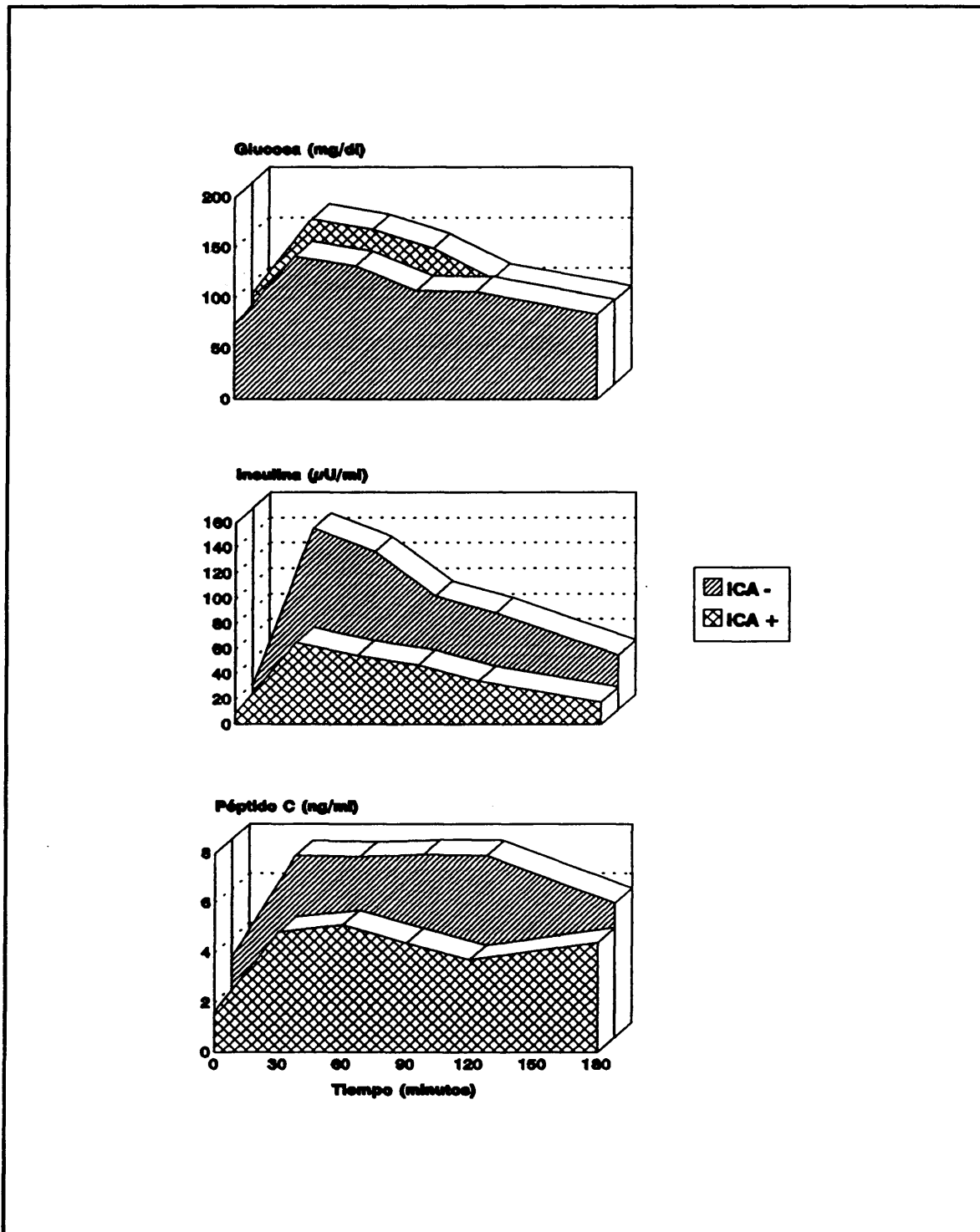


Figura 15. Areas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C en el TTOG de hermanos no diabéticos ICA + e ICA - de pacientes con DMID (correspondientes a las mismas familias).

DR4 al igual que los propósitos. Ambos tenían ICA positivos en la primera determinación a títulos de 40 y >80 unidades JDF y los dos presentaron CF-ICA positivos en la determinación inicial a título de 20 unidades JDF. El varón desarrolló DMID 4 meses después de detectar la positividad de los ICA, negativizándose éstos después de 3 años y 7 meses desde el diagnóstico. La niña desarrolló DMID 1 año y 8 meses después de objetivarse los ICA, negativizándose 1 año y 8 meses tras el diagnóstico.

Los otros tres casos eran del sexo femenino con edades de 5, 9,75 y 13 años respectivamente. Uno de ellos tenía HLA-DR4 y los otros dos HLA-DR3, DR4. Todos respondían normalmente a la sobrecarga oral de glucosa y los ICA fueron positivos a títulos de 40, 10 y 40 unidades JDF respectivamente. Los tres fueron CF-ICA negativos. En uno de los casos se negativizaron los ICA tras 1 año y 10 meses de seguimiento con posterior positivización 4 meses después y desaparición a los 2 años y 3 meses. En otro de los casos, que inicialmente era ICA negativo, se objetivó su aparición 10 meses después. En el tercer caso, los ICA se negativizaron al cabo de 1 año y 4 meses, con posterior aparición a los 7 meses. Los dos últimos casos permanecen positivos tras 3 años y 6 meses, y 1 año y 10 meses de seguimiento desde su última aparición (Fig. 16). Uno de los casos fué AAI positivo inicialmente, negativizándose 10 meses más tarde. Todos ellos permanecen con perfiles glucémicos normales en el momento actual.

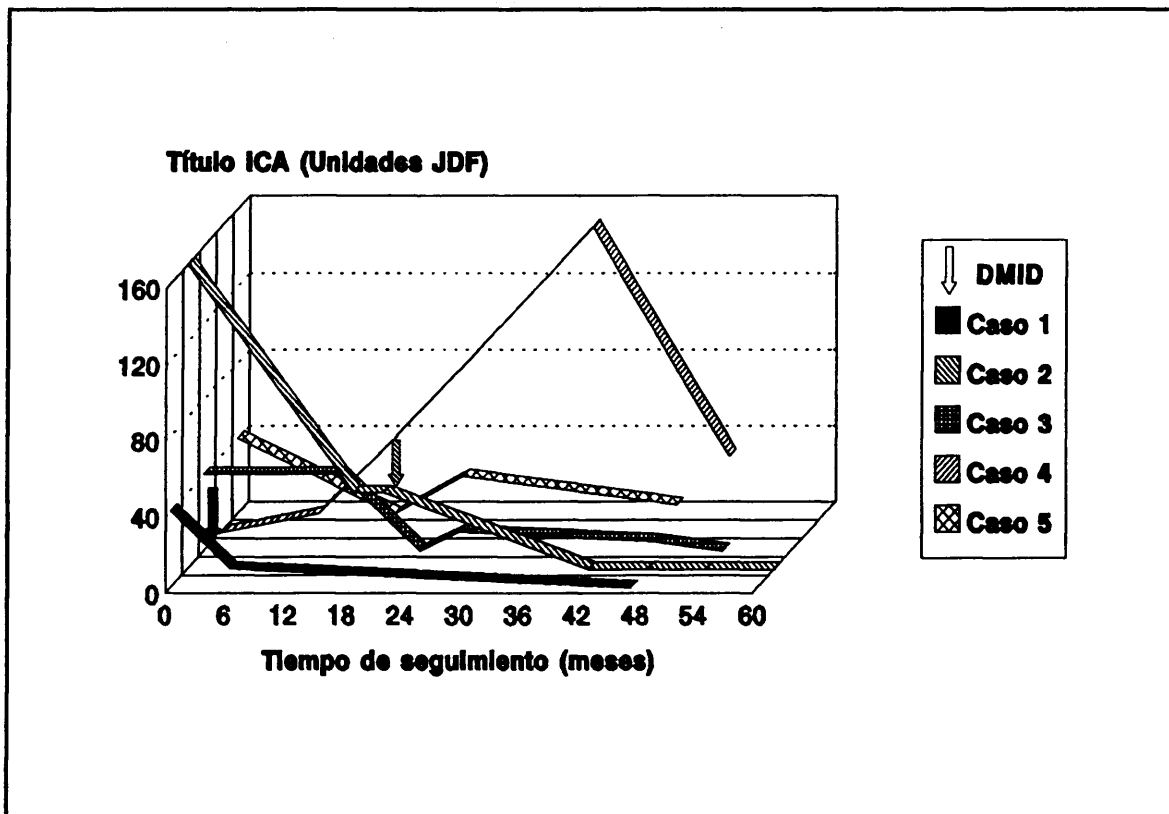


Figura 16. Niveles de anticuerpos anticélula de los islotes (ICA), a lo largo del seguimiento, de 5 niños no diabéticos ICA + (hermanos de propósitos con DMID).

3. POBLACION CON DIABETES MELLITUS INSULINODEPENDIENTE.-

3.1. DESCRIPCION.

La población de sujetos con DMID está constituida por 59 niños, con una edad media de $11,25 \pm 3,98$ años (Fig. 6).

El tiempo medio de evolución de la enfermedad fué de $37,30 \pm 34,05$ meses. 33 (55,9%) eran varones y 26 (44,1%) mujeres.

25 casos (42,4%) tenían HLA-DR3, DR4, 16 (27,1%) eran HLA-DR4, 16 (27,1%) DR3 y 2 (3,4%) no poseían ni HLA-DR3 ni DR4. El 96,6% fué HLA-DR3 y/o DR4 (Fig. 7).

54 (91,5%) eran propósitos y 5 (8,5%) hermanos. No hubo ningún progenitor con DMID.

21 casos (35,6%) eran ICA positivos y 8 (13,6%) CF-ICA positivos (Fig. 8).

Los 8 casos con CF-ICA positivos se correspondían con ICA positivos a títulos iguales o superiores a 20 unidades JDF. Ningún sujeto con DMID y anticuerpos anticélula de los islotes positivos a títulos menores a 20 unidades JDF fué CF-ICA positivo.

De los 18 sujetos con DMID con un tiempo de evolución de la enfermedad igual o menor de 12 meses, 12 (66,66%) eran ICA positivos; mientras que de los 41 sujetos con DMID de más de 12 meses de evolución de la enfermedad sólo 9 (21,95%) eran ICA positivos (Fig. 17).

Sólo un sujeto fué ICA positivo tras un tiempo de evolución de la enfermedad superior a 60 meses y sólo uno fué CF-ICA positivo tras un tiempo de evolución mayor de 24 meses.

Los 21 casos con ICA positivos tenían HLA-DR3 y/o DR4 (11 eran DR3, DR4, 5 DR3 y otros 5 DR4).

5 sujetos con ICA positivos tenían simultáneamente anticuerpos antitiroideos positivos (antimicrosomales y/o antitiroglobulina). De ellos, 4 pacientes con ICA positivos tenían simultáneamente anticuerpos antimicrosomales positivos y 2 antitiroglobulina.

12 sujetos con DMID (22,6%) tenían anticuerpos antitiroideos positivos (antimicrosomales y/o antitiroglobulina), 10 casos (18,9%) eran antimicrosomales positivos y 4 (7,5%) antitiroglobulina.

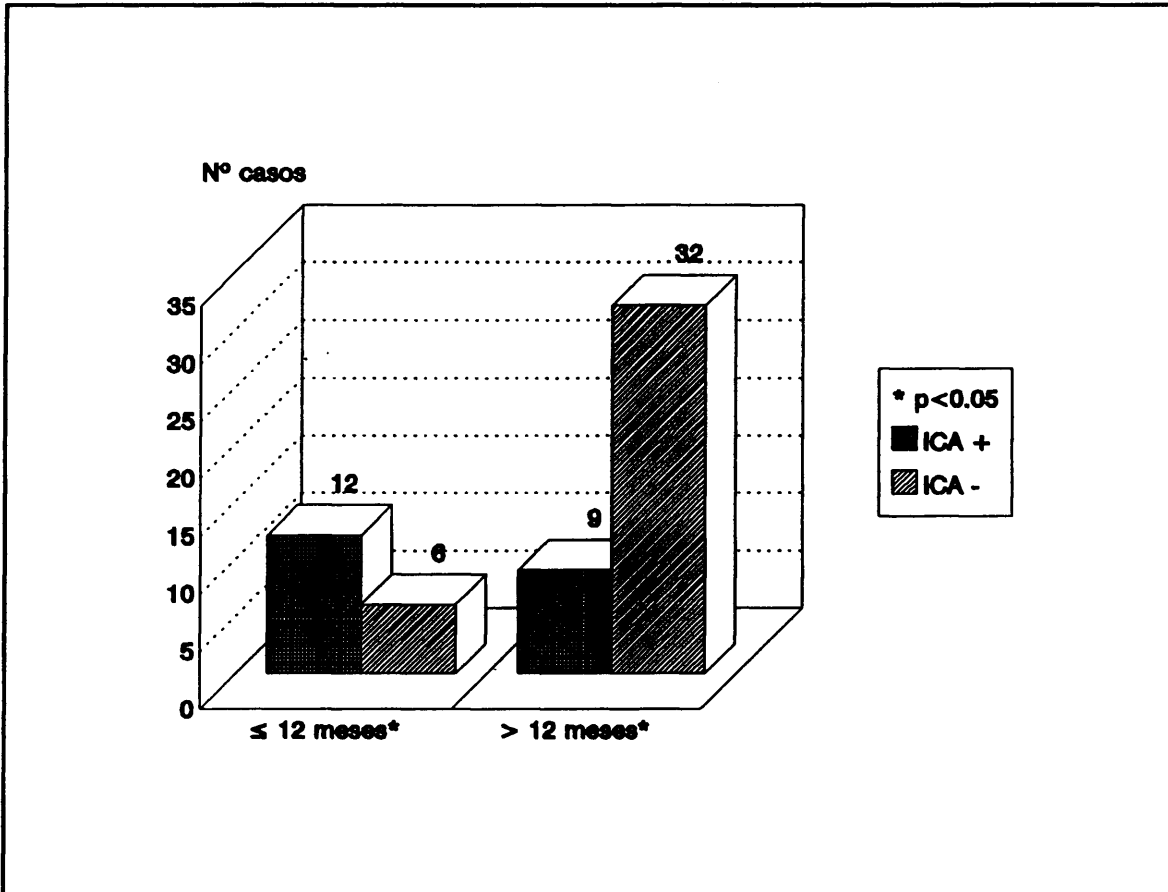


Figura 17. Prevalencia de anticuerpos anticélulas de los islotes de Langerhans (ICA) según el tiempo de evolución de la DMID.

3.2. CORRELACIONES DENTRO DE LA POBLACION CON DMID.

Existe una correlación significativa entre el tiempo de evolución de la DMID y la presencia o ausencia de ICA ($p=0,0002$). De tal forma que los pacientes con DMID con ICA positivos tienen menor tiempo de evolución que los ICA negativos ($18,55 \pm 18,32$ meses y $47,17 \pm 36,38$ meses respectivamente).

No se encontró diferencia significativa entre la positividad o negatividad de los ICA y la edad de los sujetos con DMID, ni tampoco entre la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos y la edad de los pacientes con DMID o con el tiempo de evolución de la enfermedad. Tampoco existió relación significativa entre la positividad de los ICA y la positividad de los anticuerpos antitiroideos.

No existió relación entre el tipo HLA y la persistencia de los ICA, ni entre los distintos tipos HLA y el tiempo medio de evolución de los ICA desde el diagnóstico de DMID.

No se encontró relación entre los distintos tipos HLA (DR3 y/o DR4 versus no DR3 no DR4) y la positividad de los ICA, sin embargo todos los sujetos con ICA positivos eran HLA-DR3 y/o DR4.

La prevalencia de anticuerpos antitiroideos, aunque mayor en mujeres que en varones (29,2% versus 17,2%), no fue estadísticamente significativa (Fig. 9).

Existió diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el tipo HLA (DR3 y/o DR4 versus no DR3 no DR4) y la positividad de los anticuerpos antitiroideos. Es decir, los pacientes con DMID y con anticuerpos antitiroideos positivos (antimicrosomales y/o antitiroglobulina) están asociados a HLA no DR3 no DR4, no encontrándose significación cuando consideramos por separado los distintos tipos de anticuerpos antitiroideos. Los dos casos con DMID y anticuerpos antitiroideos positivos eran portadores de HLA-DRw6/DRw52, DQw1.

4. TRANSMISION DE LOS ALELOS DIABETOGENICOS HLA.-

La herencia de los alelos DR3 o DR4 pudo ser analizada en 48 familias. 24 padres y 17 madres tenían uno y sólo un alelo DR3 y 13 padres y 23 madres tenían uno y sólo un alelo DR4.

La transmisión de los alelos DR3 (Tabla III) de los padres a los niños diabéticos fue significativamente más alta cuando se comparaba con la esperada del 50% (a versus 50%) o con los descendientes no diabéticos (a versus c). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa cuando se compararon estos últimos con la esperada del 50% (c versus 50%).

	DESCENDIENTES DE PADRES		DESCENDIENTES DE MADRES	
	Varones	Mujeres nº/total (%)	Varones	Mujeres nº/total (%)
DMID	10/12 (83,33)	11/12 (91,66)	8/11 (72,72)	5/7 (71,42)
No DMID	11/20 (55)	12/26 (46,15)	10/17 (58,82)	6/15 (40)
Total	21/32 (65,62)	23/38 (60,52)	18/28 (64,28)	11/22 (50)
		Total		Total
		21/24 (87,5 ^a)		13/18 (72,22 ^b)
		23/46 (50 ^c)		16/32 (50 ^d)
		44/70 (62,85 ^e)		29/50 (58 ^f)

a vs 50% p<0.001
c vs 50% NS
e vs 50% p<0.05
a vs c p<0.005

c+d vs 50% NS
e+f vs 50% p<0.05
c vs d NS
e vs f NS
a vs b NS

b vs 50% NS
d y f vs 50% NS
b vs d NS

Tabla III. Transmisión de los alelos HLA-DR3 de padres y madres a sus descendientes.

La transmisión de los alelos DR3 de las madres a los niños diabéticos fué del 72,22%, no encontrándose diferencia significativa cuando se comparaba con la esperada del 50% (b versus 50%) o con los descendientes no diabéticos (b versus d). Del mismo modo, no se encontró diferencia significativa al comparar los descendientes no diabéticos con la esperada del 50% (d versus 50%).

Los alelos DR3 paternos o maternos no fueron transmitidos preferentemente a los descendientes diabéticos y/o no diabéticos (a versus b, c versus d, e versus f).

La transmisión de los alelos DR4 viene expresada en la Tabla IV. Los niños diabéticos recibieron de sus padres o madres este alelo con una frecuencia más alta que la esperada del 50% (a versus 50%, b versus 50% respectivamente), y también más alta cuando se comparaba con los hermanos no diabéticos (a versus c, b versus d respectivamente), la cual no difería significativamente de la esperada del 50% (c y d versus 50%).

Asimismo, los alelos DR4 paternos o maternos no fueron transmitidos preferentemente a los descendientes diabéticos y/o no diabéticos (a versus b, c versus d, e versus f).

	DESCENDIENTES DE PADRES		HLA-DR4		DESCENDIENTES DE MADRES		HLA-DR4	
	Varones	Mujeres nº/total (%)	Total		Varones	Mujeres nº/total (%)	Total	
DMID	7/7 (100)	5/7 (71,42)	12/14 (85,71 ^a)		14/15 (93,33)	9/9 (100)	23/24 (95,83 ^b)	
No DMID	7/12 (58,33)	6/14 (42,85)	13/26 (50 ^c)		12/22 (54,54)	8/17 (47,05)	20/39 (51,28 ^d)	
Total	14/19 (73,68)	11/21 (52,38)	25/40 (62,5 ^e)		26/37 (70,27)	17/26 (65,38)	43/63 (68,25 ^f)	

a vs 50% p<0.01
c vs 50% NS
e vs 50% NS
a vs c p<0.05

c+d vs 50% NS
e+f vs 50% p<0.001
e vs f NS
c vs d NS
a vs b NS

b vs 50% p<0.001
d vs 50% NS
f vs 50% p<0.01
b vs d p<0.0005

Tabla IV. Transmisión de los alelos HLA-DR4 de padres y madres a sus descendientes.

V. *DISCUSSION*

Es bien conocida la asociación existente entre ciertas enfermedades y determinados alelos o haplotipos del sistema HLA. En el caso de la DMID diversos autores han investigado la asociación con HLA en familias y en la población general^{82,285,286}.

El 96,6% de nuestros pacientes con DMID expresan los alelos de histocompatibilidad DR3 y/o DR4 mientras que sus familiares de primer grado no diabéticos lo expresan en el 76,6% de los casos. Porcentajes similares son descritos por otros autores^{46,83}. Así el 95% de los diabéticos tipo I son portadores de los alelos DR3 y/o DR4^{61,83-85,87} en comparación con el 40-50% de la población general caucasiana.

Como podemos observar, la evidencia indica que HLA-DR3 y DR4 (o genes estrechamente ligados a ellos) están implicados en la susceptibilidad a la DMID.

La base de la asociación entre los antígenos HLA y la DMID es desconocida. Puede ser posible que la presencia de ciertos antígenos HLA hagan a las células de los islotes más susceptibles a la infección viral o más propensas al daño o muerte celular que en presencia de otros antígenos²⁸⁷.

La posesión de ambos antígenos DR3 y DR4 confiere una mayor predisposición genética a la DMID que la posesión de uno solo de ellos⁹⁰.

La presencia de los alelos DR3 o DR4 confiere un riesgo de padecer la enfermedad entre tres y cinco veces superior al de la población general, siendo veinte veces en heterocigotos DR3/DR4. Los homocigotos DR3/DR3 o DR4/DR4 no tienen mayor riesgo que los heterocigotos DR3/X o DR4/X^{56.84}.

Aunque la asociación de la DMID con los antígenos HLA-DR3 y DR4 existe⁸³, esto sólo no es suficiente para explicar todo el componente genético de la enfermedad^{102.106.117.118.120.125.288}.

El modo de herencia de esta enfermedad no se ha clarificado y se ha postulado una transmisión preferente de estos alelos hacia su descendencia¹⁴⁴.

Vadheim et al¹⁴⁴. señalan que en familias diabéticas el HLA-DR4 paterno y ambos DR3 paternos y maternos son transmitidos preferentemente a los descendientes con DMID y no diabéticos, proponiendo que los haplotipos que contienen DR3 y DR4 pueden por sí mismos contener ventajas en la fertilización y/o supervivencia del huevo.

Nuestros resultados no apoyan la existencia de una distorsión en la transmisión encontrada por estos autores¹⁴⁴. Los alelos DR3 y DR4 paternos o maternos no fueron transmitidos preferentemente a los descendientes diabéticos y/o no diabéticos.

Los alelos DR3 o DR4 paternos y DR4 maternos están significativamente aumentados en los descendientes con DMID. Sin embargo, el alelo HLA-DR3 materno, aunque fué transmitido a sus descendientes con DMID con mayor frecuencia (72,22%) de la esperada del 50%, no llegó a ser estadísticamente significativa.

Estas conclusiones parecen obvias, asumiendo que DR3 y DR4 son genes diabetogénicos por sí mismo y las familias fueron elegidas por su fenotipo diabético. No obstante, no es habitualmente posible identificar personas de alto riesgo en la población general tipificando HLA-DR, ya que sólo un pequeño porcentaje DR3 o DR4 positivo llegan a ser diabéticos. Esto sugiere que DR3 y DR4 están en desequilibrio de ligamiento con genes diabetogénicos. De otra manera, genes no ligados a HLA y/o factores ambientales podrían ser requeridos para obtener la expresión del fenotipo diabético.

En nuestro estudio, los descendientes no diabéticos de padres y madres DR3 o DR4 recibieron estos alelos con una frecuencia similar a la esperada del 50%.

La frecuencia de los alelos DR podría ser esperada idéntica en padres y madres de niños diabéticos. Sin embargo, DR3 fué más prevalente entre los padres, constituyendo el 50% de los padres y solo el 31,2% de las madres, mientras que esta proporción se invertía en cuanto al sexo de los progenitores

cuando se consideraba DR4, el cual estaba presente en el 27% de los padres y 47,91% de las madres.

En nuestra serie, 24 padres y 17 madres tenían uno y sólo un alelo DR3 y 13 padres y 23 madres tenían uno y sólo un alelo DR4.

La frecuencia de niños que heredaron el alelo DR3 de sus padres fué significativamente más alta que la esperada del 50% ($p < 0,05$), al contrario que los niños que heredaron el alelo DR3 de sus madres, en los cuales no existió diferencia significativa con respecto a la esperada del 50%.

No existió tampoco diferencia significativa entre la herencia de los alelos DR3 derivados de padres y madres.

La frecuencia de niños que heredan el alelo DR4 de sus madres fué significativamente más alta que la esperada del 50% ($p < 0,01$), al contrario que los niños que heredaron el alelo DR4 de sus padres, en los cuales no existió diferencia significativa con respecto a la esperada del 50%.

Tampoco existió diferencia significativa entre la herencia de los alelos DR4 derivados de padres y madres.

La transmisión selectiva de genes a los descendientes había sido descrita en animales y humanos. Los modelos animales,

tal como el del locus Tt en el ratón, demostraron que los haplotipos completos pueden ser transmitidos preferentemente desde padres varones a sus descendientes²⁸⁹.

Diversos autores señalaron una posible distorsión de la transmisión de alelos o haplotipos en familias con DMID. Un aumento en la herencia de HLA-B8 (y presumiblemente DR3) fué señalado en madres y padres con HLA-B8²⁹⁰.

Warram et al¹³⁹. habían sugerido que la herencia de la DMID puede ser influenciada por el sexo de los padres afectados, de tal modo que existe una mayor incidencia de DMID entre los descendientes de hombres con la enfermedad que entre aquellos de mujeres diabéticas.

La explicación para esta observación no es clara. Se ha postulado, que una mayor frecuencia de recombinación entre ligamientos de locus en la mujer que en el hombre, durante la gametogénesis, podría "proteger" a los descendientes de las mujeres diabéticas en el caso de que la susceptibilidad a la DMID sea dependiente de la combinación de varios alelos en la región HLA^{141,142}. Es posible que, los padres diabéticos, puedan transmitir haplotipos de alto riesgo a sus descendientes y las madres diabéticas, haplotipos de bajo riesgo²⁹¹.

Otra posibilidad del efecto "protector" en los niños de madres diabéticas es que el concepto de susceptibilidad puede ser selectivamente perdido a través de la muerte perinatal, fracasos de implantación o abortos espontáneos, tal vez por mecanismos inmunológicos o metabólicos¹³⁹.

La DMID es una enfermedad autoinmune progresiva y en la mayoría de los pacientes con diabetes tipo I recién diagnosticados los ICA están presentes³⁸ y pueden ser detectados años antes del comienzo clínico de la diabetes^{47,50,92,292}. El seguimiento de personas sanas con ICA positivos ha demostrado que muchas de ellas pueden llegar a ser diabéticas^{173,199}. En contraste, en alguno de los casos estos anticuerpos pueden desaparecer.

La prevalencia de ICA en nuestra población con DMID fué del 35,6%, demostrandose una relación significativa entre el tiempo de evolución de la enfermedad y la positividad o negatividad de los ICA ($p < 0,01$). Así, los sujetos con DMID de un año, o menos, de evolución, tienen una prevalencia del 66,66%, descendiendo ésta al 21,95% en aquellos pacientes con un tiempo de evolución de la enfermedad superior a un año.

Estos resultados son concordantes con los de otros autores^{87,164,171,172,293} que encuentran una prevalencia de ICA al comienzo de la DMID tan alta como del 55-85%²⁹⁴⁻²⁹⁶, con disminución gradual a medida que progresa la enfermedad^{171,226,297}.

Notsu et al²⁹⁸. encuentran una prevalencia de ICA en la población japonesa de 0,5%, 0,4% y 32% en adultos no diabéticos, niños escolares normales, y en pacientes con DMID respectivamente. La mayoría de los sujetos con ICA positivos con DMID tenían una corta duración de la enfermedad y ningún paciente con más de diez años desde el comienzo tenía anticuerpos anticélulas de los islotes.

Nuestros pacientes con DMID e ICA positivos tenían un menor tiempo de evolución de la enfermedad que los ICA negativos ($p= 0,0002$).

De nuestros resultados, al igual que de los descritos en la literatura^{293,298-300}, podemos deducir que la prevalencia de ICA depende de la duración de la diabetes.

Los CF-ICA estuvieron presentes en el 13,6% de la población con DMID y en el 1,1% de los familiares de primer grado no diabéticos, porcentaje éste último algo inferior al de Tarn et al²⁰². quienes encontraron un 3,3% de CF-ICA positivos en familiares de primer grado de niños diabéticos y al de Gorsuch et al⁴⁷. (2% en padres y 4% en hermanos) y Spencer et al²⁷⁰. (2,9%). Otros autores como Bottazzo et al¹⁶⁴. evidencian que la mayoría de los pacientes con DMID (77%) tenían ICA-IgG en el momento del diagnóstico y el 20% de éstos persisten después de años de evolución. En cuanto a los CF-ICA, éstos eran positivos

en el 78% de los pacientes con ICA positivos al comienzo de la enfermedad, disminuyendo progresivamente a lo largo del tiempo.

Sólo uno de nuestros pacientes con DMID fué ICA positivo tras un tiempo de evolución de la enfermedad superior a 60 meses y sólo uno persistió con CF-ICA positivo tras un tiempo mayor de 24 meses de duración de la enfermedad.

Se detectó ICA positivos en el 2,6% de los familiares de primer grado no diabéticos, resultados similares a los descritos por Neufeld et al⁸⁷., Winter y McLaren²²¹ y Thivolet et al³⁰¹. Otros estudios confirman este aumento de frecuencia de ICA en los familiares de primer grado, encontrando porcentajes muy diversos que oscilan entre el 0,9-21%^{47.164.173-176.293.302.303} con respecto a la población general^{87.171.172.178.197.204}. Estas variaciones en la prevalencia de ICA, pueden ser explicadas, al menos en parte, por diferencias en la sensibilidad del método utilizado en su detección^{205.207}.

Recientemente Bonifacio et al¹⁹⁸. detectaron ICA en el 3,3% de los familiares en comparación con el 2,2% de los controles. Según Montaña et al¹⁷⁵. la prevalencia de ICA fué similar entre padres (7,99%), hermanos (6,29%) y descendientes (9,86%) y entre varones (9,40%) y mujeres (6,27%).

Diversos estudios muestran que al menos un cuarto de los individuos con ICA positivos inicialmente no diabéticos

desarrollaron DMID a los seis años del reconocimiento inicial. Los ICA pueden estar presentes meses o años antes del diagnóstico^{47,50,164,174,292,304}.

Los dos casos que desarrollaron DMID, a los cuatro y veinte meses respectivamente de detectarse los ICA, éstos eran a título medio-alto (40 y >80 unidades JDF) y CF-ICA positivos en la determinación inicial a título de 20 unidades JDF. Los tres casos con ICA positivos que permanecen sanos actualmente, tras 5 años de seguimiento, fueron CF-ICA negativos y el título inicial de ICA fue medio-bajo (40, 40 y 10 unidades JDF respectivamente).

De nuestros resultados y en concordancia con estudios previos^{47,50,164} podemos concluir que los ICA pueden preceder en meses e incluso en años el inicio de la enfermedad y que los CF-ICA están más frecuentemente relacionados con el comienzo clínico de la enfermedad que los ICA convencionales y tienden a desaparecer más rápidamente.

En los diabéticos de inicio se ha demostrado que aquellos que presentan CF-ICA y a título alto, pierden más deprisa su reserva insulínica²⁹⁴.

En nuestro estudio la presencia de ICA y más concretamente de CF-ICA en hermanos de probandos con DMID se han comportado como factores pronósticos para el desarrollo de DMID.

Un título de ICA de 40 unidades JDF o mayor se asoció con un alto riesgo de desarrollar DMID.

La combinación de CF-ICA positivos junto con HLA idéntico al hermano diabético parecen conferir un muy alto riesgo de desarrollar diabetes tipo I, si bien el riesgo combinado no puede ser cuantificado con seguridad^{47,92}.

Riley et al¹⁹⁹. identificaron una serie de factores independientes que contribuían a aumentar el riesgo de DMID, tal como edad (primeras dos décadas de la vida), tener títulos elevados de ICA y ser miembro de familias múltiples.

En nuestro estudio no hemos podido demostrar que el ser miembro de familia múltiple aumentase el riesgo de desarrollar DMID, sin embargo, observamos que todos nuestros sujetos "sanos" con ICA positivos eran hermanos de probandos con DMID, con edad media de $10,4 \pm 3,84$ años, y los dos que desarrollaron DMID presentaban títulos elevados de ICA y positividad para los CF-ICA, lo que está en concordancia con el excelente valor predictivo para desarrollar DMID de los CF-ICA^{61,92,200}.

Nosotros concluimos que la determinación de ICA en parientes de probandos con DMID puede contribuir a identificar a aquellos con riesgo aumentado de desarrollar DMID. El riesgo depende del título de ICA y más concretamente de la presencia de CF-ICA, así como ser hermano compartiendo haploidencia con el

probando con DMID, mientras que los sujetos sin estos autoanticuerpos es poco probable que desarrollen DMID en el futuro.

En los 5 años de seguimiento dos de los cinco sujetos no diabéticos con ICA positivos llegaron a ser diabéticos insulino dependientes, mientras que ninguno de los ICA negativos progresó a DMID a lo largo de nuestra observación, resultados similares a los obtenidos por Riley et al³⁰⁴., entretanto que otros autores^{173.292.301} detectaron sujetos sin ICA que progresaron a diabetes durante el tiempo de seguimiento.

En el estudio familiar del hospital St. Bartholomew's²⁰² durante un seguimiento de ocho años, un 54% de los sujetos con CF-ICA desarrollaron diabetes, sugiriendo al analizar las tablas de vida que un 76% de los individuos positivos se convertirán en diabéticos.

Bonifacio et al¹⁹⁸. encuentran ICA positivos en el 3,3% de los familiares de primer grado de pacientes diagnosticados de diabetes, y tras diez años de seguimiento, encuentran que el valor predictivo para diabetes osciló entre el 40% (4 unidades JDF) y el 100% (80 unidades JDF) y, la sensibilidad, entre el 31% (80 unidades JDF) y el 88% (4 unidades JDF). Sin embargo, para Landin-Olsson et al²⁹⁶., la sensibilidad de un test ICA positivo es del 81%, la especificidad del 98% y, el valor predictivo podría ser sólo del 5%. En este estudio siete de los nueve

controles ICA positivos inicialmente se volvieron ICA negativos sin desarrollar diabetes. Los otros dos, desarrollaron diabetes a los ocho y veinticinco meses después de entrar como grupo; uno de los niños tenía un padre con diabetes tipo I mientras el otro no tenía ningún miembro de la familia con la enfermedad.

Existen datos sugerentes de que los CF-ICA son marcadores de mayor predicción que los ICA convencionales de la destrucción progresiva de las células β antes del diagnóstico^{92,200} y en la diabetes manifiesta³⁰⁵⁻³⁰⁷.

El estudio prospectivo de grupos de alto riesgo ha demostrado la existencia de una larga fase prodrómica con manifestaciones inmunológicas que preceden al comienzo clínico de la DMID. La cuantificación de los ICA y CF-ICA en las muestras de seguimiento demuestra que la monitorización de los niveles de ICA y CF-ICA a lo largo del tiempo pueden contribuir a predecir el inicio de la DMID.

En nuestro estudio los familiares con título medio-alto de ICA y presencia de CF-ICA se manifestaron como individuos de alto riesgo para desarrollar la enfermedad.

En uno de nuestros casos se observó negativización de los ICA sin aparecer la enfermedad, lo cual puede estar en relación con el carácter transitorio³⁰⁸. Así Spencer et al²⁷⁰. señalan que los ICA son a menudo transitorios, mientras que para

Riley y Maclaren¹⁷² éstos lo son raramente ya que no observaron ninguna recurrencia de ICA en pacientes con DMID después de su desaparición del suero.

En dos de los tres sujetos ICA positivos que permanecen con perfiles glucémicos normales en la actualidad se observó nueva aparición de los ICA tras su negativización, hecho que no se observó en los dos pacientes inicialmente "sanos" que evolucionaron a DMID, los cuales se negativizaron tras el diagnóstico de DMID.

La naturaleza transitoria de los ICA citoplasmáticos parece ser debida probablemente a una pérdida gradual del estímulo antigénico a medida que progresa la destrucción de los islotes hasta la ausencia total de las células β ^{219,309}.

Una posibilidad a considerar sería el fenómeno denominado comúnmente prozona, por el cual, sueros ICA negativos en una determinación inicial con suero no diluido pueden dar positivos a altas diluciones, sugiriéndose, que podría ser consecuencia de la presencia de un exceso de anticuerpos³¹⁰.

La asociación encontrada entre ICA y CF-ICA apoya la teoría que sustenta que los CF-ICA indican más la presencia de altos títulos de ICA²⁰¹ que un nuevo tipo de anticuerpos¹⁶⁴.

El papel de los ICA es todavía cuestionado ya que la destrucción de las células de los islotes puede estar ya iniciada en el momento en que los anticuerpos son detectados y éstos ser el resultado de tal destrucción y no su causa²¹⁹; sin embargo, es indudable su valor como marcador de individuos con alto riesgo de desarrollar diabetes.

Todos nuestros sujetos inicialmente "sanos" con ICA positivos fueron portadores de HLA-DR3 y/o DR4, eran hermanos de los propósitos con DMID con una edad media de $10,4 \pm 3,84$ años y existía un predominio del sexo femenino. Otros autores¹⁷⁸ habían señalado que los sujetos positivos suelen ser portadores de HLA-DR3 y/o DR4 o tener historia familiar u otra enfermedad autoinmune organoespecífica³¹¹. Sin embargo, no hemos encontrado relación entre los distintos tipos HLA y la positividad de los ICA, al igual que otros autores^{48,164,176,286}, y confirmando nuestros estudios preliminares³¹².

Se ha descrito que la persistencia prolongada de ICA parece correlacionarse con HLA-B8 y/o DR3^{226,293,313}, aunque estos hallazgos no fueron confirmados por otros autores^{302,314,315}.

Nosotros no encontramos relación entre el tipo HLA y la persistencia de los ICA, ni entre los distintos tipos HLA y el tiempo medio de evolución de los ICA desde el diagnóstico de la DMID, como tampoco hemos encontrado diferencia significativa entre la positividad o negatividad de los ICA y la edad de los

sujetos con DMID, si bien todos nuestros pacientes habían sido diagnosticados antes de los 15 años de edad.

Si los genes HLA y la autoinmunidad son factores de riesgo para DMID, el sexo varón puede ser un factor de riesgo para DMID³¹⁶. En este sentido, mientras en nuestra población general estudiada el 50% son varones y el 50% mujeres, en la población con DMID existe un discreto predominio del sexo masculino (55,9%), distribuyéndose por igual el sexo de nuestros dos casos con ICA positivos que progresaron a DMID. No obstante, el único varón familiar de primer grado con ICA positivos progresó a DMID, mientras que sólo una mujer entre cuatro familiares de primer grado con ICA positivos progresó a DMID.

Se ha descrito la presencia de AAI en el 18-38% de los diabéticos tipo I en el momento del diagnóstico, antes de iniciarse el tratamiento con insulina^{146,165,166,188,189,192}, relacionándose con diferentes tipos HLA^{188,194-196} e inversamente con la edad de comienzo de la enfermedad^{61,188,193}.

Los anticuerpos antiinsulina fueron detectados en el 2,1% de nuestra población "sana", de ellos, tres eran progenitores y uno, era una hermana portadora a su vez de ICA, porcentajes superiores a los descritos por Montaña et al¹⁷⁵. en la población mediterránea (0,53%) y Bergua et al²⁰⁴. en la población escolar española (0.3%).

Nuestros cuatro casos con AAI positivos eran HLA-DR3 y/o DR4 y la mitad de ellos estaban asociados a HLA-DR4, resultados concordantes con los hallazgos de Scherthaner et al¹⁹⁴. y Hoogwerf et al¹⁹⁵. quienes encuentran una correlación entre HLA-DR4 y títulos elevados de AAI, datos no demostrados por McEvoy et al¹⁹⁷.

Arslanian et al¹⁴⁶. encontraron una correlación negativa entre los AAI y la edad (71% de los pacientes con DMID que tenían AAI al diagnóstico estaban por debajo de los ocho años de edad, comparado con solo el 21% que estaba por encima de los ocho años), no pudiendo demostrar una diferencia significativa en los antígenos HLA-DR, ICA y función residual de las células B entre los pacientes con y sin AAI.

En nuestro estudio no hemos encontrado relación significativa entre la presencia de ICA y la de AAI ni anticuerpos antitiroideos, al igual que entre el tipo HLA y la presencia de ICA, AAI o anticuerpos antitiroideos en los familiares de primer grado "sanos" de niños con DMID. Sin embargo, los cinco sujetos ICA positivos y los cuatro con AAI positivos eran HLA-DR3 y/o DR4.

La posibilidad de asociación entre AAI e ICA es controvertida^{190,317}, mientras hay autores que encuentran dicha asociación^{189,191,192,318,319} otros estudios fracasan en demostrarla^{146,165,188,204}.

Los AAI pueden aparecer antes del comienzo de la DMID y su presencia podría sugerir un marcador adicional para individuos de riesgo de desarrollar diabetes^{166.191.318.319}, mientras que los resultados de otros estudios^{165.320} indican que su presencia es más compatible con la susceptibilidad genética individual (marcador genotípico) que con el establecimiento de la enfermedad.

Nuestros hallazgos no permiten extraer conclusiones dado el escaso número de casos, de todas formas, la presencia de HLA-DR4 y/o DR3 en todos nuestros sujetos con AAI positivos (la mitad de ellos asociados a DR4) mientras que sólo uno de ellos se asoció a ICA positivos, así como la normalidad de la reserva pancreática, podría contribuir a apoyar la hipótesis de la heterogeneidad genética de la DMID y servir como un indicador asociado a HLA más que como un marcador de la destrucción autoinmune de las células β .

Los AAI, especialmente en presencia de ICA, fueron más predictivos de DMID antes de la pubertad¹, si bien el verdadero significado como marcadores del desarrollo de diabetes tipo I sigue siendo oscuro⁵⁵. Los resultados de Wilkin et al¹⁶⁵. sugieren que los AAI no se asocian invariablemente a la diabetes clínica, ya que se encontraron en gemelos indemnes de diabéticos de larga evolución, que tienen pocas posibilidades de desarrollar diabetes⁸⁰. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que los AAI sean marcadores de una lesión de las células

insulares que no ha progresado a DMID. La frecuencia similar de AAI en gemelos no afectados de diabéticos de corta y larga evolución es compatible con un marcador de susceptibilidad genética más que de enfermedad establecida^{165.321}.

Atkinson et al¹⁸⁹. encontraron AAI en el 1,4% de los controles normales, 4% de parientes de primer grado de pacientes con DMID y en el 37% de pacientes recién diagnosticados de DMID. Los AAI positivos de parientes de primer grado de pacientes con DMID, así como de la población general, se asociaron con HLA-DR3 y/o DR4, sugiriendo que los AAI están restringidos a personas genéticamente susceptibles a DMID, aumentando la probabilidad de disfunción de células β en individuos no diabéticos ICA positivos. Así, tras la estimulación con glucosa intravenosa, la insulinopenia (medida por la alteración de la primera fase de secreción de insulina en respuesta a la glucosa intravenosa) estuvo presente en el 70% de individuos con ICA y AAI positivos, en contraste con sólo el 23% de personas con ICA positivos y AAI negativos. Estos datos documentan una asociación significativa entre los AAI e ICA y apoyan el que tanto los AAI como los ICA son marcadores de destrucción progresiva de las células β ¹⁸⁹.

Por el contrario, otros autores observaron AAI en individuos independientemente del grado de función de las células β ³¹⁹.

Al igual que en los ICA, también se han descrito fluctuaciones de anticuerpos antiinsulina y antitiroideos, por lo que puede ser simplemente un reflejo de las oscilaciones de la autoinmunidad^{165.270.322}.

En la DMID se encuentran otros autoanticuerpos organoespecíficos no pancreáticos con más frecuencia que en la población general^{154.323.324}.

Este aumento en la producción de anticuerpos puede formar parte de un defecto general en la inmunorregulación asociado a HLA-DR3, antígeno muy prevalente en familias diabéticas, lo que se traduce en una disminución de la función supresora de las células T e hiperactividad de las células β ^{325.326}.

El aumento de frecuencia de anticuerpos antimicrosomales tiroideos en pacientes con DMID fué uno de los hallazgos que apoyan una etiología autoinmune para la DMID. Riley et al²³⁰. encontraron una frecuencia aumentada de anticuerpos antimicrosomales tiroideos (17,6%), predominando en blancos (20,1%) sobre negros (5,5%), pero no de anticuerpos antitiroglobulina en pacientes blancos con DMID, con una razón mujer/varón de 2/1. En los pacientes con anticuerpos antimicrosomales tiroideos fué más frecuente la presencia de anticuerpos anticélulas parietales gástricas (16,8%) y antiadrenales (5,1%).

El 22,6% de nuestra población con DMID tenía anticuerpos antitiroideos positivos (18,9% antimicrosomales y el 7,5% antitiroglobulina), encontrándose asociados a HLA no DR3 no DR4, mientras dicha significación se perdía si consideramos por separado los distintos tipos de anticuerpos antitiroideos. Otros autores habían señalado que estos anticuerpos ocurrían independientemente de la susceptibilidad a la diabetes ligada a HLA^{228,327}, asociándose en varones la producción de anticuerpos antimicrosomales a HLA-DR5³²⁸. Yamaguchi et al¹⁷⁹., al igual que Kida et al³²⁹., encuentran que los pacientes japoneses con DMID y anticuerpos antitiroideos positivos tienen una mayor frecuencia de HLA-DRw9 que los sujetos control.

Nuestros dos casos con DMID portadores de HLA no DR3 no DR4 y con anticuerpos antitiroideos positivos poseían HLA-DRw6/DRw52, DQw1.

En cuanto a los parientes de primer grado "sanos" de probandos con DMID, éstos presentaron anticuerpos antitiroideos en el 13,2% (12% antimicrosomales y 4,2% antitiroglobulina). La edad fué mayor en los familiares con anticuerpos antitiroideos positivos que la de los negativos, sin alcanzar el grado de significación, al igual que sucedió en los niños con DMID.

No encontramos diferencia entre la presencia de anticuerpos antitiroideos y el tiempo de evolución de la enfermedad, aunque se ha descrito un declinar de los anticuerpos

antimicrosomales tiroideos (desde el 23,4% de los pacientes con DMID con menos de seis meses de evolución al 10,3% después de dos años) con el paso del tiempo de evolución de la DMID²⁹⁷, a pesar de que estos anticuerpos parecen aumentar con la edad¹⁵⁴.

Según Neufeld et al⁸⁷. cerca del 25% de pacientes con DMID tienen autoanticuerpos tiroideos microsomales y/o anticélulas parietales gástricas (autoinmunidad tirogástrica). Dichos anticuerpos están habitualmente presentes al diagnóstico, desapareciendo sólo si el proceso autoinmune ha destruido la glándula diana²²¹. Estos anticuerpos son más frecuentes en la población control a medida que aumenta la edad, afectando a más de un tercio de las mujeres caucásicas después de los 60 años²²⁸.

Riley et al²³⁰. encuentran anticuerpos antimicrosomales tiroideos en el 17,6% de los pacientes menores de 30 años con DMID, con mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres. Sin embargo, los anticuerpos antitiroideos y gástricos fueron más comunes entre pacientes con edades más tardías de comienzo de la DMID²²⁸.

La prevalencia de anticuerpos antimicrosomales en nuestro estudio fué del 18,9% en los pacientes con DMID frente al 12% de sus parientes de primer grado no diabéticos, distribuyéndose con mayor frecuencia entre las mujeres en ambas poblaciones, aunque sólo se objetivó una diferencia significativa a favor del sexo femenino en los familiares de primer grado no

diabéticos, mientras que dicha significación se perdía en los sujetos con DMID.

Otros autores^{231.232} han constatado porcentajes diferentes de pacientes diabéticos portadores de anticuerpos antitiroideos, oscilando entre un 8% de pacientes asintomáticos (comparado con el 0,5% de los controles) y un 44%, la mitad de los cuales presentaba síntomas.

En el estudio familiar realizado por Bottazzo et al²²⁶. se demostró que los anticuerpos tiroideos o gástricos eran más prevalentes en los sujetos con CF-ICA persistentes que en aquellos que perdían esta subespecie de anticuerpos.

Nosotros no pudimos demostrar relación entre la positividad de los ICA y la de los anticuerpos antitiroideos, tanto en los sujetos con DMID como en sus parientes de primer grado no diabéticos.

Tampoco se encontró relación entre la positividad de los AAI y la de los anticuerpos antitiroideos en los parientes de primer grado de probandos con DMID.

Estos resultados están de acuerdo con los de Lendrum et al³³⁰. quienes tampoco encuentran diferencias en la prevalencia de anticuerpos antitiroideos o gástricos en pacientes con ICA y sin ellos (20%).

Todos estos autoanticuerpos pueden estar presentes antes de desarrollar la enfermedad^{47.319}, lo cual ayuda a demostrar que la DMID es la manifestación final de una agresión autoinmune de larga duración.

La detección de las alteraciones de la inmunidad humoral ha sido estudiada en familiares de pacientes con DMID con el objetivo de poder predecir la enfermedad, sin embargo, estas alteraciones también se han observado en familiares que no sólo no han contraído la enfermedad, sino que incluso llegaban a negativizarse los anticuerpos sin desarrollarla³⁰⁸.

De todo ello podemos deducir que los marcadores existentes de inmunidad humoral son importantes pero insuficientes, sugiriendo que otros factores deben influir en el mecanismo de agresión de las células β .

La afectación de la función de las células β se inicia muchos meses o años antes del comienzo clínico de la diabetes^{176.331}.

Hermanos de probandos con DMID que con posterioridad desarrollaran DMID tienen a menudo alteración de la tolerancia a la glucosa varios años antes de desarrollar las manifestaciones clínicas de DMID³³², y algunos de los parientes de primer grado con ICA positivos de pacientes con DMID, tienen un test de tolerancia oral a la glucosa anormal¹⁷⁴ o disminución de la

primera fase de secreción de insulina utilizando test de tolerancia a la glucosa intravenosa¹⁷³, confirmando observaciones previas de estudios en gemelos y trillizos^{50,52}.

Nuestros hallazgos sugieren que la presencia de ICA puede ser un factor importante en determinar anomalías en la tolerancia a la glucosa. Así, los parientes de primer grado ICA positivos de pacientes con DMID tenían niveles de glucemia basal y promedios de glucosa en los distintos puntos de la curva del test de tolerancia oral más elevados que aquellos sin ICA, sin llegar al nivel de significación estadística, probablemente debido al escaso número de casos, excepto para la glucemia basal.

Los valores de insulinemia basal y péptido C basal y los promedios de insulina y péptido C en los distintos puntos de la curva tras el test de tolerancia oral a la glucosa fueron también más bajos en la población "sana" con ICA positivos, alcanzándose la significación para la insulinemia basal cuando comparábamos los hermanos ICA positivos de probandos con DMID con los negativos.

Asimismo, fueron mayores las áreas bajo la curva de glucosa, y menores las de insulina y péptido C, en los parientes de primer grado "sanos" ICA positivos que en los negativos.

Los valores de glucemia basal, área bajo la curva de glucosa, insulina, y péptido C, fueron estadísticamente más

elevados en los padres "sanos" de pacientes con DMID que en los hermanos "sanos" con ICA negativos.

Cuando comparamos los hermanos no diabéticos con ICA positivos de sujetos con DMID con los padres, se observa que los niveles de glucemia basal son más elevados y la insulinemia basal y péptido C más bajos en los hermanos no diabéticos con ICA positivos, estando próximos a la significación en las dos primeras determinaciones.

También se demostró que la insulinemia basal y el péptido C a los 60 minutos y 120 minutos eran significativamente más bajos en los hermanos "sanos" ICA positivos de pacientes con DMID que en sus propios hermanos (correspondientes a las mismas familias) ICA negativos. Mientras que las áreas bajo la curva de insulina y péptido C, aunque eran menores en los hermanos "sanos" ICA positivos, no llegaban al nivel de significación.

En este sentido, para Ginsberg-Fellner et al¹⁷⁶., la presencia de ICA no parece ser un factor primario en determinar anomalías en la tolerancia a la glucosa y/o secreción de insulina, no encontrando diferencias significativas entre los grupos de hermanos estratificados de acuerdo a la relación HLA con el probando con DMID. Sin embargo, la identidad HLA con el probando se asocia con diferencias significativas en la tolerancia a la glucosa. Estos autores encuentran una disminución de la respuesta a la insulina tras el test de tolerancia oral a

la glucosa en hermanos HLA idénticos. Del mismo modo, Orchard et al³⁰³. no encontraron relación entre la presencia de ICA y la tolerancia a la glucosa oral, mientras que los hermanos HLA idénticos de diabéticos tipo I, particularmente varones, tienen peor tolerancia a la glucosa (mayores áreas de glucosa) que sus hermanos haploidénticos y HLA no idénticos.

Sin embargo, Srikanta et al^{50,52}. encuentran una fuerte asociación entre ICA y la disminución de la primera fase de la insulina en respuesta a la glucosa intravenosa para predecir el desarrollo de diabetes tipo I en trillizos y gemelos monocigotos.

Barbosa et al³³³., al contrario que Ginsberg-Fellner et al¹⁷⁶., encuentran niveles medios de glucosa e insulina más elevados en hermanos HLA idénticos de pacientes con DMID que en los controles durante el test de tolerancia oral a la glucosa. Del mismo modo, Hollander et al³³⁴., refieren un aumento de la primera fase de secreción de insulina en respuesta a la arginina y glucosa intravenosa en hermanos de diabéticos tipo I haploidénticos, sugiriendo que una leve resistencia periférica a la insulina, y un resultante aumento de la sensibilidad de las células β en hermanos HLA idénticos contribuyen al aumento de la respuesta insulínica inducida por la glucosa.

Schober et al³³⁵. describen un aumento en la respuesta a la insulina (calculada como el área bajo la curva) tras el test de tolerancia oral a la glucosa en hermanos HLA idénticos de

niños con DMID comparada con los controles y hermanos HLA no idénticos. Esta hiperreactividad de las células β puede ser una temprana intolerancia a los carbohidratos^{335,336} o un aumento en el metabolismo de las células β genéticamente determinado³³⁵, asociado a HLA-DR4³³⁷, lo cual puede predisponer a su destrucción por factores ambientales u otros agentes^{334,335}.

Lindgren et al³³⁸., no observaron diferencias significativas entre hermanos de pacientes con diabetes mellitus tipo I, HLA idénticos, HLA haplo idénticos, y HLA no idénticos en la respuesta insulínica utilizando test de infusión de glucosa intravenosa ni en la sensibilidad a la insulina estimada por el test de infusión de glucosa-insulina-somatostatina. Al contrario de los hallazgos de Raghu et al³³⁹. que habían descrito una disminución de la sensibilidad de la insulina en hermanos HLA idénticos de pacientes diabéticos tipo I comparado con sujetos control no relacionados. Un importante hallazgo de los estudios de Lindgren et al³³⁸., fué la demostración de una significativa correlación inversa con la edad para la respuesta a la insulina y sensibilidad a la insulina en los hermanos jóvenes estudiados.

Por otro lado, Radder et al³⁴⁰. encuentran que los diabéticos insulino dependientes con ICA positivos tienen un mayor requerimiento de insulina que los sujetos con anticuerpos negativos, confirmando que la presencia de anticuerpos anticélulas de los islotes indican destrucción aumentada de células β .

La diabetes mellitus tipo I va precedida de una prolongada fase prediabética de disfunción progresiva de las células β con anomalías inmunológicas asociadas.

Estudios realizados en gemelos monocigotos⁵² demostraron que durante la "fase prediabética" la presencia de anticuerpos anticélulas de los islotes estaba temporalmente asociada con un progresivo declinar en la primera fase de la insulina en respuesta a la glucosa intravenosa. Elevaciones en la glucosa sanguínea en ayunas y anomalías en los test de tolerancia oral a la glucosa, aparecieron solo más tarde durante el curso de la enfermedad. La más temprana anomalía bioquímica demostrada fué una disminución en el pico inicial de la insulina (suma de los valores del minuto 1 y minuto 3) en respuesta a la glucosa intravenosa⁵⁰.

Nosotros hemos podido constatar la existencia de anomalías en los test de tolerancia oral a la glucosa, valorando los promedios de glucosa, insulina y péptido C, así como las áreas bajo la curva de glucosa, insulina y péptido C, en sujetos con ICA positivos hermanos de pacientes con DMID en fase prediabética.

El estudio norteamericano del Joslin Diabetic Center, mostró que los niveles de AAI no conllevaban una relación con el grado de respuesta de la primera fase de la insulina a la glucosa intravenosa en un grupo de pacientes con "alto riesgo"

de diabetes³¹⁹. En este estudio, la posesión de AAI e ICA simultáneamente parecía conferir un riesgo elevado de progresión a diabetes, puesto que 7 de 12 individuos se convirtieron en insulino dependientes. Estos resultados contrastan con los hallazgos europeos en los gemelos monocigotos de diabéticos; de 58 gemelos estudiados por el grupo europeo, los 7 positivos tanto para ICA como para AAI no habían progresado a insulino dependencia¹⁶⁵.

Nuestro único caso que fué simultáneamente ICA y AAI positivos permanece con glucemias normales tras cinco años de seguimiento y tras la negativización de los AAI.

En un estudio progresivo de función de células β en individuos no diabéticos ICA positivos, la presencia adicional de AAI aumentaba la probabilidad de disfunción de células β ¹⁸⁹. Sin embargo, Ludvigsson et al¹⁹². no fueron capaces de demostrar una más rápida pérdida de función de las células β en pacientes con ambos autoanticuerpos al diagnóstico.

Para Madsbad et al³⁴¹. la prevalencia de anticuerpos anticélulas de los islotes fué independiente de la función residual de las células β medido por el péptido C sérico y edad de comienzo, sugiriendo que los ICA no tienen papel directo en la destrucción de las células β . Sin embargo, Marnier et al²⁹⁴. observan que los valores medios de péptido C, entre los pacientes con DMID ICA positivos persistentemente, disminuyeron más

rápidamente a lo largo del tiempo comparados con los pacientes ICA negativos, postulando que la presencia de altos títulos de ICA al diagnóstico o en los tres primeros meses de terapia insulínica puede ser una ayuda como predictor de una más rápida pérdida de la función endógena de las células β .

La posible relación entre los antígenos HLA y la función residual de las células β en la diabetes tipo I es controvertida³⁴².

Se ha descrito^{195,343} que los pacientes con HLA-DR4 tienen una mejor preservación de la función de las células β que los HLA-DR4 negativos, aún en los casos de comienzo más precoz. Estos datos parecen en contradicción con los hallazgos de Eberhardt et al³⁴⁴. para quienes los pacientes con HLA-DR4 se presentan con un cuadro clínico más severo y mayor frecuencia de anticuerpos frente al virus coxsackie B y los de Ludvigsson et al⁴⁶. que encuentran que HLA-DR3 está asociado con una forma más lentamente progresiva de DMID, mientras que otros estudios habían fracasado en demostrar cualquier correlación entre determinantes HLA y concentraciones del péptido C circulante³⁴⁵.

La frecuencia de intolerancia a la glucosa está aumentada en parientes de primer grado de diabéticos insulino dependientes (especialmente hermanos de pacientes) con HLA-B8 y Bw15 y Cw3 y no portadores de B7⁹¹.

Nosotros no hemos encontrado diferencia significativa entre los distintos tipos HLA y la reserva pancreática dentro de la población "sana". Sin embargo, vimos que los hermanos ICA negativos de los propósitos con DMID portadores de HLA-DR3 tienen valores de insulinemia basal significativamente más elevados que los que poseen HLA-DR3, DR4.

Las observaciones de Knip et al³⁴⁶. sugieren que los heterocigotos Dw3/Dw4 están, al menos en niños, asociados con una forma distinta de diabetes tipo I caracterizada por una rápida destrucción de las células β , una remisión clínica de corta duración, y un pobre control metabólico.

El carácter lentamente progresivo de la destrucción de las células β previo a la aparición de la diabetes manifiesta hace preveer que la diabetes pueda convertirse en una enfermedad previsible en un futuro próximo³⁸.

Los marcadores genéticos son poco específicos para definir el riesgo, y los ICA, aunque útiles, no proporcionan un marcador suficientemente preciso, si bien los CF-ICA o la presencia de ICA a títulos elevados han demostrado tener una alta especificidad en la predicción de la enfermedad.

Un avance importante ha sido la identificación de anormalidades en la secreción de insulina en el periodo prediabético. El más destacado de estos cambios es el trastorno

en la primera fase de la respuesta de la insulina a la glucosa intravenosa^{173,347}.

El test de tolerancia a la sobrecarga oral de glucosa identifica un subgrupo de sujetos con riesgo aumentado para desarrollar DMID. La latencia prolongada en el desarrollo de DMID después de la detección de la tolerancia a la glucosa anormal sugiere que esta enfermedad puede ya ser crónica en el momento del comienzo clínico de la DMID.

Nuestros estudios indican que una combinación de la identidad HLA, con los test inmunológicos, y la valoración de la reserva pancreática, puede permitir identificar a personas que tienen alto riesgo para diabetes tipo I y nos puede ayudar a predecir el comienzo de la diabetes manifiesta.

VI. CONCLUSIONES

Del análisis detallado de nuestros resultados y tras una exhaustiva revisión de la literatura podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- Los alelos HLA-DR3 y/o DR4 (o genes estrechamente ligados a ellos) están implicados en la susceptibilidad genética a la DMID.

El 96,6% de nuestros pacientes con DMID expresaron los alelos de histocompatibilidad DR3 y/o DR4 frente al 76,6% de sus familiares de primer grado no diabéticos ($p < 0,0001$).

- 2.- No existe distorsión en la transmisión de los alelos HLA-DR3 ó DR4 desde los padres a sus descendientes.

Los alelos DR3 paternos o maternos, no fueron transmitidos preferentemente a los descendientes diabéticos y/o no diabéticos. Del mismo modo, los alelos DR4 paternos o maternos, no fueron transmitidos preferentemente a los descendientes diabéticos y/o no diabéticos.

3.- La prevalencia de ICA en la población con DMID está aumentada con respecto a la población no diabética (35,6% versus 2,6%) $p < 0,001$.

La frecuencia de ICA al comienzo de la DMID, con un tiempo de evolución de la enfermedad igual o menor de 12 meses, fué del 66,66%, con una disminución gradual a medida que progresa la enfermedad.

La prevalencia de CF-ICA en los sujetos con DMID fué mayor que en sus familiares de primer grado no diabéticos (13,6% versus 1,1%) $p < 0,01$.

Existe una asociación significativa entre la presencia de títulos de ICA iguales o mayores a 20 unidades JDF y la positividad de los CF-ICA ($p < 0,001$).

Existe una relación significativa entre el tiempo de evolución de la DMID y la presencia o no de ICA ($p = 0,0002$).

- 4.- La determinación de ICA en parientes de probandos con DMID contribuye a identificar a aquellos con riesgo aumentado de desarrollar DMID.**

El riesgo depende del título de ICA y más específicamente de CF-ICA, así como ser hermano compartiendo haploidencia con el probando diabético. Un título de ICA igual o mayor de 40 unidades JDF se asoció con un alto riesgo de desarrollar DMID.

Los ICA pueden preceder en meses e incluso años el inicio de la enfermedad.

Los CF-ICA están más relacionados con el comienzo clínico de la DMID que los ICA convencionales y tienden a desaparecer más rápidamente.

- 5.- Los familiares de primer grado sin ICA no parecen tener un riesgo aumentado de desarrollar DMID en el futuro. Durante los 5 años de seguimiento ninguno de estos individuos desarrolló la enfermedad.**

6.- Los anticuerpos antitiroideos (antimicrosomales y/o antitiroglobulina) ocurren independientemente de los genes de susceptibilidad a la DMID, estando aumentada su incidencia en el sexo femenino y en los pacientes con DMID.

Los anticuerpos antitiroideos fueron más frecuentes en las mujeres que en los varones, tanto en la población general (22,4% versus 9%, $p < 0,01$), como en los familiares de primer grado no diabéticos (19,3% versus 6,3%, $p < 0,01$) y en pacientes con DMID (29,2% versus 17,2%), si bien, en este último grupo, no fué estadísticamente significativo.

Los anticuerpos antitiroideos tuvieron mayor prevalencia en la población de pacientes con DMID que entre sus familiares de primer grado no diabéticos (22,6% versus 13,2%), sin llegar al nivel de significación estadística. No existió diferencia significativa entre la edad de los pacientes con DMID o de sus familiares no diabéticos y la presencia o ausencia de anticuerpos antitiroideos.

La prevalencia de anticuerpos antimicrosomales fué del 18,9% en pacientes con DMID frente al 12% de sus familiares de primer grado no diabéticos, sin alcanzar el grado de significación.

En los pacientes con DMID, la positividad de los anticuerpos antitiroideos se asoció a HLA no DR3 no DR4 ($p < 0,05$).

No existió relación entre la presencia de anticuerpos antitiroideos y el tiempo de evolución de la DMID o la presencia de ICA.

7.- La prevalencia de AAI en los familiares de primer grado de pacientes con DMID fué del 2,1% y todos ellos eran HLA-DR3 y/o DR4, con predominio en progenitores.

8.- Los AAI parecen actuar como un indicador determinado genéticamente asociado a HLA más que como marcador de la destrucción autoinmune de las células β .

No se demostró alteración de la reserva pancreática en los sujetos no diabéticos con AAI.

No se encontró relación significativa entre la presencia de AAI y la de ICA, ni anticuerpos antitiroideos, en la población no diabética.

9.- La afectación de la función de las células β comienza meses o años antes del diagnóstico clínico de la DMID. Los parientes de primer grado ICA positivos de pacientes con DMID tienen a menudo alteración de la tolerancia a la glucosa antes de desarrollar las manifestaciones clínicas de DMID.

Existe alteración de la reserva pancreática en sujetos no diabéticos ICA positivos con respecto a los negativos, detectándose elevaciones de la glucemia basal, promedios de glucosa en los distintos puntos de la curva y área bajo la curva de glucosa, así como disminución de la insulina, péptido C basal, promedios de insulina y péptido C en los distintos puntos de la curva (a excepción del péptido C a los 180 minutos) así como del área bajo la curva de insulina y péptido C en los sujetos no diabéticos ICA positivos.

La insulinemia basal y el péptido C a los 60 minutos y 120 minutos fueron significativamente más bajos en los hermanos no diabéticos ICA positivos que en sus propios hermanos (correspondientes a las mismas familias) ICA negativos. Asimismo, las áreas bajo la curva de insulina y péptido C eran menores en los ICA positivos aunque sin llegar al nivel de significación.

- 10.- No se encontró diferencia significativa entre los distintos tipos HLA y la reserva pancreática dentro de la población no diabética, a excepción de la insulinemia basal que fué significativamente más elevada en los hermanos ICA negativos portadores de HLA-DR3 ($15,30 \pm 4,56 \mu\text{U/ml}$) que en los que poseen HLA-DR3, DR4 ($11,23 \pm 5,20 \mu\text{U/ml}$), $p=0,0267$.
- 11.- La determinación del tipo HLA y de los anticuerpos anticélulas de los islotes, junto con el estudio de la reserva pancreática, en familiares de primer grado de sujetos con DMID, puede predecir el comienzo de la DMID en personas de alto riesgo.

VII. RESUMEN

Se estudiaron 260 individuos pertenecientes a 54 familias que tenían al menos un hijo con DMID diagnosticada antes de los 15 años de edad. Se trataba de 59 niños con DMID y 201 familiares de primer grado, de ellos 108 eran padres y 93 hermanos.

A todos se les practicó tipificación HLA-A, B, C, Bw4, Bw6, DR, DQ, determinación de ICA, CF-ICA y anticuerpos antitiroideos (antimicrosomales y antitiroglobulina). A los parientes de primer grado se les realizó además determinación de anticuerpos antiinsulina y en aquellos que no se conocían diabéticos una sobrecarga oral de glucosa con determinaciones de glucosa, insulina y péptido C.

Se hizo un seguimiento durante 5-6 años, con controles a intervalos de 6-12 meses, extrayéndoles sangre para determinación de ICA.

A los sujetos ICA positivos se les realizaron evaluaciones periódicas más estrictas con determinaciones de perfiles glucémicos.

Se encontró HLA-DR3 y/o DR4 en el 96,6% de los niños con DMID y en el 76,6% de sus familiares de primer grado no diabéticos ($p < 0,0001$).

No existió distorsión en la transmisión de los alelos HLA-DR3 ó DR4 desde los progenitores a sus descendientes.

La prevalencia de ICA en DMID fué del 35,6% frente al 2,6% de sus familiares de primer grado no diabéticos ($p < 0,001$).

Se encontró una relación significativa entre el tiempo de evolución de la DMID y la presencia o no de ICA ($p = 0,0002$). En los sujetos con DMID con un tiempo igual o menor de 12 meses de evolución de la enfermedad la prevalencia de ICA fué del 66,66%.

Los CF-ICA estuvieron presentes en el 13,6% de los niños con DMID frente al 1,1% en sus familiares de primer grado no diabéticos ($p < 0,01$).

Existió una asociación significativa entre los títulos de ICA iguales o mayores a 20 unidades JDF y la positividad de los CF-ICA ($p < 0,001$).

La edad media de los familiares no diabéticos ICA positivos fué menor que la de los ICA negativos ($10,40 \pm 3,84$ años versus $26,29 \pm 15,04$ años) $p = 0,0001$.

Los AAI estuvieron presentes en el 2,1% de los familiares de primer grado no diabéticos.

Los anticuerpos antitiroideos fueron más prevalentes en la población de sujetos con DMID (22,6%) que en sus familiares no diabéticos (13,2%), predominando en el sexo femenino ($p < 0,01$ en los familiares de primer grado no diabéticos), y presentándose asociados a HLA no DR3 no DR4 ($p < 0,05$) en los pacientes con DMID.

Se demostró una alteración de la reserva pancreática en los familiares de primer grado no diabéticos ICA positivos con respecto a los negativos.

La glucemia basal y los promedios de glucosa en los distintos puntos de la curva en el TTOG fueron más elevados en la población no diabética con ICA positivos que en la ICA negativos, llegando a ser estadísticamente significativos para la glucemia basal ($p = 0,0137$). Resultados similares se obtuvieron al comparar estos parámetros entre la población de hermanos no diabéticos con ICA positivos con los hermanos no diabéticos ICA negativos, encontrando valores de glucemia basal y a los 90 minutos de la sobrecarga oral de glucosa significativamente más elevados en los hermanos no diabéticos con ICA positivos ($p = 0,0055$ y $0,0209$ respectivamente).

Los valores de insulinemia basal y péptido C basal, y los promedios de insulina y péptido C en los distintos puntos de la curva fueron más bajos en la población no diabética con ICA

positivos con respecto a la población no diabética con ICA negativos (a excepción del péptido C a los 180 minutos) sin llegar al nivel de significación. Sin embargo, al comparar la insulinemia basal de los hermanos no diabéticos con ICA positivos con los hermanos no diabéticos ICA negativos se alcanzó la significación estadística ($p= 0,0001$).

Del mismo modo, existió una tendencia a presentar valores más elevados del área bajo la curva de glucosa y más bajos del área bajo la curva de insulina y péptido C en la población no diabética con ICA positivos.

La insulinemia basal y el péptido C a los 60 minutos y 120 minutos fueron significativamente más bajos en los hermanos no diabéticos ICA positivos que en sus propios hermanos (correspondientes a las mismas familias) ICA negativos ($p= 0,0104$, $p= 0,0325$ y $p= 0,0367$ respectivamente).

Por otro lado, la insulinemia basal fué significativamente más elevada en los hermanos no diabéticos ICA negativos portadores de HLA-DR3 que en los que poseen HLA-DR3, DR4 ($p= 0,0267$).

No existió relación entre el tipo HLA y la presencia de ICA, AAI o anticuerpos antitiroideos en los familiares no diabéticos, sin embargo, los 5 sujetos con ICA positivos y los 4 con AAI fueron portadores de HLA-DR3 y/o DR4.

En los niños con DMID no se encontró relación entre el tipo HLA y la positividad o persistencia de los ICA, ni entre la positividad o negatividad de los ICA y la positividad o negatividad de los anticuerpos antitiroideos.

A lo largo del seguimiento dos hermanos no diabéticos ICA positivos desarrollaron DMID, a los cuatro meses y veinte meses respectivamente, después de detectarse la existencia de ICA. Los dos eran HLA-DR3, DR4 al igual que los propósitos, ambos eran ICA positivos a título de 40 y >80 unidades JDF respectivamente, y los dos, presentaron CF-ICA positivos a título de 20 unidades JDF en la determinación inicial.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Maclaren N, Schatz D, Drash A, Grave G. Initial pathogenic events in IDDM. *Diabetes* 1989;38:534-538.
2. Åkerblom HK, Reunanen A. The epidemiology of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in Finland and in Northern Europe. *Diabetes Care* 1985; 8 (suppl. 1):10-16.
3. Lorenzi M, Cagliero E, Schmidt NJ. Racial differences in incidence of juvenile-onset Type 1 diabetes: epidemiologic studies in southern California. *Diabetologia* 1985;28:734-738.
4. Christau B, Kromann H, Andersen OO, Christy M, Buschard K, Arnung K, Kristensen IH, Peitersen B, Steinrud J, Nerup J. Incidence, seasonal and geographical patterns of juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Denmark. *Diabetologia* 1977;13:281-284.
5. Sterky G, Holmgren G, Gustavson KH, Larsson Y, Lundmark KM, Nilsson KO, Samuelson G, Thalme B, Wall S. The incidence of diabetes mellitus in Swedish children 1970-75. *Acta Paediatr Scand.* 1978;67:139-143.
6. Joner G, Sovik O. Incidence, age at onset and seasonal variation of diabetes mellitus in Norwegian children 1973-77. *Acta Paediatr Scand.* 1981;70:329-335.
7. Patterson CC, Thorogood M, Smith PG, Heasman MA, Clarke JA, Mann JI. Epidemiology of Type 1 (insulin-dependent) diabetes in Scotland 1968-1976: evidence of an increasing incidence. *Diabetologia* 1983;24:238-243.
8. Karjalainen J, Salmela P, Ilonen J, Surcel HM, Knip M. A comparison of childhood and adult Type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1989;320:881-886.
9. Cudworth AG, Gamble DR, White GBB, Lendrum R, Woodrow JC, Bloom A. Aetiology of juvenile-onset diabetes. A prospective study. *Lancet* 1977;i:385-388.

10. Craighead JE. Current views on the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1978;299:1439-1445.
11. Orchard TJ, Rosenbloom AL. The development of insulin-dependent diabetes mellitus among relatives. *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1):45-50.
12. Eisenbarth G. Prediction and prevention strategies in Type I diabetes. *Mt Sinai J Med.* 1991;58:274-279.
13. Bottazzo GF. β -Cell damage in diabetic insulinitis: are we approaching a solution?. *Diabetologia* 1984;26:241-249.
14. Vexiau P, Cathelineau G, Canivet J. Rôle de l'autoimmunité dans le diabète insulino-dépendant. *Sem Hôp Paris* 1985; 61: 1029-1033.
15. Rabinowe SL, Eisenbarth GS. Diabetes mellitus tipo I: ¿una enfermedad crónica autoinmune?. En: *Diabetes juvenil. Clínicas Pediátricas de Norteamérica (edición en español)*, Castelles S (ed.). Madrid, Interamericana 1984;3:533-544.
16. Binimelis J, Codina M, Oriola J, Pou JM, Barbosa J, de Leiva A. Aspectos autoinmunes de la diabetes mellitus tipo I (insulinodependiente). *Av Diabetol.* 1989;2:10-18.
17. Pujol-Borrell R, Vives M. Etiopatogenia de la diabetes 1989: diversidad de hipótesis. *Endocrinología* 1989;36:309-312.
18. Bottazzo GF, Foulis AK, Bosi E, Todd I, Pujol-Borrell R. Pancreatic β -cell damage. In search of novel pathogenetic factors. *Diabetes Care* 1988;11 (suppl. 1):24-28.
19. Palmer JP, Lernmark Å. Pathophysiology of Type I (insulin-dependent) diabetes. En: *Diabetes mellitus. Theory and practice*, Rifkin H, Porte D (ed.). New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1990;414-435.
20. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn R. Epidemiologic approach to the etiology of Type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med.* 1987;317:1390-1398.

21. Gutiérrez C, Fernández-Cruz E. Expresión aberrante de antígenos HLA-DR y el fenómeno autoinmune de las enfermedades endocrinas. Rev Clin Esp. 1986;178:255-258.
22. Muñoz A, Usac EF. Autoantígenos en la diabetes mellitus tipo 1. Endocrinología 1991;38:103-104.
23. Serrano Rodríguez S, Pujol-Borrell R, Bottazzo GF. Inmunopatología de la diabetes insulino-dependiente. Nuevas hipótesis. Rev Clin Esp. 1986;178:299-307.
24. Mandel TE. Autoimmunity and diabetes. Transplant Proc. 1989;21:2614-2616.
25. Lucas Martín A, Pujol-Borrell R, Foz Sala M. Modulación de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en las células foliculares tiroideas y en las células beta del páncreas: implicaciones en la patogenia de las enfermedades autoinmunes tiroideas y de la diabetes mellitus tipo I. Med Clin (Barc) 1986;87:684-687.
26. Goday Arnó A. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 1. ¿Una vía hacia la prevención de la enfermedad?. Med Clin (Barc) 1990;95:178-182.
27. Cudworth AG, Festenstein H. HLA genetic heterogeneity in diabetes mellitus. Br Med Bull. 1978;34:285-289.
28. Anderson CE, Hodge SE, Rubin R, Rotter JI, Terasaki PI, Irvine WJ, Rimoin DL. A search for heterogeneity in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM): HLA and autoimmune studies in simplex, multiplex and multigenerational families. Metabolism 1983;32:471-477.
29. Becker F, Schwarz G, Drummond V, Gale EM, Bottazzo GF. Further evidence for genetic heterogeneity in IDDM. XII Congress of the International Diabetes Federation. Madrid, Spain, 23-28 September 1985. Diabetes Res Clin Pract. 1985;Suppl. 1:S39 (Abstract).
30. Barbosa J, Rich S. Type 1 (insulin-dependent) diabetes and genetic heterogeneity. Diabetologia 1984;26:170.

31. Mustonen A, Ilonen J, Tiilikainen A, Kataja M, Åkerblom HK. An analysis of epidemiological data in HLA-typed diabetic children. *Diabetologia* 1985;28:397-400.
32. Owerbach D, Lernmark Å, Platz P, Ryder LP, Rask L, Peterson PA, Ludvigsson J. HLA-D region B-chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Nature* 1983;303:815-817.
33. Degnbol B, Green A. Diabetes mellitus among first - and second-degree relatives of early onset diabetics. *Ann Hum Genet.* 1978;42:25-47.
34. Goldstein S, Podolsky S. The genetics of diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 1978;62:639-654.
35. Gamble DR. An epidemiological study of childhood diabetes affecting two or more siblings. *Diabetologia* 1980;19:341-344.
36. Orchard TJ, Becker DJ, Atchison RW, LaPorte RE, Wagener DK, Rabin BS, Kuller LH, Drash AL. The development of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: two contrasting presentations. *Diabetologia* 1983;25:89-92.
37. Champsaur H, Boitard Ch, Assan R, Bach Ch. Diabète, virus et facteurs immunogénétiques. *Rev Praticien* 1981;31:11-19.
38. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986;314:1360-1368.
39. Pujol Borrell R. Inmunopatología de la diabetes Tipo 1: Papel del órgano diana. *Av Diabetol.* 1988;1:59-68.
40. Maclaren N, Riley W, Rosenbloom E, Elder M, Spillar R, Cuddeback J. The heterogeneity of black insulin dependent diabetes. *Diabetes* 1982;31(suppl. 2):65A.

41. Tajima N, LaPorte RE, Hibi I, Kitagawa T, Fujita H, Drash AL. A comparison of the epidemiology of youth-onset insulin-dependent diabetes mellitus between Japan and the United States (Allegheny County, Pennsylvania). *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1):17-23.
42. Gamble DR. The epidemiology of insulin dependent diabetes, with particular reference to the relationship of virus infection to its etiology. *Epidemiol Rev.* 1980;2:49-70.
43. Rotter JI, Vadheim CM, Rimoin DL. Genetics of diabetes mellitus. En: *Diabetes mellitus. Theory and practice*, Rifkin H, Porte D (ed.). New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1990;378-413.
44. Bennett PH. Epidemiology of diabetes mellitus. En: *Diabetes mellitus. Theory and Practice*, Rifkin H, Porte D (ed.). New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1990;357-377.
45. Laron Z, Karp M, Modan M. The incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Israeli children and adolescents 0-20 years of age: a retrospective study, 1975-1980. *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1): 24-28.
46. Ludvigsson J, Samuelsson U, Beauforts C, Deschamps I, Dorchy H, Drash A, Francois R, Herz G, New M, Schober E. HLA-DR3 is associated with a more slowly progressive form of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:207-210.
47. Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, McNally JM, Dean BM, Bottazzo GF, Cudworth AG. Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* 1981;ii:1363-1365.
48. Lendrum R, Walker G, Cudworth A, Woodrow J, Gamble D. HLA linked genes and islet cell antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J.* 1976;2:1565-1567.
49. Asplin CM, Cooney MK, Crossley JR, Dornan TL, Raghu P, Palmer JP. Cocksackie B, infection and islet cell antibodies three years before overt diabetes. *J Pediat.* 1982; 101:398-400.

50. Srikanta S, Ganda OP, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Islet-cell antibodies and Beta-cell function in monozygotic triplets and twins initially discordant for type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1983;308:322-325.
51. Jackson RA, Morris MA, Haynes BF, Eisenbarth GS. Increased circulating I_a antigen-bearing T cells in Type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1982;306:785-788.
52. Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA, Gleason RE, Kaldany A, Garovoy MR, Milford EL, Carpenter CB, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Ann Intern Med.* 1983;99:320-326.
53. McCulloch DK, Palmer JP, Benson EA. Beta cell function in the preclinical period of insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 1987;3:27-43.
54. Eisenbarth GS. Autoimmune beta cell insufficiency - diabetes mellitus Type I. *Triangle* 1984;23:111-124.
55. Editorial. Serological markers for Type 1 diabetes. *Lancet* 1986;i:1132-1133.
56. Cahill GF, McDevitt HO. Insulin-dependent diabetes mellitus: The initial lesion. *N Engl J Med.* 1981;304:1454-1465.
57. Editorial. Cyclosporin for diabetes?. *Lancet* 1986;ii:140.
58. Marx JL. Diabetes - A possible autoimmune disease. *Science* 1984;225:1381-1383.
59. Sutherland DER, Sibley R, Chinn P, Michael A, Srikanta S, Taub F, Najarian J, Goetz FC. Twin-to-twin pancreas transplantation (TX): reversal and reenactment of the pathogenesis of Type I diabetes. *Clin Res.* 1984;32:561A.
60. Sutherland DER, Goetz FC, Najarian JS. Recent experience with 89 pancreas transplants at a single institution. *Diabetologia* 1984;27:149-153.

61. Maclaren NK. How, when, and why to predict IDDM. *Diabetes* 1988;37:1591-1594.
62. Leslie RDG, Pyke DA, Denman AM. Immunosuppressive therapy in diabetes. *Lancet* 1985;i:516.
63. Stiller CR, Dupre J, Gent M, Jenner MR, Keown PA, Laupacio A, Martell R, Rodger NW, Graffenreid NW, Wolfe VB. Effects of cyclosporin immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 1984;223:1362-1367.
64. Bougneres PF, Carel JC, Castano L, Boitard C, Gardin JP, Landais P, Hors J, Mihatsch MJ, Paillard M, Chaussain JL, Bach JF. Factors associated with early remission of Type I diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl J Med.* 1988;318:663-670.
65. Stiller CR, Laupacis A, Dupre J, Jenner MR, Keown PA, Rodger W, Wolfe BMJ. Cyclosporine for treatment of early Type I diabetes: preliminary results. *N Engl J Med.* 1983;308:1226-1227.
66. Assan R, Feutren G, Debray-Shachs M, Quiniou-Debrie MC, Laborie C, Thomas G, Chatenoud L, Bach JF. Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed Type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 1985;i:67-71.
67. Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Stiller CR, Marner B, Bille G, Heinrichs D, Martell R, Dupre J, Keown PA, Jenner MR, Rodger NW, Wolfe B, Graffenried BV, Binder C. Disappearance and reappearance of islet cell cytoplasmic antibodies in cyclosporin-treated insulin-dependent diabetics. *Lancet* 1985;i:599-602.
68. Feutren G, Papoz L, Assan R, Vialettes B, Karsenty G, Vexian P, Du Rostu H, Rodier M, Sirmaj J, Lallemand A, Bach JF. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet* 1986;ii:1119-1123.

69. Herold KC, Rubenstein AH. Immunosuppression for insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med.* 1988;318:701-703.
70. Moncada E, Subirá ML, Barbería JJ, Salvador J, Sánchez Ibarrola A, Cano I, Goñi F, Oleaga A. Inmunorregulación en la diabetes juvenil. *Rev Clin Esp.* 1988;183:61-66.
71. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, Spillar R, Radjenovic D, Johnson S. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1988;319:599-604.
72. Damiano A, Guerra J. ¿Se puede predecir la diabetes insulino dependiente?. *Rev Clin Esp.* 1990;187:439-440.
73. Rubenstein AH, Pyke D. Immunosuppression in the treatment of insulin-dependent (Type 1) diabetes. *Lancet* 1987;i:436-437.
74. Thivolet Ch. Prédiction du diabète insulino dépendant. Etude des marqueurs de risque. *Presse Méd.* 1991;20:1443-1447.
75. Editorial. Prevention of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1983;i:104-105.
76. Rossini AA. Immunotherapy for insulin-dependent diabetics?. *N Engl J Med.* 1983;308:333-335.
77. Dean BM, Walker R, Bone AJ, Cooke A, Baird JD. Predicting and preventing insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1985;i:1043.
78. Editorial. The 64 K question in diabetes. *Lancet* 1990;336:597-598.
79. Wagener DK, Sacks JM, LaPorte RE, MacGregor JM. The Pittsburgh study of insulin-dependent diabetes mellitus. Risk for diabetes among relatives of IDDM. *Diabetes* 1982;31:136-144.
80. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 1981;20:87-93.

81. Tattersall R, Pike DA. Diabetes in identical twins. *Lancet* 1972;ii:1120-1125.
82. Christy M, Green A, Christau B, Kromann H, Nerup J, Platz P, Thomsen M, Ryder LP, Svejgaard A. Studies of the HLA system and insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1979;2:209-214.
83. Wolf E, Spencer KM, Cudworth AG. The genetic susceptibility to Type 1 (insulin-dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia* 1983;24:224-230.
84. Platz P, Jakobsen BD, Morling N, Ryder LP, Svejgaard A, Thomsen M, Christy M, Kromann H, Benn J, Nerup J, Green A, Hauge M. HLA-D and DR antigens in genetic analysis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1981; 21:108-115.
85. Cudworth AG, Wolf E. The genetic susceptibility of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Clin Endocrinol Metab.* 1982;11:389-408.
86. Arnaiz-Villena A, Regueiro JR, Nieto-Cuartero JA, Ordoñez A, Serrano-Rios M. HLA and complement (C4 and Bf) allotypes in Type I and Type II Spanish diabetics. En: *Diabetes mellitus. Recent knowledge on aetiology, complications and treatment*, Baba S, Gould MK, Zimmet P (ed.). New York, Academic Press (Harcourt Brace Jovanovich, Publishers) 1984;39-48.
87. Neufeld M, Maclaren NK, Riley WJ, Lezotte D, McLaughlin JV, Silverstein J, Rosenbloom AL. Islet cell and other organ-specific antibodies in U.S. caucasians and blacks with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1980;29:589-592.
88. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA DQ_β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987;329:599-604.

89. Baisch JM, Weeks T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra JD. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1990;322:1836-1841.
90. Johnston C, Pyke DA, Cudworth AG, Wolf E. HLA-DR typing in identical twins with insulin-dependent diabetes: difference between concordant and discordant pairs. *Br Med J.* 1983; 286:253-255.
91. Ludwig H, Schernthaner G, Mayr WR. Is HLA-B7 a marker associated with a protective gene in juvenile-onset diabetes mellitus?. *N Engl J Med.* 1976;294:1066.
92. Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, Wolf E, Bottazzo GF, Cudworth AG. Can future Type I diabetes be predicted?. A study in families of affected children. *Diabetes* 1982; 31:862-866.
93. Cavender DE, Wagener DK, Rabin BS, Becker DJ, Orchard TJ, Eberhardt MS, LaPorte RE, Drash AL, Kuller LH. The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) study. HLA antigens and haplotypes as risk factors for the development of IDDM in IDDM patients and their siblings. *J Chron Dis.* 1984;37:555-568.
94. Deschamps I, Lestradet H, Busson M, Hors J. Empirical risk estimates for IDDM in siblings according to HLA genotypes and birth order. XII Congress of the International Diabetes Federation. Madrid, Spain, 23-28 September 1985. *Diabetes Res Clin Pract.* 1985;Suppl. 1:S134 (Abstract).
95. Serrano-Rios M, Rigueiro JR, Severino R, López-Larrea C, Arnaiz-Villena A. HLA antigens in insulin dependent and non-insulin dependent Spanish diabetic patients. *Diabete & Metabolisme (Paris)* 1983;9:116-120.
96. Ryder LP, Svejgaard A. Genetics of HLA disease association. *Ann Rev Genet.* 1981;15:169-187.

97. Bignon JD, Semana G, Bardet S, Cheneau ML, Maugendre D, Fauchet R, Muller JY, Genetet B, Allannic A, Sai P. Genetic susceptibility linked to DR4 haplotypes in diabetes of Type-1a or associated with polyendocrinopathies (Type-1b). *Tissue Antigens* 1991;38:183-185.
98. MacDonald MJ, Gottschall JL, Hunter JB, Winter KL, Blank JL, Mason EP, Maby S. Insulin dependent diabetes: HLA-DR4 is a primary risk factor and HLA-DR3 is largely secondary. XII Congress of the International Diabetes Federation. Madrid, Spain, 23-28 September 1985. *Diabetes Res Clin Pract.* 1985;Suppl. 1:S350(Abstract).
99. Sachs JA, Cudworth AG, Jaraquemada D, Gorsuch AN, Festenstein H. Type 1 diabetes and the HLA-D locus. *Diabetologia* 1980;18:41-43.
100. Bennett PH. Changing concepts of the epidemiology of insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1):29-33.
101. Ferns GAA, Trembath RC, Hitman GA, Galton DJ. Genetics of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986; 29: 204.
102. Hitman GA, Tarn AC, Winter RM, Drummond V, Williams LG, Jowett NI, Bottazzo GF, Galton DJ. Type 1 (insulin-dependent) diabetes and a highly variable locus close to the insulin gene on chromosome 11. *Diabetologia* 1985; 28: 218-222.
103. Bell GI, Horita S, Karam JH. A highly polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984;33:176-183.
104. Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Brown JA, Shows TB. The insulin gene is located on the short arm of chromosome 11 in humans. *Diabetes* 1981;30:267-270.
105. Schernthaner G, Mayr WR. Immunoglobulin allotype markers and HLA DR genes in Type I diabetes mellitus. *Metab Clin Exp.* 1984;33:833-836.

106. Schernthaner G, Mayr WR. Immunoglobulin allotype markers and HLA DR genes in Type I diabetes mellitus. *Metabolism* 1984;33:833-836.
107. Rich SS, Weitkamp LR, Guttormsen S, Barbosa J. Gm, Km, and HLA in insulin-dependent Type I diabetes mellitus. A log-linear analysis of association. *Diabetes* 1986;35:927-932.
108. Michelson B, Lernmark Å. Molecular cloning of a polymorphic DNA endonuclease fragment associates insulin-dependent diabetes with HLA-DQ. *J Clin Invest.* 1987;75:1144-1152.
109. Owerbach D, Hägglöf B, Lernmark Å, Holmgren G. Susceptibility to insulin-dependent diabetes defined by restriction enzyme polymorphism of HLA-D region genomic DNA. *Diabetes* 1984;33:958-965.
110. Owerbach D, Gunn S, Ty G, Wible L, Gabbay KH. Oligonucleotide probes for HLA-DQA and DQB genes define susceptibility to Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1988;31:751-757.
111. Kirk RL, Serjeantson SW, Theophilus J, Zimmet P, Whitehouse S, Court JM. Age relationship between insulin-dependent diabetes and rare alleles of properdin factor B. *Lancet* 1979;ii:537.
112. de Mouzon A, Ohayon E, Ducos J, Hauptmann G. Bf and C4 markers for insulin-dependent diabetes in Basques. *Lancet* 1979;ii:1364.
113. Bertrams J, Baur MP, Grüneklee D, Gries FA. Association of BfF1, HLA-B18 and insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1979;ii:98.
114. Bertrams J, Sodemann P, Grüneklee D, Gries FA. Bf in early-onset insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1979;ii:1240.
115. Barbosa J, Weitkamp L, Guttormsen S, Johnson S, Szalapski E. Bf in early-onset insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1979;ii:1239-1240.

116. Bertrams J, Baur MP, Grüneklee D, Gries FA. Age-related association of insulin-dependent diabetes mellitus with BfF1 and the HLA-B18, BfF1 haplotype. *Diabetologia* 1981; 21:47-49.
117. Raum D, Alper CA, Stein R, Gabbay KH. Genetic marker for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1979;i:1208-1210.
118. Deschamps I, Lestradet H, Marcelli-Barge A, Benajam A, Busson M, Hors J, Dausset J. Properdin factor B alleles as markers for insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1979;ii:793.
119. Deschamps I, Lestradet H, Bonaïti C, Schmid M, Busson M, Benajam A, Marcelli-Barge A, Hors J. HLA genotype studies in juvenile insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 1980; 19:189-193.
120. Vergani D, Johnston C, B-Abdullah N, Barnett AH. Low serum C4 concentrations: an inherited predisposition to insulin dependent diabetes?. *Br Med J.* 1983;286:926-928.
121. Barnett AH, Mijovic C, Fletcher J, Chesner I, Kulkuska-Langlands BM, Holder R, Bradwell AR. Low plasma C4 concentrations: association with microangiopathy in insulin dependent diabetes. *Br Med J.* 1984;289:943-945.
122. Rich S, O'Neill G, Dalmaso AP, Nerl C, Barbosa J. Complement and HLA. Further definition of high-risk haplotypes in insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1985;34: 504-509.
123. Barbosa J, O'Neill G, Nerl C, Rich S. New genetic marker for Type I diabetes is shared by rheumatoid arthritis: complement C4B2.9. *Diabetes* 1983;32 (suppl. 1):45A.
124. McCluskey J, McCann VJ, Kay PH, Zilko PJ, Christiansen FT, O'Neill GJ, Dawkins RL. HLA and complement allotypes in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1983;24: 162-165.

125. Sheehy MJ, Rowe JR, Fuller TC, Yunis EJ, Gabbay KH. A minor subset of HLA-DR3 haplotypes is preferentially increased in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1985; 28: 891-894.
126. Ahuja MMS, Bhatia E, Mehra NK. Histocompatible antigens (HLA-DR) and autoimmunity in IDDM in India. XII Congress of the International Diabetes Federation. Madrid, Spain, 23-28 September 1985. *Diabetes Res Clin Pract.* 1985;Suppl. 1:S7 (Abstract).
127. Famuyiwa OO, Nwabuebo IE, Abioye AA. Pattern of histocompatibility (HLA) antigen distribution among Nigerian (West African black) diabetics. *Diabetes* 1982; 31: 1119-1122.
128. MacDonald MJ, Famuyiwa OO, Nwabuebo IA, Bella AF, Junaid TA, Marrari M, Duquesnoy RJ. HLA-DR associations in Black Type I diabetics in Nigeria. Further support for models of inheritance. *Diabetes* 1986;35:583-589.
129. Greenberg DA. Will a three-allele model of inheritance explain the HLA data for Type 1 (insulin-dependent) diabetes?. *Diabetologia* 1985;28:122-127.
130. Rimoin DL. Herencia en diabetes sacarina. En: *Diabetes sacarina. Clínicas Médicas de Norteamérica (edición en español)*, Bondy PK, Felig P (ed.). México, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. 1971;807-819.
131. Rotter JI, Anderson CE, Rubin R, Congleton JE, Terasaki PI, Rimoin DL. HLA genotypic study of insulin-dependent diabetes. The excess of DR3/DR4 heterozygotes allows rejection of the recessive hypothesis. *Diabetes* 1983;32: 169-174.
132. Rubinstein P, Suciu-Foca N, Nicholson JF. Genetics of juvenile diabetes mellitus. A recessive gene closely linked to HLA D and with 50 per cent penetrance. *N Engl J Med.* 1977;297:1036-1040.

133. Rubinstein P, Ginsberg-Fellner F, Falk C. Genetics of Type I diabetes mellitus: a single, recessive predisposition gene mapping between HLA-B and GLO. *Am J Hum Genet.* 1981; 33:865-882.
134. Rotter JI. The modes of inheritance of insulin-dependent diabetes mellitus. The genetics of IDDM, no longer a nightmare but still a headache. *Am J Hum Genet.* 1981;33: 835-851.
135. Hodge SE, Rotter JI, Lange KL. A three-allele mode heterogeneity in juvenile-onset insulin-dependent diabetes. *Ann Hum Genet.* 1980;43:399-412.
136. Feingold J. Genetics of diabetes mellitus. *Diabete Metabol.* 1975;1:123-129.
137. Bloom A, Hayes TM, Gamble DR. Register of newly diagnosed diabetic children. *Br Med J.* 1975;3:580-583.
138. Nerup J, Christy M, Kromann H, Platz P, Ryder LP, Thomsen M, Svejgaard A. HLA and insulin-dependent diabetes mellitus. *Postgrad Med J.* 1979;55(suppl. 2):8-13.
139. Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR. Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med.* 1984; 311:149-152.
140. Köbberling J, Brüggerboes B. Prevalence of diabetes among children of insulin-dependent diabetic mothers. *Diabetologia* 1980;18:459-462.
141. Fenger K, Sørensen SA. Evaluation of a possible sex difference in recombination for the ABO-AK linkage. *Am J Hum Genet.* 1975;27:784-788.
142. Elston RC, Lange K, Namboodiri KK. Age trends in human chiasma frequencies and recombination fractions. II. Method for analyzing recombination fractions and applications to the ABO: Nail-Patellalinkage. *Am J Hum Genet.* 1976;28:69-76.

143. Kitzmiller JL, Cloherty JP, Younger MD, Tabatabaïi A, RothchildSB, Sosenko I, Epstein MF, Singh S, Neff RK. Diabetic pregnancy and perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol.* 1978;131:560-580.
144. Vadheim CM, Rotter JI, Maclaren NK, Riley WJ, Anderson CE. Preferential transmission of diabetic alleles within the HLA gene complex. *N Engl J Med.* 1986;315:1314-1318.
145. Damiano A, Lledó G, Guerra J, Serrano Rios M, Hawkins F, Martín Villa JM, Vicario JL, Arnaiz Villena A. Preferential transmission of diabetic HLA alleles is not found in healthy Spanish parents. *International Meeting on Pre-Type I Diabetes, Barcelona, 1989.*
146. Arslanian SA, Becker DJ, Rabin B, Atchison R, Eberhardt M, Cavender D, Dorman J, Drash AL. Correlates of insulin antibodies in newly diagnosed children with insulin-dependent diabetes before insulin therapy. *Diabetes* 1985; 34:926-930.
147. LeCompte PM. "Insulitis" in early juvenile diabetes. *Arch Pathol Lab Med.* 1958;66:450-457.
148. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1965;14:619-633.
149. Gepts W, LeCompte PM. The pancreatic islets in diabetes. *Am J Med.* 1981;70:105-115.
150. Lernmark Å, Baekkeskov S. Islet cell antibodies - Theoretical and practical implications. *Diabetologia* 1981;21:431-435.
151. Huang S, Maclaren NK. Insulin-dependent diabetes: a disease of autoaggression. *Science* 1976;192:64-66.
152. de Berardinis P, Londei M, James RFL, Lake SP, Wise PH, Feldmann M. Do CD4-positive cytotoxic T cells damage islet β cells in Type 1 diabetes?. *Lancet* 1988;ii:823-824.
153. Editorial. Do T cells cause IDDM?. *Lancet* 1988;ii:661-662.

154. Irvine WJ, Clarke BF, Scarth L, Cullen DR, Duncan LJP. Thyroid and gastric autoimmunity in patients with diabetes mellitus. *Lancet* 1970;ii:163-168.
155. Bottazzo GF, Doniach D. Pancreatic autoimmunity and HLA antigens. *Lancet* 1976;ii:800.
156. Eisenbarth GS, Wilson PW, Ward F, Buckley C, Lebovitz H. The polyglandular failure syndrome: disease inheritance, HLA type, and immune function. Studies in patients and families. *Ann Intern Med.* 1979;91:528-533.
157. Cudworth AG. The HLA system, autoimmune endocrinopathy and diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 1978;8:355-357.
158. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PGF, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med.* 1985;313:353-360.
159. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, Mackay EH. Direct evidence of various immunological phenomena associated with the "insulinitis" process. *Diabetologia* 1983;25:142-143 (Abstract).
160. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. The histopathology of the pancreas in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 1986;29:267-274.
161. Foulis AK. The pathogenesis of beta cell destruction in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Pathol.* 1987;152:141-148.
162. Alviggi L, Johnston C, Hoskins PJ, Tee DEH, Pyke DA, Leslie RDG, Vergani D. Pathogenesis of insulin-dependent diabetes: a role for activated T lymphocytes. *Lancet* 1984;ii:4-6.
163. Leslie RDG, Lazarus NR, Vergani D. Events leading to insulin-dependent diabetes. *Clin Sci.* 1989;76:119-124.

164. Bottazzo GF, Dean BM, Gorsuch AN, Cudworth AG, Doniach D. Complement-fixing islet-cell antibodies in Type-I diabetes: possible monitors of active Beta-cell damage. *Lancet* 1980; i:668-672.
165. Wilkin T, Hoskins PJ, Armitage M, Rodier M, Casey C, Diaz JL, Pyke DA, Leslie RDG. Value of insulin autoantibodies as serum markers for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1985;i:480-482.
166. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 1983;222:1337-1339.
167. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;ii:1279-1283.
168. Keller U, Beglinger Ch, Berger W. Identification of subjects with a high risk of developing Type 1 (insulin-dependent) diabetes. Summary of a Workshop held on 25 May 1984 at the Children's Hospital, Basel, Switzerland. *Diabetologia* 1985;28:57-58.
169. Pujol Borrell R. Hacia la estandarización de los anticuerpos anticélulas de los islotes pancreáticos. *Med Clin (Barc)* 1986;87:633-634.
170. Nayak RC, Omar MAK, Rabizadeh A, Srikanta S, Eisenbarth GS. "Cytoplasmic" islet cell antibodies. Evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugate. *Diabetes* 1985; 34:617-619.
171. Lendrum R, Walker G, Cudworth AG, Theophanides C, Pyke DA, Bloom A, Gamble DR. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet* 1976;ii:1273-1276.
172. Riley W, Maclaren N. Islet-cell antibodies are seldom transient. *Lancet* 1984;i:1351-1352.

173. Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A, Soeldner JS, Eisenbarth GS. First-degree relatives of patients with Type I diabetes mellitus: islet-cell antibodies and abnormal insulin secretion. *N Engl J Med.* 1985;313:461-464.
174. Riley W, Hitchcock C, Alamo A, Barbour H. Islet cell autoantibodies (ICA) in "prediabetes"; metabolic and immunologic studies. *Diabetes* 1985;34 (suppl. 1): 65A.
175. Montaña E, Nonell F, Fernandez J, Recasens A, Gomis R. Prediabetes in mediterranean first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes Care* 1989;12:440-441.
176. Ginsberg-Fellner F, Dobersen MJ, Witt ME, Rayfield EJ, Rubinstein P, Notkins AL. HLA antigens, cytoplasmic islet cell antibodies, and carbohydrate tolerance in families of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1982;31:292-298.
177. Srikanta S, Ganda OP, Gleason RE, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Pre-Type I diabetes. Linear loss of beta cell response to intravenous glucose. *Diabetes* 1984;33:717-720.
178. Maclaren NK, Horne G, Spillar RP, Barbour D, Harrison D, Duncan J. Islet cell antibodies (ICA) in U.S. school children. *Diabetes* 1985;34 (suppl. 1):84A.
179. Yamaguchi Y, Chikuba N, Ueda Y, Yamamoto H, Yamasaki H, Nakanishi T, Akazawa S, Nagataki S. Islet cell antibodies in patients with autoimmune thyroid disease. *Diabetes* 1991;40:319-322.
180. Kratzsch G, Goldmann S, Töpfer A, Moncayo R. Association of HLA CW7 with decreased prevalence of islet cell antibodies in IDDM. XII Congress of the International Diabetes Federation. Madrid, Spain, 23-28 September 1985. *Diabetes Res Clin Pract.* 1985;Suppl. 1:S317 (Abstract).

181. Lernmark Å, Freedman ZR, Hofmann C, Rubenstein AH, Steiner DF, Jackson RL, Winter RJ, Traisman HS. Islet-cell-surface antibodies in juvenile diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1978;299:375-380.
182. Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Cudworth AG, Bottazzo GF. Islet-cell surface antibodies and the natural history of Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1982; 23:194A.
183. Dobersen MJ, Scharff JE, Ginsberg-Fellner F, Notkins AL. Cytotoxic autoantibodies to Beta cells in the serum of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1980;303:1493-1498.
184. Pozilli P, Sensi M, Gorsuch A, Bottazzo GF, Cudworth AG. Evidence for raised K-cell levels in Type-I diabetes. *Lancet* 1979;ii:173-175.
185. Toguchi Y, Ginsberg-Fellner F, Rubinstein P. Cytotoxic islet cell surface antibodies (ICSA) in patients with type I diabetes and their first-degree relatives. *Diabetes* 1985; 34:855-860.
186. Palmer JP, Asplin CM, Raghu PK, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, McKnight B, Paquette T, Sperling M, Baker L, Guthrie R. Anti-insulin antibodies in insulin dependent diabetics before insulin treatment. A new marker for autoimmune β cell damage?. International Symposium. Campidoglio, Rome, Italy, March 15-17, 1984. *Immunology in Diabetes '84* 1984;89 (Abstract).
187. Bergman S, Ludvigsson J, Binder Ch, Mandrup-Poulsen T. Insulin antibodies before treatment in ICA-positive children with IDDM. XII Congress of the International Diabetes Federation. Madrid, Spain, 23-28 September 1985. *Diabetes Res Clin Pract.* 1985;Suppl.1:S45 (Abstract).
188. Karjalainen J, Knip M, Mustonen A, Ilonen J, Åkerblom K. Relation between insulin antibody and complement-fixing islet cell antibody at clinical diagnosis of IDDM. *Diabetes* 1986;35:620-622.

189. Atkinson MA, Maclaren NK, Riley WJ, Winter WE, Fisk DD, Spillar RP. Are insulin autoantibodies markers for insulin-dependent diabetes mellitus?. *Diabetes* 1986;35:894-898.
190. Dean BM, Gale E, Bottazzo GF. Insulin autoantibodies during the prediabetic period. *Diabetologia* 1986;29:753.
191. Dean BM, Becker F, McNally JM, Tarn AC, Schwartz G, Gale EAM, Bottazzo GF. Insulin autoantibodies in the prediabetic period: Correlation with islet-cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia* 1986;29:339-342.
192. Ludvigsson J, Binder C, Mandrup-Poulsen T. Insulin autoantibodies are associated with islet cell antibodies; their relation to insulin antibodies and β -cell function in diabetic children. *Diabetologia* 1988;31:647-651.
193. Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herskowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Concentration of insulin autoantibodies at onset of Type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 1988;11:736-739.
194. Schernthaner G, Borkenstein M, Fink M, Mayr WR, Menzel J, Schuber E. Immunogenicity of human insulin (Novo) or pork monocomponent insulin in HLA-DR typed insulin-dependent diabetic individuals. *Diabetes Care* 1983;6(suppl. 1):43-48.
195. Hoogwerf BJ, Rich SS, Barbosa JJ. Meal-stimulated C-peptide and insulin antibodies in Type I diabetic subjects and their nondiabetic siblings characterized by HLA-DR antigens. *Diabetes* 1985;34:440-445.
196. Reeves WG, Barr D, Douglas CA, Gelsthorpe K, Hanning I, Skene A, Wells L, Wilson RM, Tattersall RB. Factors governing the human response to injected insulin. *Diabetologia* 1984;26:266-271.
197. McEvoy RC, Witt ME, Ginsberg-Fellner F, Rubinstein P. Anti-insulin antibodies in children with Type I diabetes mellitus. Genetic regulation of production and presence at diagnosis before insulin replacement. *Diabetes* 1986;35:634-641.

198. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EAM, Bottazzo GF. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990;335:147-149.
199. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter JI. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med.* 1990;323:1167-1172.
200. Ilonen J, Mustonen A, Åkerblom HK, Huttunen NP. Complement-fixing islet-cell antibodies before and after onset of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1980;ii:805.
201. Riley WJ, Neufeld M, Maclaren NK. Complement-fixing islet-cell antibodies: a separate species?. *Lancet* 1980;i:1133.
202. Tarn AC, Thomas JM, Dean BM, Ingram D, Schwarz G, Bottazzo GF, Gale EAM. Predicting insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1988;i:845-850.
203. Bruining GJ, Molenaar JL, Grobbee DE, Hofman A, Scheffer GJ, Bruining HA, de Bruyn AM, Valkenburg HA. Ten-year follow-up study of islet-cell antibodies and childhood diabetes mellitus. *Lancet* 1989;i:1100-1103.
204. Bergua M, Solé J, Marion G, Perez MC, Recasens A, Fernández J, Casamitjana R, Gomis R. Prevalence of islet cell antibodies, insulin antibodies and hyperglycaemia in 2291 schoolchildren. *Diabetologia* 1987;30:724-726.
205. Bottazzo GF, Gleichmann H. Immunology and Diabetes Workshops: report of the first international workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies. Summary of a workshop organised by the Juvenile Diabetes Foundation International held in Monte Carlo on 31 October and 1 November 1985. *Diabetologia* 1986;29:125-126.

206. Bonifacio E, Dawkins RL, Lernmark Å. Immunology and diabetes workshops: report of the second International Workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies. Summary of a workshop organised by the Immunology and Diabetes Workshops Committee, supported in part by the Juvenile Diabetes Foundation International, and held at the "Science at Sea - 1987" meeting in Perth, Western Australia, from 20-22 January 1987. *Diabetologia* 1987;30:273.
207. Gleichmann H, Bottazzo GF. Progress toward standardization of cytoplasmic islet cell-antibody assay. *Diabetes* 1987;36: 578-584.
208. Baekkeskov S, Landin M, Kristensen JK, Srikanta S, Bruining GJ, Mandrup-Poulsen T, de Beaufort C, Soeldner JS, Einsenbarth G, Lindgren F, Sundquist G, Lernmark Å. Antibodies to a 64,000 M_r human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 1987;79:926-934.
209. Christie M, Landin-Olsson M, Sundkvist G, Dahlquist G, Lernmark Å, Baekkeskov S. Antibodies to a M_r -64 000 islet cell protein in Swedish children with newly diagnosed Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1988;31:597-602.
210. Atkinson MA, Maclaren NK. Autoantibodies in non obese diabetic mice immunoprecipitate 64,000 M_r islet cell antigen. *Diabetes* 1988;37:1587-1590.
211. Atkinson MA, Maclaren NK, Scharp DW, Lacy PE, Riley WJ. 64 000 M_r autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990;335:1357-1360.
212. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 1982;298:167-169.

213. Baekkeskov S, Dyrberg T, Lernmark Å. Autoantibodies to a 64-kilodalton islet cell protein precede the onset of spontaneous diabetes in the BB rat. *Science* 1984;224:1348-1350.
214. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990;347:151-156.
215. Jones DB, Hunter NR, Duff GW. Heat-shock protein 65 as a β cell antigen of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990;336:583-585.
216. Maron R, Elias D, de Jongh BM, Bruining GJ, van Rood JJ, Schechter Y, Cohen IR. Autoantibodies to the insulin receptor in juvenile onset insulin-dependent diabetes. *Nature* 1983;303:817-818.
217. MacCuish AC, Barnes EW, Irvine WJ, Duncan LJP. Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet* 1974;ii:1529-1531.
218. Wilkin TJ, Hammonds P, Mirza I, Bone AJ, Webster K. Graves' disease of the β cell: glucose dysregulation due to islet-cell stimulating antibodies. *Lancet* 1988;ii:1155-1158.
219. Nerup J, Lernmark Å. Autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med.* 1981;70:135-141.
220. Fairchild RS, Kyner JL, Abdou NI. Specific immunoregulation abnormality in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lab Clin Med.* 1982;99:175-186.
221. Winter WE, Maclaren NK. Type I insulin dependent diabetes: An autoimmune disease that can be arrested or prevented with immunotherapy?. En: *Advances in Pediatrics*, Barness LA (ed.). Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc. 1985;32: 159-175.

222. Mandrup-Poulsen T, Benotzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH. Affinity-purified human Interleukin I is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia* 1986;29:63-67.
223. Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Helqvist S, Wogensen L, Egeberg J. Mechanisms of pancreatic-cell destruction in Type I diabetes. *Diabetes Care* 1988;11 (suppl. 1):16-23.
224. Kaye WA, Adri MNS, Soeldner JS, Rabinowe SL, Kaldany A, Kahn CR, Bistrrian B, Srikanta S, Ganda OP, Eisenbarth GS. Acquired defect in interleukin-2 production in patients with Type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1986;315:920-924.
225. Luger A, Schernthaner G, Luger TA. Lymphokine production in insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 1985;15:A1.
226. Bottazzo G, Cudworth A, Moul D, Doniach D, Festenstein H. Evidence for a primary autoimmune type of diabetes mellitus. *Br Med J.* 1978;2:1253-1255.
227. Dahlquist G, Blom L, Tuvemo T, Nyström L, Sandström A, Wall S. The Swedish childhood diabetes study - Results from a nine years case register and a one years case-referent study indicating that Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and autoimmune disorders. *Diabetologia* 1989;32:2-6.
228. Maclaren NK, Riley WJ. Thyroid, gastric, and adrenal autoimmunities associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1):34-38.
229. Betterle C, Rigon F, Pedini B, Orsolon PG, Zanette F. Autoimmune manifestations in Type I diabetic patients and in their first-degree relatives: incidence and significance. International Symposium. Campidoglio, Rome, Italy, March 15-17, 1984. *Immunology in Diabetes '84* 1984;10 (Abstract).

230. Riley WJ, Maclaren NK, Lezotte DC, Spillar RP, Rosenbloom AL. Thyroid autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus: The case for routine screening. *J Pediatr.* 1981; 99:350-354.
231. Goldstein DE, Drash A, Gibbs J, Blizzard RM. Diabetes mellitus: the incidence of circulating antibodies against thyroid, gastric and adrenal tissue. *J Pediatr.* 1970; 77:304-306.
232. Editorial. Thyroid disease in young diabetics. *Lancet* 1982; 1:1285-1286.
233. Riley WJ, Toskes PP, Maclaren NK, Silverstein JH. Predictive value of gastric parietal cell autoantibodies as a marker for gastric and hematologic abnormalities associated with insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982; 31:1051-1055.
234. Riley WJ, Maclaren NK, Neufeld M. Adrenal autoantibodies and Addison disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr.* 1980;97:191-195.
235. Cacciari E, Salardi S, Volta U, Biasco G, Partesotti S, Mantovani W, Cicognani A, Tonioli S, Tassoni P, Pirazzoli P, Bianchi FB, Barboni F, Pisi E. Prevalence and characteristic of coeliac disease in Type 1 diabetes mellitus. *Acta Paediatr Scand.* 1987;76:671-672.
236. Volta U, Bonazzi C, Pisi E, Salardi S, Cacciari E. Antigliadin and antireticulin antibodies in coeliac disease and at onset of diabetes in children. *Lancet* 1987;ii:1034-1035.
237. Mirakian R, Cudworth AG, Bottazzo GF, Richardson CA, Doniach D. Autoimmunity to anterior pituitary cells and the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1982;i:755-759.
238. Adams DD, Adams YJ, Knight JG, McCall J, White P, Horrocks R, van Loghem E. A solution to the genetic and environmental puzzles of insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1984;i:420-424.

239. Burch PRJ. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1984;i:967.
240. Editorial. Inheritance of virus-induced diabetes mellitus. *Lancet* 1976;ii:28-29.
241. Wattré P. Virus et diabète juvénile. *Sem Hôp Paris* 1984;60:1153-1161.
242. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med.* 1979;300:1173-1179.
243. Dahlquist G, Blom L, Holmgren G, Hägglöf B, Larsson Y, Sterky G, Wall S. The epidemiology of diabetes in Swedish children 0-14 years. A six-year prospective study. *Diabetologia* 1985;28:802-808.
244. Gamble DR, Taylor KW. Seasonal incidence of diabetes mellitus. *Br Med J.* 1969;3:631-633.
245. Karam JH, Lewitt PA, Young CW, Novlain RE, Frankel BJ, Fujiya H, Freedman JR, Grodsky GM. Insulinopenic diabetes after rodenticide (Vacor) ingestion. A unique model of acquired diabetes in man. *Diabetes* 1980;29:971-980.
246. Recommendations from the International Workshop on the epidemiology of insulin-dependent diabetes mellitus. Philadelphia, Pennsylvania. October 1983. *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1):5-9.
247. Tarn AC, Smith CP, Spencer KM, Bottazzo GF, Gale EAM. Type I (insulin dependent) diabetes: a disease of slow clinical onset?. *Br Med J.* 1987;294:342-345.
248. Bottazzo GF. Death of a beta cell: homicide or suicide?. *Diabetic Med.* 1986;3:119-130.

249. Weinber CR, Dornan TL, Hansen JA, Raghu PK, Palmer JP. HLA-related heterogeneity in seasonal patterns of diagnosis in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1984;26: 199-202.
250. Schernthaner G, Banatvala JE, Scherbaum W, Bryant J, Borkenstein M, Schober E, Mayr WR. 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;ii:630-632.
251. Buschard K, Madsbad S. Prospective study of virus antibodies in newly diagnosed Type I diabetic patients. International Symposium. Campidoglio, Rome, Italy, March 15-17, 1984. *Immunology in Diabetes '84* 1984;19 (Abstract).
252. King ML, Bidwell D, Voller A, Bryant J, Banatvala JE. Role of coxsackie B viruses in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1983;ii:915-916.
253. King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; Type I) diabetes mellitus. *Lancet* 1983;i:1397-1399.
254. Hazra DK, Singh R, Wahal PK, Lahiri V, Gupta MK, Jain NK, Elhence BR. Coxsackie antibodies in young Asian diabetics. *Lancet* 1980;i:877.
255. Schernthaner G, Banatvala JE, Scherbaum W, Mayr WR, Borkenstein M, Schober E. Coxsackie B virus specific IgM responses, complement-fixing islet cell antibodies, and HLA DR antigens in newly diagnosed Type I diabetics: A one-year follow-up study of C-peptide secretion in 94 patients. International Symposium. Campidoglio, Rome, Italy, March 15-17, 1984. *Immunology in Diabetes '84* 1984;102-103 (Abstract).

256. Banatvala JE, Bryant J, Schernthaner G, Borckenstein M, Schober E, Brown D, De Silva LM, Menser MA, Silink M, Cocksackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia. *Lancet* 1985;i:1409-1412.
257. Rubinstein P, Walker ME, Fedun B, Witt ME, Cooper LZ, Ginsberg-Fellner F. The HLA system in congenital rubella patients with and without diabetes. *Diabetes* 1982;31:1088-1091.
258. LaPorte RE, Tajima N, Åkerbloom HK, Berlin N, Brosseau J, Christy M, Drash AL, Fishbein H, Green A, Hamman R, Harris M, King H, Laron Z, Neil A. Geographic differences in the risk of insulin-dependent diabetes mellitus: the importance of registries. *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1):101-107.
259. Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune Type 1 diabetes. *Lancet* 1988;ii:1-4.
260. Harrison LC, Campbell IL. Persistent virus infection and Type 1 diabetes. *Lancet* 1988;ii:450.
261. Nigro G, Campea L, Midulla M. Persistent virus infection and Type 1 diabetes. *Lancet* 1988;ii:450-451.
262. Yoon JW, Ray UR. Perspectives on the role of viruses in insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care* 1985;8 (suppl. 1):39-44.
263. Bodansky HJ, Grant PJ, Dean BM, McNally J, Bottazzo GF, Hambling MH, Wales JK. Islet-cell antibodies and insulin autoantibodies in association with common viral infections. *Lancet* 1986;ii:1351-1353.
264. Bodansky HJ, Littlewood JM, Bottazzo GF, Dean BM, Hambling MH. Which virus causes the initial islet lesions in Type 1 diabetes?. *Lancet* 1984;i:401-402.

265. Helmke K, Otten A, Willems WR, Brockhaus R, Mueller-Eckhardt G, Stief T, Bertrams J, Wolf H, Federlin K. Islet cell antibodies and the development of diabetes mellitus in relation to mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 1986;29:30-33.
266. Ratzmann KP. Autoimmunity and development of diabetes mellitus in relation to mumps infection. *Diabetologia* 1986; 29:673-674.
267. Champsaur HF, Bottazzo GF, Bertrams J, Assan R, Bach C. Virologic, immunologic, and genetic factors in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediat.* 1982;100:15-20.
268. Bruserud Ø, Jervell J, Thorsby E. HLA-DR3 and -DR4 control T-lymphocyte responses to mumps and coxsackie B4 virus: studies on patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes and healthy subjects. *Diabetologia* 1985;28:420-426.
269. Jenson AB, Rosenberg HS, Notkins AL. Pancreatic islet-cell damage in children with fatal viral infections. *Lancet* 1980;ii:354-358.
270. Spencer KM, Tarn A, Dean BM, Lister J, Bottazzo GF. Fluctuating islet-cell autoimmunity in unaffected relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1984; ii:764-766.
271. Notkins AL, Onodera T, Prabhakar B. Virus-induced autoimmunity. En: *Concepts in viral pathogenesis*, Notkins AC, Oldstone MBA (ed.). New York, Springer Verlag 1984; 210-215.
272. Notkins AL, Yoon JW. Virus-induced diabetes mellitus. En: *Concepts in viral pathogenesis*, Notkins AC, Oldstone MBA (ed.). New York, Springer Verlag 1984;241-247.
273. Yoon JW, McClintock PR, Bachurski CJ, Longstreth JD, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus. No evidence for immune mechanisms in the destruction of β -cells by the D-variant of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* 1985;34: 922-925.

274. Vaandrager GJ, Molenaar JL, Bruining GJ, Plantinga AD, Ruitenbergh EJ. Islet cell antibodies, mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 1986;29:406.
275. Helmke K, Federlin K, Otten A, Willems WR. Islet cell antibodies, mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 1986;29:407.
276. McEvoy RC, Andersson J, Sandler S, Hellerström C. Multiple low-dose streptozotocin induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. *J Clin Invest.* 1984;74:715-722.
277. Helgason T, Jonasson MR. Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes. *Lancet* 1981;ii:716-720.
278. Elliot RB, Martin JM. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat?. *Diabetologia* 1984;26:297-299.
279. Green A, Borch-Johnsen K, Andersen PK, Hougaard P, Keiding N, Kreiner S, Deckert T. Relative mortality of Type 1 (insulin-dependent) diabetes in Denmark: 1933-1981. *Diabetologia* 1985;28:339-342.
280. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039-1057.
281. WHO Expert Committee on diabetes mellitus. Second report. Technical Report Series 1980;nº 646.
282. Mittal KK, Mickey MR, Signal DP, Terasaki PI. Serotyping for homotransplantation. XVIII. Refinement of microdroplet lymphocytoxicity test. *Transplantation* 1968;6:913-927.
283. Danilovs JA, Ayoub G, Terasaki PI. B lymphocyte isolation by thrombin - nylon wool. En: *Histocompatibility Testing*, Terasaki PI (ed.). Los Angeles, UCLA Tissue Typing Lab. 1980;287-288.

284. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest.* 1960;39:1157-1175.
285. Rubinstein P, Suciú-Foca N, Nicholson JF, Fotino M, Molinaro A, Harisiadis L, Hardy MA, Reemtsma K, Allen FH. The HLA system in the families of patients with juvenile diabetes mellitus. *J Exp Med.* 1976;143:1277-1282.
286. Bhatia E, Mehra NK, Taneja V, Vaidya MC, Ahuja MMS. HLA-DR antigen frequencies in a North Indian Type I diabetic population. *Diabetes* 1985;34:565-567.
287. Grundbacher FJ. Genetics of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:203.
288. Sheehy MJ, Rowe JR, MacDonald MJ. A particular subset of HLA-DR4 accounts for all or most of the DR4 association in Type I diabetes. *Diabetes* 1985;34:942-944.
289. Bennett D. The T-locus of the mouse. *Cell* 1975;6:441-454.
290. Cudworth AG, Wolf E, Gorsuch AN, Festenstein H. A new look at HLA genetics with particular reference to Type 1 diabetes. *Lancet* 1979;ii:389-391.
291. Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Cepaitis Z, Lounamaa R, The DIME Study Group. New susceptibility haplotype for Type 1 diabetes. *Lancet* 1989;ii:299-302.
292. Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA, Brink SJ, Fleischnick E, Yunis E, Alper C, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Pre-Type 1 (insulin-dependent) diabetes: common endocrinological course despite immunological and immunogenetic heterogeneity. *Diabetologia* 1984;27:146-148.
293. Irvine WJ, McCallum CJ, Gray RS, Campbell CJ, Duncan LJP, Farquhar JW, Vaughan H, Morris PJ. Pancreatic islet-cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease, and HLA type. *Diabetes* 1977;26:138-147.

294. Marner B, Agner T, Binder C, Lernmark Å, Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Walldorff S. Increased reduction in fasting C-peptide is associated with islet cell antibodies in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1985; 28:875-880.
295. Pujol-Borrell R, Richart C, Martín C, Martínez-Vázquez JM, Bottazzo GF. Islet cell antibodies in Spanish diabetics. *Lancet* 1978;ii:268.
296. Landin-Olsson M, Karlsson A, Dahlquist G, Blom L, Lernmark Å, Sundkvist G. Islet cell and other organ-specific autoantibodies in all children developing Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Sweden during one year and in matched control children. *Diabetologia* 1989;32:387-395.
297. Drell DW, Notkins AL. Multiple immunological abnormalities in patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1987;30:132-143.
298. Notsu K, Oka N, Note S, Nabeya N, Kuno S, Sakurami T. Islet cell antibodies in the Japanese population and subjects with Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1985;28:660-662.
299. Del Prete GF, Betterle C, Padovan D, Erle G, Toffolo A, Bersani G. Incidence and significance of islet-cell autoantibodies in different types of diabetes mellitus. *Diabetes* 1977;26:909-915.
300. Takahashi A, Tsujihata M, Yokota A, Yamaguchi Y, Ueda Y, Akazawa S, Miyake S, Nagataki S. A new method of detection of islet cell antibodies (ICA) using peroxidase-labeled protein A, and incidence of ICA in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:378-382.
301. Thivolet C, Beaufrère B, Geburher L, Chatelain P, Orgiazzi J, François R. Autoantibodies and genetic factors associated with the development of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in first degree relatives of diabetic patients. *Diabetologia* 1991;34:186-191.

302. Barbosa J, Chavers B, Dunsworth T, Michael A. Islet cell antibodies and histocompatibility antigens (HLA) in insulin-dependent diabetics and their first-degree relatives. *Diabetes* 1982;31:585-588.
303. Orchard TJ, Wagener DK, Rabin BS, LaPorte RE, Cavender D, Kuller LH, Drash AL, Becker DJ. Glucose tolerance in siblings of Type 1 diabetic patients: relationship to HLA status. *Diabetologia* 1986;29:39-45.
304. Riley WJ, Spillar R, Waltz J, Brody B. Predictive value of islet cell autoantibodies (ICA) - 6 years experience. *Diabetes* 1984;33 (suppl. 1):44A.
305. Mustonen A, Knip M, Åkerblom HK. An association between complement-fixing cytoplasmic islet-cell antibodies and endogenous insulin secretion in children with IDDM. *Diabetes* 1983;32:743-747.
306. Mustonen A, Knip M, Huttunen N -P, Puukka R, Käär M -L, Åkerblom HK. Evidence of delayed beta-cell destruction in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with persisting complement-fixing cytoplasmic islet-cell antibodies. *Diabetologia* 1984;27:421-426.
307. Johnston C, Millward BA, Hoskins P, Leslie RDG, Bottazzo GF, Pyke DA. Islet-cell antibodies as predictors of the later development of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. A study in identical twins. *Diabetologia* 1989;32:382-386.
308. Millward BA, Alviggi L, Hoskins PJ, Johnston C, Heaton D, Bottazzo GF, Vergani D, Leslie RDG, Pyke DA. Immune changes associated with insulin-dependent diabetes may remit without causing diabetes: a study in identical twins. *Br Med J*. 1986;292:793-796.
309. Naji A, Silvers WK, Barker CF. Autoimmunity and Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Transplantation* 1983;36:355-361.

310. Landin Olsson M, Sundkvist G, Lernmark Å. Prolonged incubation in the two-colour immunofluorescence test increases the prevalence and titres of islet cell antibodies in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1987;30:327-332.
311. Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ. Pancreatic islet-cell antibody as a marker for asymptomatic and latent diabetes and prediabetes. *Lancet* 1976;ii:1097-1102.
312. Guerra J, Lledó G, Hawkins F, Serrano Rios M, Regueiro JR, Arnaiz Villena A, Damiano A. Anticuerpos anti-islotos y su relación con el fenotipo y genotipo HLA en DID. International Meeting on Pre-Type I Diabetes, Barcelona, 1989.
313. Morris PJ, Vaughan H, Irvine WJ, McCallum FJ, Gray RS, Campbell CJ, Duncan LJP, Farquhar JW. HLA and pancreatic islet cell antibodies in diabetes. *Lancet* 1976;ii:652-653.
314. Kobayashi T, Sugimoto T, Itoh T, Kosaka K, Tanaka T, Suwa S, Sato K, Tsuji K. 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;35:335-340.
315. Vexiau P, Helmy-Khalil S, Mamoun F, Homberg JC, Cathelineau G, Deschamps I, Busson M, Hors J. Etude de 4 variétés d'anticorps anti-îlots de Langerhans chez 74 diabétiques insulino-dépendants et leur famille en fonction du génotype HLA. *Presse Méd.* 1986;15:383-386.
316. Rotter J, Riley WJ, Spillar R, Appleyard J, Rosenbloom E, Rimoin D. The male predisposition for insulin dependent diabetes (IDD). *Diabetes* 1984;33 (suppl. 1):37A.
317. Wilkin TJ, Armitage M. Insulin autoantibodies during the prediabetic period. *Diabetologia* 1986;29:752.
318. Soeldner JS, Tuttleman M, Srikanta S, Ganda OP, Eisenbarth GS. Insulin-dependent diabetes mellitus and autoimmunity: Islet-cell autoantibodies, insulin autoantibodies, and Beta-cell failure. *N Engl J Med.* 1985;313:893-894.

319. Srikanta S, Ricker AT, McCulloch DK, Soeldner JS, Eisenbarth GS, Palmer JP. Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1986;35:139-142.
320. Martín Villa M, Vicario M, de Juan D, Arnaiz Villena A, Guerra J, Lledó G, Damiano A. Determinación de anticuerpos anti-insulina en familiares de primer grado de DID. Su correlación con los anticuerpos anti-islotos de Langerhans. *International Meeting on Pre-Type I Diabetes, Barcelona, 1989.*
321. Wilkin TJ, Armitage M. Predicting insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1985;i:1279-1280.
322. Wilkin TJ, Swanson Beck J, Gunn A, Newton RW, Isles TE, Crodkes J. Autoantibodies in thyrotoxicosis. A quantitative study of their behaviour relation to the course and outcome of treatment. *J Endocrinol Invest.* 1980;3:5-14.
323. Irvine WJ. Classification of idiopathic diabetes. *Lancet* 1977;i:638-642.
324. Dorchy H, Lemiere B, Toussaint D, Gausset Ph. Anticorps anti-cellules des îlots de Langerhans et spécifiques d'organes chez les jeunes diabétiques. Relation avec l'âge, le début et la durée du diabète, la sécrétion résiduelle d'insuline et la rétinopathie. *Nouv Presse Med.* 1981;10: 2795-2798.
325. Ambinder JM, Chiorazzi N, Gibofsky A, Fotino M, Kunkel HG. Special characteristics of cellular immune function in normal individuals of the HLA-DR3 type. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982;23:269-274.
326. McCombs CC, Michalski JP. Lymphocyte abnormalities associated with HLA-B8 in healthy young adults. *J Exp Med.* 1982;156:936-941.

327. Gorsuch AN, Dean BM, Bottazzo GF, Lister J, Cudworth AG. Evidence that Type I diabetes and thyrogastric autoimmunity have different genetic determinants. *Br Med J*. 1980;280:145-147.
328. Roman SH, Davies TF, Witt ME, Ginsberg-Fellner F, Rubinstein P. Thyroid autoantibodies in HLA-genotyped Type 1 diabetic families: sex-limited DR5 association with thyroid microsomal antibody. *Clin Endocrinol*. 1986;25:23-33.
329. Kida K, Mimura G, Kobayashi T, Nakamura K, Sonoda S, Inouye H, Tsuji K. Immunogenetic heterogeneity in Type 1 (insulin-dependent) diabetes among Japanese - HLA antigens and organ-specific autoantibodies. *Diabetologia* 1989;32:34-39.
330. Lendrum R, Walker G, Gamble DR. Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset. *Lancet* 1975; i:880-883.
331. Ginsberg-Fellner F, McEvoy RC, Rubinstein P, Notkins AL. Ten-year longitudinal study of children at high risk of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1987; 317:1352-1353.
332. Rosenbloom AL, Hunt SS, Rosenbloom EK, Maclaren NK. Ten-year prognosis of impaired glucose tolerance in siblings of patients with insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982;31:385-387.
333. Barbosa J, Cohen RA, Chavers B, Michael AF, Steffes M, Hoogwerf B, Szalapski E, Mauer M. Muscle extracellular membrane immunofluorescence and HLA as possible markers of prediabetes. *Lancet* 1980;ii:330-333.
334. Hollander PH, Asplin CM, Kniaz D, Hansen JA, Palmer JP. Beta-cell dysfunction in nondiabetic HLA identical siblings of insulin-dependent diabetics. *Diabetes* 1982;31:149-153.
335. Schober E, Schernthaner G, Frisch H, Bieber J, Mayr W. β cell function in siblings of diabetic children and HLA type. *Arch Dis Child* 1983;58:923-925.

336. Jackson WPU, van Miegheem W, Keller P. Insulin excess as the initial lesion in diabetes. *Lancet* 1972;i:1040-1043.
337. Raghu P, Asplin C, Dornan T, McKnight B, Hansen J, Palmer J. Increased B-cell secretory activity in first degree relatives of IDDM is associated with HLA DR4. *Diabetes* 1983;32 (suppl. 1): 45A (Abstract).
338. Lindgren F, Dahlquist G, Efendic S, Möller E, Persson B, Thalme B, Landin Olsson M. Glucose-induced insulin response and insulin sensitivity is not related to HLA-type but to age in young siblings of Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1987;30:727-732.
339. Raghu P, Johnston C, Beard JC, Bergman R, McCulloch DK, Palmer JP. Reduced insulin sensitivity in nondiabetic, HLA-identical siblings of insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* 1985;34:991-994.
340. Radder JK, Thoolen IM, Geertzen HGM, De Jongh BM. Islet cell antibodies and clinical course in insulin-dependent diabetes mellitus. International Symposium. Campidoglio, Rome, Italy, March 15-17, 1984. *Immunology in Diabetes '84* 1984;91 (Abstract).
341. Madsbad S, Bottazzo GF, Cudworth AG, Dean B, Faber OK, Binder C. Islet-cell antibodies and beta-cell function in insulin-dependent diabetics. *Diabetologia* 1980;18:45-47.
342. Barbosa J. Type 1 (insulin-dependent) diabetes and the question of heterogeneity. *Diabetologia* 1986;29:823.
343. Danielsen R. HLA in relation to retinopathy, residual beta-cell function and age at onset in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1985;28:467.
344. Eberhardt MS, Wagener DK, Orchard TJ, LaPorte RE, Cavender DE, Rabin BS, Atchison RW, Kuller LH, Drash AL, Becker DJ. HLA heterogeneity of insulin-dependent diabetes mellitus at diagnosis. The Pittsburgh IDDM study. *Diabetes* 1985;34: 1247-1252.

345. Canivet B, Harter M, Viot G, Balarac N, Krebs BP. Residual beta-cell function in insulin-dependent diabetics: evaluation by circadian determination of C-peptide immunoreactivity. *J Endocrinol Invest*. 1980;3:107-111.
346. Knip M, Ilonen J, Mustonen A, Åkerblom HK. Evidence of an accelerated β -cell destruction in HLA-Dw3/Dw4 heterozygous children with Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:347-351.
347. Srikanta S, Ganda OP, Soeldner JS, Gleason RE, Brink SJ, Rabizadeh A, Eisenbarth GS. Prediction of overt diabetes in relatives of Type I diabetics. *Clin Res*. 1984;32:409A.