

# Marcadores genéticos y estudios epidemiológicos en la diabetes insulino dependiente en niños venezolanos

Drs. Peter Gunczler, Roberto Lanes, Zulay Layrisse, Beatriz Esparza, Rosalba Salas, Laura Hernández, Antonio Arnaiz Villena.

Hospital de Clínicas Caracas, Unidad de Endocrinología Pediátrica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC, Centro de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Higiene, Departamento de Virología, Caracas, Venezuela. Hospital 12 de Octubre, Inmunología. Madrid España.

## RESUMEN

*Los avances en la genética y epidemiología de la diabetes mellitus tipo I, de etiología auto-inmune y el descubrimiento de marcadores inmuno-genéticos están dilucidando la fisiopatología del lento proceso de destrucción de las células beta del páncreas en la fase pre diabética que finalmente conducen a la aparición de la diabetes en su forma clínica clásica.*

*Sólo ha sido en los últimos años que estas nuevas herramientas diagnósticas han ayudado a identificar a los individuos de alto riesgo susceptibles de desarrollar diabetes en las diferentes poblaciones mundiales, con posibilidades de tratamientos preventivos en el futuro.*

*Nosotros, en Venezuela, hemos iniciado el estudio de nuestra población pediátrica con diabetes mellitus tipo I, encontrando que la mayoría tienen el haplotipo HLA-DR3 o DR4, en particular la asociación de HLA-DR3 con DQW2 y HLA-DR4 con DQW8. También los estudios de ADN reflejaron una mayor susceptibilidad con la ausencia de ácido aspártico en la posición 57 en la cadena de DQ beta y con la presencia de arginina en la posición 52 de la cadena DQ alfa.*

*El marcador inmunológico más importante fue la presencia de anticuerpos anti-pancreáticos (PICA) en un 56% de los pacientes, mientras anticuerpos anti insulina (AAI) se vieron en un 8%. Sólo 11% de los familiares de 1er grado tenían antecedentes de diabetes tipo I, más de la mitad presentó alguna virosis previas al comienzo y los picos más altos de incidencia fueron en los meses de febrero a marzo y agosto a octubre*

*Palabras clave: Diabetes mellitus tipo I. Diabetes en niños. Marcadores genéticos.*

## SUMMARY

*New developments in the epidemiology and genetics of type I diabetes mellitus of autoimmune etiology and the discovery of immunogenetic markers, are helping the physiopathology of the slow process of pancreatic beta cell destruction in the pre-diabetic stage that finally ends in the classical form of insulin-dependent diabetes mellitus. It has been only in these past years that this new diagnostic tools have helped identify individuals at risk of developing type I diabetes, with the possibility of intervention studies to prevent the disease. Our group in Venezuela has initiated the study of our pediatric population with diabetes mellitus, showing that the majority of the patients carried HLA-DR3 or DR4, particularly the association of DR3-DQW2 and DR4-DQW8. DNA studies indicated a stronger susceptibility with the absence of aspartic acid in position 57 of the DQ beta chain and presence of arginine at the 52 position in the DQ alpha chain. The most important immunological marker was the presence of pancreatic cell antibodies (PICA) in 56% of the recently diagnosed children while insulin autoantibodies were present 8%. Only 11% of first degree relatives had type I diabetes. More than half of the patients had a previous history of an acute viral illness prior to the diagnosis. Peak incidence of disease was found in February to March and August to October.*

*Key words: Type I diabetes mellitus. Diabetes in children. Genetic markers.*

## INTRODUCCION

La diabetes mellitus insulino dependiente o diabetes mellitus tipo I, es una enfermedad con predisposición genética, de origen auto-inmune caracterizada por una infiltración y destrucción de las células beta de los islotes de Langerhans pancreáticos que conduce a una dependencia absoluta de insulina exógena. Existe mucha controversia en cuanto a los mecanismos de transmisión genética y la explicación más probable es que en realidad lo que sucede es que la enfermedad no se hereda directamente, sino lo que existe es una susceptibilidad a daño de las células beta, genéticamente determinada.

Una variedad de factores ambientales probablemente van a determinar que en la persona genéticamente susceptible se desencadenen los factores auto inmunes, lo que finalmente provoque la expresión clínica de la diabetes. Cada día existen evidencias más certeras de que uno de los factores desencadenantes más importantes son los virus.

Nosotros, en Venezuela, hemos iniciado estudios epidemiológicos sistemáticos en nuestra población diabética infantil, en cuanto al sitio de origen, edad y meses de presentación del comienzo, antecedentes familiares y personales patológicos. Al igual que la presencia de virus en el comienzo de la enfermedad. Los estudios inmuno genéticos incluyeron antígenos de histocompatibilidad HLA y determinación de alelos y haplotipos HLA, clase 2, a nivel de AND, usando iniciadores y sondas de oligonucleótidos específicos, así como aparición de anticuerpos anti pancreáticos (PICA) y anti insulínicos en los pacientes recién diagnosticados con diabetes mellitus tipo I y en sus familiares de 1er grado (1-13).

## MATERIAL Y METODOS

Se han evaluado 91 pacientes referidos a la Unidad de Endocrinología Pediátrica del Hospital de Clínicas Caracas. Todos presentaban diabetes mellitus tipo I, los criterios de inclusión fueron: edad menor de 21 años, presentación aguda de diabetes con síntomas clásicos de polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, deshidratación, hiperglicemia en ayunas y necesidad de insulina para su tratamiento.

Se utilizaron formatos-protocolos para la recolección de datos epidemiológicos, introducidos posteriormente a programas de computadora D-Base IV y Excel para estadísticas y análisis.

A los pacientes hospitalizados en el inicio se les tomaron muestras de sangre para anticuerpos anti-pancreáticos, (PICA), por el método de inmuno fluorescencia indirecta y fijación de complemento descrito anteriormente (1).

Muestras para anticuerpos anti insulínicos fueron recolectadas antes de recibir la primera dosis de insulina, determinados por el método de ELISA (1).

Para los estudios virales se determinaron títulos de anticuerpos específicos para la rubeola, citomegalovirus, herpes simplex, varicela zoster y 6 serotipos de coxsackie tipo B, al igual que cultivos virales en sangre periférica, heces y exudado faríngeo fueron realizadas en el departamento de virología del Instituto Nacional de Higiene de Caracas (1).

Los antígenos de histocompatibilidad humanos (HLA) clases 1 y 2 fueron definidos por serología en el laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del IVIC usando el micrométodo de linfocitotoxicidad (14,15) y por oligotipificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar regiones específicas de ADN, seguido de hibridación con oligonucleótidos seleccionados para genes DR y DQ, empleando protocolos y reactivos del XI Taller Internacional de Histocompatibilidad (1,2,14-17).

## RESULTADOS

### Epidemiología

La proporción de pacientes femeninos fue de 56% y masculinos 44% con una relación M/F de 0,79. La edad promedio para el momento del diagnóstico fue  $7,8 \pm 4,5$  años con un rango de 0,8 a 20,8 años, presentándose 2 picos de aparición de nuevos casos de diabetes, uno a los 2-3 años y otro de 7 a 11 años.

Antecedentes de diabetes mellitus tipo I fueron positivos en 11% de familiares de 1er. grado y en 21% en los de 2do grado.

Se encontró una variación estacional con los mayores picos de comienzo en los meses de febrero a marzo en 28,4% y de agosto a octubre en 27,5% de los pacientes.

Enfermedades infecciosas en los 2 meses previos al cuadro clínico se presentaron en 86% de los sujetos, siendo el 64% de ellas de vías respiratorias, 18% rubeola o varicela y el resto de las vías digestivas y/o urinarias.

La distribución geográfica en Venezuela mostró que el 81% de los pacientes provenían de la zona norte central, 10% de la región occidental, 7% de la oriental y 2% de la zona sur. Pero al analizar el sitio de origen de los padres y abuelos la distribución se torna más homogénea con 55 y 34% respectivamente, de la zona norte central, 27 y 40% de la región occidental y 15 y 20% de la región oriental del país.

### Marcadores genéticos

Se practicó determinación de antígenos de histocompatibilidad en 38 pacientes y sus familiares de 1er grado, encontrándose que 87% de ellos presentaban haplotipos DR3 y/o DR4, 31,6% eran DR3, 29% DR4 y 26,4% eran heterocigotos DR3/DR4. Los alelos DQW2 y DQW8 se hallaron en 81,6% de los niños diabéticos, siendo las asociaciones DR/DQ más frecuentes: HLA-DR3 DQW2 y HLA-DR4 DQW8 (1).

Se realizaron estudios a nivel de ADN por oligotipificación (PCR-SSO) encontrándose asociación significativa en los pacientes con DRB1\*03 y DRB1\*04 y disminución de los alelos DRB1\*07 y DRB1\*11. Los alelos DQA1\*03 y DQB1\*0302 mostraron frecuencias significativamente elevadas en los pacientes (76 y 55%, respectivamente) comparado a los controles (28 y 25%). Por otra parte, 45% de los pacientes vs 8% de los controles poseían genotipos codificando 2 heterodímeros de susceptibilidad, es decir DQ alfa arginina 52 (+). DQ beta aspártico 57 (-). (2,13).

### Marcadores inmunológicos

Anticuerpos anti pancreáticos (PICA) estaban presentes en 56% de los pacientes en el inicio, mientras que los anticuerpos anti insulínicos se encontraron en 7,8% de los sujetos; uno de los 3 familiares de 1er grado que era HLA idéntico al paciente y que presentó anticuerpos anti pancreáticos positivos, desarrolló diabetes a los pocos meses de este hallazgo (18).

### Estudios virales

Se detectó la presencia de títulos elevados de anticuerpos para citomegalovirus en 11 de 27 casos estudiados, en 7 sarampión, en 7 parotiditis, en 4 herpes zoster, varicela en 3 y ninguno positivo para coxsackie B y rubeola. Los cultivos para virus fueron negativos en los casos de comienzo estudiados.

## DISCUSION

La diabetes mellitus se presenta con mayor frecuencia en las poblaciones caucásicas (3,4), siendo su prevalencia más alta en los países nórdicos europeos, presentando un gradiente norte sur que varía de 2,2 por 1000 habitantes en Finlandia a 0,24 por 1000 en Francia. También se describe un gradiente de la incidencia con respecto al Ecuador, siendo los países más lejanos del mismo aquellos con mayor incidencia de diabetes tipo I. Aunque hoy en día aún no existen reportes completos mundiales de prevalencia, hay evidencias que sugieren que la misma es baja en las poblaciones indias asiáticas, chinas, japonesas y negras africanas. En cuanto a nuestras regiones caribeñas y el resto de Latino-América, es sólo ahora cuando se están iniciando estudios epidemiológicos para conocer el comportamiento de esta enfermedad (19-26). Nosotros, en Venezuela, estamos empezando a analizar nuestros datos en conjunto con el proyecto Diamond de la Organización Mundial de la Salud (WHO Diamond Project) (27).

La mayoría de los niños con diabetes mellitus tipo I no tienen historia familiar positiva de esta enfermedad. Esto se reconfirmó en nuestra población donde sólo 11% presentó antecedentes positivos de diabetes mellitus insulino dependiente en familiares de 1er grado.

Existen numerosos reportes sobre la incidencia estacional de la diabetes mellitus tipo I.

En el hemisferio norte, la mayoría de los casos son diagnosticados durante los meses de diciembre a febrero, mientras que en el hemisferio sur, de junio a agosto. Hay muy pocos reportes latino americanos sobre este aspecto. Estudios argentinos describen mayor incidencia en los meses de invierno, en Cuba se reportó correlación con el año escolar, mientras que en México no encontraron un patrón estacional (19-26). Nosotros observamos la mayoría de los casos nuevos de diabetes en los meses de febrero a marzo y agosto a octubre.

La edad de aparición, fue de presentación bimodal con 2 picos, uno a los 2-3 años y otro a los 7-11 años: esto coincide con las edades en que la mayoría de los niños venezolanos ingresan a las guarderías, escuelas primarias y secundarias por lo tanto están más expuestos a las virosis.

La mayoría de los pacientes evaluados por nosotros nacieron en la zona norte central de Venezuela, pero al investigar de donde provenían los padres y

abuelos, la distribución se hace más homogénea a lo largo del territorio nacional, lo cual coincide con los patrones migratorios de la población venezolana a raíz de la explotación del petróleo de los años treinta.

Reportes de la literatura mundial en cuanto a incidencia por sexo (4), describen una pequeña, pero mayor frecuencia del sexo femenino en la población no caucásica; nuestros pacientes también se situaron en esta proporción con un 56% del sexo femenino. La razón de esta prevalencia no está clara, pero se piensa que factores intrínsecos como las hormonas sexuales, talla al inicio de la pubertad y el estirón puberal pudieran incidir en esta diferencia.

La asociación entre virosis y diabetes se conoce desde los primeros reportes de aparición de diabetes infanto juvenil posterior a epidemias de parotiditis (3). Nosotros encontramos una alta incidencia de historia de virosis previa al inicio siendo la mayoría de ellas de tipo respiratorio alto. Nuestros estudios virales iniciales revelaron una mayor incidencia de anticuerpos a citomegalovirus durante el proceso y en grado menor sarampión, parotiditis y otras virosis. Llama la atención la baja incidencia de coxsackie-B, que ha sido reportado en otras poblaciones al inicio de la diabetes.

La década de los setenta confirmó la sospecha que se tenía de la diferencia en la genética entre la diabetes tipo I y la tipo II al descubrirse la estrecha asociación entre el complejo mayor de histocompatibilidad HLA y la diabetes mellitus Tipo I. Nosotros encontramos una alta incidencia de HLA-DR3 y/o HLA-DR4 en nuestros pacientes con DM, tipo I; 87% tenían HLA-DR3 y/o HLA-DR4 versus un 36% encontrada en la población general sana venezolana. Estos hallazgos son similares a los reportados en la población caucásica y en algunos de los estudios hispano americanos, como el de México y España donde también encontraron un aumento de los haplotipos HLA-DR3 y/o HLA-DR4. También observamos la estrecha asociación con los alelos HLA-DQ presentándose los HLA-DQW2 y/o HLA-DQW8 en 81,6% de los pacientes, siendo la asociación más frecuente entre HLA-DR3 con DQW2 y HLA-DR4 con DQW8: este último hallazgo también fue reportado en forma similar en pacientes mexicanos con DM tipo I.

Recientemente también iniciamos el estudio del ADN en nuestros pacientes (2), mediante oligotipificación usando la técnica del PCR/SSO, con algunos resultados similares y otros diferentes a los

reportados en poblaciones caucásicas. Se detectó una ausencia significativa del ácido aspártico en la posición 57 de la cadena DQ beta (NA) y presencia de arginina en la posición 52 de la cadena DQ alfa, representando un aumento significativo de los genotipos SS/SS susceptibles en los pacientes diabéticos versus los controles. Estos estudios vienen a reconfirmar la teoría de susceptibilidad de la asociación del NA-57 con diabetes mellitus tipo I en esta población.

Marcadores inmunológicos como los anticuerpos anti-pancreáticos (PICA) se presentan en sujetos a riesgo varios meses y/o años antes de la aparición del cuadro clínico clásico de diabetes. Este proceso de auto destrucción de las células betas es de desarrollo lento. Uno de los marcadores metabólicos importantes, es la respuesta anormal de la 1ª, fase insulínica a la curva de la tolerancia glucosada intravenosa en el estadio pre-diabético; esto se presenta cuando sólo quedan de 10-20% del total de las células betas activas. Nosotros encontramos que el 56% de nuestros pacientes presentaban PICA (+) para el momento del comienzo de la enfermedad. En nuestros estudios iniciales encontramos varios familiares de 1er grado con un HLA idéntico al del niño diabético; uno de los hermanos con PICA (+) desarrolló diabetes mellitus tipo I, a los pocos meses de este hallazgo. Actualmente existen numerosos estudios de intervención en individuos de alto riesgo con marcadores positivos, utilizando protocolos de investigación de medicamentos inmuno-moduladores, inmuno-supresores, vacunas u otros fármacos para la prevención de diabetes. Nuestros estudios contribuyen a dilucidar el comportamiento epidemiológico e inmuno genético de la diabetes mellitus tipo I en Venezuela; este tipo de estudios debe ampliarse a las diversas regiones del país para detectar los individuos a riesgo y la posibilidad de practicar pruebas de intervención para la prevención de la diabetes infanto juvenil en el futuro (28).

## REFERENCIAS

1. Gunczler P, Lanes R, Layrisse Z, et al. Epidemiology and immunogenetics in recently diagnosed Venezuelan children with insulin dependent diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol* 1993;6:165-171.
2. Balducci-Silano P, Layrisse Z, Amaro R, et al. HLA-DQA1 and DQB1 allele and genotype contribution to IDDM susceptibility in an ethnically mixed population. *Europ J Immunogenetics* 1984;21:405-414.

3. Dorman JS, La Porte RE. Mortality of insulin dependent diabetes. En: *Diabetes in America*. Data compiled 1984. National Diabetes Data Group Washington DC. 1985 (NIH Pubi No 85-148)
4. Diabetes Epidemiology Research International Group: Secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes* 1990;39:858-864.
5. Wilson K, Eisenbarth GS Immunopathogenesis and immunotherapy of type I diabetes. *Ann Rev Med* 1990;41:497-508.
6. Botazzo GF, Foulis AK, Bosi E, Todd I, Pujol-Borrel R. Pancreatic B-cell damage. In search of novel pathogenic factors. *Diabetes Care* 1988;1(1supl):24S-28S.
7. Tarn AC, Bonifacio E, Dan BM, Gale EAM, Botazzo GF. Predicting insulin dependent diabetes. *Lancet* 1988;2:627-628.
8. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. A molecular basis for genetic susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus. *Trend Genet* 1988;4:129-134.
9. Svejgaard A, Platz P, Ryder LP. Insulin dependent diabetes mellitus. En: Teresaki PI, editor. *Histocompatibility testing*. Los Angeles, CA: UCLA, 1980:638-656.
10. Layrisse Z, Rodríguez Iturbe B, García Ramírez R, Rodríguez A, Tiwari J. Family studies of the HLA system in acute post streptococcal glomerulonephritis. *Human Immunol* 1983;7:177-185.
11. Todd JA, Bell JI, MacDevitt HO. HLA-DQ8 gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987;329:599-604.
12. Morel PA, Dorman JS, Todd J, McDevitt HO, Trucco M. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: A family study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8111.
13. Khalil Y, dí Auriol L, Gobet M, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp-57 negative and HLA-DQ alpha Arg 52 confers susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990;85:1315.
14. NIAID. *Manual of Tissue Typing Techniques* NIH publication 1979-1980;No, 80-545:39.
15. Danilous JA, Ayaub G, Terasaki PI, Joint Report: B lymphocyte isolation by thombin-nylon woll. En: Teresaki PL, editor. *Histocompatibility testing* 1980. Los Angeles: Tissue Typing Laboratory 1980:287-288.
16. Second international workshop on the standardisation of insulin autoantibody measurement. *Diabetologia* 1988;31:449.
17. Kolb H, Krugner G, Gries FA, Bellman O. Islet cell antibodies: which method? *Lancet* 1983;1:479-480.
18. Botazzo 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;1:668-672.
19. Zeidier A, Loon J, Fraiser SD, Kumar D, Penny R, Teresaki P. HLA-DRW antigens in mexican-american and black-american diabetic patients. *Diabetes* 1980;29:247-250.
20. Arnaiz-Villena A, Ramón-Regueiro J, Nieto Cuartero J, Ordóñez A, Serrano-Ríos M. HLA and complement (C4 and BF) allotypes in type II Spanish diabetics. En: Baba S, Gould MK, Zimmet P, editores. *Diabetes mellitus: recent knowledge on etiology, complications and treatment*. Sydney, Australia: Academic Press, 1984:39-48.
21. Rodríguez L, Gorodezky C, Robles C, et al. HLA,BF, Y-cell subsets and some autoantibodies in mexican type I diabetes. *Histocompatibility and immuno-genetics Conf*. New York, November 1987.
22. Riley WJ, McClaren NK, Silverstein JH. The predictability of insulin dependent diabetes mellitus. *Adv Pediatr* 1988;35:167-188.
23. Durruty P, Ruiz F, García de los Ríos M. Age at diagnosis and seasonal variation in the onset of insulin dependent diabetes in Chile (Southern Hemisphere) *Diabetologia* 1979;17:357-360.
24. Díaz D, Carvajal F, Fernández L, Rodríguez J. Epidemiología de diabetes mellitus tipo I menores de 15 años: evidencias de variaciones estacionales. *Rev Cubana Invest Biomed* 1983;2:316-325.
25. Robles VC, Cornejo DJ, Dorantes AI, Gutiérrez GR, Magos IC, Pérez PE. Incidencia de diabetes mellitus tipo I 1984-1986 en el DF y área metropolitana (A.M). (en pensa). *Soc Mex Nutr Endocrinol*, Mérida 1987.
26. Durruty F, García de los Ríos M, Vergara MI, Vicente M. Estudio de anticuerpos antivirales en la diabetes juvenil. *Rev Med Chile* 1977;105:79-883
27. WHO DIAMOND Project Group: WHO multinational project for childhood diabetes. *Diabetes Care* 1990; 13:1062-1068.
28. Marks JD, Skler JS. Immunotherapy of type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:32-38.