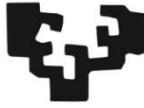


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**Secuenciación masiva aplicada al diagnóstico de  
diabetes monogénica en pacientes pediátricos con  
sospecha de diabetes tipo 1 y marcadores de  
autoinmunidad negativos**

**Tesis doctoral**

**Inés M<sup>a</sup> Urrutia Etxebarria**

**2021**



***“Cuando creíamos que teníamos todas las  
respuestas, de pronto, nos cambiaron  
todas las preguntas”***

**Bertrand Russell (1872-1970)**

Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente por las siguientes instituciones:  
CIBERDEM (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas); Universidad del País Vasco, UPV/EHU (IT795-13); Departamento de Salud del Gobierno Vasco (GV2016111035).

*Dedicado a las personas con diabetes y sus familias por vuestra generosa colaboración en la investigación de esta enfermedad. Y al personal sanitario que nos enseña a convivir con la diabetes y que confía en nuestro trabajo enviándonos a sus pacientes. Sin vuestro interés e inestimable ayuda, la investigación clínica sería imposible de llevarse a cabo.*





## **AGRADECIMIENTOS**

Han pasado muchos años desde que los ahora directores de mi tesis, mostraron por primera vez a una becaria incrédula un ovillo de hilos blanquecinos que identificaron como ADN. Y desde entonces, se despertó en mí el gusanillo por la biología molecular...

Desde esa técnica rudimentaria de fenol-cloroformo para la extracción de ADN han pasado un sin fin de nuevas técnicas, de cursos, de congresos, de seminarios... Peleas con la búsqueda de financiación de proyectos, con la puesta a punto de nuevos aparatos y metodologías, con encontrar la revista científica que acepte nuestros artículos... Y todo ese aprendizaje ha sido gracias a los grandes profesionales con los que he tenido el privilegio de trabajar a lo largo de todos estos años que han ayudado a mi formación como investigadora. Una larga carrera profesional con muchos altos y bajos en salud y trabajo, en la que siempre he tenido la suerte de tener a alguien que, de forma incondicional, me escuchara y apoyara.

A todos los que han formado y forman parte de mi vida, tanto dentro como fuera de la investigación, y que me han empujado a seguir hacia delante en los momentos difíciles

**Muchas gracias**



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS

<b>ACMG</b>	<i>American College of Medical Genetics</i> (Colegio Americano de Genética Médica)
<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i> (Asociación Americana de Diabetes)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribunucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADOs</b>	Antidiabéticos orales
<b>AFBAC</b>	<i>Affected Family based Controls</i> (Controles basados en familias con enfermos)
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CAD</b>	Cetoacidosis diabética
<b>Canal Ca<sup>2+</sup></b>	Canal de calcio dependiente de voltaje
<b>Canal K<sub>ATP</sub></b>	Canal de potasio sensible a ATP
<b>CD4<sup>+</sup></b>	Linfocitos T auxiliares (con el marcador de superficie CD4)
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Linfocitos T citotóxicos (con el marcador de superficie CD8)
<b>CNVs</b>	<i>Copy Number Variation</i> (Variación en el número de copias)
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CsK</b>	C-terminal Src kinase (enzima que fosforila los residuos de tirosina ubicados en el extremo C-terminal de las quinasas de la familia Src)
<b>dbSNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i> (Base de datos de referencia de todos los SNPs del genoma)
<b>DIAMOND</b>	<i>Diabetes Mondiale</i> (Proyecto Multinacional para la Diabetes Infantil)
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
<b>Ex</b>	Exón
<b>GABA</b>	Ácido γ-amino butírico
<b>GAD</b>	Glutamato descarboxilasa
<b>GAD65</b>	Isoforma de 65 kDa de GAD
<b>GAD67</b>	Isoforma de 67 kDa de GAD
<b>GADA</b>	Autoanticuerpos anti-GAD65
<b>GK</b>	Glucoquinasa
<b>GLUT2</b>	Transportador de glucosa tipo 2
<b>GnomADe</b>	<i>The Exome Genome Aggregation Database</i> (Base de datos de genoma y exoma)

<b>GWAS</b>	<i>Genome Wide Association Study</i> (Estudios de asociación del genoma completo)
<b>HDL-c</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HGMD</b>	<i>Human Gene Mutation Database Professional</i> (Base de datos y registro de mutaciones génicas humanas)
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Sistema de antígenos leucocitarios humanos)
<b><sup>125</sup>I</b>	Isótopo radiactivo de iodo gamma-emisor
<b>IA2</b>	Tirosina fosfatasa pancreática IA2/ICA512
<b>IA2A</b>	Autoanticuerpos anti-IA2
<b>IA2ic</b>	Porción intracelular de la molécula IA2, utilizada como antígeno en el ensayo IA2A
<b>IAA</b>	Autoanticuerpos anti-insulina
<b>IASP</b>	<i>Islet Autoantibody Standardization Program</i> (Programa de estandarización de las técnicas de detección de anticuerpos contra los islotes pancreáticos)
<b>IC 95%</b>	Intervalo de Confianza de 95%
<b>ICA</b>	Autoanticuerpos anti-islote pancreático
<b>IGV</b>	<i>Integrative Genomic Viewers</i> (Visor genómico integrado)
<b>INDEL</b>	Inserción-delección
<b>ISP</b>	<i>Ion Sphere particle</i> (Microesferas recubiertas con adaptadores)
<b>ISPAD</b>	Sociedad Internacional de Diabetes Pediátrica y Adolescente
<b>kb</b>	Kilobases (de ADN)
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>Kir6.2</b>	Subunidad proteica del canal K <sub>ATP</sub>
<b>LDL-c</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LYP</b>	<i>Lymphoid tyrosine phosphatase</i> (Proteína tirosina fosfatasa específica de linfocitos)
<b>MAF</b>	<i>Minor Allele Frequency</i> (Frecuencia del alelo menos común)
<b>MAPD</b>	<i>Median of the Absolute values of all Pairwise Differences</i> (Coeficiente que mide la uniformidad de la cobertura)
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)
<b>MIDD</b>	<i>Maternally Inherited Diabetes and Deafness</i> (Diabetes de herencia materna y sordera)
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i> (Amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples)
<b>MODY</b>	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i> (Diabetes del adulto de inicio juvenil)
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i> (Secuenciación de nueva generación)
<b>NOD</b>	<i>Non-Obese Diabetic</i> (Ratón diabético no obeso)
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i> (Razón de probabilidades)

<b>pb</b>	Pares de bases (de ADN)
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PCR-SSO</b>	<i>PCR-Sequence Specific Oligonucleotide</i> (PCR-Sondas de oligonucleótidos de secuencia específica)
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PLP</b>	Piridoxal 5'fosfato
<b>PS</b>	Tampón fosfosalino
<b>PSI</b>	Tampón fosfosalino con insulina
<b>PSI*</b>	Tampón fosfosalino con insulina radiactiva
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RIQ:P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub></b>	Rango intercuartil: Percentil 25 – Percentil 75
<b><sup>35</sup>S</b>	Isótopo radiactivo de azufre beta-emisor
<b>SD</b>	Desviación típica
<b>SEARCH</b>	Estudio multicéntrico sobre la diabetes juvenil desarrollado en Estados Unidos
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleótido único)
<b>Src</b>	<i>Stored response chain</i> (Familia de proteínas de señalización intracelular, cuya función es transmitir señales desde varios receptores de membrana a las proteínas que permiten la activación de la síntesis proteica y el crecimiento celular, principalmente)
<b>SUR1</b>	Subunidad proteica del canal K <sub>ATP</sub>
<b>TBST</b>	Tampón Tris Salino Tween 20
<b>TE</b>	Tampón Tris-EDTA
<b>TIL</b>	Tampón de incubación y lavado
<b>TODAY</b>	Estudio estadounidense sobre la diabetes tipo 2 juvenil
<b>VNTR</b>	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (Número variable de repeticiones en tándem)
<b>VUS</b>	<i>Variant of unknown significance</i> (Variante de significado incierto)
<b>ZnT8A</b>	Autoanticuerpos anti-transportador de zinc 8



## **ÍNDICE**





---

2.1.1. Obtención del antígeno ZnT8 marcado con <sup>35</sup> S.....	87
A. Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido <i>pJH5.2</i> .....	88
B. Purificación del plásmido recombinante <i>pJH5.2</i> .....	89
C. Producción del antígeno marcado <sup>35</sup> S-ZnT8 .....	90
D. Purificación del antígeno marcado <sup>35</sup> S-ZnT8 .....	92
2.1.2. Protocolo del radioensayo de detección de ZnT8A .....	93
2.1.3. Cálculo de resultados .....	96
2.2. Determinación de GADA e IA2A.....	96
2.3. Determinación de IAA .....	97
2.4. Estandarización de los ensayos para determinación de anticuerpos.....	99
3. Análisis genéticos .....	101
3.1. Extracción y cuantificación de ADN.....	101
3.2. Estudio de genético de diabetes monogénica mediante NGS.....	103
3.2.1. Diseño del panel de genes.....	103
3.2.2. Preparación de la librería .....	105
A. Amplificación del ADN genómico: PCR multiplex .....	106
B. Digestión parcial de la secuencia de los <i>primers</i> .....	107
C. Ligación de adaptadores a los amplicones .....	108
D. Purificación de la librería .....	109
E. Cuantificación de la librería: qPCR .....	110
3.2.3. Amplificación clonal de la librería .....	110
F. Amplificación clonal de la librería: PCR de emulsión .....	112
G. Enriquecimiento de las ISPs clonales.....	115
H. Cuantificación de las ISPs clonales.....	116
3.2.4. Secuenciación: Ion Torrent Proton™ .....	117
3.2.5. Procesamiento bioinformático de los datos .....	119
3.2.6. Filtrado e interpretación de variantes.....	121
3.2.7. Validación analítica del panel de genes .....	125
3.3. Estudio genético de diabetes monogénica mediante MLPA .....	125
3.4. Estudio genético del perfil HLA-DRB1 .....	130
3.4.1. Análisis de los resultados. Estudios de asociación .....	131

---

<b>V. RESULTADOS</b> .....	135
1. Características clínicas y bioquímicas de la población .....	137
2. Estudio de la autoinmunidad al debut de la enfermedad.....	140
2.1. Puesta a punto del ensayo para la detección de ZnT8A .....	140
2.2. Estandarización de los ensayos de autoanticuerpos. IASP 2018 .....	141
2.3. Influencia del sexo en la autoinmunidad presente al debut .....	143
2.4. Influencia de la edad al diagnóstico en la autoinmunidad al debut.....	144
2.5. Combinación de ensayos de detección de autoanticuerpos.....	146
3. Estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica .....	150
3.1. Validación técnica del panel de genes.....	150
3.2. Validación analítica con muestras conocidas .....	151
3.2.1. Cambios puntuales y pequeñas deleciones o inserciones .....	153
3.2.2. CNVs ( <i>Copy Number Variations</i> ).....	154
3.3. Resultados del estudio genético.....	157
4. Estudio del genotipo HLA-DRB1 .....	160
4.1. Alelos HLA-DRB1 asociados a diabetes tipo 1 en nuestra cohorte .....	160
4.2. Comparación de frecuencias de alelos HLA-DRB1 entre diabetes tipo 1 y diabetes monogénica.....	163
5. Resumen de los resultados .....	167
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	169
1. El autoanticuerpo ZNT8A como nuevo marcador de autoinmunidad. ....	171
2. Variantes genéticas identificadas en pacientes con autoinmunidad negativa .	178
3. El HLA-DRB1 como marcador en la selección de pacientes pediátricos a los que realizar un estudio genético para descartar diabetes monogénica .....	184
4. Fortalezas y limitaciones del estudio.....	189
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	191
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	195
<b>IX. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO</b> .....	219



## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. LA DIABETES MELLITUS EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólicas crónica frecuente en la edad pediátrica (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014; Grulich-Henn and Klose, 2018). El término diabetes mellitus incluye a un conjunto de trastornos metabólicos con clínica y etiopatogenia diversa, caracterizados todos ellos por la presencia persistente de concentraciones elevadas de glucosa en sangre, circunstancia responsable de gran parte de las complicaciones agudas y crónicas que los pacientes con diabetes pueden desarrollar en el tiempo (Donaghue *et al.*, 2007; Kordonouri *et al.*, 2007).

La hiperglucemia aparece cuando hay un desequilibrio entre la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas y el grado de sensibilidad hacia la misma, principalmente en hígado, músculo y adipocitos (Ize-ludlow and Sperling, 2005). Así, para que los valores de glucosa se mantengan dentro del intervalo de normalidad, es necesario que las variaciones fisiológicas de la sensibilidad a la insulina se compensen con cambios de la secreción de la misma en sentido opuesto. Por ejemplo, tal es el caso de la insulinoresistencia característica de la pubertad, que se acompaña de un marcado aumento en la producción endógena de insulina para mantener la glucemia en valores normales. En caso de que una disminución de la sensibilidad a la insulina, fisiológica o no, no pueda ser compensada adecuadamente por un aumento de su secreción, el equilibrio entre los dos factores anteriores se altera, resultando una situación de deficiencia relativa de insulina, con la consiguiente aparición de hiperglucemia. Tal sería el caso de la diabetes tipo 2, de diabetes relacionadas con síndromes de insulinoresistencia grave y lipodistrofias. En otros casos, la hiperglucemia es debida a una disminución o una pérdida total de la secreción de insulina sin cambios apreciables en la sensibilidad a la misma, tal es el caso de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo MODY y la diabetes neonatal, entre otras (Rubio Cabezas and Argente, 2012; Grulich-Henn and Klose, 2018).

En la década de los años 80, la Organización Mundial de la Salud publicó la primera clasificación ampliamente aceptada de la diabetes mellitus. Esta clasificación se basaba principalmente en el requisito del tratamiento con insulina. Así, se hablaba de dos

tipos de diabetes: la insulino dependiente, que era la forma predominante de diabetes en pediatría, y la no insulino dependiente, que era muy rara en la infancia y adolescencia (Alberti and Zimmet, 1998). Los nuevos conocimientos sobre la fisiopatología y la genética de la diabetes mellitus han cambiado la visión de la diabetes en pediatría. La actual clasificación de la diabetes recomendada por la Sociedad Internacional de Diabetes Pediátrica y Adolescente, ISPAD, 2018 (Mayer-Davis *et al.*, 2018), está basada en la clasificación de la ADA (*American Diabetes Association*, 2018) y describe cuatro grupos generales de diabetes mellitus, que se clasifican además en subtipos específicos. Aunque la diabetes tipo 1 (grupo I de la actual clasificación) es la más prevalente en pediatría, en ciertas etnias cada vez se diagnostica con más frecuencia la diabetes tipo 2 ligada al aumento de la obesidad infantil (grupo II de la actual clasificación). Asimismo, es importante considerar otros tipos de diabetes por las implicaciones terapéuticas que con frecuencia conlleva su diagnóstico (grupo III de la actual clasificación). En la tabla 1 se presenta la clasificación de la diabetes según la *American Diabetes Association* (ADA), 2018.

En los siguientes apartados se detallan las características de los tipos de diabetes que se presentan con mayor frecuencia en la infancia y la adolescencia. Se comienza con la diabetes tipo 1, para continuar con la diabetes tipo 2 y la monogénica, y se finaliza con una breve descripción de la diabetes secundaria.

### **1.1. Diabetes mellitus tipo 1**

La diabetes mellitus tipo 1 es un trastorno autoinmune que causa la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas productoras de insulina, lo que conduce a una deficiencia absoluta de esta hormona en el paciente. Aunque se puede diagnosticar a cualquier edad, los picos en la presentación ocurren entre los 5 y los 7 años de edad y/o cerca de la pubertad (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014). Supone alrededor del 10% de los casos de diabetes en la población general, pero es la forma de diabetes más frecuente con gran diferencia en la edad pediátrica, en la que supone más de 90% de los casos (Mayer-Davis *et al.*, 2018).

**Tabla 1.** Clasificación etiológica de la diabetes mellitus

<b>I. Diabetes tipo 1 (destrucción de la célula <math>\beta</math>, déficit absoluto de insulina)</b>	
A. Autoinmune	
B. Idiopática	
<b>II. Diabetes tipo 2 (resistencia a la insulina, déficit relativo de insulina)</b>	
<b>III. Otros tipos específicos de diabetes</b>	
A. Alteraciones genéticas función célula $\beta$	E. Inducidas por fármacos
1. Diabetes tipo MODY	1. Vacor
2. Diabetes neonatal	2. Pentamidina
3. Diabetes mitocondrial	3. Acido nicotínico
4. Otros	4. Glucocorticoides
B. Alteraciones genéticas acción insulina	5. Hormona tiroidea
1. Resistencia a la insulina tipo A	6. Diazóxido
2. Leprechaunismo	7. Agonistas $\beta$ -adrenérgicos
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall	8. Tiazidas
4. Diabetes lipoatrófica	9. Dilantina
5. Otras	10. Interferon- $\gamma$
C. Enfermedades pancreáticas exocrinas	11. Otros
1. Pancreatitis	F. Infecciones
2. Traumatismo / pancreatomeclomía	1. Rubeola congénita
3. Neoplasia	2. Citomegalovirus
4. Fibrosis quística	3. Otras
5. Hemacromatosis	G. Mediada por alteraciones inmunológicas
6. Pancreatopatía fibrocalculosa	1. Síndrome del hombre rígido
7. Otras	2. Anticuerpos antirreceptor de insulina
D. Endocrinopatías	3. Otros
1. Acromegalia	H. Otros síndromes genéticos
2. Síndrome de Cushing	1. Síndrome de Down
3. Glucagonoma	2. Síndrome de Klinefelter
4. Feocromocitoma	3. Síndrome de Turner
5. Hipertiroidismo	4. Síndrome de Wolfram
6. Somatostatinaoma	5. Ataxia de Friedrich
7. Aldosteronoma	6. Corea de Huntington
8. Otras	7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
	8. Distrofia miotónica
	9. Porfiria
	10. Síndrome de Prader-Willi
	11. Otros
<b>IV. Diabetes Gestacional (diabetes diagnosticada en el 2º o 3º trimestre de embarazo)</b>	

Basada en la clasificación de la *American Diabetes Association (ADA)*, 2018. Adaptado de (Mayer-Davis *et al.*, 2018)

### 1.1.1. Epidemiología de la diabetes tipo 1

La incidencia de la diabetes tipo 1 en jóvenes a nivel mundial varía según la geografía, la edad, el sexo y el origen étnico (Shah and Nadeau, 2020). Los resultados del Proyecto Multinacional para la Diabetes Infantil (*Diabetes Mondiale* o DIAMOND) promovido por la Organización Mundial de la Salud (*The Diamond Project Group*, 2006), encontró las mayores tasas de incidencia de diabetes tipo 1 en Finlandia, seguido por Cerdeña y Suecia (40, 37 y 30 casos por cada 100.000 niños-año, respectivamente) con un ligero predominio masculino (proporción de 3:2 entre hombres y mujeres en la incidencia a la edad de  $\geq 13$  años). Por el contrario, en Venezuela y en ciertas regiones de China se detectaron las incidencias más bajas (menos de 1 caso por cada 100.000 niños-año). Posteriormente, el estudio SEARCH sobre la diabetes juvenil en Estados Unidos, estimó en 2012 una incidencia de diabetes tipo 1 de 27 casos por cada 100.000 niños-año entre niños y adolescentes blancos no hispanos. La estimación para niños afroamericanos e hispanos fue menor, de 19 y 14,8 casos por cada 100.000 niños-año, respectivamente, y las tasas más bajas correspondieron a asiáticos e isleños del Pacífico (personas de origen chino, filipino, coreano, hawaiano, indio-asiático, japonés, samoano, vietnamita, entre otras) con 9,7 casos por cada 100.000 niños-año y a jóvenes nativos americanos con 6,5 casos por cada 100.000 niños-año, sin presentar diferencias significativas por sexo (Mayer-Davis *et al.*, 2017). Estos resultados proporcionaron una nueva clara evidencia de diferencias entre etnias.

Tanto la variación geográfica como el aumento de las tasas de incidencia de diabetes tipo 1 a nivel mundial representan un enigma epidemiológico por resolver (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014). La variación geográfica parece reflejar un grado diferente de susceptibilidad genética a la diabetes entre etnias. Sin embargo, se han encontrado grandes diferencias en la incidencia en poblaciones europeas próximas y que son genéticamente similares. Tal es el caso de la incidencia en Estonia que es menos de un tercio de la incidencia en Finlandia, aunque los dos países están separados por menos de 120 km (Podar *et al.*, 2001). Por otro lado, el rápido aumento de la incidencia de la diabetes de tipo 1 ha sido casi un fenómeno mundial durante las

últimas décadas que queda reflejado en muchos estudios epidemiológicos (EURODIAB ACE Study Group, 2000; Harjutsalo, Sjöberg and Tuomilehto, 2008; Dabelea, 2009; Stanescu, Lord and Lipman, 2012; Mayer-Davis *et al.*, 2017).

Se desconocen los mecanismos que subyacen a estos enigmas pero sugieren un papel importante de los factores ambientales en la patogenia de la enfermedad, ya que los cambios genéticos o el hecho de que nazcan más niños de madres con diabetes tipo 1 no pueden explicar por sí solos esos rápidos incrementos de las tasas de incidencia (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014). Diversos estudios han propuesto que factores ambientales que actúan a una edad temprana podrían desencadenar el proceso autoinmune en individuos susceptibles (Rewers and Ludvigsson, 2016). Por ejemplo, se han analizado factores perinatales como el peso elevado al nacer (Cardwell, Stene, Joner, Davis, *et al.*, 2010) o la edad materna avanzada (Cardwell, Stene, Joner, Bulsara, *et al.*, 2010) ambos asociados débilmente a un mayor riesgo a desarrollar diabetes. Dada la variación estacional en la aparición de la diabetes tipo 1, se ha investigado ampliamente sobre un desencadenante viral, siendo los enterovirus el principal candidato (Yeung, Rawlinson and Craig, 2011). Asimismo, se ha estudiado el papel de la alimentación en la infancia, basado en que la exposición temprana a ciertas proteínas podría ser un desencadenante del proceso autoinmune (Knip, Virtanen and Akerblom, 2010). Además, la alta tasa de incidencia en países del norte de Europa comparado con la reducción de tasas al acercarse al Ecuador (gradiente norte-sur), ha sugerido que los valores bajos de vitamina D detectados en pacientes con diabetes tipo 1 podrían ser una causa del desarrollo de la patología (Blanton *et al.*, 2011).

Otros factores recientemente propuestos están basados en los cambios en el estilo de vida que ha experimentado la sociedad en los últimos 20 años. Estos cambios han proporcionado una mejor higiene y como consecuencia una menor exposición a enfermedades infecciosas comunes que protegen de enfermedades autoinmunes y alérgicas (Bach and Chatenoud, 2012) propiciando así el desarrollo de diabetes tipo 1. Asimismo, asociado con un cambio en el estilo de vida actual más sedentario, ha habido un aumento de la prevalencia del sobrepeso y la obesidad que puede contribuir

también a la creciente incidencia de la enfermedad. La hipótesis que se postula es que en las personas genéticamente susceptibles, la resistencia a la insulina puede inducir tanto la apoptosis de las células  $\beta$ -pancreáticas como la respuesta inmunitaria, lo que daría lugar a la aparición de la diabetes tipo 1 (Ferrara-Cook *et al.*, 2020).

Está siendo también objeto de considerable atención el papel del microbioma intestinal ya que hay pruebas que indican que la disbiosis intestinal desempeña un papel específico en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, incluida la diabetes de tipo 1 (Boerner and Sarvetnick, 2011). En este sentido se propone que quizás varios factores ambientales como la dieta, la higiene o la obesidad, entre otros, pueden aumentar el riesgo a diabetes debido a sus efectos en la composición del microbioma intestinal del individuo (Boerner and Sarvetnick, 2011).

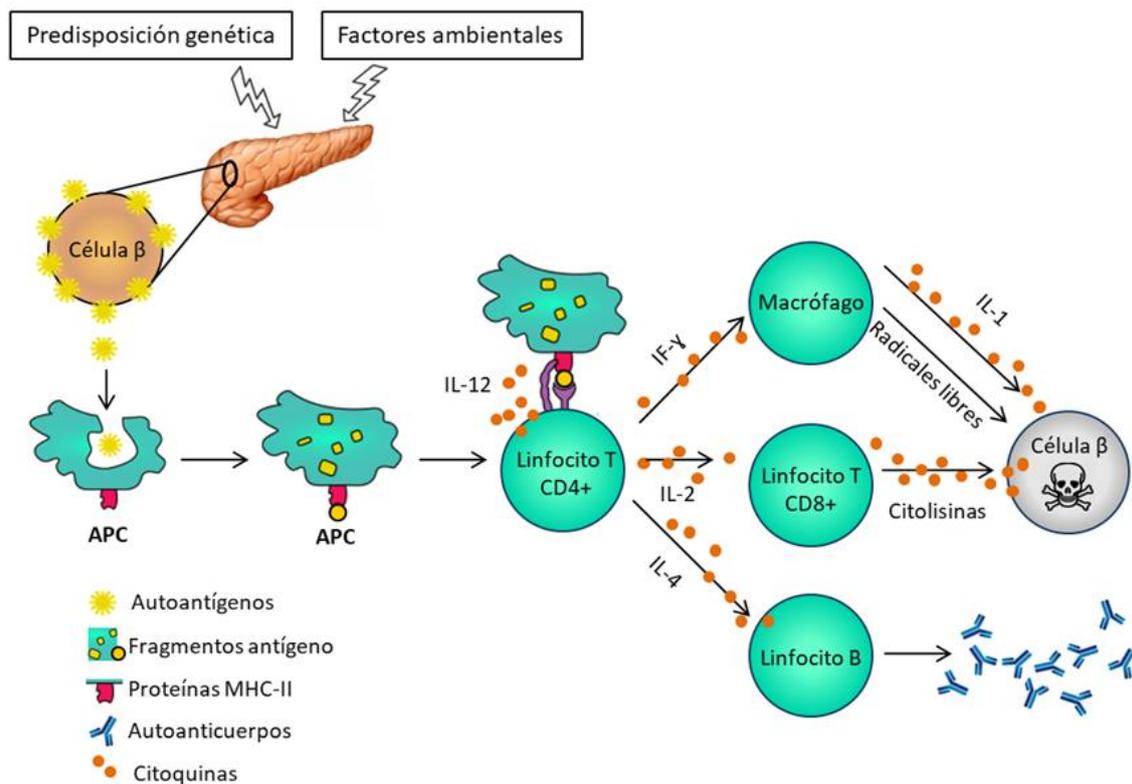
Hasta el momento no se ha identificado un agente específico con una influencia inequívoca en la patogénesis. Cada vez hay más pruebas que apoyan la heterogeneidad de la diabetes tipo 1 por edad, genotipo y fenotipo autoinmune. La combinación o sucesión de exposiciones a factores ambientales causales puede variar entre los individuos, así como a lo largo del tiempo dentro de una población. Esta heterogeneidad podría explicar observaciones inconsistentes, a veces incluso contradictorias, de diferentes poblaciones (Rewers and Ludvigsson, 2016). Es necesaria más investigación para esclarecer qué factores genéticos y ambientales locales son importantes y cuáles son universales, lo que permitirá una detección selectiva y el desarrollo de nuevas terapias para tratar e idealmente prevenir la enfermedad.

### **1.1.2. Etiopatogenia de la diabetes tipo 1**

El mecanismo que contribuye a la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas en la diabetes mellitus tipo 1 está mediado por una infiltración linfocítica en los islotes de Langerhans, pero la cuestión de si existe un estímulo desencadenante de la respuesta inmunológica contra las células  $\beta$ , o si la respuesta inmunológica es un acontecimiento estocástico, ha sido objeto de considerable especulación y controversia (DiMeglio, Evans-Molina and Oram, 2018). La teoría más aceptada es que la respuesta

autoinmune se desencadena en una persona genéticamente predispuesta por medio de algún factor ambiental, como se ha detallado en el apartado anterior.

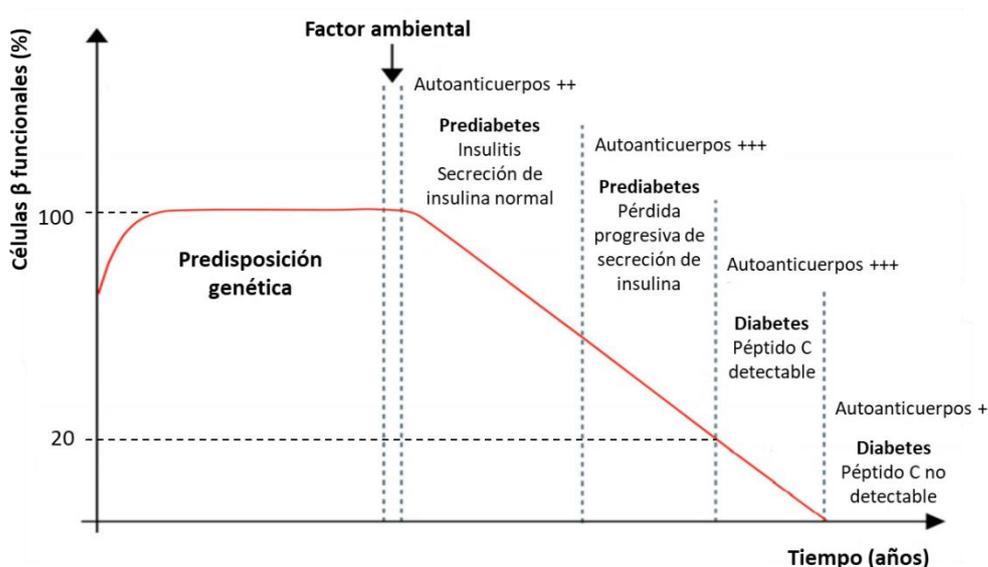
La activación inmunológica se inicia con la liberación de ciertas proteínas de membrana o autoantígenos por parte de las células  $\beta$ -pancreáticas como consecuencia del daño causado en ellas por el estímulo desencadenante (Figura 1).



**Figura 1.** La célula  $\beta$  dañada libera proteínas de membrana que actúan como autoantígenos. Las células presentadoras de antígenos (APC) fagocitan los autoantígenos, los presentan en su superficie a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y liberan interleucina 12 (IL12) para activarlos. A su vez, los linfocitos CD4<sup>+</sup> activos liberan citoquinas como interferón gamma (IF $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2) para activar a los macrófagos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> que actúan de manera sinérgica para destruir a las células  $\beta$  pancreáticas. La interleucina 4 (IL-4) estimula a los linfocitos B responsables de la secreción de anticuerpos contra los autoantígenos de la célula  $\beta$ .

Los autoantígenos son fagocitados por células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas o linfocitos B) y son expuestos en sus membranas acoplados a sus moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC), formándose complejos MHC-antígeno. Estas células se infiltran en los islotes

pancreáticos, provocando una inflamación denominada insulinitis, y migran hacia los ganglios linfáticos donde realizan una sinapsis inmunológica con los receptores del MHC presentes en una población específica de linfocitos T, los linfocitos coadyuvantes CD4<sup>+</sup>. Estos linfocitos CD4<sup>+</sup> son activados por la interleucina-12 liberada por las células presentadoras de antígenos. A su vez, los linfocitos CD4<sup>+</sup> activados, liberan diferentes citoquinas que provocan un aumento en la actividad de macrófagos, linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> y linfocitos B. Los macrófagos liberan radicales libres que dañan a las células β, y los linfocitos CD8<sup>+</sup> son, en última instancia, responsables de la lisis de las células β al liberar unas sustancias tóxicas, las citolisinas, que las destruyen. Por otro lado, los linfocitos B son los responsables de la producción de autoanticuerpos contra distintas proteínas de las células β-pancreáticas. Esta fase subclínica de la enfermedad caracterizada por la presencia de autoanticuerpos en la sangre, se denomina prediabetes y puede prolongarse durante años hasta que el número de células β-pancreáticas productoras de insulina sea insuficiente para mantener la normoglucemia, figura 2 (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014). En este momento hacen su aparición los cuadros de hiperglucemia y cetosis, manifestaciones clínicas típicas de la diabetes tipo 1 que requieren un tratamiento con insulina exógena.



**Figura 2.** Modelo del desarrollo de la diabetes tipo 1. Adaptado de (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014)

Los autoanticuerpos, que se encuentran en la circulación sanguínea del paciente, se consideran biomarcadores determinantes de diabetes tipo 1 que reflejan el daño celular (Lampasona and Liberati, 2016; Nakayasu *et al.*, 2019). A pesar de su importancia como marcadores de un proceso autoinmune en curso, la opinión más generalizada es que los autoanticuerpos no son los principales efectores del daño de la célula  $\beta$ -pancreática (Ilonen, Lempainen and Veijola, 2019; Nakayasu *et al.*, 2019). No obstante, hay evidencias científicas que apoyan la idea de que los autoanticuerpos asociados a la diabetes tipo 1 podrían desempeñar algún papel en el desarrollo de la enfermedad. Así, por ejemplo, se ha observado que los ratones NOD deficientes en linfocitos B muestran una importante resistencia al desarrollo de la diabetes autoinmune (Serreze *et al.*, 1996). También se ha observado que el tratamiento con Rituximab, anticuerpo monoclonal que causa un agotamiento selectivo de los linfocitos B, preserva la secreción de péptido-C durante un año después del diagnóstico de diabetes tipo 1 (Pescovitz *et al.*, 2009). Actualmente, se investiga en el desarrollo de estrategias de inmunoterapia consistentes en administrar a pacientes autoantígenos reconocidos por los autoanticuerpos en un esfuerzo por inducir la tolerancia y modificar el desarrollo de diabetes tipo 1 en edad pediátrica (Ludvigsson *et al.*, 2008; Näntö-Salonen *et al.*, 2008).

### **1.1.3. Marcadores autoinmunes en la diabetes tipo 1**

La presencia de autoanticuerpos contra las células  $\beta$ -pancreáticas en una persona con diabetes confirma la etiología autoinmune de la enfermedad. Los autoanticuerpos pancreáticos suelen estar presentes al inicio de la enfermedad y persisten durante períodos de tiempo variables después de su aparición. Además, pueden preceder a la manifestación clínica de la diabetes en meses e incluso años, lo que los convierte, por ahora, en los mejores biomarcadores que pueden predecir el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Barker *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2018; Chiarelli, Giannini and Primavera, 2019).

El riesgo a desarrollar diabetes se relaciona con el número de autoanticuerpos detectados en el paciente: la presencia de dos o más autoanticuerpos da una

probabilidad más alta de padecer la enfermedad que la presencia de uno solo (Ziegler *et al.*, 2013). Incluso con la presencia de múltiples autoanticuerpos, existe una gran variabilidad en la tasa de progresión. Esta variabilidad se correlaciona con variables como la edad en la seroconversión, los niveles de autoanticuerpos, la presencia de combinaciones específicas de autoanticuerpos y la presencia de genotipos que incluyen o no genes HLA (Sosenko, 2016; Vehik *et al.*, 2020).

La lista de autoanticuerpos que se han descubierto hasta el momento es muy amplia (Winter and Schatz, 2011). En la tabla 2 se presenta una selección de los más relevantes.

**Tabla 2.** Autoanticuerpos más relevantes relacionados con la diabetes tipo 1

---

**I. Insulina y moléculas relacionadas con su procesado y almacenaje**

Insulina (Palmer *et al.*, 1983)

Proinsulina (Kuglin *et al.*, 1990)

Carboxypeptidasa H (Castaño *et al.*, 1991)

Transportador del zinc 8 (ZnT8A) (Wenzlau *et al.*, 2007)

**II. Proteínas de tipo Tirosina Fosfatasa**

IA-2 (Verge *et al.*, 1996)

IA-2  $\beta$  (Kawasaki, Hutton and Eisenbarth, 1996)

**III. Enzimas**

GADA (Baekkeskov *et al.*, 1990)

30-kDa quimiotripsinógeno pancreático (Kim *et al.*, 1993)

51-kDa descarboxilasa aromática-L-amino-ácida (Rorsman *et al.*, 1995)

DNA topoisomerasa II (Chang *et al.*, 1996)

Anhidrasa carbónica II (Taniguchi *et al.*, 2003)

**IV. Miscelánea**

ICA (Bottazzo, Florin-Christensen and Doniach, 1974)

Proteína de 38-kDa del islote pancreático (Pak *et al.*, 1990)

GLUT2 (Johnson *et al.*, 1990)

Proteínas de choque térmico, HSPs (Jones, Hunter and Duff, 1990)

GM2-1 gangliosido (Dotta *et al.*, 1997)

Glicolípidos (Cabrera-Rode *et al.*, 1995)

Glima 38 (Aanstoot *et al.*, 1996)

Aminoacyl-tRNA sintetasa (Park *et al.*, 2010)

---

Adaptado de (Winter and Schatz, 2011)

Los anticuerpos anti-islole, ICAs, fueron descritos por primera vez hace más de 40 años (Bottazzo, Florin-Christensen and Doniach, 1974). Estos autoanticuerpos son detectados por una técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando como sustrato tejido pancreático de donantes de órganos del grupo sanguíneo 0. La técnica consiste en incubar el suero del paciente sobre el tejido pancreático para que los anticuerpos del suero reconozcan las estructuras antigénicas celulares del tejido. La interacción se evidencia por medio de la posterior incubación con un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado con un fluoróforo. Los resultados se evalúan con un microscopio de fluorescencia y si hay autoinmunidad en el suero los islotes se muestran fluorescentes. Los ICAs son policlonales, es decir, comprenden un grupo heterogéneo de autoanticuerpos que incluyen, en grado variable, IAA, IA2A, GADA y ZnT8A, además de otros autoanticuerpos hasta ahora no caracterizados.

Los ensayos para la detección de ICAs están sujetos a variaciones en el tejido pancreático, el conjugado, los tiempos de incubación, la humedad y la interpretación biológico-científica. Por ello, tras el descubrimiento de los ICAs surgieron discrepancias entre los resultados de los laboratorios que utilizaban diferentes protocolos para los ensayos. Estas discrepancias condujeron a establecer *workshops* internacionales para la estandarización de las técnicas, un esfuerzo destinado a la normalización de los ensayos de autoanticuerpos y a la evaluación de los resultados de los laboratorios (Lampasona and Liberati, 2016). En general, la principal contribución de los *workshops* ha sido la información de que los ensayos en los que la unión de los anticuerpos se produce en la interfaz de una superficie sólida recubierta de antígeno, como es el caso del ELISA directo (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), no permiten la detección sensible y específica de los autoanticuerpos anti-islole. Por consiguiente, los formatos para la medición de autoanticuerpos se basan en ensayos en los que la interacción de los anticuerpos con el antígeno se produce total o parcialmente en fase fluida como es el caso de los radioinmunoensayos (RIA) que por el momento son los que presentan mayor fiabilidad, los ensayos de electroquimioluminiscencia (ECL) o los enzimoimmunoensayos del tipo ELISA puente (Lampasona and Liberati, 2016).

Los autoanticuerpos contra la insulina (IAA), la enzima glutamato descarboxilasa (GADA), la proteína tirosina fosfatasa IA2 (IA2A), y la proteína transportadora de zinc 8 (ZnT8A), son los autoanticuerpos mejor caracterizados asociados con la diabetes autoinmune. El ZnT8A es el de más reciente reconocimiento y tiene el potencial de estar entre los cuatro más prevalentes. Los demás autoanticuerpos descritos en la tabla 2 son difíciles de cuantificar y/o no son suficientemente prevalentes ni específicos para la diabetes tipo 1, por lo que en la actualidad no se justifica su uso como marcadores de esta enfermedad en la práctica clínica (Winter and Schatz, 2011).

#### **1.1.3.1. Autoanticuerpos anti-insulina (IAA)**

La insulina fue el primero de los autoantígenos identificados en la diabetes tipo 1. La primera publicación sobre la presencia de anticuerpos contra la insulina en pacientes con diabetes antes del tratamiento, tuvo lugar en 1963 (Pav, Jezkova and Skrha, 1963). La confirmación de estos resultados y su relación con el proceso autoinmune que tiene lugar en esta patología, se produjo dos décadas más tarde con el desarrollo de un radioensayo que detectaba autoanticuerpos anti-insulina (IAA) en pacientes con diabetes no tratados e incluso varios años antes del inicio clínico de la enfermedad (Palmer *et al.*, 1983).

La insulina es una hormona polipeptídica sintetizada por las células  $\beta$ -pancreáticas cuya función es la regulación del nivel de glucosa en la sangre. En su forma activa consta de dos cadenas polipeptídicas: la A, de 20 aminoácidos y la B, de 31. Estas dos cadenas se unen entre sí por medio de dos puentes disulfuro. La respuesta humoral contra la insulina se dirige fundamentalmente contra los epítomos conformacionales y no reaccionan con el antígeno desnaturalizado. Los aminoácidos clave para la unión de IAA de alta afinidad han sido mapeados dentro de los residuos de 8 a 13 de la cadena A, mientras que la mayoría de IAA de baja afinidad dependen de los residuos de 28 a 30 de la cadena B. Sin embargo, también se ha descrito casos de IAA positivo con afinidad hacia otros epítomos (Achenbach *et al.*, 2004).

La presencia de IAA es más común en la edad pediátrica que en la adulta (Winter and Schatz, 2011), y los títulos más altos de IAA (por encima de 2000 nU/mL) se describen casi exclusivamente en niños que desarrollan la enfermedad antes de los 5 años. Por el contrario, menos del 50% de los pacientes que desarrollan diabetes después de los 15 años tienen niveles medibles de IAA (Michels *et al.*, 2015). Transcurridos unos 10 días desde la primera administración de insulina, la determinación de IAA ya no es válida porque la inyección de insulina exógena puede provocar una respuesta inmunitaria de anticuerpos secundarios contra la insulina que no pueden distinguirse, con los métodos habituales, de la producción de autoanticuerpos (Winter and Schatz, 2011).

#### **1.1.3.2. Autoanticuerpos anti-GAD<sub>65</sub> (GADA)**

A principios de la década de los 80, se descubrió la presencia de anticuerpos contra una proteína de los islotes pancreáticos de peso molecular de 64 kDa (Baekkeskov *et al.*, 1990). Esta actividad era específica de pacientes con diabetes tipo 1, ya que se presentaba en aproximadamente el 70% de los pacientes al inicio clínico, pero no se detectaba en controles sanos. La identificación de la enzima glutamato descarboxilasa como el antígeno de 64 kDa tuvo lugar en pacientes con un desorden neurológico muy poco frecuente llamado síndrome de la persona rígida (*Stiff-man syndrome*) que suele asociarse con diabetes tipo 1 y que se presenta con elevados títulos de GADA y positividad ICA (Solimena *et al.*, 1988).

La enzima glutamato descarboxilasa, GAD, cataliza la descarboxilación del ácido glutámico para formar el ácido  $\gamma$ -amino butírico, GABA, que es un neurotransmisor que inhibe o reduce la actividad neuronal en el sistema nervioso central. El GABA ejerce funciones de señalización en varios tejidos periféricos y células del intestino, estómago, páncreas, trompa de Falopio, útero, ovario, testículos, riñón, vejiga urinaria, pulmón, ojo e hígado. (Lampasona and Liberati, 2016). Se desconoce el papel específico del GAD en las células  $\beta$ -pancreáticas aunque se ha sugerido que el GABA podría ser importante para el metabolismo energético de la célula  $\beta$ , debido a su capacidad para generar NADH y ATP en una ruta alternativa al ciclo de Krebs (Vincent *et al.*, 1983).

Existen dos isoformas de la molécula GAD, de pesos moleculares de 65 kDa (GAD<sub>65</sub>) y 67 kDa (GAD<sub>67</sub>). La molécula GAD<sub>65</sub> incluye un dominio NH<sub>2</sub> terminal, un dominio intermedio que contiene un sitio de unión de cofactores de piridoxal 5'-fosfato (PLP), y un dominio catalítico terminal COOH. La isoforma GAD<sub>67</sub> está codificada por un gen distinto y es en general 76% homóloga a la GAD<sub>65</sub>. En el islote pancreático humano, GAD<sub>65</sub> parece ser la forma predominante, y se ha detectado mayoritariamente en células β, aunque no es exclusivo de estas. La respuesta humoral contra la molécula GAD<sub>65</sub> está muy bien caracterizada y se pueden identificar epítomos de reconocimiento en el dominio NH<sub>2</sub> terminal, el dominio de enlace PLP medio y en el dominio COOH terminal. Aproximadamente el 80% de los sueros de diabéticos en el momento del diagnóstico reconocen la isoforma GAD<sub>65</sub>, mientras que anticuerpos frente a la forma GAD<sub>67</sub> aparecen en menos del 20% de los sujetos con diabetes tipo 1 y parece deberse a reacciones cruzadas con GAD<sub>65</sub> (Winter and Schatz, 2011; Lampasona and Liberati, 2016). La presencia de los GADA antes del diagnóstico de la enfermedad subraya la importancia de los anticuerpos anti-GAD para predecir el riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 en los niños (Knip *et al.*, 2016), lo que demuestra su importante papel en los criterios de diagnóstico de la enfermedad.

### **1.1.3.3. Autoanticuerpos anti-IA2 (IA2A)**

Después de la identificación de GAD<sub>65</sub> como componente principal del antígeno de 64 kDa, un estudio publicado en 1995 (Payton, Hawkes and Christie, 1995) puso de manifiesto la heterogeneidad de los anticuerpos anti-64 kDa, ya que el tratamiento suave con tripsina de la fracción de 64 kDa inmunoprecipitada con suero de pacientes con diabetes, originaba fragmentos de peso molecular de 37, 40 y 50 kDa. Únicamente el fragmento de 50 kDa desaparecía previa incubación con anticuerpos anti-GAD<sub>65</sub>.

El cribado de una genoteca de expresión de islote humano con suero de pacientes con diabetes (Rabin *et al.*, 1992) identificó el antígeno ICA512 (*islet cell antigen 512*). Paralelamente, otro grupo investigador aisló la molécula IA2 (*insulinoma associated protein 2*) a partir de una genoteca de ADNc de insulinoma humano (Lan *et al.*, 1994). El estudio de la secuencia del ADN codificante demostró que ICA512 e IA2 son la

misma proteína (Pietropaolo, Hutton and Eisenbarth, 1997). Por otro lado, se ha demostrado que el fragmento de 40 kDa (a partir del antígeno de 64 kDa) corresponde a la región intracelular de IA2 y que el fragmento de 37 kDa deriva de otra molécula denominada IA2 $\beta$ , con una homología del 42% con IA2 y con la que parece compartir varios epítomos (Pietropaolo, Hutton and Eisenbarth, 1997).

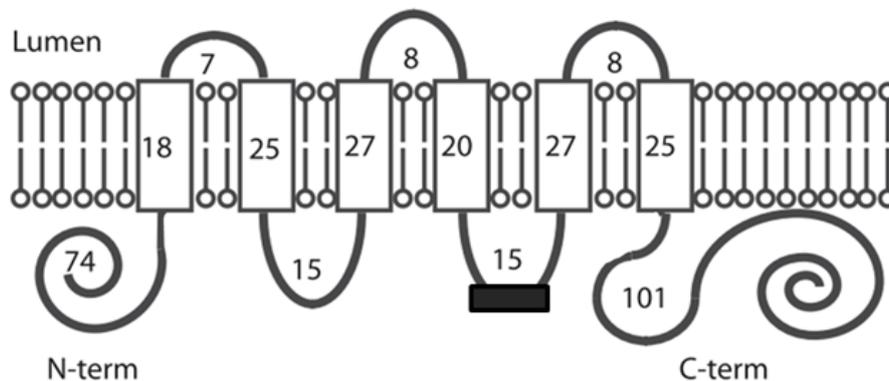
La molécula IA2 es una proteína de 979 aminoácidos que guarda relativa homología con la familia de los receptores tirosina-fosfatasa. Se trata de una proteína de membrana de los gránulos de secreción de células neuroendocrinas y que en humanos se encuentra, entre otros lugares, en células secretoras de proteínas del cerebro, hipófisis y páncreas. Resultados de diferentes investigaciones apuntan a que su función en la célula  $\beta$ -pancreática es de modulador positivo de la secreción de insulina, no obstante, el mecanismo molecular que subyace a esta función es hasta el momento desconocido (Hu *et al.*, 2005). La proteína IA2 presenta un péptido señal de 34 aminoácidos, una región extracelular (aminoácidos 35-575), otra transmembrana (576-600) y un dominio intracelular (601-979) en la que se encuentra una zona homóloga a otras tirosina fosfatasa (696-979) pero que está inactivada por la sustitución de dos aminoácidos: alanina en posición 911 por aspártico y aspártico por alanina en posición 877, dos lugares conservados críticos para la actividad de la enzima (Hu *et al.*, 2005). Respecto a la respuesta humoral contra la molécula IA2, se han identificado múltiples epítomos lineales cortos contra la región intracelular de la molécula y epítomos conformacionales del dominio homólogo a otras tirosina fosfatasa (Hu *et al.*, 2005).

La prevalencia de los IA2A en pacientes con diabetes en el momento del diagnóstico está entre el 50-70% (Notkins, 2002). Se ha encontrado también una sensibilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-IA2 $\beta$  en torno al 50%. Sin embargo, más del 95% de los sueros IA2A positivos reconocen también IA2 $\beta$  (Kawasaki *et al.*, 1996). Estudios encaminados a determinar la cronología de aparición de los autoanticuerpos frente a IA2 e IA2 $\beta$  han observado que los anti-IA2 $\beta$  se presentan más tarde que los anti-IA2, como consecuencia de la prolongación de la autoinmunidad a otros epítomos de la proteína IA2, lo que va en contra de la posible existencia de una respuesta específica contra IA2 $\beta$ .

### 1.1.3.4. Autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A)

El transportador de zinc 8 (ZnT8), es la proteína de más reciente identificación como antígeno en la diabetes mellitus tipo 1 (Wenzlau *et al.*, 2007) sugiriendo su potencial como marcador serológico predictivo y de diagnóstico de diabetes autoinmune que complementa a los clásicos descubiertos previamente: IAA, GADA e IA2A.

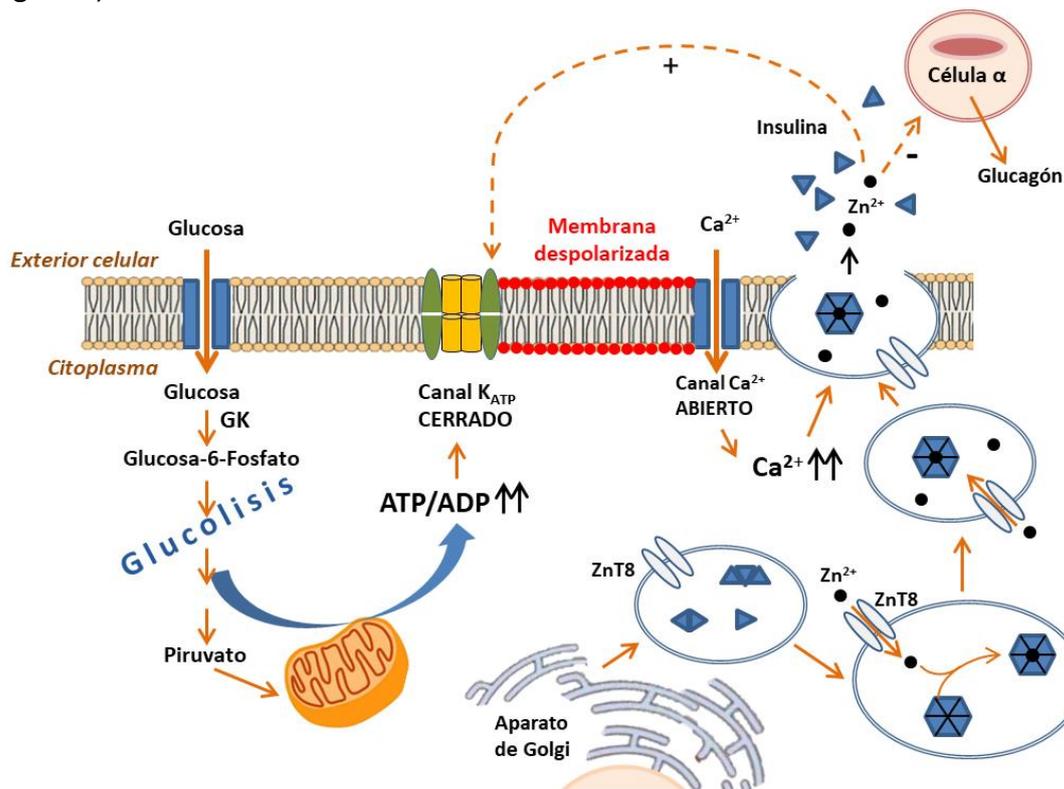
El ZnT8 es una proteína de 369 aminoácidos codificada por el gen *SLC30A8* localizado en el cromosoma 8q24.11. Este transportador se encuentra localizado en la membrana de los gránulos de secreción de insulina de la célula  $\beta$ -pancreática (Chimienti *et al.*, 2004), donde actúa en el transporte de zinc desde el citoplasma de la célula  $\beta$  al interior del gránulo de secreción. Está compuesto por 6 dominios transmembrana con un extremo carboxilo terminal y otro amino terminal y un dominio rico en histidina entre la cuarta y la quinta hélice, con alta afinidad al zinc (Figura 3).



**Figura 3.** N-term corresponde al extremo amino terminal formado por los aminoácidos del 1 al 74; C-term corresponde al extremo carboxilo terminal formado por los aminoácidos del 264 al 369. Adaptado de (Wenzlau *et al.*, 2007).

El zinc es un elemento fundamental para el procesamiento, maduración y almacenamiento de la insulina (Chimienti, Favier and Seve, 2005). Durante la síntesis de esta hormona, la presencia del transportador ZnT8 en las vesículas de insulina es necesaria para permitir que el zinc se incorpore dentro de esas vesículas y así facilitar la formación de hexámeros sólidos de zinc-insulina. Normalmente, la insulina es

secretada por las células  $\beta$ -pancreáticas después de la estimulación de la glucosa (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismo de secreción de insulina y función hipotética del transportador ZnT8 y de los iones de zinc en la célula  $\beta$  pancreática. La acumulación de zinc en las vesículas se produce a lo largo de todo el proceso de maduración, almacenamiento y secreción de la insulina. La insulina se almacena en el interior de las vesículas secretoras con una estructura hexagonal unida a dos iones de  $Zn^{2+}$  por hexágono. El zinc es también un componente importante en los mecanismos de secreción de insulina por medio de una acción autocrina y modula la función de células vecinas mediante interacciones paracrinas. Adaptado de (Chimienti, Favier and Seve, 2005).

La secreción de insulina se produce como consecuencia de la entrada de glucosa al interior celular a través del transportador de glucosa GLUT-2. La glucosa se incorpora a la glucólisis y sufre una fosforilación por parte de la glucoquinasa (GK) con el consiguiente gasto de ATP. En los siguientes pasos de la glucólisis se produce piruvato, NADH y ATP. El piruvato entra en la mitocondria y activa el ciclo de Krebs generando más ATP y poder reductor. Tanto el poder reductor generado en el citosol (NADH) y transportado al interior mitocondrial, como el generado en la mitocondria en el ciclo de Krebs (NADH y FADH<sub>2</sub>) entran en la cadena respiratoria mitocondrial y activa el transporte de electrones en los diferentes complejos que la conforman. A partir de ahí

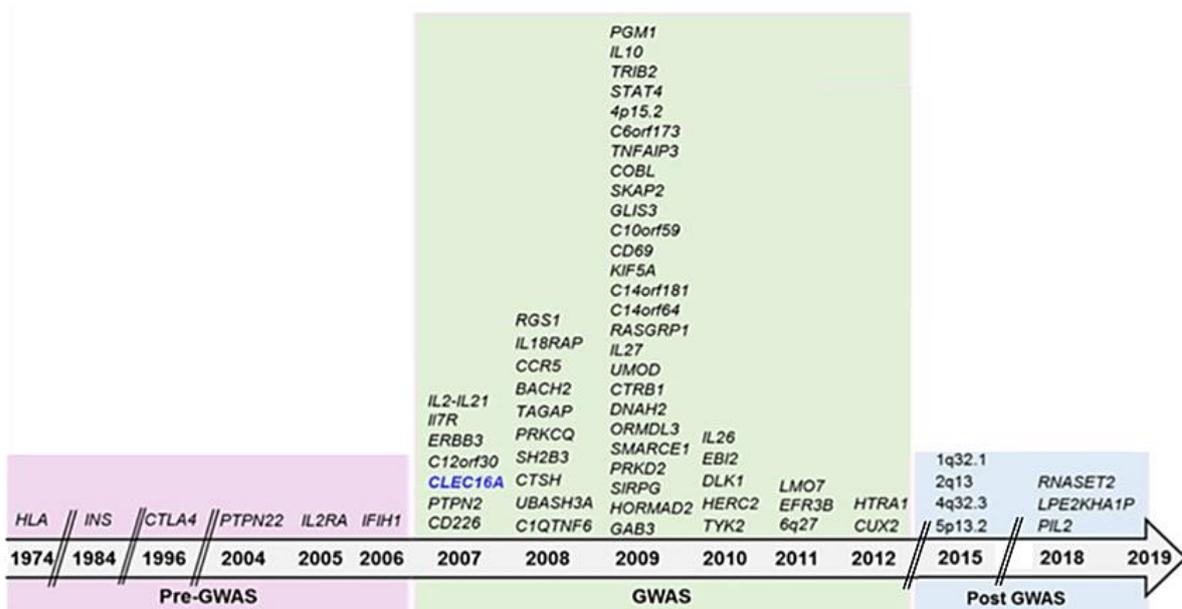
se crea un gradiente de  $H^+$  a ambos lados de la membrana mitocondrial interna que es aprovechado por la ATP-sintetasa para generar ATP. El aumento del cociente ATP/ADP provoca el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), lo que despolariza la membrana celular y provoca la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ . El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular hace que los gránulos de insulina del citoplasma se aproximen a la membrana y sean secretados al medio extracelular por exocitosis. Junto con la insulina se liberan grandes cantidades de zinc al medio extracelular (Qian *et al.*, 2000). Varias publicaciones científicas demuestran que el zinc regula esta vía a muchos niveles, es decir, en los canales del  $K_{ATP}$  (Bancila *et al.*, 2005), en la síntesis y almacenamiento de insulina (Dodson and Steiner, 1998) y a nivel de células  $\alpha$  modulando su función mediante interacciones paracrin/autocrin (Ishihara *et al.*, 2003).

La respuesta humoral contra el ZnT8 es compleja y comprende varios determinantes antigénicos dirigidos a los extremos carboxilo y amino terminal del transportador de zinc localizados en el citoplasma. Los sueros de pacientes con diabetes tipo 1 y ZnT8A positivo reconocen mayormente el dominio carboxilo terminal del transportador (residuos 268-369), resultando muy poco frecuente la presencia de anticuerpos que reconozcan al fragmento amino terminal (residuos 1-74) (Wenzlau *et al.*, 2007). Por otro lado, en el extremo carboxilo terminal del ZnT8 existe un polimorfismo no sinónimo (rs1326634 G>T) con dos variantes polimórficas en el aminoácido 325 (Arg/Trp). Este aminoácido 325 es clave en la generación de variantes polimórficas de la proteína y en la especificidad de la unión de autoanticuerpos (Wenzlau *et al.*, 2008). Conforme a estos descubrimientos, se han publicado trabajos que evalúan el reconocimiento específico de los ZnT8A presentes en sueros de pacientes con diabetes tipo 1 utilizando construcciones monoméricas del dominio carboxilo terminal que contienen Arg o Trp en el residuo 325 y construcciones diméricas con Arg-Arg, Trp-Trp o Arg-Trp (Kawasaki *et al.*, 2008; Vaziri-Sani *et al.*, 2011; Faccinetti *et al.*, 2016). Según los resultados del primer *workshop* internacional para la estandarización de la determinación de autoanticuerpos anti-ZnT8, la construcción heterodimérica (Arg-Trp) es la que presenta mejor combinación de sensibilidad y especificidad para ser utilizada en el *screening* rutinario de ZnT8A en personas con diabetes (Lampasona *et al.*, 2011).

**1.1.4. Susceptibilidad genética en la diabetes tipo 1**

Una evidencia de la contribución de los factores genéticos en la etiología de la diabetes tipo 1 es el aumento considerable del riesgo a padecer la enfermedad entre los familiares de enfermos, comparado con el riesgo del 0,4% estimado para la población general. Así, en los niños que tienen un progenitor con diabetes se estima un riesgo a desarrollar la patología del 1-9%, entre hermanos es del 6-7% y entre gemelos idénticos alcanza el 70% si el seguimiento es a largo plazo (DiMeglio, Evans-Molina and Oram, 2018; Redondo, Steck and Pugliese, 2018).

En la actualidad se establece que la diabetes tipo 1 es una enfermedad poligénica. Los estudios sobre la genética de la diabetes tipo 1 comenzaron en la década de los 70 y revelaron la contribución de los genes del sistema del antígeno leucocitario humano o HLA. Posteriormente, los estudios familiares y de genes candidato descubrieron otros cinco genes que se asocian con la diabetes tipo 1, *INS*, *CTLA4*, *PTPN22*, *IL2RA* e *IFIH1*. A partir de 2007, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés *Genome Wide Association Study*) han aumentado drásticamente el número de genes asociados con la diabetes tipo 1 a más de 60, figura 5



**Figura 5.** Esquema cronológico del descubrimiento de los genes que contribuyen a la susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 1. Adaptado de (Bakay *et al.*, 2019)

Muchos de los *loci* que se han encontrado asociados a la patología contienen genes que afectan a la respuesta inmune, aunque también pueden estar implicadas vías alternativas, aún desconocidas. A continuación se presentan los más relevantes.

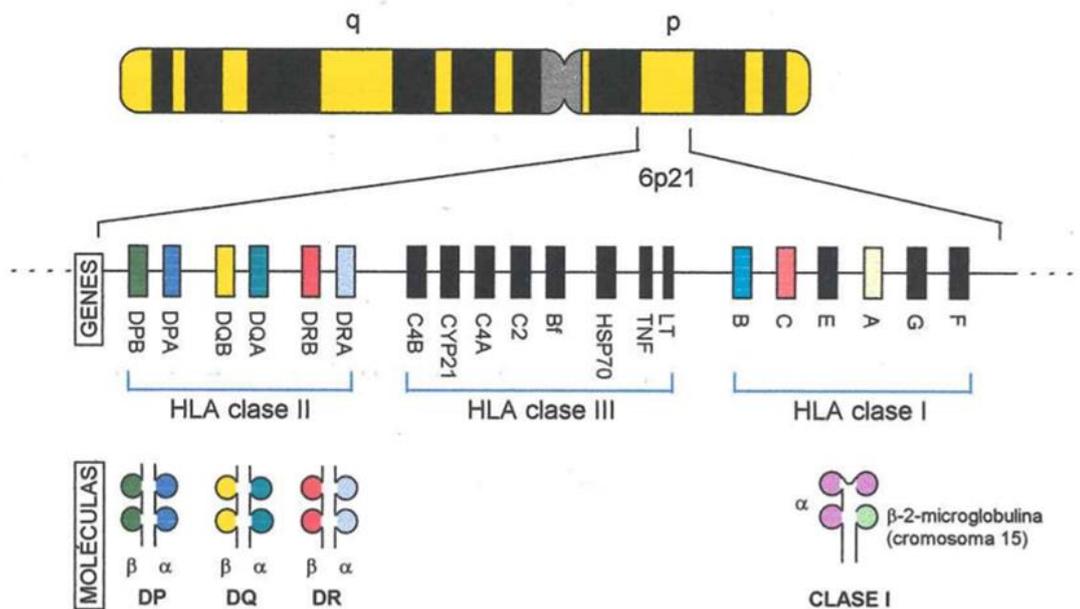
#### **1.1.4.1. Genes HLA**

Todas las especies de mamíferos tienen un conjunto de genes estrechamente ligados y muy polimórficos, que fueron descubiertos por su implicación en el rechazo o aceptación de trasplantes o injertos de tejidos u órganos, de ahí deriva su nombre de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*).

Las moléculas codificadas por el MHC son esenciales en el desarrollo de las respuestas inmunes específicas, tanto la humoral como la celular. Estas moléculas tienen un papel esencial en el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T, de forma que el conjunto de alelos de los genes MHC que posee un individuo, influye sobre el repertorio de epítomos que pueden reconocer sus linfocitos. Por esa razón, la capacidad de respuesta frente a los patógenos y los fenómenos de autoinmunidad dependen de esa dotación concreta de alelos del complejo MHC. En humanos, este conjunto de genes del MHC se sitúa en el cromosoma 6 en la posición p21, y se conoce como sistema de antígenos leucocitarios humanos o HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigen*).

El sistema HLA juega un papel crítico en la patogénesis de la diabetes tipo 1. La asociación entre la diabetes tipo 1 y el HLA se publicó por primera vez en 1973, tras la observación de una mayor frecuencia de ciertos antígenos HLA en los pacientes con diabetes tipo 1 en comparación con individuos sanos (Singal and Blajchman, 1973). Entre los genes HLA, los más relacionados con la susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 1 son los HLA de clases I y II, que sintetizan proteínas que resultan esenciales para la especificidad inmunitaria y desempeñan una función importante en la predisposición a diversas enfermedades autoinmunes.

La organización de los genes HLA en el cromosoma se muestra en la siguiente figura.



**Figura 6.** Organización de los genes de HLA en el cromosoma 6, región p21.1-21.3. Los genes HLA de clase II codifican las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que componen las moléculas DP, DQ y DR. Los genes HLA de clase I (A, B, C) codifican las cadenas  $\alpha$  de las moléculas de clase I. La codificación de la cadena  $\beta$  corresponde al cromosoma 15. Los rectángulos negros representan otros genes cuyos productos no intervienen en el reconocimiento inmune.

Las moléculas HLA de clase I son glicoproteínas transmembrana que se presentan en la superficie de todas las células nucleadas. Estas moléculas están formadas por una cadena pesada polimórfica (también denominada cadena  $\alpha$ ) que se asocia mediante un enlace no covalente a una cadena ligera no polimórfica, microglobulina  $\beta$ 2, codificada en el cromosoma 15. Las cadenas  $\alpha$  de las moléculas de clase I están codificadas por genes en los *loci* HLA-A, HLA-B y HLA-C. Los linfocitos que expresan moléculas CD8 reaccionan con moléculas HLA de clase I. Estos linfocitos suelen tener una función citotóxica, que requiere la capacidad de reconocer cualquier célula infectada. Debido a que cada célula nucleada expresa moléculas HLA de clase I, todas las células infectadas pueden actuar como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Las moléculas HLA de clase II se expresan sólo en la superficie de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B), y sirven para presentar

péptidos procesados procedentes de antígenos exógenos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las moléculas HLA de clase II son glicoproteínas transmembrana formadas por dos cadenas glicoproteicas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que forman heterodímeros asociados de forma no covalente. Cada una de ellas está codificada por un gen diferente, A y B respectivamente, situados de forma contigua en la región HLA. La cadena  $\alpha$  del HLA-DR está codificada por un único gen DRA, mientras que la  $\beta$  puede estar codificada por distintos genes B (DRB1, DRB3, DRB4 o DRB5) siendo todos ellos a su vez polimórficos. Las cadenas HLA-DQ están codificadas por un solo gen DQA1 y otro DQB1, como también es el caso de las cadenas HLA-DP codificadas por los genes DPA1 y DPB1. Las moléculas HLA-DQ y -DP son polimórficas en ambas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ .

Las moléculas HLA de clase III incluyen algunos componentes del complemento (C4, C2 y Bf), que son proteínas de la superficie celular que intervienen en la respuesta inflamatoria, la agregación de leucocitos, la fagocitosis y la actividad bactericida. Otros genes de clase III codifican la enzima 21-hidroxilasa, el factor de necrosis tumoral (TNF del inglés *tumor necrosis factor*) THF- $\alpha$  y la linfotoxina o TNF- $\beta$ , así como otras moléculas asociadas al transporte peptídico, respuesta inmune y ciertos sistemas enzimáticos. Algunas moléculas HLA de clase III se han descrito asociadas con diabetes tipo 1, aunque no está claro si estas asociaciones son primarias o causadas por estar en desequilibrio de ligamiento con otros genes HLA de clase II (Valdes and Thomson, 2009; Kumar *et al.*, 2012).

La región HLA de clase II ha sido propuesta como la principal implicada en la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 contribuyendo en un 40-50% al riesgo genético a desarrollar la enfermedad (DiMeglio, Evans-Molina and Oram, 2018). Sin embargo, los mecanismos biológicos exactos por los que los alelos de los genes que codifican el HLA contribuyen al riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 siguen siendo difíciles de interpretar (Nyaga *et al.*, 2018).

Tanto la susceptibilidad como la protección a desarrollar diabetes tipo 1 están asociadas con las secuencias altamente polimórficas de los genes HLA de clase II, concretamente los genes DR y DQ. En la región HLA los genes presentan desequilibrio

de ligamiento, es decir, debido a la proximidad que hay entre ellos, la frecuencia de recombinación entre los genes es menor del 50%, por lo que los alelos no se segregan de forma independiente sino que tienden a heredarse juntos. A la combinación de alelos de diferentes *loci* de un cromosoma que se transmiten juntos a la descendencia se denomina haplotipo (cada individuo hereda dos haplotipos, el materno y el paterno). Esto es particularmente habitual en los genes DR y DQ de tal forma que para una población determinada un alelo DR o DQ se encuentra generalmente en un solo haplotipo o en escasas combinaciones. En muchos casos, la sola presencia de un alelo permite asumir los otros alelos del haplotipo.

En poblaciones caucásicas, los haplotipos que confieren el mayor riesgo a desarrollar diabetes tipo 1 son el DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 (también conocido como DR3-DQ2) y el DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02 (también conocido como DR4-DQ8) principalmente los haplotipos portadores de los alelos DRB1\*04:05, \*04:01 y \*04:02. Hasta el 90% de las personas con diabetes tipo 1 son portadores de uno de los dos haplotipos de alto riesgo y alrededor del 30% de los pacientes portan los dos haplotipos de riesgo en heterocigosis, comparado con el 2% de la población general. De hecho, la combinación de los dos haplotipos en un individuo confiere el mayor riesgo a desarrollar diabetes (Erlich *et al.*, 2008; Redondo, Steck and Pugliese, 2018; Lee and Hwang, 2019). Por otro lado, también se han descrito haplotipos que disminuyen el riesgo a desarrollar diabetes, como es el caso del haplotipo DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 (también conocido como DR2) y en menor medida del DRB1\*1401-DQA1\*0101-DQB\*0503 y DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303 (Redondo *et al.*, 2000; Erlich *et al.*, 2008).

#### **1.1.4.2. Genes no-HLA**

En 1984, el gen de la insulina, **gen *INS***, fue identificado como el segundo *locus* asociado con la diabetes tipo 1 (Bell, Horita and Karam, 1984). Está localizado en el cromosoma 11p15.5, se expresa en las células  $\beta$ -pancreáticas y en el timo, y después de la región HLA es el que presenta mayor asociación. La susceptibilidad a desarrollar la patología se asocia a una región polimórfica localizada en el extremo 5' del gen, que

se origina por la repetición en tándem de un oligonucleótido de 14-15 pb (VNTR del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*). El número de repeticiones varía en un amplio rango que puede ir desde 26 a más de 200, lo que permite la clasificación de los alelos en tres tamaños: alelos clase I (de 26 a 63 repeticiones), alelos clase II (de 64 a 143 repeticiones) y alelos clase III (de 140 a 210 repeticiones). Los alelos de clase I se asocian con un aumento del riesgo de diabetes tipo 1 en comparación con los alelos protectores dominantes de clase III (Bennett *et al.*, 1995; Urrutia *et al.*, 1998), pero el mecanismo fisiopatológico por el que el genotipo INS-VNTR condiciona la aparición de la enfermedad está aún por determinar. En este sentido, se ha descubierto que el *locus* VNTR regula la expresión de dos genes que podrían ser relevantes en la patogénesis de la enfermedad, el propio gen de la insulina y el gen del factor de crecimiento insulínico tipo 2, *IGF2* (Kennedy, German and Rutter, 1995). Los alelos VNTR clase I se asocian con una menor transcripción del gen *INS* y por tanto una menor expresión de la insulina en el timo. Los niveles bajos de insulina en el timo se asocian con una disminución de la tolerancia hacia la misma, lo que aumentaría la susceptibilidad a la enfermedad. Diferentes estudios publicados que proponen a la insulina y sus precursores como el principal autoantígeno iniciador de la diabetes tipo 1 respaldarían esta hipótesis (Kent *et al.*, 2005; Zhang, Nakayama and Eisenbarth, 2008).

En 1996, el **gen *CTLA4*** localizado en el cromosoma 2q33, fue reconocido como otro posible gen que confiere susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 1 (Nisticò *et al.*, 1996). El gen codifica un receptor proteico situado en la membrana celular de los linfocitos T activados CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y está asociado con varias enfermedades autoinmunes, entre ellas la diabetes tipo 1 (Kristiansen, Larsen and Pociot, 2000; Tang *et al.*, 2012). Se trata de una molécula que actúa como posible inhibidora de la proliferación de linfocitos T y de la producción de interleucina 2. Los polimorfismos del gen *CTLA4* asociados con la diabetes tipo 1, a través de distintos mecanismos aún no determinados, dan como resultado un menor control de la proliferación de los linfocitos T (Kristiansen, Larsen and Pociot, 2000; Wing *et al.*, 2008).

Posteriormente, en un estudio caso-control publicado en 2004, se identificó el **gen *PTPN22*** asociado con la diabetes tipo 1 (Bottini *et al.*, 2004). Este gen, localizado en el

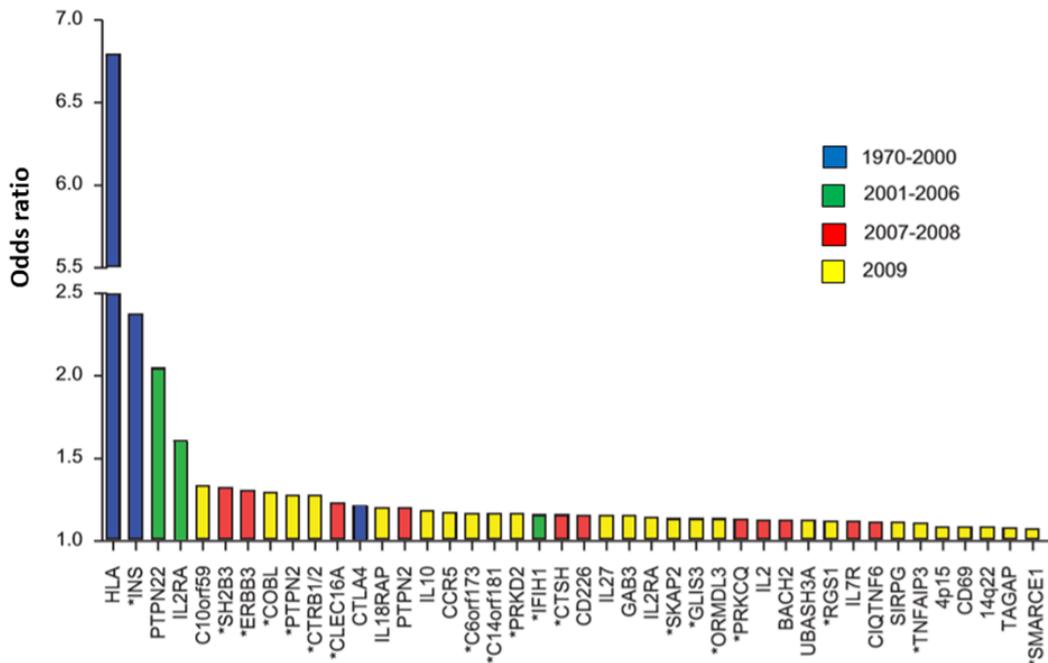
cromosoma 1p13, codifica una proteína tirosina fosfatasa específica de linfocitos (LYP del inglés *lymphoid tyrosine phosphatase*) que actúa como inhibidora de la activación de los linfocitos T mediante la interacción con la tirosina quinasa Csk (C-terminal Src quinasa). El polimorfismo rs2476601 asociado con la diabetes tipo 1, consiste en la sustitución de Arginina por Triptófano en la posición 620 de la proteína, lugar clave de unión del complejo LYP-Csk. Los individuos portadores del polimorfismo pueden tener cantidades reducidas de complejos LYP-Csk y, ante la falta de inhibición, los linfocitos T son más propensos a desencadenar una respuesta inmune destructiva contra los autoantígenos generados después de la acción de un factor ambiental estimulante (Bottini *et al.*, 2004).

En 2005 se identificó el **gen *IL2RA***, localizado en el cromosoma 10p15.1, como otro posible gen asociado a la diabetes tipo 1. Codifica la subunidad alfa del receptor de interleucina-2 (CD25), altamente expresado en linfocitos T reguladores. Se han descrito variantes del gen *IL2RA* que afectan a la sensibilidad de la señal de la interleucina-2, lo que puede jugar un papel importante en la disfunción de los linfocitos T reguladores y en la patogénesis de la diabetes tipo 1 (Vella *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2015).

Por último, en un estudio de asociación que implicaba a 6.500 SNPs (Smyth *et al.*, 2006), se identificó el **gen *IFIH1***, localizado en el cromosoma 2q24, que codifica una helicasa de ARN implicada en la respuesta inmune innata frente a virus. El gen *IFIH1* es el sexto gen reconocido asociado a esta patología en la época previa al GWAS.

Gracias al desarrollo de los estudios de asociación del genoma completo, GWAS, que en un contexto libre de hipótesis permiten probar un gran número (hasta millones) de variantes en grandes poblaciones clínicamente bien caracterizadas, se han hecho grandes progresos en el descubrimiento de genes o *loci* asociados con el riesgo de diabetes tipo 1, llegando a identificarse más de 60 (Nyaga *et al.*, 2018; Bakay *et al.*, 2019; Lee and Hwang, 2019). Sin embargo, en comparación con el HLA o incluso con el gen *INS*, la contribución de todos estos genes a la susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 1 es claramente menor (Figura 7). Por otro lado, se desconocen en gran medida los mecanismos de acción de estos *loci* en el desarrollo y la progresión de la

enfermedad, lo que limita la aplicación clínica de los hallazgos del GWAS (Bakay *et al.*, 2019). Caracterizar la función y esclarecer los mecanismos biológicos subyacentes en estos *loci*, así como identificar genes y SNPs de susceptibilidad, e integrar los datos GWAS con datos de transcriptoma y epigenoma en la diabetes tipo 1, es el próximo gran desafío de la era post-GWAS.



**Figura 7.** Representación de la *Odds Ratio* de los alelos de riesgo de 42 genes/*loci* asociados con el desarrollo de diabetes tipo 1. La mayoría de estos genes están implicados en la respuesta inmune. El asterisco indica los genes que se expresan en los islotes pancreáticos. El color designa el año del descubrimiento del gen candidato. Adaptado de (Pociot *et al.*, 2010).

## 1.2. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes tipo 2, previamente conocida como diabetes no insulino dependiente o diabetes del adulto, se debe a la coexistencia de cierto grado de resistencia a la acción de la insulina y un defecto funcional en las células  $\beta$ -pancreáticas que no permite compensar completamente la situación mediante un incremento de la secreción de insulina (Rubio Cabezas and Argente, 2012). En adultos, este tipo de diabetes representa alrededor del 90% de todos los casos. Sin embargo, en la mayoría de las poblaciones pediátricas estudiadas, la diabetes tipo 2 representa menos del 50% de los

casos de diabetes, existiendo grandes diferencias de prevalencia entre etnias, desde valores menores al 3% en poblaciones europeas caucásicas hasta alcanzar casi el 50% en India y Japón y el 64% en poblaciones indígenas americanas (Aguayo *et al.*, 2013; Reinehr, 2013; Dabelea *et al.*, 2014; Barrett *et al.*, 2020; Shah and Nadeau, 2020).

El aumento de casos de diabetes mellitus de tipo 2 en niños y adolescentes está asociado al aumento de la obesidad infantil, y se está convirtiendo en una preocupación de salud pública cada vez más importante en todo el mundo (Rosenbloom *et al.*, 2008). El estudio SEARCH sobre la diabetes juvenil desarrollado en Estados Unidos (Mayer-Davis *et al.*, 2017), evaluó la tendencia de la tasa de incidencia de diabetes tipo 2 juvenil en 10 años de seguimiento (2002-2012). Encontraron un incremento anual significativo de la incidencia en todos los grupos étnicos excepto en blancos no hispanos. Así, la tasa de incidencia aumentó en más de un 9% en nativos americanos y en asiáticos e isleños del Pacífico (personas de origen chino, filipino, coreano, hawaiano, indio-asiático, japonés, samoano, vietnamita, entre otras). El incremento estimado entre niños afroamericanos e hispanos fue menor, en torno al 6,6%. En contraste, los jóvenes blancos no hispanos presentaron una incidencia baja y estable de 4 casos/100.000-año a lo largo de los 10 años de seguimiento.

Al igual que en la diabetes tipo 2 de los adultos, la diabetes tipo 2 de los jóvenes se asocia con la resistencia a la insulina, junto con el deterioro progresivo de la función de la célula  $\beta$ -pancreática y la deficiencia relativa de insulina en ausencia de marcadores inmunológicos relacionados con la diabetes. Sin embargo, los mecanismos precisos por los que la diabetes tipo 2 progresa en este grupo de edad todavía no están bien caracterizados. Se pensaba que este tipo de diabetes en los jóvenes estaba asociada con complicaciones crónicas debido a una exposición más prolongada a la enfermedad, pero diversos estudios muestran que la función de la célula  $\beta$  del páncreas se deteriora más rápidamente en los jóvenes con diabetes tipo 2 en comparación con la diabetes de inicio en la edad adulta (Hannon and Arslanian, 2015; Barrett *et al.*, 2020). En general, los niños con diabetes tipo 2 son obesos, tienen niveles inicialmente altos de péptido C, presentan resistencia a la insulina (hiperlipemia, hipertensión, acantosis nigricans, hiperandrogenismo ovárico y enfermedad de hígado graso no alcohólico),

tienen historia familiar de diabetes y ausencia de autoanticuerpos pancreáticos (Rosenbloom *et al.*, 2008). La edad media de presentación de la patología es de 13,5 años, coincidiendo con la resistencia fisiológica a la insulina característica de la adolescencia, con una presentación más temprana en niñas frente a niños debido a las diferencias en la edad de inicio de la pubertad. Aunque es raro el desarrollo de esta patología en niños prepúberes, se han descrito casos en menores de 10 años (Klingensmith *et al.*, 2016).

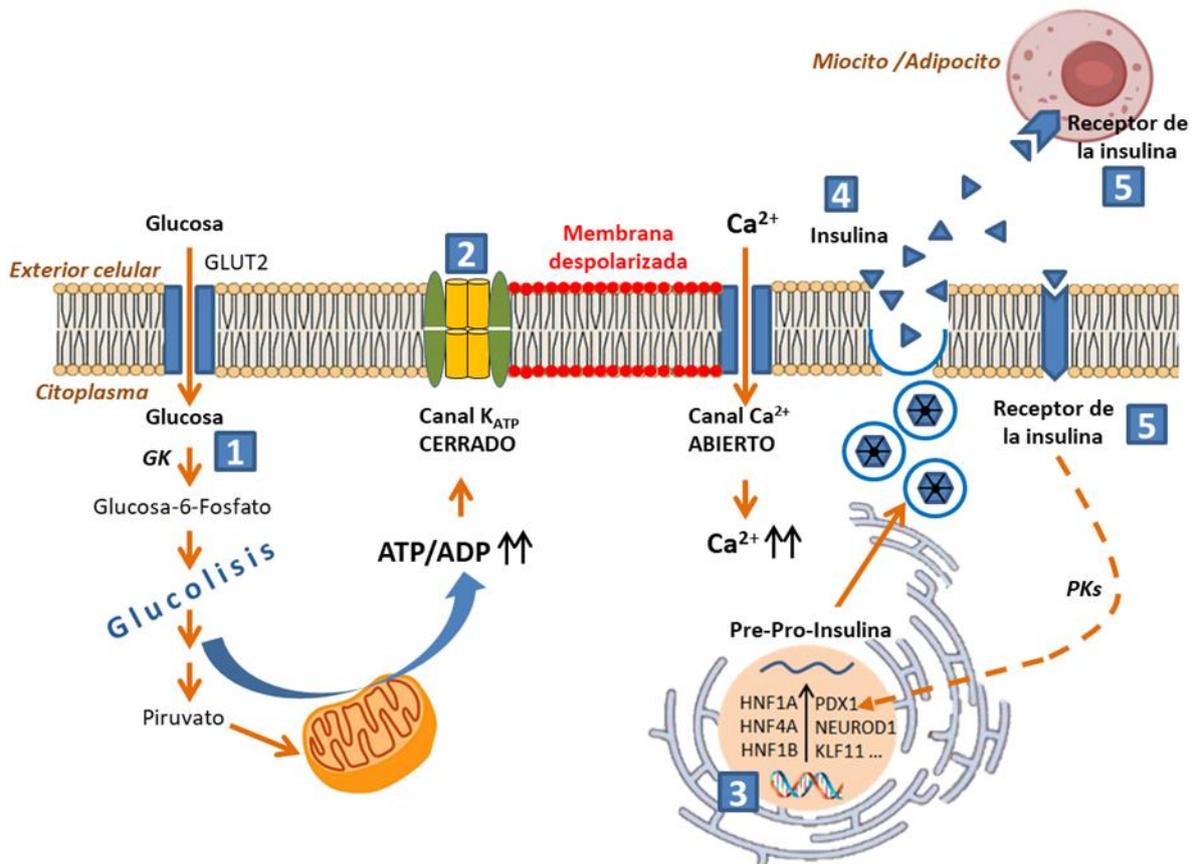
La diabetes tipo 2 de la infancia es un grupo muy heterogéneo y todavía parece ser un término que recoge una variedad de diabetes de diferente etiología. En la práctica clínica, en ocasiones es difícil diferenciar entre la diabetes tipo 2 y la tipo MODY (desarrollada en el apartado 1.3.1.). En un examen sistemático de pacientes con inicio de diabetes tipo 2 antes de los 30 años de edad que se llevó a cabo en el Reino Unido, aproximadamente el 25% de los pacientes se identificaron como casos MODY (Thanabalasingham *et al.*, 2012).

Por este motivo, aunque la prevalencia de la diabetes tipo 2 ha aumentado claramente en la infancia durante las últimas décadas, se estima que una proporción importante se reclasificará en el futuro (Grulich-Henn and Klose, 2018). La prevalencia de la diabetes tipo 2 en la infancia podría haberse sobrestimado en el pasado debido a clasificaciones erróneas (Awa *et al.*, 2011; Thanabalasingham *et al.*, 2012). La caracterización precisa y la exclusión de otras formas de diabetes, principalmente monogénicas, son esenciales para un tratamiento adecuado e individualizado de esos pacientes, que de otro modo corren un alto riesgo de sufrir complicaciones relacionadas con la diabetes.

### **1.3. Diabetes monogénica**

Las formas monogénicas de diabetes representan un grupo heterogéneo poco común de alteraciones de un solo gen, caracterizadas principalmente por defectos funcionales de las células  $\beta$  del páncreas que dan lugar a una hiperglucemia de moderada a grave (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). Hasta el momento se han descrito más de 30

genes en los que se han identificado variantes patogénicas asociadas a cuadros clínicos monogénicos que pueden afectar bien a la síntesis de la insulina, como las alteraciones en factores de transcripción o de la propia insulina, a su secreción, como las alteraciones en los canales de potasio, o a su función, como las alteraciones en el receptor de la insulina (Alkorta-Aranburu *et al.*, 2014; Hattersley *et al.*, 2018). Figura 8.



**Figura 8.** Proceso de secreción de insulina en la célula  $\beta$ -pancreática en respuesta a la glucosa. Los números indican proteínas asociadas con disfunciones de la célula  $\beta$ -pancreática causantes de diabetes monogénica. 1. Alteraciones en el gen de la Glucoquinasa (*GCK*); 2. Alteraciones en los genes que codifican los canales de potasio sensibles a ATP (*ABCC8*, *KCNJ11*); 3. Alteraciones de los factores de transcripción nucleares (*HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, etc); 4. Alteraciones en el gen de la insulina (*INS*); 5. Alteraciones en el gen del receptor de la insulina (*INSR*). *GK* glucoquinasa; *PKs* proteína quinasa.

Cuando la célula  $\beta$ -pancreática se encuentra en estado de reposo (niveles plasmáticos de glucosa bajos), los canales  $K_{ATP}$  permanecen abiertos debido a la concentración baja de ATP intracelular y los iones potasio fluyen al exterior de la célula. Como consecuencia, la membrana se mantiene hiperpolarizada e impide la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. El  $Ca^{2+}$  no entra al interior celular y, por

tanto, no estimula la secreción de insulina. En cambio, cuando los niveles de glucosa en plasma aumentan, ésta entra a la célula a través del transportador GLUT2. El metabolismo celular de la glucosa provoca el aumento de las concentraciones de ATP intracelulares que bloquea a los canales  $K_{ATP}$ . Este cierre conlleva la despolarización de la membrana plasmática y la consiguiente apertura de los canales de calcio, lo que permite la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular. El aumento del  $Ca^{2+}$  en el citoplasma celular es el principal desencadenante de la fusión de las vesículas de insulina con la membrana plasmática y, por lo tanto, de la secreción de insulina. La insulina liberada tiene efectos autocrinos sobre el receptor de la insulina de la célula  $\beta$ , iniciando cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas. Estas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión génica y de efectos mitogénicos. (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2009).

La actividad de la célula  $\beta$ -pancreática se puede ver afectada cuando genes, que codifican proteínas claves para su correcto funcionamiento, portan alteraciones patogénicas que alteran su funcionalidad. Así, por ejemplo, mutaciones activantes en los genes que codifican las proteínas que conforman el canal  $K_{ATP}$  (*ABCC8*, *KCNJ11*) impiden el cierre del canal incluso cuando los niveles de glucosa plasmática son altos. Como consecuencia, se produce un flujo continuo de potasio al exterior celular que hiperpolariza la membrana plasmática e impide la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Al disminuir la concentración de calcio intracelular no se estimula la secreción de insulina. La insuficiencia de insulina impide a la glucosa entrar en las células, aumenta su concentración en sangre y acarrea la diabetes al paciente.

En la infancia y la adolescencia la diabetes monogénica incluye fundamentalmente a la diabetes denominada clásicamente tipo MODY y la diabetes de comienzo neonatal, pero también incluye otras formas monogénicas menos frecuentes como son la diabetes mitocondrial y otros síndromes genéticos raros asociadas a esta patología (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). Hoy en día se tiende a sustituir los términos diabetes tipo MODY y diabetes neonatal por la denominación más amplia de diabetes monogénica, ya que hay varios casos en los que diferentes alteraciones en un mismo

gen, pueden provocar ambos tipos de diabetes. Esta denominación es la que se ha seguido en este trabajo.

Los estudios sobre la prevalencia de diabetes monogénica entre los casos pediátricos de diabetes, se han llevado a cabo fundamentalmente en poblaciones caucásicas, y las estimaciones varían desde el 1,1% en población pediátrica noruega (Irgens *et al.*, 2013) al 6,3% en población pediátrica italiana (Delvecchio *et al.*, 2017). En otros países europeos como el Reino Unido y Polonia se han determinado prevalencias del 2,5% y 4,2% respectivamente (Fendler *et al.*, 2012; Shepherd *et al.*, 2016). El estudio multicéntrico SEARCH sobre diabetes juvenil en Estados Unidos, identificó una prevalencia mínima de MODY en pediatría del 1,2% (Pihoker *et al.*, 2013) y una prevalencia de 0,25% de diabetes neonatal (Kanakatti Shankar *et al.*, 2013).

### **1.3.1. Diabetes tipo MODY**

El término MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) se utilizó por primera vez en los años 70 para describir formas hereditarias de diabetes distintas de la diabetes de tipo 1 dependiente de insulina y de la diabetes tipo 2 no dependiente de insulina (Tattersall, Fajans and Arbor, 1975). En la actualidad, MODY representa un grupo clínicamente heterogéneo de desórdenes autosómicos dominantes causados por mutaciones en los genes involucrados tanto en el desarrollo de las células  $\beta$ -pancreáticas como en la secreción de insulina, y es la forma más común de diabetes monogénica. Hasta el momento se han descrito al menos 14 genes asociados a un subtipo distinto de MODY, cada uno de los cuales difiere en cuanto a la función, la presentación clínica (edad de inicio y patrón de hiperglucemia), las manifestaciones extra-pancreáticas, el riesgo de complicaciones y la respuesta al tratamiento (Vaxillaire and Froguel, 2016).

A continuación, en la tabla 3 se presenta un resumen de las características clínicas y las consecuencias terapéuticas de cada tipo MODY, así como el gen implicado y la frecuencia que cada tipo de MODY representa dentro de la diabetes monogénica.

**Tabla 3.** Características clínicas de los diferentes subtipos de MODY

Subtipo	Gen ( <i>locus</i> )	Función de la proteína	Prevalencia	Otras características	Tratamiento
MODY1	<i>HNF4A</i> (20q12)	Factor de transcripción	5-10%	Hiperinsulinemia en útero, macrosomía fetal e hipoglucemia neonatal. Alteraciones lipídicas.	Sensible a las sulfonilureas
MODY2	<i>GCK</i> (7p13)	Enzima de la glucólisis	30-60%	Leve hiperglucemia de por vida. A menudo asintomático. Diabetes gestacional.	Sin tratamiento excepto en el embarazo
MODY3	<i>HNF1A</i> (12q24.2)	Factor de transcripción	30-60%	Glucosuria. HDL-colesterol elevado	Sensible a las sulfonilureas
MODY4	<i>PDX1</i> (13q12.1)	Factor de transcripción	<1%	En homocigosis provoca agenesia pancreática	Dieta, ADOs o insulina
MODY5	<i>HNF1B</i> (17q21)	Factor de transcripción	5-10%	Diabetes asociada con anomalías renales y genito-urinarias	Insulina
MODY6	<i>NEUROD1</i> (2q31.3)	Factor de transcripción	<1%	En homocigosis puede causar diabetes neonatal permanente, anomalías neurológicas y dificultades de aprendizaje	ADOs o insulina
MODY7	<i>KLF11</i> (2p25)	Factor de transcripción	<1%	Similar a diabetes tipo 2	ADOs o insulina
MODY8	<i>CEL</i> (9p34)	Enzima Lipasa	<1%	Disfunción del páncreas endocrino y exocrino	ADOs o insulina
MODY9	<i>PAX4</i> (7q32)	Factor de transcripción	<1%	Diabetes propensa a la cetosis	Dieta, ADOs o insulina
MODY10	<i>INS</i> (11p15.5)	Hormona	<1%	Puede ocasionar diabetes neonatal y MODY	ADOs o insulina
MODY11	<i>BLK</i> (8p23)	Tirosina quinasa	<1%	Frecuente obesidad	Dieta, ADOs o insulina
MODY12	<i>ABCC8</i> (11p15.1)	SUR1 (Subunidad del canal K <sub>ATP</sub> )	<1%	Generalmente asociado a diabetes neonatal pero también es una forma poco frecuente de MODY	Sensible a las sulfonilureas
MODY13	<i>KCNJ11</i> (11p15.13)	Kir6.2 (Subunidad del canal K <sub>ATP</sub> )	<1%	Generalmente asociado a diabetes neonatal pero también es una forma poco frecuente de MODY	Sensible a las sulfonilureas
MODY14	<i>APPL1</i> (3p14.3)	Serina/Treonina quinasa	<1%	Diabetes de debut en edad adulta	Dieta, ADOs o insulina

ADOs: antidiabéticos orales. Adaptada de (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018)

Las variantes patogénicas en los genes *GCK* y *HNF1A* son la causa más frecuente en poblaciones caucásicas, sin embargo, la proporción de mutaciones *GCK* vs. *HNF1A* varía entre países debido posiblemente a las diferentes estrategias de reclutamiento de pacientes para realizar las pruebas genéticas. Por ejemplo, el análisis de glucosa en sangre en individuos jóvenes y asintomáticos, identifica una mayor proporción de diabetes monogénica causada por variantes patogénicas en *GCK* (Shields *et al.*, 2010). Esta puede ser la razón por la que las variantes patogénicas en *GCK* predominan en España, Italia, Francia, Alemania y la República Checa, donde se examinan más casos pediátricos, mientras que las mutaciones en *HNF1A* es el subtipo MODY más común en los Países Bajos y Dinamarca (Estalella *et al.*, 2007). En general, en caucásicos, los genes *GCK*, *HNF1A* y *HNF4A* representan aproximadamente el 85-90% de todos los casos de MODY en pediatría (Shields *et al.*, 2010; Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). Sin embargo, en poblaciones asiáticas se ha descrito una proporción diferente. En Japón sólo explican un 48% de los casos de MODY pediátricos y en Corea el porcentaje es incluso menor, en torno al 10% (Urakami, 2019). Estas diferencias apoyan la idea de que aparte de la influencia de las diferentes formas de reclutamiento en la frecuencia de los subtipos de MODY, también puede existir una diferencia genética entre poblaciones.

### **1.3.1.1. Alteraciones en el gen de la glucoquinasa (*GCK*)**

El gen *GCK*, también conocido como MODY2, está localizado en el cromosoma 7 (7p13). Es una de las formas más comunes de diabetes tipo MODY, representando el 30-60% de los casos de diabetes monogénica (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). El gen *GCK* codifica la glucoquinasa, una enzima que se expresa predominantemente en los hepatocitos y las células  $\beta$ -pancreáticas y desempeña un papel central en el metabolismo de la glucosa al catalizar la fosforilación de la glucosa a glucosa 6 fosfato, el paso que inicia la glucólisis. Se trata de una enzima que regula el metabolismo de la glucosa en las células  $\beta$ -pancreáticas, controlando la secreción de insulina en respuesta a las variaciones en las concentraciones de glucosa intracelular (Matschinsky, 2002).

Las mutaciones heterocigotas inactivantes (pérdida de función) del gen *GCK* provocan una disminución de la sensibilidad de las células  $\beta$ -pancreáticas al aumento de las concentraciones de glucosa y, por consiguiente, dan lugar a un aumento del punto de ajuste de la secreción de insulina estimulada por la glucosa, es decir, se necesita un umbral más elevado de glucosa (hiperglucemia) para que se pueda secretar insulina (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). Desde el punto de vista clínico, las variantes patogénicas inactivantes en el gen *GCK* causan una hiperglucemia leve que permanece estable a lo largo de los años, de hecho, la hiperglucemia puede detectarse, si se busca, desde el nacimiento. Sin embargo, puesto que es clínicamente silente, se suele diagnosticar en controles rutinarios en la edad adulta. Salvo que la mutación sea *de novo*, en las familias suelen existir varias generaciones afectadas, con diagnóstico de hiperglucemia o de diabetes tipo 2 leve.

Aunque los pacientes con mutaciones en *GCK* tienen una hiperglucemia de por vida, la prevalencia y gravedad de complicaciones micro y macrovasculares son similares a las de las personas sin diabetes (Steele *et al.*, 2014). Generalmente no precisa tratamiento farmacológico, salvo que se asocie a otros factores de riesgo como, por ejemplo, la obesidad, o durante el embarazo, situación especial en la que el tratamiento dependerá del genotipo del feto. En este sentido, hay que recordar que la insulina es un factor de crecimiento fundamental en el período intrauterino, por lo que para que el crecimiento del feto sea apropiado, se necesita que las concentraciones de insulina sean adecuadas. Así, en madres portadoras de una alteración patogénica en el gen *GCK*, si el feto no hereda la alteración, éste tendrá un hiperinsulinismo secundario a la hiperglucemia materna y, como consecuencia, presentará macrosomía. En este caso hay que intervenir para mantener una concentración de glucosa normal en la madre. Por el contrario, si el feto hereda la alteración, la hiperglucemia de la madre favorece para que el feto libere su propia insulina, evitando la insulinopenia prenatal y alcanzando un crecimiento intrauterino adecuado. En este caso no habría que intervenir en el control glucémico de la madre porque se podría provocar una reducción de secreción de insulina en el feto y como consecuencia un crecimiento intrauterino bajo.

A pesar de que las alteraciones patogénicas en heterocigosis en el gen *GCK* sean clínicamente silentes, el diagnóstico de *GCK-MODY* mediante pruebas genéticas es esencial para evitar un tratamiento innecesario y para identificar a otros miembros de la familia que tengan la alteración y poder valorar, en las mujeres, una intervención terapéutica en caso de embarazo.

### **1.3.1.2. Alteraciones en los factores de transcripción *HNF4A*, *HNF1A* y *HNF1B***

Los factores de transcripción nucleares (*HNF4A*, *HNF1A* y *HNF1B*) regulan la expresión de muchos genes esenciales para el desarrollo y la función normal del hígado, el intestino, el riñón y los islotes pancreáticos. En las células  $\beta$  del páncreas, estos factores de transcripción regulan la expresión del gen de la insulina, así como la expresión de otros genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa (Maestro *et al.*, 2007). Sus alteraciones causan una disfunción progresiva de las células  $\beta$  que provoca diabetes de características clínicas semejantes pero, a veces, asociada a diferentes manifestaciones extra-pancreáticas. A diferencia de las alteraciones en heterocigosis en el gen *GCK*, los pacientes con variantes patogénicas en heterocigosis en los factores de transcripción HNF nacen con normoglucemia y la hiperglucemia aparece generalmente a partir de la segunda década de la vida, es progresiva y grave. Todos los pacientes terminan por necesitar tratamiento farmacológico y, si no se trata de manera adecuada, son frecuentes las complicaciones derivadas del mal control glucémico.

**Gen *HNF1A*.** Las alteraciones del gen *HNF1A* son, junto con las del gen *GCK*, las más frecuentes y representan entre el 30-60% de las diabetes monogénicas (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). El gen *HNF1A*, también conocido como *MODY3*, está localizado en el cromosoma 12 (12q24.2) y regula la expresión de múltiples genes asociados con el metabolismo de la glucosa y la producción y secreción de insulina. Desde el punto de vista clínico, las variantes patogénicas en heterocigosis en el gen *HNF1A* causan una reducción en la secreción de insulina, lo que provoca una alteración de la glucemia antes de la aparición de la diabetes franca, que generalmente se desarrolla en el período pospuberal. El papel del *HNF1A* en la regulación de la

transcripción y la expresión del co-transportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) puede explicar el mantenimiento de los niveles de glucosa normal durante algún tiempo. Dicho co-transportador es el responsable de la mayor parte de la reabsorción de la glucosa desde la luz de los túbulos renales, por lo que una drástica disminución de la expresión de SGLT2 en los individuos con mutaciones en *HNF1A* aumenta la excreción urinaria de glucosa y por tanto disminuye su concentración plasmática (Pontoglio *et al.*, 2000). Sin embargo, con el tiempo, los defectos de secreción empeoran como resultado de la disfunción progresiva de las células  $\beta$ -pancreática desencadenando una diabetes clara, que puede confundirse con una diabetes tipo 1 o tipo 2. Debido a la reducida reabsorción de glucosa por el riñón, la glucosuria es frecuente en este tipo de MODY. Además, los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol) se presentan frecuentemente elevados debido al papel del *HNF1A* en el metabolismo de los lípidos (Shih *et al.*, 2001). A pesar del alto HDL, el riesgo de enfermedades cardiovasculares es mayor en los individuos con *HNF1A*-MODY en comparación con sus parientes no afectados (Steele *et al.*, 2010). La prevalencia de complicaciones microvasculares en pacientes con este subtipo de MODY está fuertemente relacionada con el control glucémico.

Una de las características más importantes del *HNF1A*-MODY es la sensibilidad a las sulfonilureas, que es la primera opción de tratamiento en este tipo de diabetes monogénica. Esto tiene implicaciones significativas, particularmente para aquellas personas previamente mal diagnosticados de diabetes tipo 1, ya que pueden suspender el tratamiento con insulina y ser tratados con sulfonilureas, incluso después de un tratamiento de insulina prolongado (Shepherd *et al.*, 2003).

**Gen *HNF4A*.** Las alteraciones en heterocigosis en el gen *HNF4A*, también conocido como MODY1, son menos comunes y representan entre el 5 y el 10% de los casos (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). El gen *HNF4A*, localizado en el cromosoma 20 (20q13.12), se expresa en el hígado, riñón, intestino e islotes pancreáticos. Es un regulador clave de la expresión de los genes hepáticos y es un activador importante del factor de transcripción *HNF1A* que a su vez activa la expresión de un gran número de genes implicados en el metabolismo de la glucosa, el colesterol y los ácidos grasos.

La presentación clínica de los pacientes con *HNF4A*-MODY es similar a la del *HNF1A*-MODY y se caracteriza por un descenso progresivo de la función de las células  $\beta$ -pancreáticas. En aproximadamente un 50% de los casos, las variantes patogénicas del gen *HNF4A* causan hiperinsulinemia en el útero, lo que conduce a una macrosomía fetal significativa y a la subsiguiente hipoglucemia neonatal (esto ocurre raramente en el *HNF1A*-MODY) (Pearson *et al.*, 2007). En general la hipoglucemia es transitoria, y progresa hacia una glucemia normal en la infancia, pero posteriormente la disfunción progresiva de las células  $\beta$ -pancreáticas provoca una disminución de la secreción de insulina que con el transcurso del tiempo termina en una diabetes que puede confundirse con una diabetes tipo 1 o tipo 2. La mayoría de los portadores de cambios patogénicos en *HNF4A* desarrollan diabetes en la adolescencia o en la edad adulta temprana (antes de los 25 años), pero algunos portadores no desarrollan diabetes hasta una edad más avanzada.

El *HNF4A*-MODY también se presenta con características extra-pancreáticas únicas, incluyendo niveles reducidos de colesterol HDL, bajos niveles de triglicéridos y altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL) (Pearson *et al.*, 2005). Las complicaciones macro y micro vasculares se producen a un ritmo similar al de la diabetes de tipo 1 y tipo 2 y están fuertemente relacionadas con el control glucémico. El tratamiento en este caso, como en el de *HNF1A*-MODY, es también con dosis bajas de sulfonilureas.

**Gen *HNF1B*.** Las mutaciones de *HNF1B*, también conocido como MODY5, representan menos del 10% de todos los casos de MODY (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). El gen *HNF1B* localizado en el cromosoma 17 (17q21) desempeña un papel crucial en el desarrollo embrionario temprano y está involucrado en la diferenciación tisular y organogénesis incluyendo el intestino, el hígado, el pulmón, el riñón y el páncreas. Como consecuencia, los portadores de variantes patogénicas en *HNF1B* pueden presentar anomalías en el desarrollo de todos estos órganos (Clissold *et al.*, 2015). Las alteraciones en heterocigosis tienen un espectro clínico amplio y heterogéneo de presentación, por lo que su diagnóstico debe ser considerado en circunstancias clínicas específicas. Así, además de una diabetes semejante a la de *HNF1A*, asocia anomalías

renales (quistes renales, displasia renal, etc) que pueden ser diagnosticadas intraútero y suelen preceder al diagnóstico de la diabetes. En pediatría la implicación renal es más frecuente que la diabetes. También se pueden asociar malformaciones genitales (útero bicorne, quistes en el epidídimo, agenesia de vasos eferentes, etc) y en raras ocasiones, alteraciones del páncreas exocrino o del hígado. A menudo, las alteraciones del gen *HNF1B* son *de novo*, por lo que se presentan como casos aislados en ausencia de antecedentes familiares (Clissold *et al.*, 2015). Más del 50% de los casos se pueden deber a una delección parcial o total del gen, por lo que las pruebas genéticas para el *HNF1B*-MODY deben incluir un método para detectar este tipo de alteraciones. No parece existir ninguna correlación entre el tipo o la posición de la mutación y las características clínicas (Clissold *et al.*, 2015). Los pacientes no suelen responder a sulfonilureas y necesitan tratamiento con insulina.

#### **1.3.1.3. Otras formas raras de MODY**

**Gen *PDX1*.** Las alteraciones patogénicas en el gen *PDX1* o *IPF1* (*insulin promoter factor 1*), también conocido como MODY4, representan un subtipo raro de diabetes monogénica con una frecuencia menor del 1% (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). Está localizado en el cromosoma 13q12.1 y codifica un factor de transcripción clave en el desarrollo del páncreas embrionario. Así, variantes patogénicas en heterocigosis en el gen *PDX1* pueden producir importantes alteraciones en la formación del páncreas embrionario, las cuales pueden desencadenar desequilibrios en la función del páncreas post-natal que se asocian con diabetes tipo MODY de comienzo tardío (Gagnoli *et al.*, 2005). La edad de inicio de la diabetes se produce más tarde que la de otras formas de MODY, entre los 17 y los 67 años, y los fenotipos clínicos van desde la disminución de la tolerancia a la glucosa, hasta la diabetes no insulino dependiente con una amplia variedad de tratamientos, tanto dieta exclusivamente, como agentes hipoglucémicos orales, y/o insulina (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). Las alteraciones en homocigosis se asocian con diabetes neonatal grave con agenesia pancreática (Schwitzgebel *et al.*, 2003).

**Gen *NEUROD1*.** El gen *NEUROD1*, también conocido como MODY6, está localizado en el cromosoma 2q31.3 y codifica un factor de transcripción básico que participa en el desarrollo del linaje celular endocrino así como en el desarrollo neuronal. Las variantes patogénicas en heterocigosis en el gen *NEUROD1* inducen a una diabetes tipo MODY, mientras que en homocigosis pueden causar diabetes neonatal permanente, anomalías neurológicas y dificultades de aprendizaje (Kristinsson *et al.*, 2001; Rubio-Cabezas *et al.*, 2010).

**Gen *KLF11*.** El gen *KLF11* se encuentra en el cromosoma 2p25 y codifica un factor de transcripción que desempeña un papel importante en el funcionamiento de las células  $\beta$  del páncreas regulando los niveles de expresión de la insulina. Además, también puede afectar a la función de las células  $\beta$  al regular la expresión de ciertas enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa que protegen a las células  $\beta$  contra la glucolipotoxicidad (Robertson *et al.*, 2004). Un control estricto del estrés oxidativo es crítico para mantener la homeostasis de las células  $\beta$ , de hecho, se cree que el estrés oxidativo está involucrado en la progresión de la disfunción de las células  $\beta$  del páncreas en la diabetes tipo 2. Se han descrito dos variantes funcionales del gen *KLF11* asociadas con la diabetes tipo MODY conocido como MODY7 (Neve *et al.*, 2005).

**Gen *PAX4*.** El gen *PAX4* localizado en el cromosoma 7q32, codifica un factor de transcripción que desempeña un papel importante en la generación, desarrollo, diferenciación y supervivencia de las células  $\beta$ -pancreáticas (Lorenzo *et al.*, 2017). Se trata de un gen clave de susceptibilidad a la diabetes mellitus en el que se han descrito polimorfismos asociados a diabetes tipo 1 y tipo 2 (Lorenzo *et al.*, 2017) y alteraciones patogénicas causantes de la forma monogénica de diabetes denominada MODY9 (Plengvidhya *et al.*, 2007).

**Genes *BLK* y *CEL*.** Otras formas monogénicas extremadamente raras son las debidas a trastornos enzimáticos, como es el caso de alteraciones en el gen *BLK* y el gen *CEL*. El gen *BLK*, localizado en el cromosoma 8p23, codifica una tirosina quinasa no receptora. Es una proteína de señalización intracelular que utiliza la adición de grupos fosfato a la tirosina de las cadenas proteicas para transmitir señales desde varios receptores de

membrana a las proteínas y así permite la activación de la síntesis proteica y el crecimiento celular, principalmente. Se expresa en células  $\beta$ -pancreáticas donde promueve la síntesis y secreción de insulina mediante la regulación de los factores de transcripción Pdx1 y Nkx6.1. La disminución de la actividad de la tirosina quinasa reduce el contenido de insulina y hace que las células  $\beta$  respondan menos a la glucosa, lo que lleva a una disminución de la secreción de insulina y, con el tiempo, a la diabetes tipo MODY, conocida como MODY11 (Borowiec *et al.*, 2009).

Las alteraciones en el gen *CEL*, localizado en el cromosoma 9p34, también conocido como MODY8, asocian la diabetes de comienzo tardío a una disfunción pancreática exocrina con déficit de elastasa fecal, dolor abdominal y diarrea (Raeder *et al.*, 2006). Aunque este gen se expresa en las células acinares exocrinas, no lo hace en las células  $\beta$  y no se conoce por qué mecanismo causa un fallo progresivo de las productoras de insulina. Codifica una lipasa estimulada por las sales biliares que es secretada por el páncreas al tracto digestivo. La enzima ayuda a la digestión del colesterol y de las vitaminas liposolubles, y a la absorción intestinal de la grasa. Hasta la fecha, sólo se han identificado mutaciones en heterocigosis en el gen *CEL* en tres familias (Torsvik *et al.*, 2010) y las tres se asocian a una región VNTR altamente polimórfica localizada en el exón 11. Se trata de una región formada por la repetición de un oligonucleótido de 33 pb que se repite entre 7 y 21 veces con pequeñas variaciones en la secuencia. Es muy difícil de secuenciar por métodos de NGS debido al alto contenido de GC y la considerable variación de longitud que puede presentar (Torsvik *et al.*, 2010) por lo que el gen *CEL* no se ha incluido en el panel de genes desarrollado para este estudio.

**Genes *ABCC8*, *KCNJ11* e *INS*.** Aunque las alteraciones de los genes *ABCC8* y *KCNJ11*, que codifican los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), y del propio gen *INS* se han asociado siempre a diabetes neonatal (desarrollado en el apartado 1.3.2.), hoy en día se admite que pueden manifestarse en edades tardías. Variantes patogénicas en el gen de la insulina se han asociado con diabetes monogénica MODY10 (Molven *et al.*, 2008), y mutaciones activadoras en los genes *ABCC8* y *KCNJ11* con diabetes monogénica MODY12 y 13, respectivamente (Bonfond *et al.*, 2012; Bowman *et al.*, 2012). Tanto

en el caso de alteraciones en *ABCC8* como en *KCNJ11* el tratamiento recomendado son las sulfonilureas. Sin embargo, las alteraciones patogénicas en el gen *INS* requieren un tratamiento con insulina.

**Gen *APPL1*.** Por último, el gen *APPL1* es el gen relacionado con MODY que se ha identificado más recientemente. *APPL1* es una proteína con múltiples dominios funcionales que interactúan con otras proteínas, incluyendo los componentes clave de la vía de señalización de la insulina. Se han identificado dos alteraciones de pérdida de función en el gen *APPL1* en un estudio de 60 familias con clínica de MODY mediante secuenciación del exoma completo (Prudente *et al.*, 2015).

Estos 14 genes asociados con la diabetes tipo MODY (tabla 3) se examinan rutinariamente en los paneles de diagnóstico de MODY. Sin embargo, muchos de ellos se han descrito en un número limitado de familias y las pruebas genéticas no siempre son convincentes (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). En el 15-20 % de casos clínicamente compatibles con un diagnóstico de MODY no se encuentra ninguna causa genética, son los conocidos como MODYX, lo que sugiere la existencia de otros genes implicados en esta enfermedad que pueden condicionar la aparición de nuevos subtipos en un futuro próximo.

**Diabetes monogénica autoinmune.** Aunque una característica de la diabetes monogénica es la ausencia de autoinmunidad, algunas alteraciones monogénicas raras producen diabetes con presencia de autoanticuerpos anti-islole (Strakova *et al.*, 2019). Se conoce como diabetes monogénica autoinmune. Hace dos décadas se reconocieron dos subtipos de diabetes autoinmune monogénica: el síndrome de poliedrocrinopatía autoinmune tipo 1 causado por alteraciones patogénicas en el gen *AIRE* (Akirav, Ruddle and Herold, 2011) y el síndrome IPEX (inmunodesregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada a X) causado por alteraciones en el gen *FOXP3* (Bennett *et al.*, 2001).

Mediante la secuenciación de nueva generación, se han identificado nuevas alteraciones genéticas que conducen a formas monogénicas de diabetes autoinmune,

en su mayoría acompañadas de otras afecciones autoinmunes o de desregulación inmunológica de aparición temprana, como citopenias de origen inmune, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, eccema atópico grave o baja estatura. Las nuevas causas genéticas incluyen variantes en el gen *IL2RA*, que codifica la subunidad  $\alpha$  del receptor de interleucina-2 (también llamada CD25), y que conducen a un fenotipo similar al IPEX (Caudy *et al.*, 2007), y variantes en el gen *STAT3* que codifica el transductor de señales y activador de la transcripción STAT3 y se asocia a diabetes de comienzo temprano y a otros trastornos autoinmunes generalizados con diarrea crónica o hipotiroidismo autoinmune neonatal (Flanagan *et al.*, 2014). Recientemente también se han asociado con diabetes monogénica autoinmune variantes patogénicas en los genes *CTLA4*, el *LRBA* y *STAT1* (Kuehn *et al.*, 2014; Toubiana *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2017). El diagnóstico de diabetes monogénica autoinmune está fuera de los objetivos de este trabajo.

### **1.3.2. Diabetes neonatal**

La diabetes mellitus rara vez se presenta antes de los 6 meses de vida, y cuando lo hace, no se acompaña habitualmente de autoinmunidad frente a las células  $\beta$ -pancreáticas, ni lleva asociado un mayor riesgo genético para desarrollar diabetes tipo 1 (Edghill, Dix, *et al.*, 2006). Este tipo de diabetes, conocida tradicionalmente como diabetes neonatal, se asocia en la mayoría de los casos a alteraciones genéticas de tipo monogénico y se reconocen más de 20 genes involucrados (Greeley *et al.*, 2011; Hattersley and Patel, 2017; Beltrand *et al.*, 2020). La etiología de la diabetes neonatal puede atribuirse a la ausencia o la alteración del desarrollo del páncreas y a la disfunción o la destrucción temprana de las células  $\beta$  de los islotes lo que ocasiona que los afectados, generalmente, nazcan con un mayor o menor grado de retraso de crecimiento intrauterino secundario a la deficiencia de insulina durante la vida fetal.

Desde un punto de vista clínico, se diferencian dos tipos de diabetes neonatal que son clínica y genéticamente muy heterogéneas: una forma permanente, que requiere tratamiento continuado desde el diagnóstico, y una forma transitoria, que remite pocos meses después de su aparición (Vaxillaire and Froguel, 2016). No obstante, al

menos el 50% de las diabetes neonatales transitorias pueden recidivar en la pubertad o en el embarazo (diabetes gestacional), por lo que es importante hacer un seguimiento durante toda la vida.

**Genes *ABCC8* y *KCNJ11*.** Aproximadamente el 50% de los casos de diabetes neonatal permanente tiene una alteración patogénica en alguno de los dos genes que codifican los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) localizados en la membrana plasmática de las células pancreáticas. Los canales  $K_{ATP}$  están formados por cuatro subunidades kir6.2 (codificadas por el gen *KCNJ11*) y cuatro subunidades SUR1 (codificadas por el gen *ABCC8*). Mutaciones inactivantes en los genes *KCNJ11* o *ABCC8* son responsables de hiperinsulinismo neonatal. Por el contrario, mutaciones activantes de ambos genes se asocian con diabetes neonatal. En este caso, la alteración impide que se puedan cerrar correctamente los canales  $K_{ATP}$  inducido por el aumento de la concentración de ATP citoplasmática y, como consecuencia, el potasio sale al medio extracelular. La membrana hiperpolarizada provoca que el canal de calcio se mantenga cerrado y no permita la entrada de calcio al interior celular y, por tanto, no estimula la secreción de insulina (Figura 8. Esquema de la secreción de insulina en la célula  $\beta$ -pancreática, pág. 47). En el caso del *KCNJ11* las mutaciones activantes causantes de diabetes neonatal permanente siguen un patrón de herencia autosómico dominante, mientras que en el caso del *ABCC8* se han descrito mutaciones activadoras dominantes, así como recesivas o heterocigotas compuestas (Ellard *et al.*, 2007).

Aunque las alteraciones en estos genes son más comunes en diabetes neonatal permanente, ambos genes del canal  $K_{ATP}$  también se han relacionado con algunos casos de diabetes neonatal transitoria (Flanagan *et al.*, 2007) y, aproximadamente el 20% de los pacientes presentan trastornos neurológicos como consecuencia de la expresión de los genes mutados en las neuronas del sistema nervioso central (Gloyn *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2010).

Dado que los canales  $K_{ATP}$  son la diana de las sulfonilureas, estos fármacos sustituyen a la insulina en el tratamiento de muchos casos de diabetes neonatal debido a que estimulan su secreción al unirse a la subunidad SUR1 e induciendo el cierre del canal.

Además, en pacientes con trastornos neurológicos asociados a mutaciones en *ABCC8* y *KCNJ11*, el tratamiento con dosis altas de sulfonilureas mejora también el cuadro clínico neurológico, aspecto que no corrige el tratamiento con insulina. Aunque las alteraciones de los canales  $K_{ATP}$  se han asociado habitualmente a diabetes neonatal, existen cuadros clínicos que se manifiestan en edades posteriores (*MODY12* y *MODY13*) e, incluso, la misma mutación en una familia se puede manifestar en un individuo como diabetes neonatal y en otros como diabetes de comienzo tardío.

**Gen *INS*.** Las variantes patogénicas en heterocigosis en el gen *INS* son una causa frecuente de diabetes neonatal permanente (Stoy *et al.*, 2010). Estas mutaciones provocan un desdoblamiento de la proinsulina y su acumulación en el retículo endoplásmico, lo que conduce a una apoptosis sucesiva de células  $\beta$ -pancreáticas, un mecanismo similar al observado en la fisiopatología de la diabetes tipo 1. También se han descrito variantes patogénicas recesivas en el gen *INS* causantes de diabetes neonatal permanente y transitoria (Garin *et al.*, 2010). Como en el caso de los canales  $K_{ATP}$ , la diabetes causada por alteraciones patogénicas en el gen *INS* también se puede manifestar en edades más avanzadas asociado a *MODY10* (Molven *et al.*, 2008).

**Región 6q24.** La mayoría de los casos de diabetes neonatal transitoria puede deberse a alteraciones en el brazo largo del cromosoma 6, región 6q24 (Naylor *et al.*, 2011). En los individuos sanos, una de las dos copias de la región 6q24 está sometida a *imprinting* materno, es decir, en condiciones normales sólo se expresa el alelo procedente del padre. Por el contrario, los niños con las dos copias activas, bien por pérdida del *imprinting* materno, por isodisomía paterna (heredar los dos alelos del padre) o por duplicación del alelo paterno, presentan diabetes neonatal transitoria. Se han propuesto dos genes de esta región, *PLAGL1* y *HYMAI*, como implicados en este trastorno, pero el mecanismo exacto por el cual la sobreexpresión de los genes de la región 6q24 da lugar a la diabetes neonatal transitoria sigue sin esclarecerse. Los pacientes con diabetes neonatal transitoria normalmente necesitan dosis bajas de insulina desde el nacimiento, y entran en remisión completa dentro del primer año de vida. Sin embargo, tienden a recaer durante la adolescencia (Greeley *et al.*, 2011). Un estudio reciente ha descrito casos de diabetes neonatal asociada a anomalías de

metilación del cromosoma 6 que responden bien a la sustitución de insulina por sulfonilureas (Garcin *et al.*, 2018).

**Otros genes.** A parte de los genes que codifican para los canales de potasio  $K_{ATP}$  y el gen *INS*, también son causa de diabetes neonatal permanente las alteraciones patogénicas en homocigosis o heterocigosis compuesta en los genes *GCK* y *PDX1*, mientras que en heterocigosis se asocian a diabetes tipo MODY2 y MODY4. La diabetes neonatal transitoria, aunque de manera mucho menos frecuente, también puede deberse a defectos moleculares en otros genes involucrados en el funcionamiento de la célula  $\beta$ -pancreática. Se han descrito casos de diabetes neonatal transitoria asociados a mutaciones raras en el gen *HNF1B* (Edghill, Bingham, *et al.*, 2006). En la mayoría de estos casos los pacientes presentaban otras alteraciones además de la diabetes, como por ejemplo quistes renales o disfunción exocrina del páncreas.

Los pacientes con alteraciones en la banda 6q24 o en homocigosis en el gen *INS*, en el *GCK* o en el *PDX1* nacen con un marcado retraso de crecimiento intrauterino y debutan de forma abrupta en la primera semana de vida. Por el contrario, el fenotipo de la diabetes neonatal debido a mutaciones en los genes del canal  $K_{ATP}$  o las alteraciones en heterocigosis del gen *INS* es menos evidente, con un retraso de crecimiento ausente o leve y un diagnóstico más tardío, a partir del primer mes de vida. Toda esta variabilidad clínica remarca la necesidad de dilucidar la base molecular de la diabetes neonatal en cada paciente, ya que el pronóstico y el tratamiento depende del diagnóstico preciso de la enfermedad (Hattersley and Patel, 2017).

### **1.3.3. Síndromes genéticos raros asociadas a diabetes**

Las formas sindrómicas de diabetes son raras, y representan menos del 1% de los niños con diabetes (Barrett, 2007). A continuación hacemos una breve reseña de los más prevalentes en la infancia y adolescencia.

**Diabetes mitocondrial.** La forma más frecuente de diabetes mitocondrial se debe a una alteración patogénica puntual del ADN mitocondrial, m.3243A>G, que causa una

alteración en el ARN de transferencia para la leucina. Otras alteraciones puntuales del ADN mitocondrial se han asociado con este tipo de diabetes pero son extremadamente raras (Zhu *et al.*, 2017). La gravedad del cuadro clínico varía dependiendo del grado de heteroplasmia, es decir, del porcentaje de copias del ADN mitocondrial que presente la mutación (Robinson *et al.*, 2020). En los casos más leves la alteración se asocia a un cuadro de diabetes de herencia materna que suele manifestarse en adolescentes o adultos jóvenes acompañado por sordera neurosensorial, MIDD, del inglés *Maternally Inherited Diabetes and Deafness* (Zhu *et al.*, 2017). La forma más grave es el llamado síndrome MELAS, del inglés *Myoclonus, Epilepsy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes* (El-Hattab *et al.*, 2015). Otras enfermedades mitocondriales que cursan con diabetes son el síndrome de Kearns-Sayre (miocardiopatía, oftalmoplejía, degeneración pigmentaria de la retina) debido a delecciones grandes en el ADN mitocondrial (Laloi-Michelin *et al.*, 2006).

**Síndrome de Wolfram.** También conocido por el acrónimo DIDMOAD (diabetes insípida, diabetes mellitus, atrofia óptica y sordera), es una enfermedad autosómica recesiva muy poco frecuente. La diabetes mellitus suele ser la primera manifestación en aparecer, a veces incluso en lactantes, pero el dato clave para sospechar el diagnóstico es su asociación con atrofia óptica antes de los 16 años de edad. Los pacientes suelen fallecer en la tercera o cuarta década de la vida, generalmente como consecuencia de un largo proceso neurodegenerativo. La mayoría de los casos presentan mutaciones en el gen *WFS1*, pero existe una variante minoritaria sin diabetes insípida secundaria a mutaciones en *CISD2* (Rigoli and Bella, 2012).

**Síndromes monogénicos que cursan con insulinoresistencia.** Las variantes patogénicas en el gen del receptor de la insulina, *INSR*, producen un espectro de síndromes de gravedad variable (Semple *et al.*, 2011). La forma más grave, conocida como Leprechaunismo o síndrome de Donohue, es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, que produce una pérdida total de la acción de la insulina y cursa con retraso de crecimiento intrauterino con ausencia de grasa subcutánea, rasgos dismórficos (orejas de implantación baja, labios gruesos, hipertrichosis y macrogenitalismo) y diabetes de inicio neonatal o en la lactancia.

El síndrome de Rabson-Mendenhall también es de herencia autosómica recesiva aunque en este caso el defecto de unión insulina-receptor no es total. Es de presentación más tardía y puede asociarse con hipertrofia gingival con displasia dental y nefropatía quística medular.

Por último, el síndrome de resistencia a la insulina tipo A es la forma clínica más leve que puede heredarse con un patrón autosómico dominante o, en menor frecuencia, recesivo. Suele diagnosticarse en mujeres adolescentes sin sobrepeso que consultan por *acantosis nigricans* intensa y signos clínicos y analíticos de hiperandrogenismo (síndrome de ovario poliquístico). Se ha descrito una forma clínica similar poco común en pacientes con autoanticuerpos que bloquean el receptor de la insulina (síndrome de insulinoresistencia tipo B).

**Lipodistrofias congénitas.** Los cuadros de lipodistrofias congénitas constituyen un grupo de enfermedades del tejido adiposo que originan una marcada resistencia a la insulina, secundaria a la falta de adipocitos y/o a los bajos niveles de adipoquinas circulantes. Según la distribución de la ausencia del tejido adiposo pueden ser lipodistrofias generalizadas o parciales. La lipodistrofia generalizada congénita (síndrome de *Berardinelli-Seip*), de la que se han descrito 2 variantes producidas por mutaciones en *AGPAT2* y *BSCL*, es una enfermedad recesiva que cursa con ausencia de tejido adiposo, *acantosis nigricans* marcada, hipertrigliceridemia, virilización y miocardiopatía. La diabetes suele aparecer coincidiendo con el desarrollo puberal aunque puede hacerlo ya desde el período neonatal (Barrett, 2007).

En la lipodistrofia parcial familiar tipo *Dunningan*, la pérdida de tejido adiposo subcutáneo se limita a las extremidades, los glúteos y la región baja del tronco. Además del fenotipo característico, los pacientes presentan datos clínicos y analíticos compatibles con un síndrome metabólico marcado. La diabetes se manifiesta en la adolescencia o en los primeros años de la vida adulta. Aproximadamente la mitad de los casos se deben a mutaciones en heterocigosis en *LMNA* o *PPARG* (Garg, 2004).

**Síndrome de Alström.** Está producido por alteraciones patogénicas en el gen *ALMS1*. Es una forma sindrómica sin retraso mental caracterizada por desarrollo de obesidad troncal y síndrome metabólico en los primeros 5 años de vida y que cursa con retinitis pigmentosa y sordera (Barrett, 2007). Otras características clínicas incluyen miocardiopatía dilatada, disfunción hepática y renal, hipertensión, hipotiroidismo, hipogonadismo, anomalías urológicas, baja estatura en edad adulta y anomalías esqueléticas.

**Síndrome de Bardet-Biedl.** Es otra forma de obesidad sindrómica que, a diferencia del anterior, cursa con retraso mental, alteraciones visuales y auditivas, polidactilia e hipogonadismo (Barrett, 2007). Hasta el momento ha sido asociado al menos a 15 *loci* genéticos distintos (*BBS1* a *BBS15*), todos ellos relacionados con componentes de los cuerpos basales de los centrosomas.

**Otros.** Hay cuadros de diabetes neonatal permanente con hipoplasia cereberal que se asocian con alteraciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *PTF1A*, que codifica a una proteína esencial en el desarrollo normal del páncreas y del cerebelo (Gabbay *et al.*, 2017). Recientemente, se han descrito mutaciones en el factor de transcripción *GLIS3* en pacientes que presentan diabetes neonatal junto con hipotiroidismo, glaucoma, quistes renales y fibrosis hepática (Dimitri, 2017). Se ha observado que mutaciones en heterocigosis en los genes *GATA6* y *GATA4*, asociados a malformaciones cardíacas congénitas, también se asocian a un espectro variable de manifestaciones de diabetes, que van desde la agenesia pancreática con diabetes neonatal a la diabetes del adulto con y sin insuficiencia exocrina (De Franco *et al.*, 2013; Shaw-Smith *et al.*, 2014).

#### **1.4. Diabetes secundaria**

El concepto de diabetes secundaria se refiere a que existe alguna otra enfermedad o trastorno de base reconocible que produce o permite que la diabetes aparezca. La etiología de estas diabetes es muy heterogénea ya que engloba un gran número de patologías, siendo las más frecuentes las debidas a patologías pancreáticas, a

determinados trastornos endocrinológicos y los efectos adversos a fármacos (Rubio Cabezas and Argente, 2012; Sanzana G. and Durruty A., 2016). El grado de anomalías respecto al metabolismo de la glucosa es muy variable, desde cuadros con una mínima intolerancia a la glucosa hasta diabetes con hiperglucemia grave.

En función de la patología concreta, el mecanismo subyacente puede ser un déficit en la secreción de insulina, que ocurre en la patología pancreática como es el caso de la pancreatectomía, la pancreatitis, la neoplasia pancreática y enfermedades sistémicas como hemocromatosis y la fibrosis quística (Barrio, 2015; Meier and Giese, 2015), o una alteración de los mecanismos de contrarregulación de la insulina, como ocurre en las endocrinopatías que ocasionan un exceso de hormona de crecimiento, corticoides, catecolaminas u hormonas tiroideas (Resmini *et al.*, 2009).

Los fármacos pueden también inducir trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono por diferentes mecanismos. Los que resultan de mayor interés, por su uso habitual en la clínica o por la importancia cuantitativa del cambio metabólico que producen, son los corticoides, antipsicóticos atípicos, estatinas, diuréticos, antivirales, antineoplásicos e inmunosupresores. Pueden precipitar una diabetes en individuos predispuestos que ya tienen alguna alteración en la secreción o acción de la insulina, o pueden dañar de forma permanente a las células  $\beta$ -pancreáticas como es el caso de ciertas toxinas como la estreptozotocina y la pentamidina endovenosa (Clore and Thurby-Hay, 2009; Sattar *et al.*, 2010; Correl *et al.*, 2015).

## 2. IDENTIFICACIÓN DE DIABETES MONOGENICA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

Establecer correctamente el tipo de diabetes que padece un paciente es importante para elegir el mejor tratamiento, anticipar las complicaciones derivadas de la patología y predecir el riesgo de enfermedad en los familiares. Las características típicas de los tipos de diabetes más frecuentes en la infancia y adolescencia (diabetes tipo 1, tipo 2 y monogénica) se muestran a continuación en la tabla 4 (Shah and Nadeau, 2020).

**Tabla 4.** Resumen de la presentación clínica clásica de los tipos de diabetes más frecuentes en la infancia y la adolescencia.

	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2	Diabetes monogénica
Edad al diagnóstico	De 4-6 y de 10-14 años	Después de la pubertad. Poco frecuente <10 años	Antes de los 25 años
Peso corporal	Normopeso	>90% Sobrepeso/Obesidad	Normopeso
Autoinmunidad	Presente	Ausente	Ausente*
Insulinorresistencia	Poco común	Presente	Ausente
Riesgo de CAD	Alto	Bajo	Bajo
Péptido C después del diagnóstico	Bajo	Detectable	Detectable
Historia familiar DM	Poco frecuente	Frecuente	Frecuente

\*Salvo en casos poco frecuentes de diabetes monogénica autoinmune. CAD: cetoacidosis diabética. Adaptado de (Shah and Nadeau, 2020).

La existencia de una superposición clínica entre la diabetes monogénica y la diabetes tipo 1 y tipo 2, trae como consecuencia frecuentes diagnósticos erróneos (Sanyoura, Philipson and Naylor, 2018). El fenotipo clásico de diabetes monogénica incluye una diabetes no insulino dependiente, sin cetoacidosis, con un debut de la enfermedad antes de los 25 años, sin autoinmunidad y un progenitor afectado. Sin embargo, varios estudios han demostrado que un número sustancial de individuos con un diagnóstico genético confirmado de diabetes monogénica no encajan en la descripción clínica clásica, y se estima que más del 80% de los casos de MODY están aún sin diagnosticar (Shields *et al.*, 2010).

Así, por ejemplo, aunque la mayoría de los casos diagnosticados de MODY no son obesos, el estudio estadounidense TODAY sobre la diabetes tipo 2 juvenil, se encontró que en una cohorte de niños y adolescentes con obesidad/sobrepeso, el 4,5% tenía cambios patogénicos en los genes MODY, lo que sugiere que la diabetes monogénica debería considerarse en niños pequeños y adolescentes independientemente del índice de masa corporal (Kleinberger *et al.*, 2018). Respecto a la historia familiar, mientras que por sí sola no discrimina la diabetes monogénica de otras formas de diabetes, se podría sospechar MODY en los niños con más de dos generaciones consecutivas afectadas. Un progenitor con diabetes está presente en el 60-90% de los casos de diabetes monogénica comparado con un 10% de los niños con diabetes tipo 1. Pero el hecho de tener un progenitor con diabetes, tampoco es un factor de discriminación entre MODY y diabetes tipo 2 ya que un progenitor afectado está presente en más del 50% de los casos de diabetes tipo 2 de inicio juvenil. Aun así, la sospecha de una forma monogénica de diabetes debería ser mayor si hay historia familiar de diabetes y los afectados no son obesos o carecen de características metabólicas propias de insulinoresistencia.

La ausencia de autoinmunidad pancreática al debut y el péptido C detectable después de 3 a 5 años del diagnóstico, son características compatibles con una diabetes tipo MODY y son biomarcadores que se utilizan para la identificación de este tipo de diabetes. En el estudio SEARCH sobre la diabetes juvenil realizado en Estados Unidos, 586 niños con diabetes, autoanticuerpos negativos y niveles de péptido C en ayunas  $\geq 0,8$  ng/mL fueron examinados para detectar alteraciones patogénicas en los tres genes MODY más comunes: *GCK*, *HNF1A* y *HNF4A*. Se encontró que el 8% (47/586) de los niños con estas características tenían una alteración compatible con MODY. De estos pacientes con alteración genética sólo el 6% (3/47) habían sido correctamente diagnosticados de MODY previamente, mientras que más del 90% de los casos (40/47) tenían un diagnóstico incorrecto de diabetes tipo 1 (36%) o diabetes tipo 2 (51%) (Pihoker *et al.*, 2013). En el Reino Unido, una revisión sistemática en población pediátrica con diabetes usando los mismos biomarcadores confirmó una prevalencia de diabetes monogénica del 2,5% (20/808) y además sugirió que la mitad de todos los pacientes MODY no tenían un diagnóstico genético (Shepherd *et al.*, 2016). En el

estudio TODAY, los autoanticuerpos negativos y la presencia de péptido C también se utilizaron para seleccionar a los pacientes a los que realizar las pruebas genéticas en su cohorte de pacientes pediátricos con sobrepeso u obesidad diagnosticados de diabetes tipo 2. En este caso se encontró un 4,5% (22/488) de pacientes con alteraciones patogénicas en genes MODY y por tanto un diagnóstico incorrecto (Kleinberger *et al.*, 2018). Este hecho es de suma importancia ya que tanto la estrategia terapéutica como el consejo genético dependen del tipo de diabetes que tenga el paciente.

La detección temprana de la diabetes monogénica en niños y adolescentes permite una medicina personalizada desde el inicio de la enfermedad. Se ha demostrado que un tratamiento dirigido a la causa genética da lugar a mejor control de la glucemia, a menos complicaciones relacionadas con la diabetes y a una disminución del costo del tratamiento y mejora de la calidad de vida del paciente (Shepherd *et al.*, 2003; Bacon *et al.*, 2016; Johnson, Carter, *et al.*, 2019). Además, distinguir entre diabetes monogénica y diabetes tipo 1 o tipo 2 también tiene importantes repercusiones en lo que respecta al control de los trastornos extra-pancreáticos relacionados con ciertos subtipos de MODY y a la identificación de los familiares afectados y en situación de riesgo (Kleinberger and Pollin, 2015). Dado que la diabetes monogénica es un grupo genéticamente heterogéneo, la capacidad de utilizar la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) para secuenciar varios genes simultáneamente es un medio potencialmente rentable de aumentar la tasa de diagnóstico molecular en los pacientes afectados (Ellard *et al.*, 2013).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### HIPÓTESIS

El término diabetes mellitus describe un complejo trastorno metabólico caracterizado por una hiperglucemia crónica como resultado de la insuficiente secreción de insulina y/o la disminución de la respuesta de los tejidos a la misma, lo que provoca anomalías en el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas.

La etiología de la enfermedad es muy diversa, y los factores de riesgo, tanto los genéticos como los ambientales que intervienen en su desarrollo, son muy diferentes para cada tipo de diabetes. Así, podemos hablar de diabetes poligénicas, como es el caso de la diabetes tipo 1, en la que se produce una destrucción autoinmune de la célula  $\beta$ -pancreática productora de insulina, y la diabetes tipo 2, asociada a la obesidad y a la resistencia a la insulina. También existen diabetes monogénicas, que parecen ser menos frecuentes que las anteriormente citadas, y que están causadas por una alteración específica en algún gen concreto que puede afectar a la síntesis de insulina, a su secreción o a su función. Dado que la mayor parte de las características clínicas de la diabetes monogénica no son específicas, se estima que un alto porcentaje de casos permanecen sin diagnosticar o se diagnostican erróneamente como diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.

La diabetes tipo 1 es una enfermedad crónica frecuente en pediatría. Aunque presenta un patrón de herencia poligénico desconocido, se sabe que los genes con mayor influencia en la susceptibilidad a desarrollar esta patología están localizados en la región HLA, que codifica proteínas relacionadas con el reconocimiento inmune. En este tipo de diabetes, la presencia de autoanticuerpos en la sangre del paciente se considera un marcador del proceso destructivo autoinmune. Sin embargo, no todos los pacientes pediátricos con diagnóstico de diabetes tipo 1 muestran evidencia de autoinmunidad basada en los marcadores clásicos (IAA, GADA e IA2A). Se han identificado también autoanticuerpos frente al transportador celular de Zinc 8 (ZnT8A), localizado en la membrana de los gránulos de secreción de insulina de la célula  $\beta$ -pancreática, que podrían considerarse un nuevo marcador predictivo y diagnóstico de autoinmunidad.

En las dos últimas décadas, la diabetes mellitus tipo 2, propia de la edad adulta, podría haber aumentado en la edad pediátrica de forma paralela al incremento de la prevalencia de obesidad. Aunque en ciertas poblaciones como la afroamericana, la hispana y las nativas americanas, la diabetes tipo 2 puede llegar a ser tan frecuente como la tipo 1 en niños y adolescentes, los casos pediátricos con diabetes tipo 2 son excepcionales en poblaciones caucásicas.

En este contexto, se formulan tres hipótesis relacionadas con optimizar el diagnóstico de diabetes en pediatría. La primera hipótesis plantea que en pacientes pediátricos con una aparente diabetes tipo 1 y sin autoinmunidad detectable basada en los autoanticuerpos clásicos (IAA, GADA e IA2A), la incorporación del análisis de ZnT8A puede mejorar la precisión del diagnóstico de diabetes autoinmune. La segunda hipótesis propone que un estudio genético por secuenciación masiva (NGS) orientado al diagnóstico de diabetes monogénica, puede demostrar la presencia de esta forma rara de diabetes en pacientes pediátricos con diabetes y autoinmunidad negativa. Y por último, la tercera hipótesis se fundamenta en que el HLA-DRB1 puede ser un marcador para identificar la diabetes monogénica en pediatría y, como consecuencia, caracterizar la especificidad HLA-DRB1 como paso previo a la NGS puede ayudar a mejorar la selección de los candidatos a los que realizar el estudio genético orientado al diagnóstico de este tipo específico de diabetes.

Este estudio proporcionará herramientas que ayudarán a definir mejor la etiología de la diabetes en pediatría y permitirá a los pacientes beneficiarse del diagnóstico correcto de su enfermedad, aspecto crucial para el control clínico, la elección terapéutica y el pronóstico, así como para el asesoramiento genético, cuando proceda.

## OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es determinar la prevalencia de diabetes monogénica en pacientes pediátricos con aparente diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa.

Para alcanzar este objetivo principal nos planteamos los siguientes **objetivos operativos**:

1. Desarrollar la metodología para el análisis del autoanticuerpo anti-ZnT8 (ZnT8A).
2. Evaluar la contribución del análisis del ZnT8A para mejorar la precisión del diagnóstico de diabetes tipo 1 en pediatría, dentro del contexto de la respuesta humoral en la diabetes autoinmune.
3. Desarrollar, mediante la tecnología de secuenciación masiva, un panel de genes orientado al diagnóstico de diabetes monogénica.
4. Realizar el estudio genético de diabetes monogénica en los pacientes pediátricos de nuestra cohorte con aparente diabetes tipo 1 y autoinmunidad no detectable.
5. Establecer la utilidad del perfil HLA-DRB1 como marcador diferenciador de diabetes monogénica en población pediátrica, y su capacidad para mejorar la selección de candidatos a los que realizar el estudio genético orientado al diagnóstico de este tipo específico de diabetes.



### **III. ESTRATEGIA DEL ESTUDIO**



De acuerdo con los objetivos planteados, este trabajo de investigación se dividirá en 3 fases:

- 1. Optimización del diagnóstico de diabetes tipo 1 en pediatría mediante la incorporación del autoanticuerpo anti-ZnT8 como nuevo marcador de autoinmunidad.** En esta primera fase se pondrá a punto la metodología para el análisis de los autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A). Posteriormente se analizarán los autoanticuerpos clásicos IAA, GADA e IA2A, junto con el ZnT8A, en todos los pacientes en el momento del debut de la enfermedad. Se evaluará la combinación de ensayos más efectiva para el despistaje de diabetes tipo 1 en pediatría.
- 2. Diseño de un estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica.** En esta segunda fase se pondrá a punto la metodología NGS de un panel de 12 genes asociados con diabetes monogénica, y se validará la técnica con pacientes diagnosticados con anterioridad de esta patología por nuestro laboratorio mediante técnicas moleculares convencionales (Sanger y MLPA). A continuación, se realizará el estudio genético mediante NGS a todos los pacientes pediátricos con diabetes de nuestra cohorte en los que no se haya detectado autoinmunidad tras el análisis de autoanticuerpos que se desarrollará en la primera fase del estudio. Asimismo, se realizará el estudio genético a todos los pacientes que presenten sólo autoinmunidad positiva para el ZnT8A.
- 3. Estudio de la aportación del genotipo HLA-DRB1 para la selección de pacientes a los que realizar un estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica.** En esta tercera fase se determinarán, en primer lugar, los alelos HLA-DRB1 que confieren susceptibilidad a diabetes tipo 1 en nuestra población. A continuación, se comparará el genotipo HLA-DRB1 entre pacientes con diabetes tipo 1, pacientes con diabetes monogénica y población control. Y por último, se tipificará el *locus* HLA-DRB1 en todos los pacientes pediátricos con autoinmunidad indetectable de nuestra cohorte, con el propósito de valorar la capacidad del HLA-DRB1 para mejorar la selección de pacientes a los que realizar un estudio genético para descartar diabetes monogénica



## **IV. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**



En los siguientes apartados se describe la metodología utilizada para el desarrollo de este trabajo de investigación. En primer lugar, se detallan las características de los pacientes incluidos en el estudio, así como el proceso de la recolección de las muestras necesarias para cada una de las fases en las que se divide este trabajo. En segundo lugar, se explica el procedimiento de análisis de los autoanticuerpos y de la estandarización de los ensayos. Y por último, en el tercer apartado, se explica la metodología molecular utilizada tanto para el diagnóstico de la diabetes monogénica como para la caracterización molecular del *locus* HLA-DRB1, así como el análisis estadístico de los resultados que se ha seguido mediante estudios de asociación.

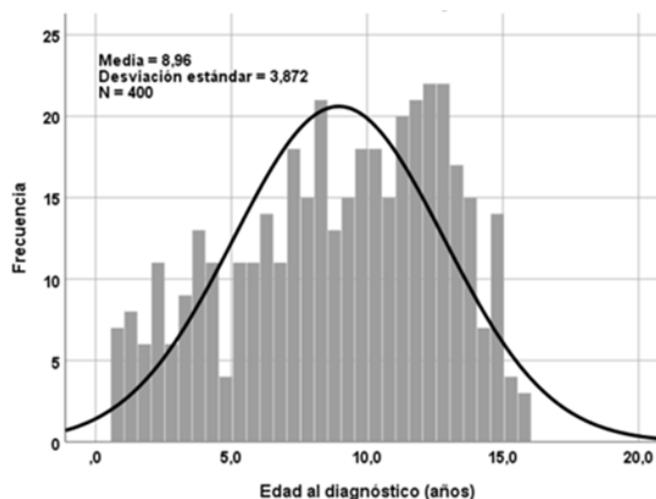
### **1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

Para el análisis de la autoinmunidad al debut clínico de la diabetes, y para el estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica en los pacientes que presentaron autoinmunidad negativa (primera y segunda fase del estudio), se reclutaron entre 2012 y 2017 pacientes al debut con sospecha de diabetes tipo 1 procedentes de ocho hospitales de referencia en España: H.U. Basurto, Bizkaia; H.U. Cruces, Bizkaia; H.U. Miguel Servet, Zaragoza; H.U. Ramón y Cajal, Madrid; H.U. Severo Ochoa, Madrid; H.U. Son Espases, Palma de Mallorca; H.U. Vall d'Hebron, Barcelona; H.U. Virgen del Rocío, Sevilla. Se reunieron un total de 400 pacientes en edad pediátrica no emparentados, con un diagnóstico reciente de diabetes tipo 1 según los criterios de la Sociedad Internacional de Diabetes Pediátrica y Adolescente, ISPAD (Mayer-Davis *et al.*, 2018) y menos de una semana en tratamiento con insulina.

En todos los casos se recogió una muestra de suero separado por centrifugación en el hospital de origen (un tubo BD *Vacutainer* para suero con gel separador de 8,5 ml), y de sangre total (un tubo BD *Vacutainer* con anticoagulante EDTA de 3 ml), tanto del paciente en el momento del debut de la diabetes (índice) como de sus progenitores. El suero se utilizó para la determinación de autoanticuerpos y la sangre total para realizar los estudios genéticos, tanto para el diagnóstico de diabetes monogénica en los pacientes en los que no se detectó autoinmunidad, como para la caracterización molecular del HLA-DRB1 llevada a cabo en todos los pacientes. Además, también se

recogieron datos clínicos que incluían la edad al diagnóstico, la presencia de cetoacidosis diabética según los criterios de la ISPAD (Wolfsdorf *et al.*, 2018) y los antecedentes familiares de diabetes. Las muestras procedentes de hospitales ubicados en Bizkaia llegaron al laboratorio a las pocas horas de la extracción, y las procedentes de hospitales de otras provincias llegaron por mensajería en 24 horas. Una vez recibidas en el laboratorio, las muestras fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el caso del suero y a  $-40^{\circ}\text{C}$  en el caso de la sangre total hasta el momento del análisis.

La cohorte final de 400 pacientes presentó un 47% de niñas y una mediana de edad de 9,4 años, (RIQ 6,2 - 12,2). La edad mínima fue de 9 meses y la máxima de 16 años. La distribución de las edades de los pacientes incluidos en la primera y segunda fase del estudio se muestra en el histograma de la derecha (figura 9).

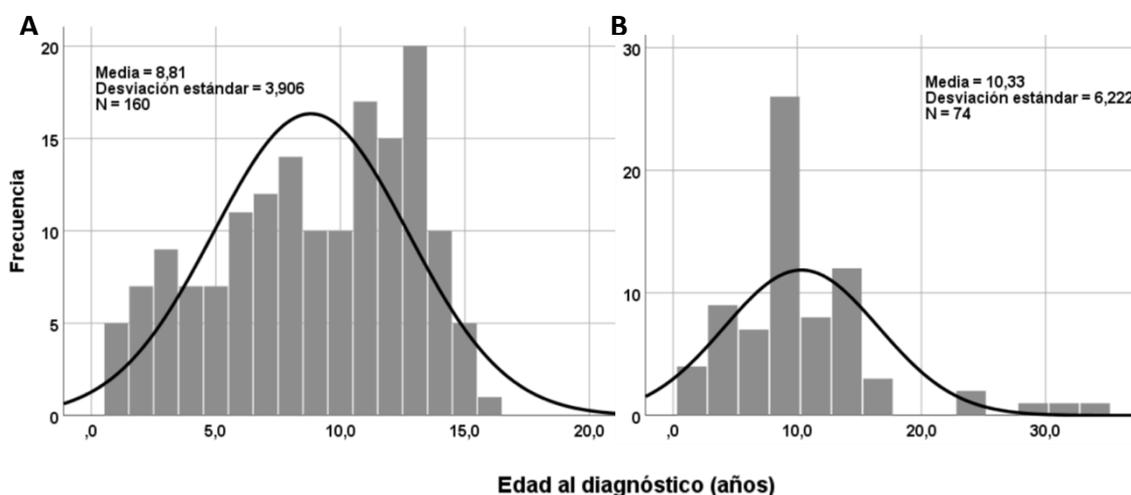


**Figura 9.** Distribución de las edades de los pacientes incluidos en la primera y segunda fase del estudio.

Para la valoración de la utilidad del HLA-DRB1 como biomarcador de diabetes tipo 1 (tercera fase del estudio) se incluyeron dos grupos diferentes de familias que se describen a continuación. El primer grupo se definió para determinar los alelos HLA-DRB1 que confieren susceptibilidad a diabetes tipo 1 en nuestra población. Consistió en 160 familias no emparentadas, formadas por ambos progenitores y un hijo/a en edad pediátrica con diagnóstico de diabetes tipo 1 confirmado por la presencia de autoinmunidad al debut (al menos un anticuerpo positivo). La mediana de edad en la cohorte fue de 9 años, (RIQ 6 - 12); edad mínima 1 año; edad máxima 15,5 años (figura 10 A).

El segundo grupo se definió para comparar las frecuencias de genotipos HLA-DRB1 de riesgo entre pacientes con diabetes tipo 1, pacientes con diabetes monogénica y

población control. Con esta finalidad, se añadió a las 160 familias descritas anteriormente, un segundo grupo de 74 familias no emparentadas, formadas por ambos progenitores y un hijo/a con un reciente diagnóstico de diabetes monogénica confirmado por un estudio genético. En este segundo grupo, 61 pacientes portaban una variante patogénica en heterocigosis en el gen *GCK* y 13 portaban una variante patogénica en heterocigosis en el gen *HNF1A*. La mediana de edad en la cohorte fue de 10 años, (RIQ 7 - 13); edad mínima 1,5 años; edad máxima 33 años. Todos los pacientes, tanto los portadores de variantes patogénicas como los familiares sanos, presentaron autoinmunidad negativa (figura 10 B).



**Figura 10.** Distribución de las edades de los pacientes incluidos en la tercera fase del estudio. El histograma A corresponde a los pacientes con diabetes tipo 1 y el histograma B corresponde a los pacientes con diabetes monogénica.

Los participantes fueron reclutados entre 2005 y 2017 de 12 hospitales de referencia en España: H.U. Basurto, Bizkaia; H.U. Costa del Sol, Málaga; H.U. Cruces, Bizkaia; H.U. Marqués de Valdecilla, Santander; H.U. Miguel Servet, Zaragoza; Complejo Hospitalario de Navarra; H.U. Ramón y Cajal, Madrid; H.U. Reina Sofía, Córdoba; H.U. Severo Ochoa, Madrid; H.U. Son Espases, Palma de Mallorca; H.U. Vall d'Hebron, Barcelona; H.U. Virgen del Rocío, Sevilla.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Euskadi (PI2017135) y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos y/o sus padres.

## 2. ANÁLISIS DE AUTOANTICUERPOS

En todos los pacientes incluidos en las tres fases de este estudio se analizaron los autoanticuerpos IAA, GADA, IA2A y ZnT8A en suero recogido en el momento del diagnóstico, que se mantuvo congelado a -80°C hasta el día del análisis. Se consideró autoinmunidad positiva tener al menos uno de los cuatro autoanticuerpos analizados positivo.

Los cuatro ensayos de anticuerpos utilizados en este trabajo fueron puestos a punto en el laboratorio de Investigación en Genética y Control de Diabetes y Enfermedades Endocrinas del Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia. Se trata de técnicas manuales y no se utilizaron kits comerciales. Las cuatro técnicas son radioensayos de unión a moléculas marcadas isotópicamente: insulina, GAD<sub>65</sub>, IA2<sub>IC</sub> o ZnT8, según el caso.

En el caso de los IAA se utiliza un preparado comercial de insulina humana recombinante, marcada con iodo 125 (<sup>125</sup>I). Por otra parte, las moléculas de GAD<sub>65</sub>, IA2<sub>IC</sub> y ZnT8 son producidas *in vitro* en nuestro laboratorio a partir de los plásmidos recombinantes *pEX9*, *pIA2ic* y *pJH5.2*, cedidos por Åke Lernmark (Universidad de Washington, Seattle, USA), Ezio Bonifacio (Instituto Científico San Raffaele, Universidad de Milán, Italia) y John Hutton (Centro Barbara Davis, Universidad de Colorado, Denver, USA) respectivamente. Por esta razón, antes de describir el protocolo del radioinmunoensayo (apartado 2.1.2.), se describen los pasos para la producción *in vitro* de dichos antígenos (apartado 2.1.1.). Son técnicas de biología molecular que se explican en detalle para los ZnT8A y, posteriormente, se mencionan las particularidades de los ensayos para GADA e IA2A (apartado 2.2.). Los IAA, que se analizan con un protocolo diferente, se detallan a continuación (apartado 2.3.).

Para finalizar, se explica en qué consisten los programas internacionales de estandarización en los que participamos para conocer el rendimiento de los ensayos y la concordancia de los resultados entre laboratorios (apartado 2.4.).

## 2.1. Desarrollo del radioensayo de detección de autoanticuerpos anti-ZnT8

La técnica desarrollada para la detección de autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A) es un radioinmunoensayo (RIA). Se trata de una técnica semicuantitativa capaz de determinar la cantidad de autoanticuerpos presentes en el suero en relación con determinados sueros patrón. El fundamento de la técnica es la precipitación mediante partículas de agarosa-proteína A de los complejos inmunes anticuerpo-antígeno marcado, y la cuantificación de la cantidad de anticuerpo presente en función de la cantidad de antígeno precipitado. La técnica se divide en 5 partes que se detallan a continuación:

1. Obtención del antígeno humano recombinante marcado con radiactividad ( $^{35}\text{S}$ ) mediante un sistema de transcripción/traducción *in vitro* del plásmido *pJH5.2* que codifica para el antígeno ZnT8.
2. Incubación de los sueros problema con el antígeno marcado con  $^{35}\text{S}$  para la formación de los complejos inmunes.
3. Precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo marcado con  $^{35}\text{S}$  mediante agarosa-proteína A.
4. Determinación de la cantidad de antígeno precipitado (contaje de centelleo).
5. Cálculo y análisis de resultados.

### 2.1.1. Obtención del antígeno ZnT8 marcado con $^{35}\text{S}$

El plásmido recombinante utilizado en este ensayo, *pJH5.2*, contiene dos copias en tándem de la secuencia de ADN que codifica para el dominio carboxilo terminal del ZnT8 (del aminoácido 268 al 369). Se trata de una construcción quimérica que produce las dos variantes polimórficas (Arg o Trp en posición 325) de la proteína unidas por una bisagra CLFCEDPCDPSTPPGSSGGGKDFSILLME con la pauta de lectura correcta bajo el control del promotor del virus bacteriófago SP6 en el plásmido vector *pCDNA3.1* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ([doi.org/10.2337/db08-0522](https://doi.org/10.2337/db08-0522)).

La producción *in vitro* de la molécula ZnT8 marcada con el isótopo radiactivo  $^{35}\text{S}$  a partir del plásmido recombinante *pJH5.2* se desarrolla en los siguientes pasos:

- A. Transformación de *Escherichia coli* con el plásmido recombinante *pJH5.2*
- B. Purificación del plásmido recombinante *pJH5.2*
- C. Producción del antígeno marcado  $^{35}\text{S}$ -ZnT8: transcripción/traducción *in vitro*.
- D. Purificación del antígeno marcado  $^{35}\text{S}$ -ZnT8.

#### **A. Transformación de *Escherichia coli* con el plásmido recombinante *pJH5.2***

Para la producción continuada del antígeno ZnT8 es necesario asegurar la perpetuidad del plásmido *pJH5.2*. Para ello, el plásmido se introdujo mediante transformación bacteriana en una cepa de *E. coli DH5 $\alpha$*  (estirpe modificada genéticamente de manera que es posible inducir en el laboratorio la competencia de las células, así como mantener el plásmido de forma estable en su interior).

La transformación bacteriana es un proceso por el cual las células captan ADN libre presente en el medio. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado estado de competencia, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celular lo que permiten la entrada de ácidos nucleicos al interior celular. El protocolo se detalla a continuación:

#### **Reactivos y equipos necesarios para la transformación bacteriana:**

- **Plásmido *pJH5.2*** resuspendido en tampón TE, a una concentración de 100 ng/ml
- **Tampón TE** (Tris-EDTA): 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0.
- **Células de *E. coli DH5 $\alpha$*  competentes** (*Subcloning Efficiency™ DH5 $\alpha$  Competent Cells*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, Cat.No.18265-017) conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- **Medios y reactivos para el cultivo bacteriano:**

- **Caldo Luria:** Triptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; Na Cl 10 g/l; pH 7,2. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
  - **Agar Luria:** 15 g/l de agar bacteriológico en caldo Luria. El medio autoclavado se reparte en placas Petri que se conservan a temperatura ambiente.
  - **Solución stock de ampicilina:** 100 mg/ml ampicilina sódica en agua MilliQ. Se conserva en alícuotas de 1 ml a -20°C.
  - **Medio Luria suplementado con ampicilina:** 1 ml de solución stock de ampicilina por cada litro de medio Luria esterilizado (concentración final 100 µg/ml). En el caso de agar Luria, la ampicilina se añade cuando el medio está a unos 50°C. El medio suplementado se reparte en placas de Petri que se conservan a 4°C durante no más de un mes.
- **Incubador de CO<sub>2</sub>. Autoclave. Baño termostático. Nevera. Congelador -80°C.**

**Protocolo detallado:**

- Descongelar en hielo una alícuota de 200 µl de células de *E. coli DH5α* competentes.
- Añadir a las células competentes aproximadamente 100 ng del plásmido *pJH5.2*. Mantener en hielo 30 min.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se somete a las células a un choque térmico de 2 min a 42°C en un baño termostático.
- Añadir 800 µl de caldo Luria e incubar con agitación a 37°C durante 1 h.
- Sembrar del tubo de transformación de 50 a 100 µl en una placa de agar Luria suplementada con ampicilina e incubar a 37°C durante 18 horas en estufa.
- Transcurrido el tiempo de incubación, las placas con las colonias transformantes se conservan a 4°C hasta su uso.

**B. Purificación del plásmido recombinante *pJH5.2***

El ADN plasmídico se purificó a partir de pequeños cultivos líquidos (5 ml de Luria-ampicilina) de una colonia, que se denominan minipreparaciones o minipreps, obteniéndose unos 10 µg de plásmido purificado. Para la producción a gran escala del

plásmido y su utilización en la producción de antígenos recombinantes, se utilizaron cultivos de 100 a 500 ml, denominados maxipreps, que producen alrededor de 1 mg de ADN purificado.

Para la purificación del plásmido *pJH5.2* a partir de los cultivos bacterianos, en ambos casos se utilizaron kits comerciales de purificación de ADN plasmídico, basados en un método rápido y sencillo de lisis alcalina del cultivo bacteriano seguido de una etapa final de purificación en columna con matrices especializadas (QIAPREP *Spin Miniprep* Cat. No. 27104 y QIAGEN *Plasmid Maxi kit* Cat. No. 12162. QIAGEN, Hilden, Alemania). La concentración de ADN plasmídico de las preparaciones se determinó por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta.

### C. Producción del antígeno marcado <sup>35</sup>S-ZnT8

La molécula ZnT8 se sintetizó *in vitro* en una reacción acoplada de transcripción/traducción del plásmido *pJH5.2*. En resumen, la reacción consistió en la producción, en primer lugar, del ARN mensajero (ARNm) codificado por el fragmento de ADN complementario (ADNc) correspondiente a ZnT8 del plásmido *pJH5.2*. Como el fragmento de ADNc clonado se encuentra bajo el control del promotor bacteriófago SP6, se utiliza la enzima ARN-polimerasa específica para SP6. Seguidamente, en el mismo tubo, tiene lugar la traducción de ese transcrito de ARNm a la secuencia peptídica del transportador de zinc ZnT8, comenzando desde la primera metionina (el primer triplete AUG), hasta la primera señal de terminación. Para este segundo proceso se utilizó un lisado de reticulocitos de conejo, que son células anucleadas que conservan su capacidad de síntesis proteica. El marcaje radiactivo del antígeno recombinante ocurre de manera simultánea al proceso de síntesis, ya que los reactivos para el proceso incluyen el aminoácido radiactivo <sup>35</sup>S-Metionina, que es incorporado al péptido producido.

#### Reactivos necesarios para la producción del antígeno marcado:

- **Plásmido *pJH5.2*** purificado y resuspendido en buffer TE.

- **TnT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System** Promega, Madison, WI. Cat. No. L4600. Contiene: TnT® *Rabbit Reticulocyte Lysate* (1 ml); TnT® *Reaction Buffer* (90 µl); TnT® *SP6 RNA Polymerase* (60 µl); *Amino Acid Mixture, minus Methionine*, 1 mM (50 µl).
- **RNasin® Ribonuclease Inhibitors**. Promega, Madison, WI. Cat. No. N2111
- **Metionina marcada con <sup>35</sup>S**. *EasyTag™ L-[<sup>35</sup>S]-Methionine*, 500 µCi (18.5 MBq), *Stabilized Aqueous Solution*. PerkinElmer, Waltham, MA. Cat. No. NEG709A.

**Protocolo detallado:**

- Descongelar en hielo las alícuotas de reticulocitos que se vayan a utilizar. El lisado se suministra en alícuotas de 200 µl. Es recomendable alicuotar en volúmenes más pequeños (de 25 o 50 µl) ya que el lisado pierde actividad con cada descongelación.
- Poner en hielo el resto de los componentes de la reacción, excepto el buffer TnT que se descongela a temperatura ambiente y se mezcla con *vortex* antes de su utilización.
- Preparar un **mix para la reacción de marcaje** (cantidades para 1 reacción):
  - TnT® *Rabbit Reticulocyte Lysate* ..... 25 µl
  - TnT® *Reaction Buffer* ..... 2 µl
  - Mezcla de aminoácidos, sin Metionina... 2 µl
  - RNasin..... 1 µl
  - Metionina marcada con S<sup>35</sup> ..... 4 µl

Volumen total por reacción 34 µl. Mezclar bien con pipeta y centrifugar unos segundos para acumular toda la mezcla en el fondo del tubo.
- Para cada reacción de marcaje añadir a un tubo de 0,5 ml los reactivos en este orden:
  - Plásmido *pJH5.2* ..... 3 µg
  - Agua MilliQ..... 12 µl
  - Mezcla de reacción de marcaje ..... 34 µl
  - TnT® *SP6 RNA Polymerase*..... 1 µl

Mezclar suavemente con pipeta. Incubar a 30°C durante 90 - 120 minutos. Tras el tiempo de incubación se procede a la purificación del antígeno S<sup>35</sup>-ZnT8

#### **D. Purificación del antígeno marcado <sup>35</sup>S-ZnT8**

Con el propósito de determinar exactamente la cantidad de antígeno marcado producido, así como para evitar las uniones inespecíficas en los ensayos de análisis de anticuerpos, es importante eliminar de la preparación de antígeno marcado el exceso de <sup>35</sup>S-Metionina no incorporada, junto con pequeños péptidos incompletos que se hubieran podido formar en la reacción. Para ello se realizó una cromatografía de tamizado molecular con una matriz capaz de retener moléculas de tamaño inferior a 5 kDa. Con este paso también se consigue el cambio del buffer de resuspensión del antígeno por otro más adecuado para su conservación.

#### **Reactivos y equipos necesarios para la purificación del antígeno marcado <sup>35</sup>S-ZnT8:**

- **Producto de la reacción de transcripción/traducción *in vitro*.**
- ***Illustra™ NAP™ Columns***, NAP-5, Sephadex™ G-25 DNA Grade. Thermo Fisher Scientific. Cat. No. 17-0853-01
- **Buffer Tris-Salino-Tween 20 (TBST):** 50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20. El buffer se filtra a través de un filtro de acetato de nitrocelulosa de 0,22 µm de poro y se conserva a 4°C.
- **Líquido de centelleo** para muestras con 20% de agua como máximo. MicroScint-20; PerkinElmer, Waltham, MA. Cat. No. 6013621.
- **Contador de centelleo de radiaciones β.** MicroBeta2 *Microplate Counter for Radiometric Detection*. PerkinElmer, Waltham, MA. Cat. No. 2450.

#### **Protocolo detallado:**

- Equilibrar las columnas de purificación NAP-5 lavando con 4 ml de buffer TBST frío. La columna debe de mantenerse siempre húmeda.

- Completar el volumen de la reacción de marcaje hasta 150  $\mu\text{l}$  con TBST y mantenerlo en hielo.
- Comprobar que la columna se ha vaciado totalmente (no gotea) y añadir suavemente los 150  $\mu\text{l}$  de la reacción de marcaje.
- Cuando se detiene el flujo, añadir suavemente 200  $\mu\text{l}$  de TBST frío. Se separan 2 fases, el frente del marcaje (color rojo) avanza por la matriz de la columna, dejando atrás un frente rosado más débil que corresponde a la metionina no incorporada.
- Cuando se detiene el flujo, añadir 300  $\mu\text{l}$  de TBST. El frente rojo avanza hasta el extremo inferior de la columna.
- Cuando se detiene el flujo, añadir 600  $\mu\text{l}$  de TBST y recoger el eluyente (de color rojo claro) hasta que se vuelva transparente en un tubo Eppendorf. Agitar con *vortex* el tubo y centrifugar. Desechar la columna.
- Añadir 2  $\mu\text{l}$  de la muestra a un tubo Eppendorf lleno de líquido de centelleo. Cuantificar la radiactividad en un contador de centelleo de radiaciones  $\beta$  y dividir la medición entre 2. El resultado se expresa en cpm/ $\mu\text{l}$ .
- Dividir el marcaje en alícuotas de  $1,5 \cdot 10^6$  cpm y conservar a  $-80^\circ\text{C}$  hasta un máximo de 1 mes. Se utiliza una de estas alícuotas por cada placa de ensayo (de 96 reacciones).

### **2.1.2. Protocolo del radioinmunoensayo de detección de autoanticuerpos anti-ZnT8**

Para la detección de los autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A), se utilizó un radioinmunoensayo en el que se incuban las muestras de suero a analizar con el antígeno  $^{35}\text{S}$ -ZnT8 producido según los métodos detallados en los apartados anteriores. La técnica se ejecuta en placas *microtiter* de 96 pocillos. En cada placa se analizan por duplicado 38 sueros problema, un control negativo y otro positivo, puros. Además, también se incluyen siete diluciones seriadas a 1:2 de otro control positivo que es el mismo para todos los ensayos. La técnica, que se explica a continuación, se desarrolla durante 2 días consecutivos.

**Reactivos y equipos necesarios para el desarrollo de la técnica:**

- **<sup>35</sup>S-ZnT8**, producido según apartado 2.1.1. El antígeno se conserva a -80°C en alícuotas con  $1,5 \cdot 10^6$  cpm de antígeno purificado.
- **Tampón de Incubación/lavado (TIL)**: 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; 0.15% (v/v) Tween 20; 0.1% BSA; 0.1% Azida sódica; pH 7,4. Esterilizar por filtración a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,22  $\mu$ m de poro. Conservar a 4°C durante un mes como máximo.
- **Suspensión de proteína A-agarosa al 25% (v/v) en TIL**
- ⊖ **Placas de 96 pocillos de fondo redondo de poliestireno**. Sarstedt, Nümbrecht, Alemania. Cat. No. 82.1582.
- **Placas de filtración de 96 pocillos**. *MultiScreen-DV, Opaque Plates, 0,65  $\mu$ m*. Millipore SA, Molsheim, Francia. Cat. No. MADVNOB10.
- **Dispositivo de filtración para placas**. *MultiScreen System Filtration Manifold*; Millipore SA, Molsheim, Francia.
- **Líquido de centelleo** para muestras con hasta 20% de agua. *Microscint 20*; Packard Instruments Co, USA. Cat. No. 13621.
- **Contador de centelleo para placas de 96 pocillos**. *Top Count*; Packard instruments co, USA.
- **Agitador orbital**. *Heidolph Titramax 100*.

**Protocolo detallado de la técnica:**

**DÍA 1: incubación de las muestras**

- Descongelar los sueros a analizar conservados a -80°C: 38 sueros de pacientes, 1 control negativo y 1 control positivo puros y otro control positivo que se diluirá con suero fisiológico: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128.
- Descongelar la alícuota del antígeno <sup>35</sup>S-ZnT8 y diluirlo en 8 ml del buffer TIL (concentración final 200 cpm/ $\mu$ l). Mantener en hielo hasta su uso.
- Colocar la placa de incubación (placa microtiter de 96 pocillos en “u”) sobre hielo y añadir 3  $\mu$ l de suero a cada pocillo. Se añade cada muestra por duplicado.

- Añadir 75 µl del antígeno <sup>35</sup>S-ZnT8 diluido a cada pocillo y cubrir la placa con Parafilm. Agitar brevemente para homogeneizar la mezcla. Incubar a 4°C durante 18 horas.
- Preparar una placa MultiScreen de filtración para la inmunoprecipitación que se realizará al día siguiente. Se humedece con 200 µl de TIL por pocillo, se envuelve la placa con papel de aluminio y se deja a temperatura ambiente durante 18 horas.

### **DÍA 2: precipitación con proteína A**

- Preparar la solución de agarosa-proteína A. En un tubo de 50 mL, añadir 25 mL de la suspensión comercial de agarosa-proteína A y completar con agua MilliQ. Agitar brevemente y centrifugar en frío a 800 xg durante 5 min. Decantar el sobrenadante y repetir el lavado. Lavar una vez más con TIL y decantar el sobrenadante. Comprobar el volumen de agarosa-proteína A y añadir 3 veces ese volumen de TIL para conseguir una suspensión al 25% vol/vol. Conservar a 4°C no más de tres meses.
- Lavar la placa de filtración dos veces con 200 µl de TIL por pocillo. Añadir el líquido y volcar la placa inmediatamente. Secar la placa golpeándola boca abajo contra un papel absorbente.
- Añadir 50 µl de suspensión agarosa-proteína A a cada pocillo de la placa de filtración.
- Utilizando una pipeta multicanal, transferir 50 µl de cada pocillo de la placa de incubación a la placa de filtración (que contiene la agarosa-proteína A). Envolver la placa de filtración con papel de aluminio e incubarla a 4°C con agitación durante 45 minutos exactos.
- Desenvolver la placa y colocarla sobre el aparato de filtración. Añadir 100 µl de TIL a cada pocillo. Conectar el vacío hasta que se absorba todo el líquido de los pocillos.
- Hacer tres lavados más con 200 µl de TIL.
- Después del cuarto lavado, añadir 150 µl de TIL a cada pocillo, tapar la placa, envolverla con papel de aluminio e incubarla a 4°C con agitación a velocidad media durante al menos 5 minutos.

- Desenvolver la placa y colocarla sobre el aparato de filtración. Conectar el vacío hasta que se absorba todo el líquido de los pocillos.
- Hacer tres lavados más con 200 µl de TIL.
- Retirar el soporte inferior de la placa. Escurrir la placa sobre papel absorbente, secar a la luz de una lámpara durante 15 minutos aproximadamente girando la placa para que el secado sea uniforme. Cuando la placa está seca se puede observar que la agarosa-proteína A de cada pocillo aparece cuarteada.
- Colocar la placa sobre el soporte para el contador. Añadir 50 µl de líquido de centelleo a cada pocillo y sellar la placa con una hoja adhesiva. Agitar a velocidad máxima durante 30 segundos y cuantificar en el contador β.

### 2.1.3. Cálculo de resultados

Los resultados de cada determinación se expresaron de manera semicuantitativa en unidades arbitrarias denominadas ZnT8INDEX. El ZnT8INDEX relativiza la cantidad de antígeno precipitado por el suero problema (MUESTRA) a la cantidad precipitada por un suero patrón (POS y NEG). La fórmula matemática que se aplica es:

$$\text{ZnT8INDEX} = \left( \frac{\text{cpmMUESTRA} - \text{cpmNEG}}{\text{cpmPOS} - \text{cpmNEG}} \right)$$

En la ecuación, cpmMUESTRA, cpmNEG y cpmPOS, representan la radiactividad precipitada por la muestra problema, por el patrón negativo y el suero positivo, respectivamente, expresado en cpm (cuentas por minuto). Los valores son el promedio de los dos duplicados. Como suero patrón positivo se utilizó el suero de un paciente con diagnóstico reciente de diabetes tipo 1 y como patrón negativo la mezcla de suero de 20 individuos sin historia ni antecedentes familiares de diabetes tipo 1.

### 2.2. Determinación de autoanticuerpos anti-GAD (GADA) y anti-IA2 (IA2A)

El principio de la técnica de detección de autoanticuerpos anti-GAD y anti-IA2 es igual al de la técnica de anti-ZnT8, excepto por el antígeno utilizado. En el caso del anti-GAD el antígeno corresponde a la totalidad de la región codificante de GAD<sub>65</sub> marcada con

$^{35}\text{S}$  y se obtiene por transcripción/traducción *in vitro* del plásmido *pEx9* cedido por A Lernmark de la Universidad de Washington, Seattle, USA, y en el caso del IA2A corresponde a la porción intracelular de IA2 marcada también con  $^{35}\text{S}$  y se obtiene por transcripción/traducción *in vitro* del plásmido *pIA2ic* cedido por el grupo de E. Bonifacio, del Instituto Scientifico San Raffaele de Milán, Italia.

### 2.3. Determinación de autoanticuerpos anti-insulina (IAA)

Los autoanticuerpos anti-insulina (IAA) se cuantificaron utilizando un radioensayo de competición en fase líquida basado en la técnica descrita por Vardi *et al*, que utiliza como antígeno insulina humana recombinante marcada con yodo radiactivo ( $^{125}\text{I}$ ) en el aminoácido tirosina en posición A14 (Vardi *et al.*, 1987). En resumen, las muestras se analizan por duplicado, y se incuban a 4°C durante una semana, en presencia y en ausencia de competición con insulina no radiactiva. Los complejos inmunes se precipitan con polietilenglicol y la cantidad de radiactividad precipitada se determina en un contador de radiaciones gamma. Los resultados de la prueba se expresan de manera cuantitativa en nU/ml, en función de la cantidad de insulina radiactiva precipitada según la ecuación descrita en la página 99.

#### Reactivos y equipos necesarios para el desarrollo de la técnica:

- **Suero** de los pacientes
- **Insulina radiactiva:** *Insulin (human, recombinant)*, [ $^{125}\text{I}$ ], 10  $\mu\text{Ci}$ . PerkinElmer, Waltham, MA. Cat.No NEX420010UC. El producto liofilizado se resuspendió en 1 ml de agua MilliQ, a una concentración de aproximadamente 5 pmol/ml (700.000 nU/ml aprox) y se conservó a -20°C.
- **Tampón fosfosalino (PS):** 0,15 M NaCl; 67,2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 12,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,05% BSA, fracción V; 0,025%  $\gamma$ -globulina bovina). Se preparó una solución nueva para cada ensayo.
- **Tampón Veronal:** 20 mM Barbitol sódico (Sigma-Aldrich); 2,4 mM HCl; pH 8,6. Se preparó una solución nueva para cada ensayo.

- **Solución de polietilenglicol (PEG) al 14,3%:** 14,3% PEG-8000 (Sigma-Aldrich); 0,1% Tween 20, en tampón Veronal. Se preparó una solución nueva para cada ensayo.
- **Solución PEG al 11,0%:** 11,0% PEG-8000 (Sigma-Aldrich); 0,1% Tween 20, en tampón Veronal. Se preparó solución nueva para cada ensayo.
- **Solución PSI:** 9 nU/ml Humulina Regular Lilly (100 UI/ml) en tampón PS. Se preparó una solución nueva para cada ensayo.
- **Solución PSI\*:** Se preparó una dilución 1:100 de la insulina radiactiva en tampón PS, hasta una concentración aproximada de 0,05 pmol/ml (7000 nU/ml aprox)
- **Tubos de 5 ml de poliestireno.** Corning. Cat.No 352052.
- **Contador de radiación Gamma.** *Detector Gamma Counter 2480 Wizard<sup>2</sup>™*, PerkinElmer, Waltham, MA.
- **Agitador vortex multitubo.** Corning 4010 *Multi-Tube Vortexer*
- **Centrífuga Megafuge 40R,** Heraeus. Thermo Fisher Scientific

#### **Protocolo detallado de la técnica:**

Para cada muestra a analizar, se realizaron cuatro determinaciones (duplicados con y sin competición con insulina fría) siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- Distribuir 150 µl del suero problema en cada uno de los cuatro tubos de 3 ml.
- A dos de los tubos añadir 50 µl de tampón PSI (tubos de competición o PSI) y a los otros dos 50 µl de tampón PS (tubos sin competición o PS). Incubar los tubos a 4°C durante 1 h.
- Transcurrido el tiempo de incubación, añadir a todos los tubos, PS y PSI, 200 µl de solución PSI\*. La mezcla se agitó en un agitador multitubo y se incubó a 4°C durante una semana. Como control de la cantidad total de radiactividad añadida a cada tubo del ensayo (tubos TOTAL) se añadieron 200 µl de PSI\* a cuatro tubos sin suero.
- Después de la semana de incubación, hacer un lavado de los tubos con solución 14,3% PEG y seguido otros dos lavados con solución 11,0% PEG. Cada uno de los lavados consistió en añadir a cada tubo 1,5 ml de la solución de PEG fría, homogenizar vigorosamente la mezcla en un agitador multitubo y centrifugar los

tubos a 2000 xg y 4°C durante 30 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante se desechó por decantación.

- Finalizado el último lavado, se determinó en un contador de radiación y la radiactividad del precipitado (que contiene los complejos inmunes autoanticuerpo-insulina radiactiva) en cada uno de los cuatro tubos de cada suero problema (tubos PS y PSI) y en los cuatro tubos TOTAL. La cantidad de autoanticuerpos anti-insulina se expresó de manera cuantitativa en nU/ml en función de la cantidad de insulina radiactiva precipitada, según la ecuación:

$$\text{IAA (nU/ml)} = \left( \frac{\text{cpmPS} - \text{cpmPSI}}{\text{cpmTOTAL}} \right) \cdot 10^4$$

donde cpmPS, cpmPSI y cpmTOTAL representan el promedio de la radiactividad precipitada por los dos tubos sin competición (PS), los dos tubos con competición (PSI) y los cuatro tubos TOTAL, respectivamente, expresado todo en cuentas por minuto (cpm).

#### **2.4. Estandarización de los ensayos de determinación de autoanticuerpos. IASP 2018**

Para la estandarización de los ensayos de determinación de autoanticuerpos asociados a la diabetes autoinmune, nuestro laboratorio participa en el programa bianual de estandarización de autoanticuerpos contra los islotes pancreáticos, IASP (*Islet Autoantibody Standardization Program*) desde 1995. El IASP es un esfuerzo de colaboración internacional dirigido a mejorar el rendimiento de los ensayos de análisis de autoanticuerpos asociados a la diabetes tipo 1 y optimizar la concordancia de los resultados entre laboratorios (Bingley and Williams, 2004). Es un programa promovido por la Sociedad de Inmunología de la Diabetes, IDS (*The Immunology of Diabetes Society*) y la NIH (*National Institutes of Health, USA*), está coordinado por un comité nominado por la IDS, y dirigido por la Universidad de Florida (*Endocrine Autoantibody Laboratory*).

Los laboratorios que participan en el programa de estandarización analizan muestras para detectar autoanticuerpos asociados a la diabetes autoinmune, tanto en sueros de

pacientes con diabetes tipo 1 al debut como en sueros de controles. Las muestras distribuidas son idénticas para todos los laboratorios y se hace un análisis ciego, es decir, la identificación de la muestra es desconocida para el analista. Es el comité del IASP el que centraliza la recopilación y el análisis de los resultados, para poder así proporcionar a cada laboratorio participante una comparación imparcial del rendimiento de los ensayos que utiliza para la determinación de autoanticuerpos anti-islote.

En concreto, en el estudio de comparación inter-laboratorios del IASP celebrado en 2018, los laboratorios participantes, entre ellos el nuestro, recibieron 140 muestras de suero codificadas: 50 pacientes (43 sueros de pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico y 7 familiares de primer grado con un metabolismo de la glucosa alterado y autoanticuerpos múltiples positivos) y 90 muestras de población control sin diabetes (todos donantes de sangre). Participaron 37 laboratorios de 17 países de América del Norte, Europa, Asia y Australia, que presentaron los resultados de 48 ensayos diferentes de GADA, 47 de IA2A y 42 de ZnT8A.

El ensayo para la determinación de IAA, necesita un volumen de suero (600  $\mu$ l) que está por encima de la cantidad de suero suministrado por el programa de estandarización (100  $\mu$ l), razón por la cual, en la actualidad, no es posible participar en programas de estandarización internacionales con este ensayo.

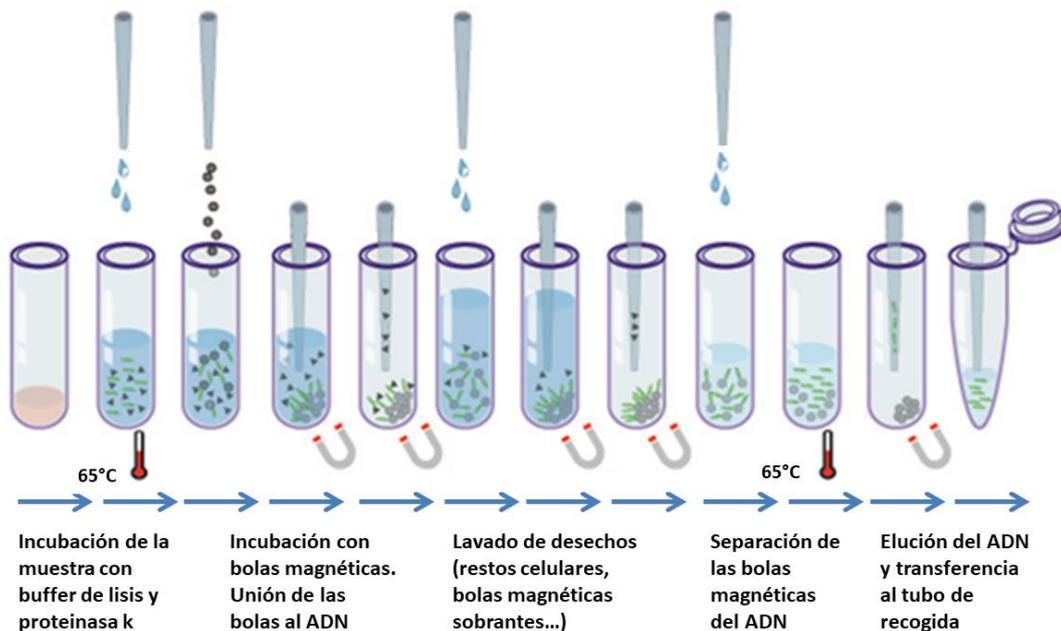
El IASP, proporciona para cada ensayo evaluado los valores de sensibilidad y especificidad de la técnica. El programa de estandarización define **sensibilidad** como el porcentaje de sueros de pacientes que el laboratorio participante notifica como positivos utilizando su propio punto de corte, y **especificidad** como el porcentaje de sueros de controles sanos que el laboratorio participante notifica como negativos utilizando su propio punto de corte.

### 3. ANÁLISIS GENÉTICOS

Para realizar los análisis genéticos se recogió de todos los pacientes una muestra de sangre periférica en un tubo BD *Vacutainer* de 3 ml con anticoagulante EDTA. A continuación, se explica el proceso de extracción de ADN a partir de sangre total (apartado 3.1.). Seguidamente, se detalla la metodología NGS y MLPA que se aplicó para el diagnóstico de diabetes monogénica en los pacientes con autoinmunidad negativa (apartado 3.2. y 3.3.). Por último, se describe la metodología para la caracterización molecular de alta resolución del *locus* HLA-DRB1 (apartado 3.4.) así como los procedimientos seguidos para los análisis estadísticos de asociación.

#### 3.1. Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó con el extractor automático *MagPurix* desarrollado por *Zinexts Life Science Corp.* (ZP02001 *MagPurix Blood DNA Extraction kit* 200) a partir de 400  $\mu$ l de sangre periférica recogida en un tubo *Vacutainer* con anticoagulante EDTA y congelada a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la extracción. En la figura 11 se presenta un esquema del proceso de extracción basado en partículas magnéticas:



**Figura 11.** Proceso de extracción de ADN basado en partículas magnéticas. Imagen adaptada de *MagPurix Extraction Kit Handbook*

En resumen, la técnica se basa en la unión reversible del ADN a unas microesferas electromagnéticas que el equipo transporta y mezcla con diferentes reactivos durante el proceso de purificación. Tras la lisis celular y la unión del ADN a las microesferas, éstas se someten a una serie de lavados para eliminar todos los componentes celulares contaminantes. Finalmente, el ADN purificado es separado de las microesferas y es resuspendido en 100  $\mu$ l de un buffer de elución.

La concentración y pureza del ADN se determinó mediante espectrofotometría utilizando el equipo *Nanodrop* 2000 y mediante fluorometría con el equipo *Qubit* 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La espectrofotometría determina la concentración y pureza de una muestra basándose en la capacidad de absorción de un compuesto presente en la solución a una longitud de onda determinada. De este modo, la concentración del ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de la absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm, mientras que la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras. A 280 nm absorben compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Se considera que un ADN tiene pureza óptima si el cociente A260/280 tiene un valor entre 1,8 y 2,0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos un cociente A260/280 mayor de 1,6. Un valor A260/280 menor de 1,6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas y un valor de A260/280 mayor de 2,1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. A 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando el valor del cociente A260/230 se sitúa en torno a 1,5 - 2,2. Un valor menor de 1,5 indicaría presencia de contaminantes en la muestra.

La ventaja de la fluorometría respecto a la espectrofotometría es su alta precisión y sensibilidad. Se basa en la utilización de fluoróforos que se intercalan específicamente entre las moléculas de ADN, minimizando así los efectos de los contaminantes. La precisión de las mediciones incluso a bajas concentraciones (rango de efectividad de 10  $\mu$ g a 1  $\mu$ g) hace que el fluorímetro *Qubit* sea la herramienta ideal para aplicaciones, tales como PCR en tiempo real y secuenciación masiva.

Todas las muestras de ADN utilizadas en los análisis genéticos presentaron una concentración superior a 50 ng/μl y una pureza en rangos óptimos. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su utilización en los análisis genéticos.

### 3.2. Estudio genético de diabetes monogénica mediante NGS

El estudio genético para la búsqueda de variantes patogénicas causantes de diabetes monogénica, se realizó con la tecnología de secuenciación masiva desarrollada por *Life Technologies*, actualmente Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) con la plataforma *Ion Torrent™ Personal Genome Machine®* (PGM). En concreto se desarrolló un panel de genes. Se trata de una estrategia de secuenciación masiva que proporciona un cribado de alto rendimiento de múltiples genes de forma simultánea y altamente eficiente. El proceso de trabajo para la secuenciación del panel de genes se sintetiza en los siguientes pasos y el procedimiento se detalla a continuación:

1. Diseño del panel de genes: *Ion AmpliSeq™ Designer tool*
2. Preparación de librerías: *Ion AmpliSeq™ library kit*.
3. Amplificación clonal (PCR en emulsión): *OneTouch OT2™*. Cuantificación de la PCR de emulsión (*Ion Sphere Quality Control*) y enriquecimiento de las microesferas con amplicón (*One touch ES*)
4. Secuenciación: *Ion Torrent Proton™*
5. Procesamiento bioinformático de los datos: *Torrent Suite 4.2.1.™*
6. Filtrado e interpretación de las variantes: *Ion reporter software 4.0.™*

#### 3.2.1. Diseño del panel de genes

En el diseño del panel se incluyeron 12 genes relacionados con diabetes monogénica, tanto las formas más frecuentes (*GCK, HNF1A, HNF4A, HNF1B, INS, ABCC8, KCNJ11*) como otras raras (*PDX1, NEUROD1, KLF11, PAX4 y BLK*). Para el diseño de los *primers* que permiten la secuenciación simultánea de los 12 genes, se utilizó la herramienta informática *Ion AmpliSeq Designer tool v.4.4.8* (<https://www.ampliseq.com>). El diseño

incluyó la región exónica y las regiones 3'UTR, 5'UTR y promotora de los 12 genes señalados anteriormente, así como 50 pb del límite intrón-exón para asegurar la captura de zonas de *splicing*.

Los paneles de Thermo Fisher Scientific se caracterizan por agrupar los *primers* en varios grupos o *pooles*. La finalidad de esta agrupación es que los *primers* no se solapen en la amplificación y que no se generen productos de amplificación o amplicones no deseados, lo que es un problema habitual en la NGS.

El panel resultante comprende 272 amplicones, de 125 a 375 pb, y los *primers* necesarios para amplificar las regiones de interés están divididos en 3 *pooles*, uno de 88 parejas de *primers* y dos de 92 parejas de *primers* cada uno. El tamaño total del panel es de 69,22 kb con una cobertura teórica del 99,13% (Tabla 5).

**Tabla 5.** Cobertura teórica de los genes incluidos en el panel de acuerdo a la herramienta informática *Ion AmpliSeq Designer tool*.

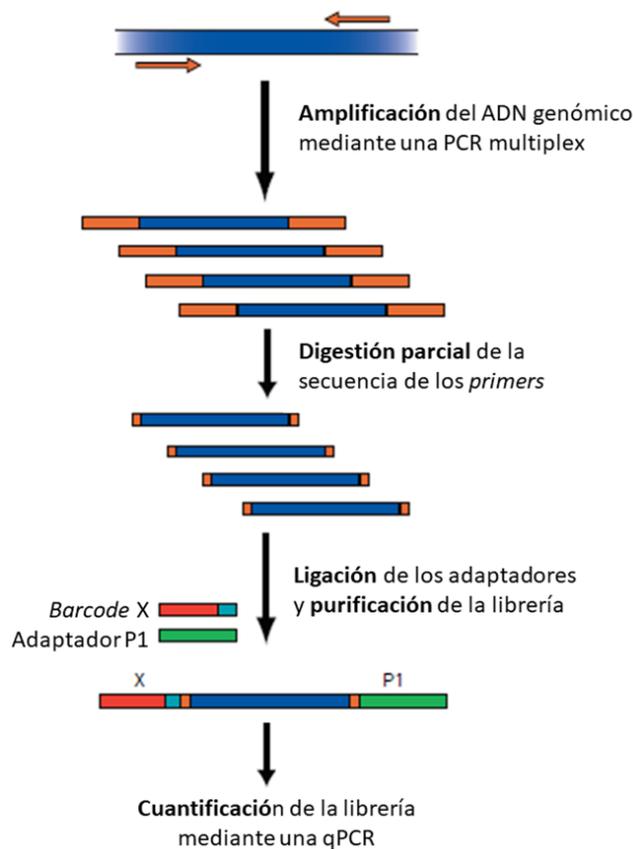
Gen	Localización cromosómica	Bases a secuenciar (pb)	Bases perdidas (pb)	Cobertura (%)
<i>KLF11</i>	2p25	4866	21	99,57
<i>NEUROD1</i>	2q32	3202	0	100
<i>GCK</i>	7p15.3-p15.1	4595	0	100
<i>PAX4</i>	7q32.1	2910	0	100
<i>BLK</i>	8p23-p22	3890	0	100
<i>ABCC8</i>	11p15.1	8823	0	100
<i>KCNJ11</i>	11p15.1	3769	160	95,75
<i>INS</i>	11p15.5	1306	0	100
<i>HNF1A</i>	12q24.31	4543	0	100
<i>PDX1</i>	13q12.1	2773	278	89,97
<i>HNF1B</i>	17q12	4417	0	100
<i>HNF4A</i>	20q13.12	7574	0	100

pb: pares de bases

### 3.2.2. Preparación de la librería

La preparación de la librería consiste en la amplificación múltiple y simultánea de las regiones genómicas de interés de los 12 genes seleccionados relacionados con diabetes monogénica. Para la preparación de las librerías se utilizó el *Ion AmpliSeq library kit 2.0* siguiendo el protocolo establecido por el fabricante con pequeñas modificaciones para optimizar el rendimiento. El protocolo se resume en los siguientes pasos (Figura 12):

- A. Amplificación del ADN genómico mediante una PCR multiplex.
- B. Digestión parcial de la secuencia de los *primers*.
- C. Ligación de los adaptadores a los amplicones.
- D. Purificación de la librería.
- E. Cuantificación del producto amplificado mediante una PCR cuantitativa (qPCR).



**Figura 12.** Diagrama de flujo del procedimiento seguido para la preparación de librerías. Imagen adaptada de *Ion AmpliSeq™ DNA Library Preparation User Guide*.

**Reactivos y equipos necesarios para la preparación de librerías:**

- ***Ion Ampliseq™ Library kit 2.0 – 96LV*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4480441). Incluye: 5X *Ion Ampliseq™ HiFi Mix* (1 x 384 µL), *FuPa Reagent* (1 x 192 µL), *Switch solution* (1 x 384 µL), *DNA Ligase* (1 x 192 µL).
- ***2X Ion Ampliseq™ Primer Pool*** (100 nM) (Thermo Fisher Scientific).
- ***Ion Xpress™ Barcode Adapters*** 1-16 kits (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4471250). Incluye: *Ion Xpress™ Barcodes* (16 tubes x 20 µL), *Ion Xpress™ P1 Adapter* (1 x 320 µL).
- ***NucleoMag NGS Clean-up & Size Select*** (Macherey-Nagel, Cat. No. 744970.50).
- ***Ion Library TaqMan™ Quantitation kit*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4468802). Incluye: 2X *Ion Library TaqMan® qPCR Mix*, 20X *Ion Library TaqMan® Quantitation Assay* and *E. coli DH10B Control Library* (68 pM) (2 x 25 µL).
- ***Absolute Ethanol*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. BP2818100).
- ***DynaMag™ -2 magnet*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 12321D).
- ***DNA LoBind tubes*** (1,5 mL) (Eppendorf AG, Hamburg, Germany, Cat. No. 022431021).
- ***Corning™ PCR Microplates*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 12799438).
- ***Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film*** (Bio-Rad, Cat. No. MSA5001).
- ***Veriti 96-well Thermal Cycler*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4375786).
- ***Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System*** (Thermo Fisher Scientific).
- ***Vortex mixer*** (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Cat. No. 541-10000-00).

**Protocolo detallado:****A. Amplificación del ADN genómico mediante una PCR multiplex**

El ADN genómico de cada paciente se diluyó a 5 ng/µl y se incluyeron 20 pacientes por librería. Para cada muestra se prepararon tres reacciones PCR, una PCR para cada *pool* de *primers*:

- Preparar un *mix* con los reactivos que hay que añadir a cada *pool* de *primers*:

- 5x Ion Ampliseq™ HIFI Mix: 2 µL
- 2x Ion Ampliseq™ Primer pool: 5 µL
- En hielo, añadir 7 µL del *mix* + 3 µL de ADN a cada tubo. Volumen final 10 µL. Agitar con pipeta.
- Amplificar en termociclador (*Veriti 96-well Thermal Cycler*) en las condiciones:

	Temperatura	Tiempo
	99 °C	2 min
19 ciclos	99 °C	15 seg
	60 °C	8 min
	10 °C	∞

En este punto del proceso, el producto de PCR puede almacenarse a 10°C durante la noche o a -20°C para períodos más prolongados de tiempo.

#### B. Digestión parcial de la secuencia de los *primers*

La digestión parcial es un paso importante ya que degrada los *primers* unidos a los amplicones, de forma que posteriormente en la secuenciación no oculten posibles mutaciones que puedan existir en las posiciones de hibridación de los *primers* al ADN genómico. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Juntar en un tubo por paciente los amplicones obtenidos en cada *pool*. Añadir a cada tubo 7 µl *pool* 1 + 7 µl *pool* 2 + 7 µl *pool* 3. Volumen final 21 µL. Agitar con *vortex*.
- En hielo, añadir a cada tubo 2 µL del enzima FuPa. Agitar con pipeta. El volumen final es de 23 µL.
- Incubar en el termociclador (*Veriti 96-well Thermal Cycler*) en las condiciones:

Temperatura	Tiempo
50 °C	10 min
55 °C	10 min
60 °C	20 min
10 °C	No más de 1 hora

### C. Ligación de adaptadores a los amplicones

El siguiente paso consiste en ligar a los amplicones dos adaptadores: el *Ion Xpress™ Barcode X* y el *Ion P1 Adapter*.

Los códigos de barras o *Barcodes* son unas secuencias específicas cortas de 6 a 14 nucleótidos que se unen al extremo 3' de los amplicones de cada paciente y que son específicas para cada uno de los individuos que se incluyen en la librería. Esta es la manera de poder separar *a posteriori* las lecturas que correspondan a cada paciente. La "X" se refiere a cualquier *Barcode* del 1 al 96. Por el extremo 5' del amplicón se une el *Ion P1 Adapter* de 17 nucleótidos de longitud. Tanto los *Barcodes* como el *P1 Adapter* servirán como secuencias complementarias para oligonucleótidos que se utilizarán en pasos posteriores de la NGS. El procedimiento a seguir para la ligación de los adaptadores es el siguiente:

- Preparar dilución 1:4 de cada uno de los *Barcode* diferentes que se van a utilizar en la librería:
  - *Ion P1 Adapter*: 0.5 µL
  - *Ion Xpress™ Barcode X*: 0.5 µL
  - Agua MilliQ: 1 µL
- En hielo, añadir a cada tubo 4 µl de *Switch solution* y 2 µl del *Barcode-Adapter mix*. Añadir seguidamente 2 µl de ligasa. El volumen final es de 31 µl. Agitar con *vortex*.
- Incubar en el termociclador en las condiciones:

Temperatura	Tiempo
22 °C	30 min
68 °C	5 min
72 °C	5 min
10 °C	No más de 1 hora

En este punto del proceso, el producto de PCR puede almacenarse a 10 °C durante la noche o a -20 °C para períodos más prolongados de tiempo.

#### D. Purificación de la librería

La purificación de las librerías se realiza con el reactivo *Agencourt AMPure® XP* que contiene bolas magnéticas a las que se une el ADN de forma reversible. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Preparar los reactivos:
  - Dejar el reactivo *Agencourt AMPure® XP* a temperatura ambiente. Agitar con *vortex* para dispersar bien las bolas magnéticas.
  - Preparar etanol al 70%
- Traspasar las librerías a tubos *Eppendorf Low Retention* de 1,5 ml.
- Añadir 45 µl de *Agencourt AMPure® XP* a cada librería. Agitar con pipeta. Incubar la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN se pega a las bolas magnéticas.
- Colocar los tubos en la gradilla magnética *DynaMag™-2 Magnet* e incubar 2 min o hasta que el líquido esté claro. Las bolas se pegan a la pared del tubo. Desechar el líquido sin mover las bolas.
- Añadir 150 µl de etanol al 70% e ir girando el tubo *Eppendorf* colocado en la gradilla magnética para que vayan rodando las bolas por la pared del tubo. Hay que dar una vuelta completa. Eliminar el líquido sin mover las bolas pegadas a la pared del tubo.
- Repetir el lavado nuevamente con 150 µl de etanol al 70%. Eliminar el líquido sin mover las bolas pegadas a la pared del tubo.
- Mantener los tubos abiertos en la gradilla magnética y secar a temperatura ambiente durante 5 min. Es importante que no quede etanol en la muestra.
- Pasar los tubos de la gradilla magnética a una gradilla convencional. Añadir 50 µl de Low TE y resuspender las bolas con pipeta y *vortex* hasta que se separen totalmente. Incubar 2-5 min a temperatura ambiente. En este momento se desprende el ADN de las bolas magnéticas.
- Colocar los tubos nuevamente en la gradilla magnética, esperar 2 min aproximadamente hasta que el líquido esté transparente. Pasar el líquido a un tubo nuevo y desechar las bolas magnéticas. El líquido en el que está resuspendida la librería, debe quedar perfectamente transparente, libre de bolas magnéticas.

En este punto del proceso, el producto de PCR puede almacenarse a 10°C durante la noche o a -20°C para períodos más prolongados de tiempo.

### E. Cuantificación de la librería mediante PCR cuantitativa (qPCR)

- Preparar dilución 1:100 de cada librería para cuantificar.
- Preparar 3 diluciones seriadas 1:10 a partir de *E.coli DH10B Ion Control Library* (68 pM). Se utilizará para realizar la curva standard con 3 puntos de concentración conocida (6.8 pM, 0.68 pM y 0.068 pM).
- Preparar un *mix* con los reactivos que hay que añadir a cada muestra a cuantificar:
  - 2X *Ion Library TaqMan®qPCR Mix*: 10 µl
  - 20x *Ion Library TaqMan® Quantitation Assay*: 1 µl
- En hielo, añadir 11 µL del *mix* + 9 µL de la librería diluida. Cuantificar cada muestra por duplicado. Añadir 2 controles negativos. Volumen final 20 µL. Agitar con pipeta.
- Amplificar en termociclador (*Real-Time PCR System 7300*) en las condiciones:

	Temperatura	Tiempo
	50 °C	2 min
	95 °C	20 seg
40 ciclos	95 °C	3 seg
	60 °C	30 seg
	10 °C	∞

- Calcular la concentración de cada librería. Normalmente las librerías amplificadas presentan una concentración entre 100 y 500 pM.
- Igualar la concentración de cada librería a 100 pM con *Low TE*. Mezclar 5 µl de cada librería a 100 pM en un tubo. Proceder a la amplificación clonal de la librería o almacenar a -20°C hasta su uso.

### 3.2.3. Amplificación clonal de la librería.

Los métodos de secuenciación no son lo suficientemente sensibles como para secuenciar una sola molécula, por ello, es necesario un paso de clonación y de

enriquecimiento de las librerías para generar muchas copias de cada fragmento de ADN amplificado que puedan ser utilizadas como entidades a secuenciar. Este proceso se realizó con el sistema *Ion OneTouch 2* desarrollado por Thermo Fisher Scientific, que consta de 2 módulos: el equipo *Ion OneTouch 2<sup>TM</sup>* (OT2) y el sistema de enriquecimiento *Ion OneTouch<sup>TM</sup> ES*.

El equipo OT2 incluye tres tecnologías que permiten la automatización del proceso completo. La primera es el filtro de reacción que crea millones de microreactores en los que se produce la amplificación clonal. La segunda es el termociclador totalmente integrado y la placa de amplificación desechable que permite someter a un ciclo térmico a los microreactores. La tercera es la centrifuga integrada, que recupera las microesferas con fragmentos de ADN clonados (ISPs positivas). Se ha seguido el protocolo establecido por el fabricante *Ion PGM<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> View OT2 kit user guide for use with Ion OneTouch<sup>TM</sup> 2 System*. El protocolo se resume en los siguientes pasos:

- F. Amplificación clonal de la librería mediante una PCR de emulsión.
- G. Enriquecimiento de la muestra con ISPs positivas.
- H. Cuantificación de ISPs positivas.

#### **Reactivos y equipos necesarios:**

- ***Ion PGM<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> View OT2 Kit*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A29900) (8rxn). Incluye: Reactivos, Soluciones y Fungible:
  - *Ion PGM<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> View OT2 Reagents* (Cat. No. A29811). Incluye: *Ion PGM<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> View Reagent Mix* (8 × 800 µL), *Ion PGM<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> View Enzyme Mix* (1 x 400 µL), *Ion PGM<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> View ISPs* (1 x 800 µL).
  - *Ion PGM<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> OT2 Solutions* (Cat. No. A27742). Incluye: *Ion OneTouch<sup>TM</sup> Breaking Solution* (2 × 1.2 mL), *Ion OneTouch<sup>TM</sup> Oil* (1 x 450 mL), *Ion OneTouch<sup>TM</sup> Reaction Oil* (1 x 25 mL), *Nuclease-free Water* (1 x 30 mL), *Ion OneTouch<sup>TM</sup> Recovery Solution* (1 x 350 mL), *Neutralization Solution* (1 x 100 µL), *Ion OneTouch<sup>TM</sup> Wash Solution* (1 x 16 mL), *MyOne<sup>TM</sup> Beads Wash Solution* (2 x 1.4 ml), *Tween<sup>TM</sup> Solution* (1 x 6 mL).

- *Ion PGM™ OT2 Supplies* (Cat. No. A27744). Incluye: *Ion OneTouch™ Reagent Tubes* (2 tubos), *Ion OneTouch™ Recovery Routers* (8 routers), *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* (16 tubos), *Ion OneTouch™ Sipper Tubes* (2 tubos), *Ion OneTouch™ Amplification Plate* (8 placas), *Ion OneTouch™ Cleaning Adapter* (8 adaptadores), *Ion OneTouch™ Reaction Filter* (8 filtros).
- ***Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads*** (Thermo Fisher, Cat. No 65001)
- ***Ion Sphere Quality Control kit*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4468656). Incluye: *Ion Probes* (20 µL), *Alexa Fluor™ 488 Calibration Standard* (400 µL), *Alexa Fluor™ 647 Calibration Standard* (400 µL), *Annealing Buffer* (400 µL) and *Quality Control Wash Buffer* (20 mL).
- ***Qubit® 2.0 Fluorometer*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q32866).
- ***DynaMag™-2 magnet*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 12321D).
- ***Ion OneTouch 2 Instrument*** (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4474779).
- ***Microcentrifuge Sorvall™ Legend™ Micro 17R*** (Thermo Fisher, Cat. No. 75002440).

#### Protocolo detallado:

#### F. Amplificación clonal de la librería mediante una PCR de emulsión

La amplificación clonal se llevó a cabo mediante una PCR de emulsión en el equipo *Ion OneTouch 2 Instrument* (OT2). Este procedimiento consiste en aislar, en gotas acuosas dentro de una fase oleosa, los fragmentos individuales de ADN generados en la librería, junto con microesferas recubiertas con adaptadores (*Ion Sphere Particles* o ISPs). Cada gota tendrá, de manera ideal, una ISP unida a un único fragmento de ADN junto con todos los reactivos necesarios para la reacción de PCR (figura 13).

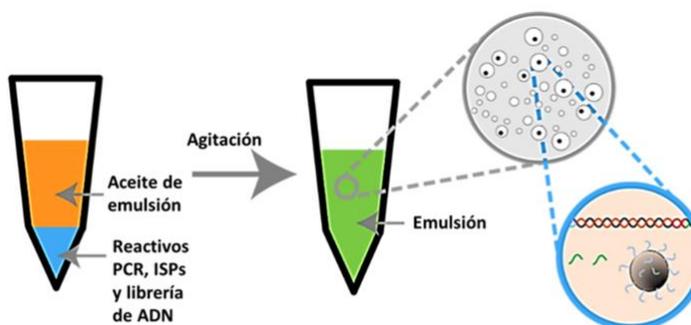
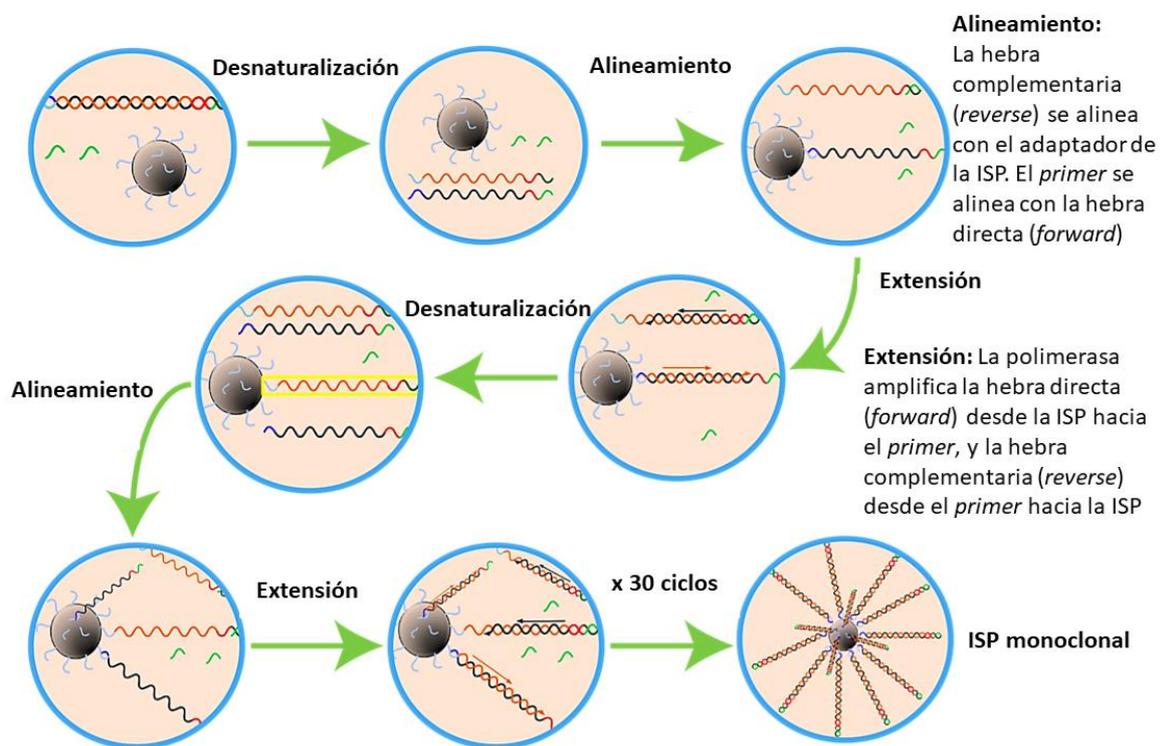


Figura 13. Detalle de los componentes de una PCR de emulsión. Adaptado de "Emulsion PCR" A. Vierstraete, 2012.

Una vez conseguida la emulsión, se realiza una PCR convencional, con la particularidad de que en el tubo de reacción se realizan al mismo tiempo miles de reacciones en paralelo, es decir, en cada gota tiene lugar un proceso de amplificación independiente a partir de una sola molécula de ADN de cadena simple, generándose miles de copias que permanecerán unidas a la microesfera a través de los adaptadores. Después de los ciclos de reacción, se obtiene una amplificación clonal de cada fragmento unido a una ISP (Figura 14).



**Figura 14.** Detalle de los pasos de una PCR de emulsión. El dibujo reproduce lo que sucede en cada gota de la emulsión. Simultáneamente tienen lugar miles de reacciones de amplificación en paralelo cuyo resultado esperado es que en cada gota haya una amplificación clonal de un fragmento de ADN unido a una ISP (*Ion Sphere Particles* monoclonales).

Tras la PCR de emulsión se formarán 3 tipos de ISPs: las ISPs monoclonales que se encuentran asociadas a millones de copias de un solo fragmento de ADN, las ISPs policlonales asociadas a millones de copias de 2 o más fragmentos diferentes de ADN y las ISPs no clonales a las que no se ha unido ningún fragmento de ADN. Las ISPs de

interés para la posterior secuenciación son las monoclonales. Para favorecer la formación de ISP monoclonales se diluye la cantidad de ADN de 100 a 8 pM como paso previo a la emulsión (ver protocolo a continuación). El procedimiento a seguir para la amplificación clonal de la librería es el siguiente:

- Configuración del equipo *One Touch OT2™* según instrucciones del fabricante:
  - Abrir la tapa y dispensar 150 µL del reactivo *One Touch™ Breaking Solution* en cada uno de los 2 tubos de recuperación. Insertar los tubos de recuperación en cada ranura de la centrífuga y cerrar la tapa.
  - Instalar la placa de amplificación, los tubos desechables y el inyector siguiendo las instrucciones del fabricante.
  - Dispensar los reactivos *Ion One Touch™ Oil* y el *Ion One Touch™ Recovery Solution* siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Preparación de la solución de amplificación:
  - Agitar con *vortex* 30 segundos el *Ion PGM™ Hi-Q™ View Reagent Mix* y centrifugar 2 segundos. Mantener a temperatura ambiente.
  - Centrifugar 2 segundos el *Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzyme Mix*. Mantener en hielo.
  - Mantener la *Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs* a temperatura ambiente 30 minutos.
- Diluir la librería de 100 pM a 8 pM añadiendo a 2 µl de la librería 23 µl de agua Milli Q. Agitar con *vortex* 5 segundos, centrifugar 2 segundos y dejar en hielo.
- Preparar las microesferas *PGM™ Hi-Q™ View ISPs* agitando con *vortex* 1 min. Centrifugar 2 seg y mezclar con pipeta.
- Preparar la solución de amplificación añadiendo a un tubo con 800 µl de *Ion PGM™ Hi-Q™ View Reagent Mix* los siguientes reactivos en orden y mezclando con pipeta:
  - Agua MilliQ: 25 µl
  - *Ion PGM™ Hi-Q™ View enzyme*: 50 µl
  - Librería diluída a 8 pM: 25 µl
  - *PGM™ Hi-Q™ View ISPs*: 100 µl
- Agitar con *vortex* la solución de amplificación y centrifugar 5 segundos.

- Rellenar el *Ion One Touch™ Reaction Filter* con la solución de amplificación y el *Ion One Touch™ Reaction Oil*. Instalar el filtro y poner en marcha el aparato *Ion One Touch™ 2* siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Cuando termina la amplificación se recogen las ISPs:
  - Abrir la tapa y sacar ambos tubos de recuperación del aparato. Dejarlos cuidadosamente en una gradilla.
  - Eliminar todo el líquido salvo 100 µl de cada tubo sin mover el sedimento de ISPs.

En este punto la solución de recuperación puede ser almacenada a 2 - 5°C por 3 días añadiendo 500 µl de *Ion One Touch™ Wash Solution*.

- Procesar las ISPs
  - Añadir 500 µl de *Ion One Touch™ Wash Solution* a los 2 tubos de recuperación y mezclar con pipeta para dispersar las ISPs.
  - Combinar el contenido de los 2 tubos en un tubo *Eppendorf low retention* de 1.5 ml. Centrifugar 2.5 min a 15.000 xg.
  - Eliminar todo el líquido salvo 100 µl de la *Ion OneTouch™ Wash Solution* sin mover el sedimento.
- Cuantificar las ISPs clonales transfiriendo 2 µL a un tubo y utilizando el fluorímetro Qubit®2.0 (ver apartado H. cuantificación de las ISPs clonales). El porcentaje óptimo de ISPs clonales no enriquecidas tiene que estar entre un 10 y un 30%.

### G. Enriquecimiento de las ISPs clonales

Tras la PCR de emulsión, se eliminan aquellas ISPs a las que no se ha unido ningún fragmento de ADN y por tanto no ha habido clonación, enriqueciendo así la muestra en microesferas que contienen fragmentos de ADN clonado. El enriquecimiento se realiza con el equipo *Ion OneTouch™ ES* y se utilizan *Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads*, que son esferas magnéticas recubiertas de una capa de estreptavidina unida covalentemente a su superficie. Las *Dynabeads* forman el complejo estreptavidina-biotina con los *barcodes* de las ISPs monoclonales y policlonales (el extremo 3' de los *barcodes* está biotinilado). Este complejo es una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conocen y es capaz de unirse a un

imán del *Ion OneTouch<sup>TM</sup>ES* que permite el lavado de las ISP no clonales mediante detergente *Tween* y *Wash solution*. El procedimiento a seguir es el siguiente:

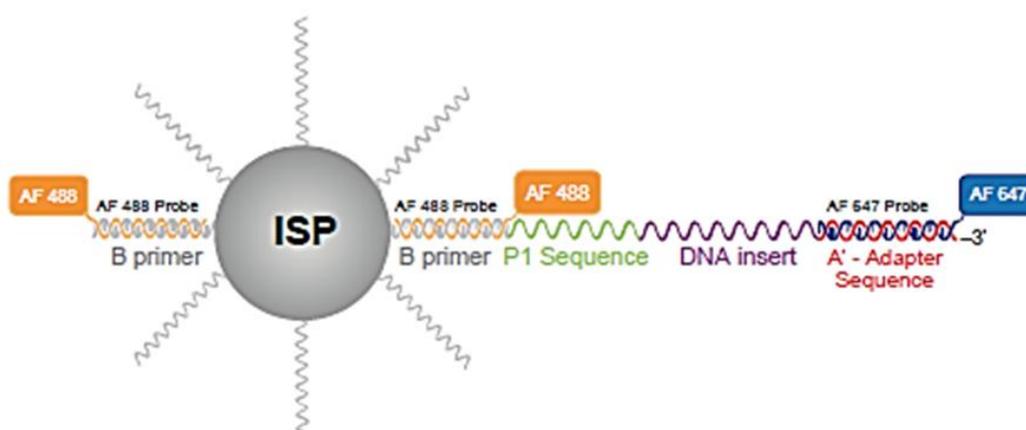
- Preparar la *Melt-Off Solution*:
  - *Tween*<sup>®</sup> Solution: 280 µl
  - NaOH 1M: 40 µl
- Resuspender las *Dynabeads<sup>TM</sup>MyOne<sup>TM</sup>Streptavidin C1 Beads*:
  - Agitar el tubo que contiene las *Dynabeads* con *Vortex* 30 seg y centrifugar 2 seg. Abrir el tubo y dispersar con la pipeta el pellet de partículas.
  - Transferir 13 µl de las *Dynabeads<sup>TM</sup>MyOne<sup>TM</sup>Streptavidin C1 Beads* a un nuevo tubo *Eppendorf LoBind<sup>TM</sup>* y colocarlo en la gradilla magnética *DynaMag<sup>TM</sup>-2* durante 2 min.
  - Eliminar el sobrenadante sin mover el *pellet*.
  - Añadir 130 µl de *MyOne<sup>TM</sup> Beads Wash Solution* a las microesferas. Sacar el tubo de la gradilla magnética, hacer *vortex* 30 seg y centrifugar 2 seg.
- Rellenar una tira de 8 tubos alineados con las siguientes soluciones:
  - Tubo 1. Muestra de las ISPs con fragmento amplificado: 100 µl
  - Tubo 2. *Dynabeads<sup>TM</sup> MyOne<sup>TM</sup> Streptavidin C1 Beads* resuspendidas en *MyOne<sup>TM</sup> Beads Wash Solution*: 130 µl
  - Tubos 3, 4 y 5. *Ion OneTouch<sup>TM</sup> Wash Solution*: 300 µl
  - Tubo 6. Vacío
  - Tubo 7. *Melt-Off Solution*: 300 µl
- Colocar la tira de 8 tubos en la ranura de la bandeja del *Ion OneTouch<sup>TM</sup>ES* y poner en marcha el aparato siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Cuantificar las ISPs clonales con el fluorímetro Qubit 2.0 (ver apartado H. cuantificación de las ISPs clonales). En este punto las ISPs clonadas enriquecidas pueden ser almacenadas a 2-8°C durante no más de 3 días.

#### H. Cuantificación de las ISPs clonales

Para la cuantificación de las ISPs clonales se utilizó el *Ion Sphere<sup>TM</sup> Quality Control kit* (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4468656) junto con el fluorímetro *Qubit<sup>®</sup> 2.0*

*Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. Q32866) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El método se basa en medir con un fluorímetro la fluorescencia de las *Ion Sphere™ Particles* (ISPs) marcadas con dos fluoróforos diferentes: Alexa Fluor™ 488 y Alexa Fluor™ 647.

- La sonda marcada con Alexa Fluor® 488 se une al primer B de las ISPs, es decir, a todas las ISPs presentes en la solución.
- La sonda marcada con Alexa Fluor® 647 se une al primer A de las ISPs, es decir, sólo se une a las ISPs con fragmento de ADN clonado (Figura 15).



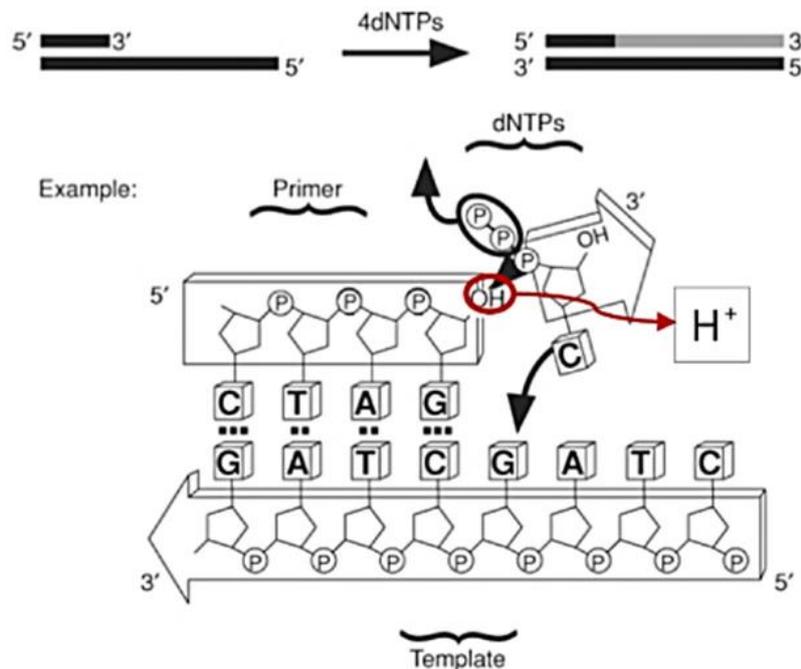
**Figura 15.** Fluoróforos Alexa Fluor® 488 y Alexa Fluor® 647 unidos a una *Ion Sphere particle* (ISP). Imagen de *Ion Sphere™ Quality Control Kit user guide*.

Con el Fluorómetro Qubit® 2. 0 se cuantifica la relación entre la fluorescencia del fluoróforo Alexa Fluor® 647 (ISPs clonales) y la del fluoróforo Alexa Fluor® 488 (todas las ISPs). Esta relación nos da el porcentaje de ISPs clonales

#### 3.2.4. Secuenciación: Ion Torrent Proton™

La estrategia de esta tecnología se basa en un método de semiconducción iónica. Las ISPs clonales se depositan en un chip de secuenciación. Este chip tiene millones de pocillos y en cada pocillo sucede una reacción de secuenciación. El chip contiene un sistema integrado de detección electroquímica de forma que, en la reacción de secuenciación, cada vez que la polimerasa incorpora un nuevo nucleótido a la cadena de ADN en síntesis, se libera un protón ( $H^+$ ) que modifica el pH de la solución. Esta variación de pH es detectada por un sensor de voltaje situado en cada micropocillo del

chip que unido a un sistema ISFET (*ion-sensitive field effect transistor*) genera una señal gráfica proporcional al número de nucleótidos añadidos (Figura 16).



**Figura 16.** Reacción de secuenciación según el método de semi-conducción iónica en el que se basa la plataforma *Ion Torrent Proton™*

Para discernir cuál de los nucleótidos se ha introducido, se repiten varios ciclos, cada uno de ellos con la adición de un único nucleótido. Este proceso se repite secuencialmente durante un número de ciclos establecido y se produce simultáneamente en todos los pocillos del chip. La señal observada para cada molécula de la librería es el consenso de las señales emitidas por cada uno de los clones del grupo de amplificación. El secuenciador tiene integrado un software que asigna una base nitrogenada a cada señal detectada durante la reacción de secuenciación. Este paso es conocido como *base calling* o asignación de bases.

Se ha seguido el protocolo establecido por el fabricante *Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing kit user guide for use with: Ion 318™ Chip v2, Ion 316™ Chip v2 y Ion 314™ Chip v2*.

### 3.2.5. Procesamiento bioinformático de los datos

La aplicación de la tecnología NGS a la clínica incluye la necesidad de que la bioinformática procese y ayude en la interpretación de la cantidad masiva de datos generados por los secuenciadores. Para el análisis bioinformático se utilizó el *software* comercial de *Ion Torrent* ya que garantiza un uso optimizado de los parámetros de configuración del análisis.

El procesamiento bioinformático de los datos o *workflow* comprende los siguientes pasos:

1. Control de calidad (*Base quality scoring*)
2. Alineamiento de las secuencias contra el genoma de referencia (*Alignment*)
3. Detección de variantes (*Variant calling*)
4. Anotación de variantes (*Annotation*)

Una vez terminado el proceso de secuenciación, el programa de gestión, *Torrent Suite™*, genera automáticamente un informe donde se detallan las estadísticas globales de la carrera junto con algunos datos específicos de cada muestra, tales como el porcentaje de bases con una exactitud en el *base calling* mayor del 99% (Q-score mayor de 20), el número de lecturas totales, la cobertura media de la secuenciación, la uniformidad de la cobertura en las regiones de interés y el *strand-bias* (sesgo que se produce cuando al secuenciar se encuentran más lecturas de una cadena de ADN que de la otra).

El programa *Torrent Suite™* extrae las lecturas de cada muestra por separado, recorta los adaptadores de cada una de ellas y excluye aquellas que tienen una baja calidad. Con el conjunto de lecturas con buena calidad, este programa usa el alineador TMAP (*Torrent Mapping Alignment Program*) para alinear las lecturas contra el genoma de referencia procedente de bases de datos actualizadas (NCBI *National Center for Biotechnology Information*). Este paso consiste en buscar, dentro del genoma de referencia, la posición que más encaja con cada una de las lecturas. Se usan distintos

algoritmos estadísticos para encontrar la posición más correcta, ya que, el genoma humano tiene muchas zonas repetitivas y, en algunos casos, una lectura puede encajar perfectamente en distintas regiones del genoma. Una vez que se han alineado las lecturas se deben ordenar por coordenada genómica. El alineamiento finaliza con la creación de un archivo BAM.

El archivo BAM se usa para ejecutar el *Torrent Variant Caller*. Este programa compara las lecturas alineadas con el genoma de referencia, buscando aquellas posiciones donde exista una discrepancia entre ambas secuencias. Si se encuentran suficientes lecturas con la misma diferencia, de forma que se pueda descartar un error de secuenciación o de alineamiento, esa diferencia se identifica como una variante. La variante se acompaña de una frecuencia alélica, VAF (*Variant Allele Frequency*), que se corresponde con el porcentaje en el que aparece la variante respecto de la cobertura total de esa base. El archivo de salida del proceso de detección de variantes (*variant calling*) es un archivo VCF. Este archivo contiene todas las diferencias entre las lecturas de la muestra y el genoma de referencia. Sin embargo, carece de la información sobre qué genes se encuentran en la región donde se han encontrado las variantes.

Toda la información de cada muestra, archivos BAM y VCF, es transferida al software *Ion Reporter™* para proceder a la anotación de variantes, es decir, poder conocer toda la información referente a la zona genómica donde se ha detectado una variante.

Generalmente se obtiene una elevada cantidad de variantes en cada muestra analizada, aunque el número suele variar dependiendo de la cantidad de regiones que se analicen dentro del panel. El *Ion Reporter* permite combinar toda la información sobre las variantes detectadas y guardarlo en un único archivo de texto separado por columnas, que se puede abrir fácilmente usando *Microsoft Excel* o *softwares* similares. La anotación es importante para el posterior filtrado de variantes. Tanto las variantes como los alineamientos, pueden ser visualizados con el programa IGV (*Integrative Genomic Viewers*).

### 3.2.6. Filtrado e interpretación de las variantes

El tipo de alteraciones que se pueden detectar son tanto variantes de un nucleótido único (SNVs, *single nucleotide variants*), como pequeñas inserciones o deleciones y variaciones en el número de copias (CNVs, *copy number variations*). Como se ha mencionado anteriormente, la lista de variantes que proporciona el análisis bioinformático es bastante extensa debido a la detección, no sólo de variantes potencialmente patogénicas, sino también de polimorfismos, variantes situadas en zonas intrónicas, errores de secuenciación, etc. Las variantes con baja calidad (Phred-Score  $\leq 20$ ) no fueron tenidas en consideración.

Para la categorización de las variantes se siguieron las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) para la clasificación y notificación de variantes (Richards *et al.*, 2015). Según la ACMG, teniendo en cuenta un conjunto de evidencias asociadas a características inherentes a cada variante, éstas se pueden clasificar en cinco categorías: patogénica, probablemente patogénica, significado incierto (VUS), probablemente benigna y benigna.

La primera evidencia que se tuvo en cuenta para evaluar la patogenicidad de las variantes fue la frecuencia poblacional de cada una de ellas. Los datos poblacionales se determinaron a partir de bases de datos genómicas públicas (1000 *Genomes Project*, GnomAD y dbSNP). Las variantes con un MAF  $> 0,01$  no se consideraron patogénicas ya que tenían una frecuencia superior a lo esperado para la prevalencia de diabetes monogénica en población general. La ausencia (o muy baja frecuencia) de la variante en bases de datos poblacionales se consideró una evidencia a favor de su patogenicidad.

Para valorar la posible patogenicidad de las variantes raras detectadas (MAF  $\leq 0,01$ ) se evaluaron otros criterios como el tipo de variante (por ejemplo si es *nonsense*, *frameshift* o si afecta al sitio de *Splicing*), los datos clínicos del portador y la posible segregación de la variante con los enfermos de la familia, si hay estudios funcionales y de relación genotipo-fenotipo en la literatura (*PubMed*) e información sobre la

variante en cuestión en las bases de datos de enfermedades (*Human Gene Mutation Database Professional*).

En el caso de las variantes que no se encontraron en las bases de datos consultadas o que tenían una prevalencia muy baja sin ninguna otra información disponible en la literatura, se evaluaron para predecir su posible patogenicidad utilizando *softwares* de predicción diferentes según el tipo de variante:

**Variantes *missense*:** Para predecir los posibles efectos patogénicos de las alteraciones que generan un cambio de aminoácido en una proteína, se utilizaron los siguientes softwares

- **SIFT**, *Sorting Intolerant From Tolerant* (<http://sift.jcvi.org/>) y **PANTHER**, *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships* (<http://www.pantherdb.org/>) son softwares que calculan el posible impacto de una variante teniendo en cuenta el nivel de conservación de la región a la que afecta. En base al grado de conservación, establecen si la alteración es tolerable o deletérea.
- **PolyPhen2**, *Polymorphism Phenotyping* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), **MutPred**, *Mutation Prediction* (<http://mutpred.mutdb.org/>) y **Mutation Taster** (<http://www.mutationtaster.org/>) son softwares que además de tener en cuenta si la región en la que se encuentra la alteración está evolutivamente conservada, predicen, por algoritmos que integran diferentes bases de datos como *Ensembl*, *UniProt*, *ClinVar*, *ExAC*, *1000 Genomes Project*, *phyloP*, *phastCons*, etc, el efecto que la sustitución de un aminoácido puede tener en la estructura y función de una proteína.
- **SNPs&GO** (<https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go.html>). Es un predictor integrado de GO (Gene Ontology) que utiliza un método clasificador SVM (Support Vector machine) que usa diferente información sobre el proceso biológico, la función molecular y el componente celular para predecir si una variación dada puede ser clasificada como relacionada con una enfermedad o neutra.
- **PROVEAN**, *Protein Variation Effect Analyzer* (<http://provean.jcvi.org/index.php>) es un software que predice a través de múltiples alineamientos con proteínas

homólogas, si la variación de la secuencia de la proteína (una sustitución de un aminoácido o un Indel) puede afectar a su función biológica.

- **VarSome**, (<https://varsome.com/>) es un recurso de análisis que muestra una información detallada de la variante consultada, incluyendo el estado de patogenicidad pronosticado a partir de una variedad de herramientas, el contexto genómico, así como información de más de 35 bases de datos públicas. Permite a los usuarios marcar la patogenicidad de las variantes y vincularlas a fenotipos, enfermedades y publicaciones específicas. Por último, proporciona una evaluación automatizada de la patogenicidad en consonancia con las directrices ampliamente aceptadas de la ACMG.

**Variantes en regiones promotoras:** Las células eucariotas traducen la información del ADN y sintetizan las proteínas mediante un proceso denominado transcripción. Los promotores son secuencias localizadas normalmente en el inicio del gen, que tienen un papel crucial en este proceso. En los promotores se localizan motivos funcionales, tales como la caja-TATA, caja-GC, caja-CAAT y el sitio de inicio de la transcripción, que funcionan como sitios de unión para diversos factores de transcripción y otras proteínas necesarias para el proceso. Para predecir si las variantes detectadas en estas regiones pudieran tener algún efecto sobre el nivel de transcripción, se utilizó el siguiente *software*

- **NNPromoter**, ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter)) *Neural Network Promoter Prediction*. Este programa proporciona un listado de lugares de unión potenciales de diferentes factores de transcripción y predice si la alteración podría alterar alguno de ellos.

**Variantes en zonas de *splicing*** (corte y empalme entre exones). El empalme alternativo (*alternative splicing*), es un proceso por el cual el ARN obtenido de la transcripción sufre una serie de modificaciones con el objetivo de producir distintas isoformas de una misma proteína. De forma general, las modificaciones son eliminaciones o retenciones de las secuencias codificantes del gen. Las isoformas generadas, pueden tener funciones diferentes, incluso opuestas. Este mecanismo tiene

lugar gracias a una compleja regulación donde intervienen múltiples proteínas, que realizan su función gracias a que reconocen secuencias específicas que marcan el lugar de corte y empalme.

Para predecir los posibles efectos funcionales resultantes de las variantes localizadas en estas regiones (*splice-site*) se utilizaron dos softwares principalmente:

- **NNSplice** (<http://www.fruitfly.org/seqtools/splice.html>). El software reconoce las regiones aceptoras y donadoras necesarias para el corte y empalme. Predice si las alteraciones podrían modificar alguno de ellos.
- **NeteGene2** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>). En base a la secuencia de nucleótidos, el programa predice los lugares de corte y empalme. Comparando los lugares potenciales de corte y empalme de la secuencia normal y de la secuencia alterada, podemos establecer si las regiones de corte y empalme sufren alguna modificación debido a la alteración.

Una variante fue considerada patogénica cuando diferentes estudios avalaron su patogenicidad, mientras que fue probablemente patogénica cuando estaba descrita de este modo en la literatura o cuando no estaba descrita pero los softwares de predicción sugerían que era un cambio patogénico. Las variantes de muy baja frecuencia en la población general se consideraron VUS si la información disponible sobre su posible patogenicidad era insuficiente o presentaba evidencias de patogenicidad contradictorias con los criterios evaluados.

Es importante tener en cuenta que la categorización de una variante en el momento del diagnóstico está basada en los registros de las bases de datos consultadas y en la literatura disponible en el momento de la realización del estudio. En revisiones posteriores, la identificación recurrente de una variante, variaciones en la frecuencia poblacional o nuevos datos sobre la funcionalidad de un gen pueden ser determinantes para su reclasificación. Los resultados de cada paciente deben ser evaluados por el laboratorio y el médico responsable dentro del contexto de la historia médica y familiar del paciente, y la identificación de una nueva variante genética no

debe ser asumida como relevante simplemente porque sea rara, o *de novo* (no heredada). Además, en la medida de lo posible, la toma de decisiones a partir de los resultados genéticos debe de complementarse con información clínica adicional.

### 3.2.7. Validación analítica del panel de genes

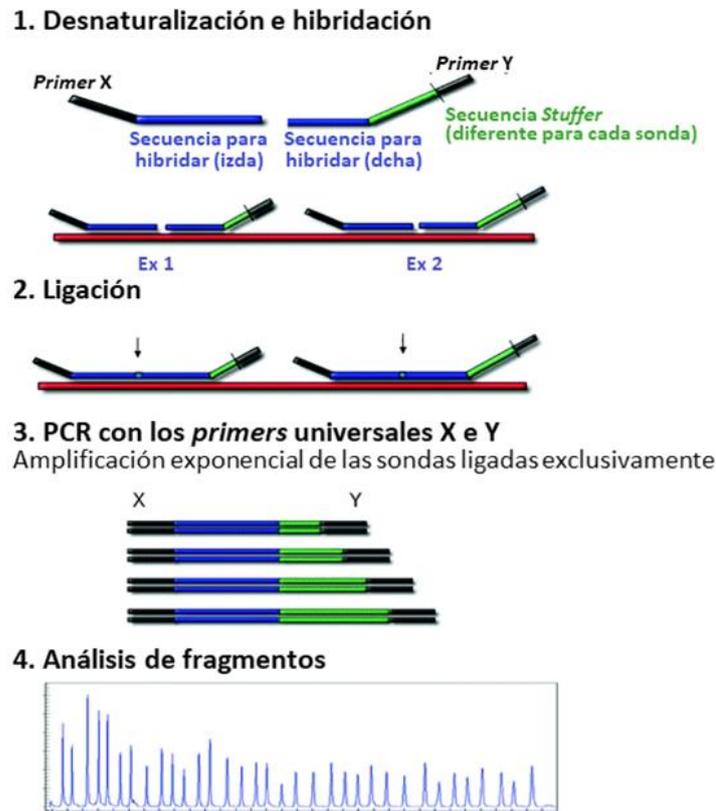
Una vez puesta a punto la metodología, antes de utilizar el panel de genes para el diagnóstico de diabetes monogénica es importante comprobar la exactitud con la que el panel de genes identifica variantes genéticas de interés. Este es el propósito de la validación analítica. Para ello, se seleccionaron muestras de pacientes diagnosticados previamente de diabetes monogénica por nuestro equipo mediante Sanger o MLPA y se estudiaron nuevamente mediante NGS. La evaluación analítica del panel se hizo en términos de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad entre ensayos. Se definió **sensibilidad analítica** como el porcentaje de variantes previamente detectadas por Sanger o MLPA que el panel fue capaz de detectar, **especificidad analítica** como el porcentaje de variantes detectadas por el panel (que cumplieran los criterios de calidad,  $p < 0.001$ ) y que fueron confirmadas por Sanger y por tanto eran variantes reales, y definimos **reproducibilidad analítica** como el porcentaje de variantes detectadas para un paciente en una librería y que se repitieron en otras dos librerías diferentes.

### 3.3. Estudio genético de diabetes monogénica mediante MLPA

La técnica de amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación o MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) permite identificar posibles deleciones o duplicaciones parciales o totales de determinados genes conocidas como CNVs (*Copy Number Variations*). Las CNVs, tanto en heterocigosis como en homocigosis, son una fuente de variación genética importante que juega un papel relevante en muchas enfermedades, incluida la diabetes monogénica.

A los 25 pacientes en los que no se detectó ninguna variante patogénica puntual o pequeñas inserciones o deleciones mediante NGS, se les realizó un estudio genético con la técnica MLPA para detectar posibles CNVs causantes de su diabetes.

En la figura 17 se muestra un resumen del fundamento de la técnica que se explica a continuación.



**Figura 17.** Esquema del procedimiento seguido para el análisis de deleciones o duplicaciones totales o parciales de genes (CNVs) mediante MLPA

El procedimiento de la tecnología MLPA consiste en añadir al ADN previamente desnaturalizado una mezcla de sondas MLPA que hibridarán en los exones de los genes de interés. Las sondas MLPA son parejas de oligonucleótidos que deben hibridar a secuencias del ADN adyacentes, de modo que en un paso posterior puedan ser convertidas en una única sonda mediante una reacción de ligación. Todas las sondas ligadas son amplificadas por PCR usando la misma pareja de *primers*. Uno de los *primers* tiene un marcaje fluorescente que permite visualizar los productos amplificados que son separados posteriormente mediante una electroforesis capilar. Comparando el patrón (área y tamaño) de los picos obtenidos para las muestras analizadas frente al patrón de los picos de los controles de referencia que se incluyen en cada muestra a estudiar, se puede determinar la posible variación en el número de

copias en el ADN del paciente. Para este estudio se ha utilizado el kit comercial SALSA MLPA MODY P241 que contiene 53 sondas para los genes *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* y *HNF1B* que origina productos de amplificación de tamaños entre 136 y 495 nucleótidos.

**Reactivos y equipos necesarios:**

- **SALSA MLPA *Probemix* P241 MODY** (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Incluye: SALSA *probemix* (oligonucleótidos sintéticos purificados de bacterias, Tris-HCl y EDTA. pH 8,0). SALSA Tampón MLPA (KCl, Tris-HCl, EDTA y PEG-6000. pH 8,5). Tampón A ligasa-65 (NAD de origen bacteriano. pH 3,5). Tampón B ligasa-65(Tris-HCl, detergente no iónico, MgCl<sub>2</sub>. pH 8,5). Enzima ligasa-65 de origen bacteriano [glicerol, BRIJ (0,05%), EDTA, Beta-Mercaptoetanol (0,1%), KCl, Tris-HCl. pH 7,5]. Tampón SALSA-PCR 10X. SALSA PCR *primer mix* [oligonucleótidos sintéticos, uno de ellos marcado fluorescentemente (FAM), dNTP, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ (0,04%). pH 8]. Enzima SALSA polimerasa [glicerol, BRIJ (0,5%), EDTA, DTT (0,1%), KCl, Tris-HCl. pH 7,5]. Agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O).
- **Termociclador *GeneAmp*<sup>®</sup>PCR System 9700** (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).
- **Equipo de electroforesis capilar ABI 3130xl *Genetic Analyzer*** (Thermo Fisher Scientific)
- **Marcador de talla GeneScan<sup>™</sup> 500 ROX<sup>™</sup>** Cat. No. 401734 (Thermo Fisher Scientific)
- **Hi-Di<sup>™</sup> *Formamide*** Cat. No. 4311320 (Thermo Fisher Scientific).
- **Software de análisis Gene-Mapper<sup>®</sup>**, v.4.0 (Thermo Fisher Scientific).

**Protocolo detallado:**

En cada ensayo se incluyen, además de las muestras de los pacientes, al menos tres controles normales (muestras de referencia distribuidas aleatoriamente), un control positivo con una deleción conocida y una muestra sin ADN.

- **Desnaturalización.** Incubar 5 µl de cada muestra de ADN (100ng) en el termociclador a 98°C durante 10 min. Mantener a 25°C.
- Preparar la **reacción de hibridación:** por cada muestra mezclar 1,5 µl de SALSA *probemix* y 1,5 µl de SALSA tampón MLPA. Agitar con *vortex*. Añadir 3 µl del *mix* a cada muestra y mezclar con pipeta. Incubar en el termociclador 1 min a 95°C, seguido de una hibridación de 16 a 20 horas a 60°C.
- Preparar la **reacción de ligación:** por cada muestra mezclar 3 µl de tampón A ligasa-65, 3 µl de tampón B ligasa-65 y 25 µl de agua MilliQ. Agitar con *vortex*. Añadir a la mezcla 1 µl de enzima ligasa-65 y mezclar de nuevo con pipeta. Bajar la temperatura del termociclador a 54 °C, añadir 32 µl del *mix* e incubar durante 15 min. Después de la reacción de ligación aumentar la temperatura a 98°C durante 5 min para desactivar la ligasa.
- Preparar la **reacción de PCR:** por cada muestra mezclar 2 µl de SALSA PCR *primer mix*, 0,5 µl de SALSA polimerasa y 7,5 µl de MilliQ. Mezclar con pipeta. Añadir 10 µl del *mix* a cada muestra de ligación e incubar en las siguientes condiciones:

	Temperatura	Tiempo
35 ciclos	95 °C	30 seg
	60 °C	30 seg
	72 °C	60 seg
	72 °C	20 min
	15 °C	∞

Se puede almacenar el producto amplificado una semana a 4°C. Para más tiempo de almacenamiento congelar a -20°C.

Una vez obtenido el producto amplificado se procede a la separación de fragmentos por electroforesis capilar. El procedimiento se detalla a continuación:

- Preparar un *mix* con 10 µl de formamida (desnaturalizante que evita enrollamientos de la hebra de ADN) y 0,5 µl del marcador de talla *GeneScan™ 500 ROX™*. Añadir 10 µl del *mix* a 2 µl de cada muestra de sondas amplificadas. Agitar con *vortex*.

- Desnaturalizar las muestras en termociclador a 95°C durante 5 min. Así se evita que, en caso de que las muestras contengan una cantidad elevada de guaninas y citosinas, permanezcan en doble hebra alterando su movilidad.
- Enfriar las muestras rápidamente en hielo durante 5 min para estabilizar las moléculas e introducir la placa con las muestras en el secuenciador.

Una vez finalizada la separación de los fragmentos se procede al análisis del número de copias con el software GeneMapper® v.4.0. El proceso comprende los siguientes pasos:

- Valoración de la calidad del experimento MLPA. Para ello se inspeccionan los patrones de picos en los electroferogramas teniendo en cuenta los siguientes controles internos de calidad que incluye cada muestra:
  - Un fragmento control (sonda dependiente de ligación de un tamaño de 92 nucleótidos). Su aparición nos muestra que la ligación ha funcionado correctamente.
  - Cuatro fragmentos Q (tamaños 64, 70, 76 y 82 nucleótidos). Controles que nos indican si la cantidad de ADN es la correcta para el experimento. Si la señal de los picos de estos controles es superior a un tercio de la señal del pico control de 92 nucleótidos nos indica que la muestra no tenía suficiente cantidad de ADN. En el control sin ADN solo debe aparecer la señal de los controles de calidad internos Q.
  - Dos fragmentos D (tamaños 88 y 96 nucleótidos). Controles que nos indican problemas en la desnaturalización de las muestras. Si la señal de los picos de estos controles es inferior a un 40% de la señal del pico control de 92 nucleótidos nos indica que las muestras no se han desnaturalizado correctamente.
  - Fragmentos en los cromosomas X (100 nucleótidos) e Y (105 nucleótidos). Controles que ayudan a evitar un posible intercambio de muestras.
- Normalización de los resultados. Las intensidades de fluorescencia detectadas por la electroforesis capilar dependen de muchos factores (degradación del colorante fluorescente, la variabilidad entre los capilares, la exactitud del pipeteo, etc.). Por

lo tanto, los datos generados necesitan ser normalizados para obtener unos resultados de confianza. La normalización requiere dos pasos:

- Intra-normalización. Comparación dentro de cada muestra de la intensidad de fluorescencia de cada pico con los picos de las sondas de referencia incluidas en la muestra. Para ello se divide el área o la altura del pico de cada producto de amplificación entre el área o altura total de tan sólo las sondas de referencia de esa muestra.
- Inter-normalización. Comparación de la intensidad de fluorescencia de cada pico con los picos de las sondas de referencia incluidas en toda la carrera. Para ello se divide el *ratio* intra-normalizado en la muestra problema entre la media del *ratio* intra-normalizado de todas las muestras de referencia.

En este tipo de normalización se da por supuesto que no se producen cambios en las regiones genómicas específicas para las sondas de referencia. Una dosis génica entre 0,8 y 1,15 indica normalidad; entre 1,35 y 1,55 una duplicación en heterozigosis; entre 1,70 y 2,20 una duplicación en homozigosis; entre 0,35 y 0,65 una delección en heterozigosis; y finalmente, una dosis génica de 0 indica la presencia de una delección en homozigosis.

### **3.4. Estudio genético del perfil HLA-DRB1**

La caracterización molecular del HLA-DRB1 se llevó a cabo con la metodología molecular PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide*), combinada con la tecnología *Luminex*<sup>®</sup>. En concreto, se realizó una caracterización de alta resolución del *locus* HLA-DRB1 con el kit comercial LABType-HD-HLA-DRB1 Cat. No. RSSOH2B1 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) para lo que se contrataron los servicios de Rafer, S.L.

La base de la metodología PCR-SSO es la amplificación específica de ADN por PCR, con la subsiguiente hibridación del producto amplificado con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSO). Para la amplificación se usan *primers* marcados con biotina y específicos para el *locus* HLA-DRB1. El producto de PCR biotinilado se

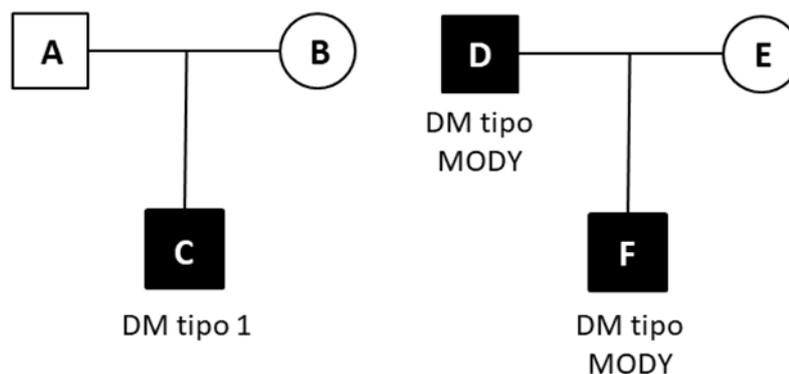
desnaturaliza y se incuba posteriormente con sondas de ADN unidas a microesferas cifradas de forma fluorescente. Estas sondas, que son específicas para cada alelo HLA-DRB1, sólo hibridarán con el ADN amplificado que reconozca el alelo del individuo a tipar. A continuación, se añade un conjugado estreptavidina-ficoeritina (SAPE). Un analizador de flujo, LABScan™ 100, identifica la fluorescencia intrínseca de las microesferas y la luz emitida por los fluorocromos unidos a los productos de PCR que han hibridado con las sondas. Para la asignación de la tipificación de HLA-DRB1 se utiliza el software de interpretación HLA Fusion™ que basa la asignación del alelo en el patrón de reacción comparado con patrones asociados a secuencias de genes HLA publicadas.

#### **3.4.1. Análisis de los resultados: Estudios de asociación**

Los estudios de asociación genética buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado. Así, para demostrar la asociación de un marcador concreto con una enfermedad, se requiere la comparación de las frecuencias del marcador entre una población enferma (casos) y otra sana (controles). Si la población de pacientes enfermos tiene una frecuencia mayor del marcador de interés respecto a la población control sana, y esa diferencia es estadísticamente significativa, se habla de asociación. La asociación entre el marcador y la patología se interpreta como una evidencia a favor de la implicación del marcador en la susceptibilidad de padecer la enfermedad estudiada.

Los estudios de asociación se pueden plantear entre individuos sin tener en cuenta la historia familiar de la enfermedad (estudios caso-control), o también se pueden plantear en familias. Los análisis de asociación realizados en familias nucleares tienen la ventaja de permitir definir y comparar una población enferma con una sana evitando posibles asociaciones debidas a estratificaciones genéticas por orígenes étnicos diferentes en los casos y los controles. Aprovechando esta ventaja, para hacer los estudios de asociación del HLA-DRB1 y la diabetes, se han incluido familias formadas por ambos progenitores y un hijo/a, bien con un reciente diagnóstico de diabetes tipo 1, confirmado por un análisis de cuatro autoanticuerpos (IAA, GADA,

IA2A y ZnT8A), o bien con un diagnóstico de diabetes tipo MODY, confirmado con un estudio genético. A continuación, en la figura 18 se muestran dos árboles genealógicos que representan los dos tipos de familias incluidas en los estudios de asociación.

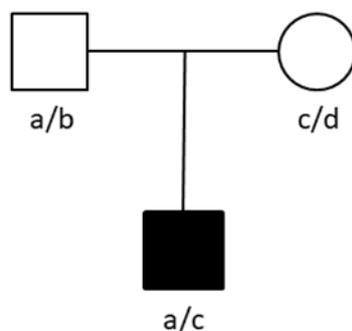


**Figura 18.** Tipo de familias que se han incluido en los estudios de asociación. Círculo mujer. Cuadrado varón. Símbolo negro persona con diabetes tipo 1 (C) o con diabetes tipo MODY (D, F).

Para determinar los alelos HLA-DRB1 implicados en la susceptibilidad de padecer diabetes tipo 1 en nuestra cohorte, se realizó un estudio familiar de asociación tipo AFBAC (*Affected Family Based Controls*) con familias formadas por los progenitores y al menos un descendiente con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico.

En cada una de las familias, de los cuatro alelos HLA-DRB1 parentales (dos del padre y dos de la madre), los que no se transmitieron al hijo con diabetes tipo 1 se clasificaron como “alelos no diabéticos” o “población de alelos control” y los que fueron transmitidos al paciente se clasificaron como “alelos diabéticos” o “población de alelos enferma”. En la figura 19 se ilustra un ejemplo de un árbol familiar con los alelos asignados a cada uno de sus miembros. Los alelos del padre se identifican con las letras “a” y “b” y los de la madre con las letras “c” y “d”. El hijo, que tiene diabetes tipo 1, ha heredado el alelo “a” del padre y el alelo “c” de la madre. Por tanto, en esta familia, los dos alelos transmitidos al hijo, que tiene diabetes, formarían el grupo de alelos diabéticos “a” y “c”, y los dos alelos que no se han transmitido al hijo y los

portan los progenitores que no tienen diabetes, formarían el grupo de alelos no diabéticos “b” y “d”.



**Figura 19.** Distribución alélica en una familia con un hijo con diabetes tipo 1. Los alelos del padre son a y b y los de la madre son c y d. El paciente ha heredado el alelo “a” del padre y el “c” de la madre. La distribución AFBAC en esta familia sería: Alelos diabéticos “a, c”; Alelos no diabéticos “b, d”. Círculo mujer. Cuadrado varón. Símbolo negro persona con diabetes tipo 1.

En el ejemplo de la figura 19 sólo hay un individuo con diabetes, por lo que los alelos de riesgo son dos. También podría darse el caso de que un progenitor tenga la patología (por ejemplo, la madre c/d), en este caso el alelo “d” sería considerado también alelo de riesgo. De este modo, el número mínimo de alelos diabéticos en cada familia es dos (los dos del caso índice) y el máximo es cuatro. Ambas poblaciones de alelos pueden ser comparadas empleando los mismos métodos estadísticos que en el caso de estudios poblacionales caso-control.

Para comparar la distribución de los genotipos HLA-DRB1 entre los pacientes con diabetes tipo MODY y los pacientes con diabetes tipo 1 se realizó un estudio de asociación tipo caso-control que incluyó exclusivamente a los descendientes de las familias, es decir, individuos con diabetes no relacionados representados por las letras “C” y “F” en la figura 18.

Para comparar la distribución de los genotipos HLA-DRB1 entre los pacientes con diabetes tipo MODY y los pacientes sanos, se realizó nuevamente un estudio caso-control. En este caso, se incluyeron únicamente las familias con un descendiente con

diabetes tipo MODY, y se compararon las frecuencias de los genotipos HLA-DRB1 de los progenitores (Figura 18). Los portadores de la mutación (*GCK*-MODY o *HNF1A*-MODY) constituyeron la población de enfermos (individuos “D”) y los progenitores sanos que no portaban la mutación formaron la población de controles sanos (individuos “E”).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SPSS (v. 21; SPSS Inc., Chicago, IL). Las variables cuantitativas no-paramétricas se expresaron como medianas y rango intercuartil (RIQ:  $P_{25} - P_{75}$ ) y las cualitativas como frecuencias y porcentajes. Las frecuencias se compararon utilizando la prueba Chi cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para comparar las variables cuantitativas. El nivel de significación se definió como  $p < 0,05$ . Como medida de asociación se utilizó la *Odds Ratio* (OR) que permite relacionar cuánto más probable es que se produzca una exposición determinada entre las personas enfermas (casos) que entre las sanas (controles).

## **V. RESULTADOS**



En los siguientes apartados se presentan los resultados obtenidos en los diferentes aspectos abordados en el transcurso de este trabajo de investigación. En primer lugar, se muestran las características clínicas y bioquímicas de la cohorte estudiada compuesta por 400 pacientes pediátricos con sospecha clínica de diabetes tipo 1 al debut. En segundo lugar, se presentan los resultados de la puesta a punto de la metodología del análisis del autoanticuerpo ZnT8A, junto con su aportación como marcador serológico en el diagnóstico de la diabetes tipo 1 dentro del contexto de la autoinmunidad humoral que caracteriza esta patología. En tercer lugar, se exponen los resultados de la validación técnica y analítica del panel de genes, así como el resultado del estudio genético llevado a cabo en los pacientes que no presentaron autoinmunidad para los autoanticuerpos clásicos analizados (IAA, GADA e IA2A) y en los que sólo presentaron autoinmunidad para el ZnT8A. Por último, se presentan los resultados de la caracterización molecular del *locus* HLA-DRB1 en nuestra población y su posible utilización como biomarcador para seleccionar los pacientes pediátricos con clínica de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa a los que hacer un estudio genético para descartar una posible diabetes monogénica. Para finalizar, en un diagrama de flujo, se resumen los resultados más relevantes obtenidos en este trabajo.

### **1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA POBLACIÓN**

La cohorte de pacientes incluida en el análisis de la autoinmunidad al debut de la diabetes y en el estudio genético para descartar diabetes monogénica en los pacientes que presentaron autoinmunidad negativa para IAA, GADA e IA2A (primera y segunda fase del estudio), consistió en 400 pacientes pediátricos con sospecha clínica de diabetes tipo 1 según criterio de la ISPAD 2018 (Mayer-Davis *et al.*, 2018). A todos ellos se les hizo una tipificación molecular de alta resolución del *locus* HLA-DRB1 mediante PCR-SSO y se les analizó los autoanticuerpos IAA, GADA, IA2A y ZnT8A en el suero recogido en el momento del diagnóstico. Se consideró autoinmunidad positiva tener al menos uno de los autoanticuerpos analizados positivo.

Los datos clínicos recogidos de todos los pacientes al debut incluyeron: la edad al diagnóstico, la presencia de cetoacidosis diabética al diagnóstico según los criterios de

la ISPAD (Wolfsdorf *et al.*, 2018) y los antecedentes familiares de diabetes. Los datos se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Características de la población incluida en la primera y segunda fase del estudio.

	Autoinmunidad positiva al debut (n=377)	Autoinmunidad negativa al debut (n=23)	valor- <i>p</i>	OR (IC 95%)
Género (% femenino)	48,0	34,8	ns <sup>a</sup>	-
Edad al debut (años)	9,5 (6,1-12,1)	9,3 (7,0-13,8)	ns <sup>c</sup>	-
Fam. 1 <sup>er</sup> grado con DM (%)	17,2	13,0	ns <sup>b</sup>	-
Presencia de CAD (%)	40,8	18,2	0,035 <sup>a</sup>	3,11 (1,03-9,36)
0 alelos riesgo HLA-DRB1 (%)	8,0	8,7	ns <sup>b</sup>	-
1 alelo riesgo HLA-DRB1 (%)	42,4	43,5	ns <sup>a</sup>	-
2 alelos riesgo HLA-DRB1 (%)	49,6	47,8	ns <sup>a</sup>	-

Edad al debut expresada como mediana (rango intercuartil). Familiares de 1<sup>er</sup> grado: padres y/o hermanos. CAD: Cetoacidosis diabética. 0 alelos de riesgo (ni DR3, ni DR4); 1 alelo de riesgo (DR3 o DR4); 2 alelos de riesgo (DR3/3, DR4/4 o DR3/4). El alelo\*0403 se excluyó del grupo de alelos de riesgo. <sup>a</sup>Prueba chi-cuadrado de Pearson <sup>b</sup>Prueba exacta de Fisher <sup>c</sup>Prueba U de Mann-Whitney. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

En los 23 casos en los que no se detectó autoinmunidad para ninguno de los cuatro autoanticuerpos analizados (IAA, GADA, IA2A y ZnT8A), se recogieron datos clínicos más detallados registrados en el momento del diagnóstico y en el último reconocimiento médico. Éstos incluyeron: los antecedentes familiares de diabetes, la edad al diagnóstico, el índice de masa corporal (IMC) expresado como *Z-score* para niños según la tabla de crecimiento española de 2010 (Sánchez González *et al.*, 2011), la duración de los síntomas de diabetes, la presencia o no de cetoacidosis diabética en el momento del diagnóstico, datos analíticos, dosis de insulina y si el paciente, además de la diabetes, padecía alguna otra enfermedad autoinmune. Los datos clínicos junto con los resultados de la caracterización molecular del locus HLA-DRB1 se presentan, a continuación, en la tabla 7.

**Tabla 7.** Datos clínicos de los pacientes con autoinmunidad negativa.

ID	Antecedentes		Características clínicas al diagnóstico								Características clínicas en la última consulta					HLA-DRB1	
	Sexo	Familiares de 1 <sup>er</sup> grado con DM	Edad al debut (años)	IMC z-score	Duración de síntomas (días)	CAD	Glucosa (mg/dL)	HbA1C (%)	Péptido-C (ng/mL)	Dosis insulina (U/Kg/d)	Tiempo evolución (años)	IMC z-score	HbA1C (%)	Dosis insulina (UI/Kg/d)	Otras enfermedades autoinmunes	Alelo1/Alelo2	
1	F	0	9.3	-1.29	30	No	683	>15	<0.05	0.85	5.6	0.14	7.7	0.53	No	0301 / 0301	
2	M	0	14.7	2.72	20	No	249	13	1.7	0.75	4.2	2.29	6.5	0.32	Tiroiditis	0102 / 1101	
3	F	Madre	14.3	0.41	90	No	280	12.5	2.13	0.8	1.4	1.69	9	1.7	No	0404 / 0802	
4	M	0	7	-0.74	14	Yes	422	11.7	0.29	0.9	5.0	-0.44	8.7	0.8	No	0403 / 1102	
5	M	0	13.3	1.59	15	No	357	11.1	0.48	0.85	2.1	0.63	6.4	0.8	No	0301 / 1601	
6	M	0	16	-0.12	30	No	519	11	0.3	0.65	2.7	-0.18	6.5	0.17	No	0301 / 0301	
7	M	0	8.1	-2.02	21	Yes	756	13.1	S/D	1	2.2	-1.29	6	0.46	No	0301 / 1601	
8	M	0	15.9	3.18	60	No	300	12.7	1.01	0.9	4.8	S/D	7.5	S/D	S/D	0404 / 0901	
9	F	0	9.3	0.64	15	No	395	11.5	1.23	0.81	4.7	0.35	7.5	0.82	No	0301 / 0405	
10	F	0	10.8	0.37	6	No	216	13	0.99	0.68	2.9	0.51	6.7	0.5	No	0301 / 0403	
11	M	S/D	5.7	-0.41	5	No	159	8.7	1.13	0.33	2.9	-0.63	8.1	0.41	No	0405 / 1401	
12	M	0	7.3	-0.39	3	No	232	5.9	1.84	0.4	2.9	-0.05	7.6	1	No	0301 / 0701	
13	M	0	8	-1.25	7	No	454	13	0.31	1.02	2.7	-0.63	6.9	0.77	No	0301 / 0801	
14	F	0	13.8	-0.41	180	Yes	>500	17.5	S/D	1.27	2.3	-0.42	11	0.49	No	0101 / 0401	
15	M	0	7.4	-0.37	7	No	325	10.8	0.86	0.97	2.3	-0.20	8.2	0.84	No	0401 / 0701	
16	M	0	9.9	-0.46	60	No	251	11	0.38	0.90	2.8	-0.63	6.7	0.79	Tiroiditis	03 / 04	
17	F	0	8.5	-0.70	30	No	934	17.2	S/D	1.23	1.7	0.17	7.6	0.87	No	0301 / 0405	
18	M	Madre	12	0.35	7	No	203	8.9	1.54	0.62	0.8	0.02	6.4	0	No	0301 / 0402	
19	M	0	14.4	0.51	30	No	334	10.5	1.72	0.69	0.4	0.46	5.8	0.17	No	0301 / 0301	
20	M	Madre	0.8	-1.16	7	Yes	330	8.8	0.12	0.76	0.7	-0.10	8.1	0.61	Celiaquía	0301 / 0404	
21	F	0	2.2	-0.47	21	Yes	445	11.8	0.15	1.2	0.3	2.74	7.1	0.74	No	0301 / 0401	
22	M	0	5.6	1.14	7	No	371	11	0.23	0.72	0.8	0.14	7.1	0.6	No	0301 / 0401	
23	F	0	6.3	-0.68	60	No	723	13.6	0.45	1.2	0.9	0.23	8.4	0.56	No	0301 / 0404	

F:femenino; M:masculino. Familiares de 1<sup>er</sup> grado: padres y/o hermanos. IMC z.score: índice de masa corporal expresado como Z-score para niños según tabla crecimiento española 2010. CAD: Cetoacidosis diabética. Síntomas de diabetes: al menos 2 de los síntomas clásicos asociados con el debut de DM (polidipsia, polifagia, poliuria, pérdida de peso, visión borrosa). Valores normales para glucosa (67-110 mg/dL); Péptido-C (0,8-4,2 ng/mL); HbA1C (4,8-6,2%). S/D: sin dato.

## 2. ESTUDIO DE LA AUTOINMUNIDAD AL DEBUT DE LA ENFERMEDAD

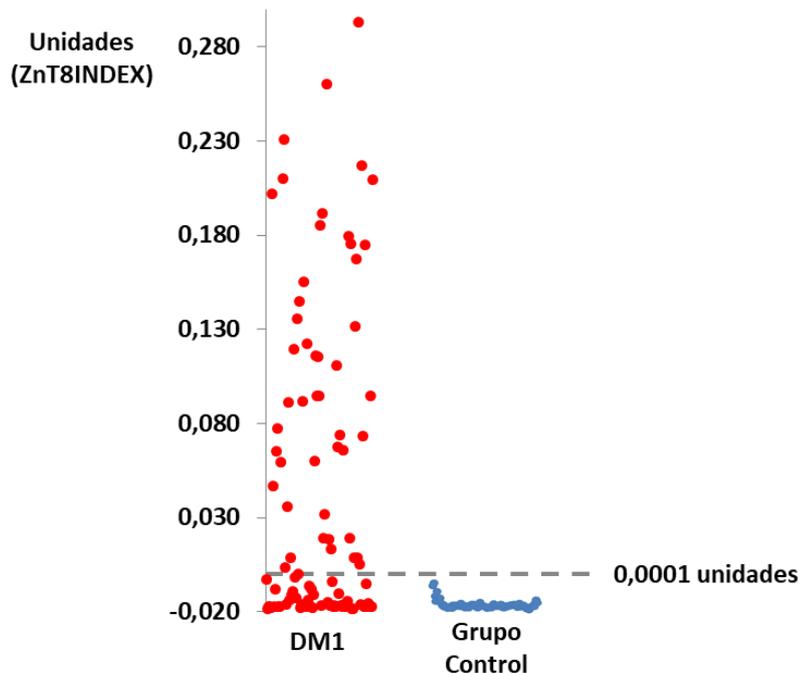
El estudio de la autoinmunidad en el momento del diagnóstico (primera fase del estudio) se comenzó con la puesta a punto del ensayo para la detección de autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A) según la metodología descrita previamente (pág. 87-96). A continuación, se analizó la presencia de autoanticuerpos al debut (IAA, GADA, IA2A, y ZnT8A) en el suero de los 400 pacientes pediátricos con sospecha clínica de diabetes tipo 1. Además, se examinó la posible influencia del sexo y de la edad al diagnóstico de los pacientes en la presencia de diferentes autoanticuerpos al debut, así como la combinación de ensayos de detección de autoanticuerpos más efectiva para el despistaje de diabetes tipo 1 en pediatría.

### 2.1. Puesta a punto del ensayo para la detección de ZnT8A

Para establecer el límite de positividad de la técnica, se determinó la presencia de ZnT8A mediante el radioinmunoensayo descrito en métodos en las muestras de suero de 100 controles sanos, mediana de edad 10,4 años (RIQ: 8,0 – 12,3) y 100 pacientes con diabetes tipo 1 en el momento del debut, mediana de edad 9,3 años (RIQ: 5,3 – 12,7). Se calculó el nivel de ZnT8A en cada una de las muestras en unidades ZnT8INDEX de acuerdo con la ecuación descrita en métodos (pág. 96). El límite inferior de positividad se situó en 0,0001 unidades (media  $\pm$  3SD del valor ZnT8INDEX en las 100 muestras del grupo control) sin que se detectara ninguna muestra de la población general con niveles ZnT8INDEX por encima de dicho límite (Figura 20). La proporción de positivos en el grupo de pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 fue del 51%.

En lo referente a la consistencia del ensayo en términos de repetitividad de los resultados, se comprobó la variabilidad encontrada en cuatro medidas independientes de tres muestras con distinto nivel de positividad (media  $\pm$  SD unidades ZnT8INDEX): alto ( $0,378 \pm 0,017$  unidades), medio ( $0,287 \pm 0,016$  unidades) y bajo ( $0,072 \pm 0,006$  unidades). El coeficiente de variación, calculado como el cociente entre la desviación estándar y la media de las cuatro mediciones, fue de 4,4% para el suero con positividad alta, 5,5% para el de positividad media y 8,6% para el débilmente positivo.

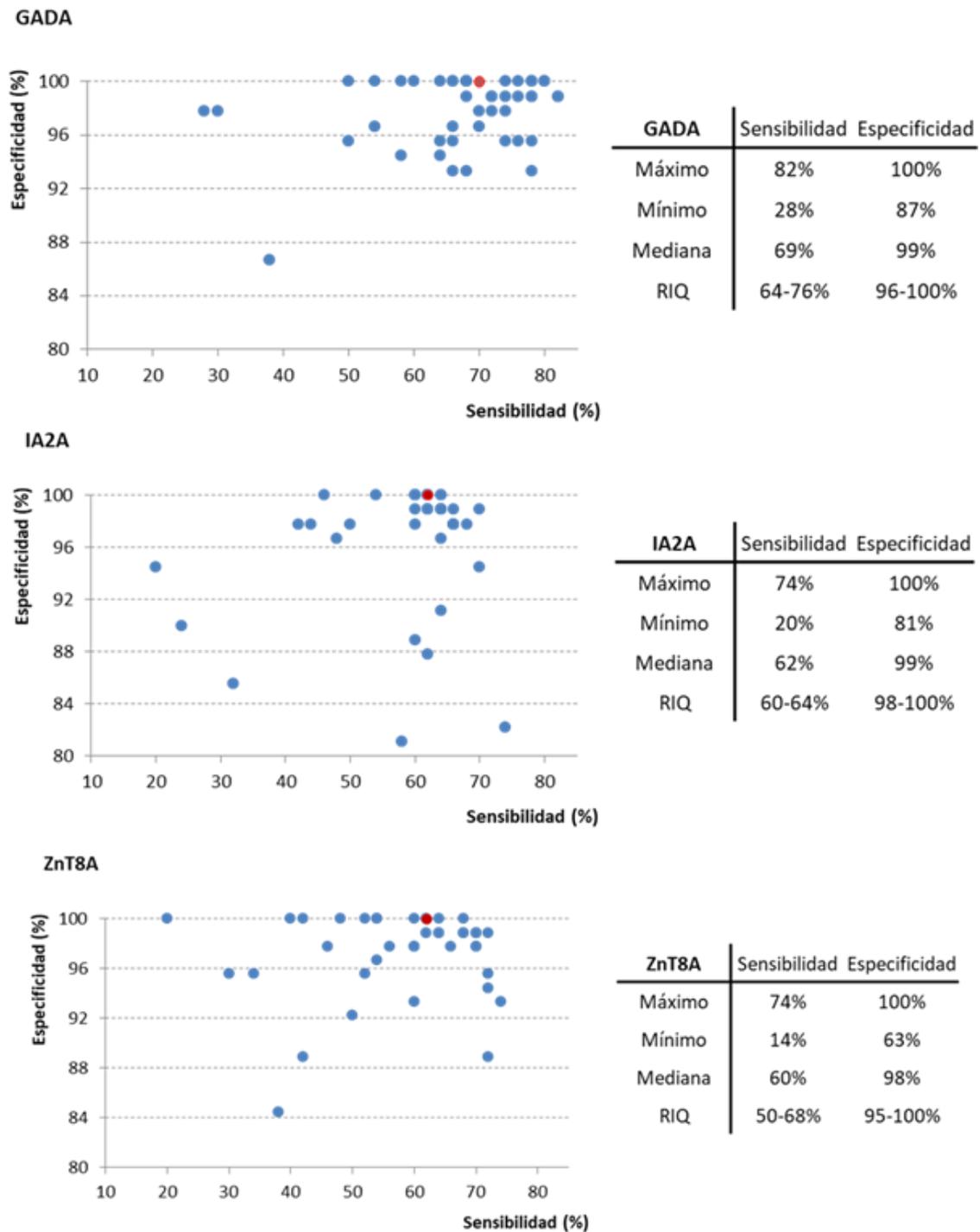
Así, con un valor orientativo de sensibilidad de la técnica en torno al 50%, con una especificidad del 100% y un coeficiente de variación menor de 9% se incluyó el ensayo ZnT8A para el diagnóstico de diabetes tipo 1 en nuestra cohorte de 400 pacientes en edad pediátrica.



**Figura 20.** Resultados del radioinmunoensayo en el análisis de suero de 100 controles sanos y 100 pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 (DM1) en el momento del debut de la enfermedad. El límite de positividad para los ZnT8A se estableció en 0,0001 unidades ZnT8INDEX

## 2.2. Estandarización de los ensayos de autoanticuerpos. IASP 2018

Para la estandarización de los ensayos de determinación de autoanticuerpos asociados a la diabetes autoinmune, el laboratorio participa en programas internacionales bianuales de estandarización de ensayos para la determinación de autoanticuerpos contra los islotes pancreáticos desde 1995 con buenos resultados de sensibilidad y especificidad. Como muestra representativa, se presentan a continuación los resultados obtenidos en el programa de estandarización IASP 2018 para los autoanticuerpos GADA, IA2A y ZnT8A.



**Figura 21.** Representación de la sensibilidad y especificidad de todos los ensayos evaluados en el IASP 2018. Participaron 37 laboratorios y se evaluaron 48 ensayos de GADA, 47 ensayos de IA2A y 42 ensayos de ZnT8A. El punto rojo representa el valor de sensibilidad y especificidad de nuestros ensayos. RIQ: rango intercuartil.

En la figura 21 se representa los resultados de sensibilidad y especificidad de todos los ensayos evaluados en el *workshop* de 2018 para cada uno de los autoanticuerpos por separado. A la derecha de cada gráfica se recoge en una tabla los valores máximo y mínimo, y la mediana y el rango intercuartil de los valores de sensibilidad y especificidad para cada autoanticuerpo. Los tres ensayos RIA desarrollados en nuestro laboratorio obtuvieron una especificidad del 100% (porcentaje de negativos entre controles sanos) y una sensibilidad del 68% para GADA y del 62% para IA2A y ZnT8A (porcentaje de positivos entre los pacientes con diabetes tipo 1).

El ensayo para la determinación de IAA, necesita un volumen de suero (600  $\mu$ l) que está por encima de la cantidad de suero suministrado por el programa de estandarización (100  $\mu$ l), razón por la cual, en la actualidad, no es posible participar en programas de estandarización internacionales con este ensayo. La sensibilidad y especificidad de la técnica, calculada a partir de una validación interna del laboratorio utilizando 448 sueros de pacientes menores de 35 años recogidos al debut de la diabetes tipo 1 y 398 controles sanos, es de 60% y 100% respectivamente.

### 2.3. Influencia del sexo de los pacientes en la autoinmunidad presente al debut

El resultado del análisis de la posible relación entre el sexo de los pacientes y la presencia de cada autoanticuerpo analizado por separado, no mostró diferencias estadísticamente significativas en ningún caso. Se apreció una frecuencia superior de IAA y GADA en niñas que no alcanzó la significación estadística (Tabla 8)

**Tabla 8.** Comparación entre sexos del porcentaje de pacientes positivos para cada uno de los autoanticuerpos analizados individualmente.

	Niños (n = 211)		Niñas (n = 189)		valor-p
	n	%	n	%	
IAA	131	62,1	129	68,2	0,197
GADA	146	69,2	147	77,8	0,053
IA2A	140	66,3	129	68,2	0,686
ZnT8A	121	57,3	108	57,1	0,967

Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

Se examinó también la posible influencia del sexo del paciente en el número de autoanticuerpos positivos que presentaron al debut y tampoco se observaron diferencias significativas (Tabla 9). La presencia de tres autoanticuerpos positivos resultó la combinación más frecuente en ambos sexos y solo en un 7% en niños y en un 4% en niñas no se detectó autoinmunidad positiva al debut de la enfermedad.

**Tabla 9.** Comparación entre sexos del porcentaje de pacientes con diferente número de autoanticuerpos positivos al diagnóstico

	Niños (n = 211)		Niñas (n = 189)		valor-p
	n	%	n	%	
4 anticuerpos positivos	49	23,2	51	27,0	0,386
3 anticuerpos positivos	76	36,0	67	35,4	0,906
2 anticuerpos positivos	43	20,4	45	23,8	0,408
1 anticuerpo positivo	28	13,3	18	9,5	0,241
0 anticuerpos positivos	15	7,1	8	4,2	0,217

Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

#### 2.4. Influencia de la edad al diagnóstico en la autoinmunidad presente al debut

Para establecer la posible relación entre los autoanticuerpos presentes al debut y la edad al diagnóstico, se analizó la presencia de cada autoanticuerpo de forma individual en los pacientes clasificados en 3 grupos de acuerdo a la edad de inicio de la enfermedad: menores de 6 años (n = 91), entre 6 y 11 años (n = 164) y mayores de 11 años (n = 145). Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Comparación entre diferentes edades al diagnóstico del porcentaje de pacientes positivos para cada uno de los autoanticuerpos analizados individualmente.

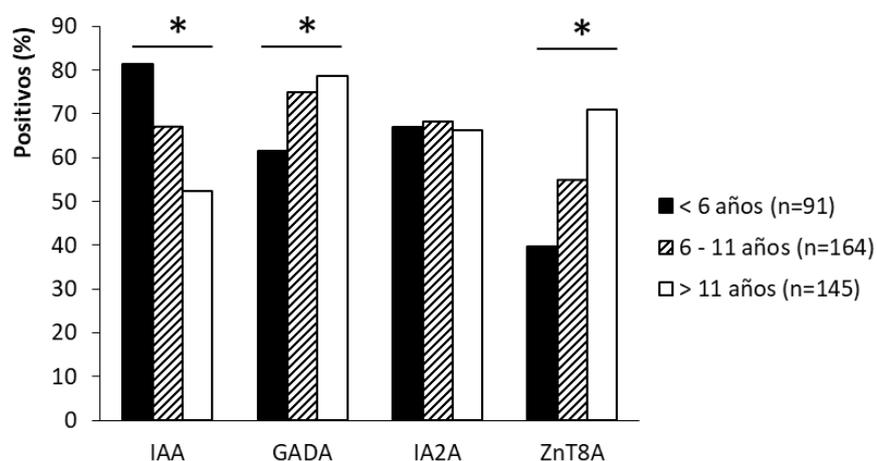
	< 6 años (n = 91)		6 - 11 años (n = 164)		> 11 años (n = 145)		valor-p
	n	%	n	%	n	%	
IAA	74	81,3	110	67,1	76	52,4	<0,001
GADA	56	61,5	123	75,0	114	78,6	0,013
IA2A	61	67,0	112	68,3	96	66,2	0,926
ZnT8A	36	39,6	90	54,9	103	71,0	<0,001

Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de pacientes con autoinmunidad positiva para IAA, GADA y ZnT8A. La frecuencia más elevada de autoanticuerpos IAA positivos correspondió al grupo de menor edad con un 81%, y fue decreciendo considerablemente según aumentaba la edad de inicio de la enfermedad hasta un 52% en los mayores de 11 años.

En el caso de los autoanticuerpos ZnT8A se apreció el efecto contrario, una frecuencia superior de positivos en el grupo de mayor edad, un 71%, que disminuyó progresivamente en los pacientes con diagnóstico más temprano, en los que la frecuencia de positivos fue de un 40%. La misma correlación positiva con la edad que presentaron los ZnT8A se observó en los GADA, aunque las diferencias entre las frecuencias de pacientes con GADA positivo en relación a la edad al diagnóstico fueron menores, un máximo de 79% en los mayores de 11 años, frente a un 62% en los menores de 6 años.

En el caso de los IA2A, no se demostró ninguna correlación con la edad en el momento del diagnóstico, presentando en los tres intervalos de edad considerados una frecuencia de positividad muy similar, en torno al 66%. En la figura 22 se muestra una representación gráfica de las frecuencias de pacientes positivos para cada autoanticuerpo analizado por separado de acuerdo a la edad al diagnóstico.



**Figura 22.** Distribución del porcentaje de pacientes positivos para cada uno de los autoanticuerpos en los diferentes grupos de edad de inicio de la enfermedad. Los asteriscos indican que la diferencia entre los grupos de edad es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Los resultados del análisis estadístico del número de autoanticuerpos positivos que presentaron los pacientes al debut en relación a la edad del paciente, se muestran en la tabla 11

**Tabla 11.** Comparación del porcentaje de pacientes con diferente número de autoanticuerpos positivos al debut entre diferentes edades al diagnóstico.

	< 6 años (n = 91)		6 - 11 años (n = 164)		> 11 años (n = 145)		valor-p
	n	%	n	%	n	%	
4 anticuerpos positivos	11	12,1	45	27,4	44	30,3	0,004
3 anticuerpos positivos	41	45,1	55	33,5	47	32,4	0,106
2 anticuerpos positivos	25	27,5	37	22,6	26	17,9	0,221
1 anticuerpo positivo	10	11,0	16	9,8	20	13,8	0,532
0 anticuerpos positivos	4	4,4	11	6,7	8	5,5	0,741

Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

La frecuencia de pacientes que presentaron los 4 autoanticuerpos positivos resultó considerablemente inferior en el grupo de menor edad al diagnóstico. En el resto de los grupos de edad no se observaron diferencias estadísticamente significativas. La presencia de 3 anticuerpos positivos fue la característica más frecuente en todos los intervalos de edad considerados.

## 2.5. Combinación de ensayos de detección de autoanticuerpos

Con el objetivo de seleccionar la estrategia más efectiva para el despistaje de diabetes tipo 1 en pediatría, se evaluó cada autoanticuerpo por separado y todas las combinaciones posibles de 2, 3 y 4 autoanticuerpos, tanto en los tres intervalos de edad considerados en el estudio como en la cohorte pediátrica en su totalidad.

Como se muestra en la tabla 12, las prevalencias de ZnT8A, IAA, IA2A y GADA al debut de la enfermedad, determinadas para la cohorte pediátrica completa, fueron 57,3, 65,0, 67,3 y 73,3%, respectivamente. Siguiendo con el análisis de la totalidad de la cohorte, en el 94,3% de los pacientes se detectó una respuesta autoinmune contra la célula  $\beta$ -pancreática y el 82,8% de ellos presentaron dos o más autoanticuerpos positivos. En concreto, un 25% de los pacientes (100/400) presentó cuatro

autoanticuerpos positivos, un 36% (143/400) presentó positividad para tres y un 22% (88/400) fue positivo para dos. La incorporación del análisis de ZnT8A a los ensayos de detección de autoanticuerpos aumentó el número de pacientes con autoinmunidad positiva de 373 (93,3%) a 377 (94,3%). Además, se redujo el porcentaje de pacientes con un solo autoanticuerpo positivo de un 18,5% (74/400) a un 11,5% (46/400). La positividad aislada para ZnT8A permitió la confirmación de diabetes autoinmune en un 14,8% (4/27) de los pacientes pediátricos que resultaron negativos para el resto de los autoanticuerpos analizados. Finalmente, en 23 pacientes pediátricos (23/400, 5,7%) con diagnóstico clínico de diabetes tipo 1 no se detectó autoinmunidad.

**Tabla 12.** Porcentaje de pacientes positivos para todas las combinaciones posibles de los 4 ensayos.

Autoanticuerpos evaluados	Todos (n = 400)	< 6 años (n = 91)	6 - 11 años (n = 164)	> 11 años (n = 145)
ZnT8A	57,3	39,6	54,9	71
IAA	65,0	81,3	64,1	52,4
IA2A	67,3	67,0	68,3	66,2
GADA	73,3	61,5	75,0	78,6
IA2A, ZnT8A	79,0	73,6	79,3	82,1
IAA, IA2A	83,3	92,3	84,7	79,3
IAA, ZnT8A	84,3	90,1	82,9	82,1
GADA, ZnT8A	84,5	76,9	84,1	89,7
GADA, IAA	87,8	92,3	89,0	83,4
GADA, IA2A	90,3	87,9	90,9	91,0
IAA, IA2A, ZnT8A	88,0	93,4	86,0	86,9
GADA, IA2A, ZnT8A	91,8	87,9	92,1	93,8
GADA, IAA, ZnT8A	92,5	94,5	92,7	91,0
GADA, IAA, IA2A	93,3	95,6	92,7	92,4
GADA, IA2A, IAA, ZnT8A	94,3	95,6	93,3	94,5

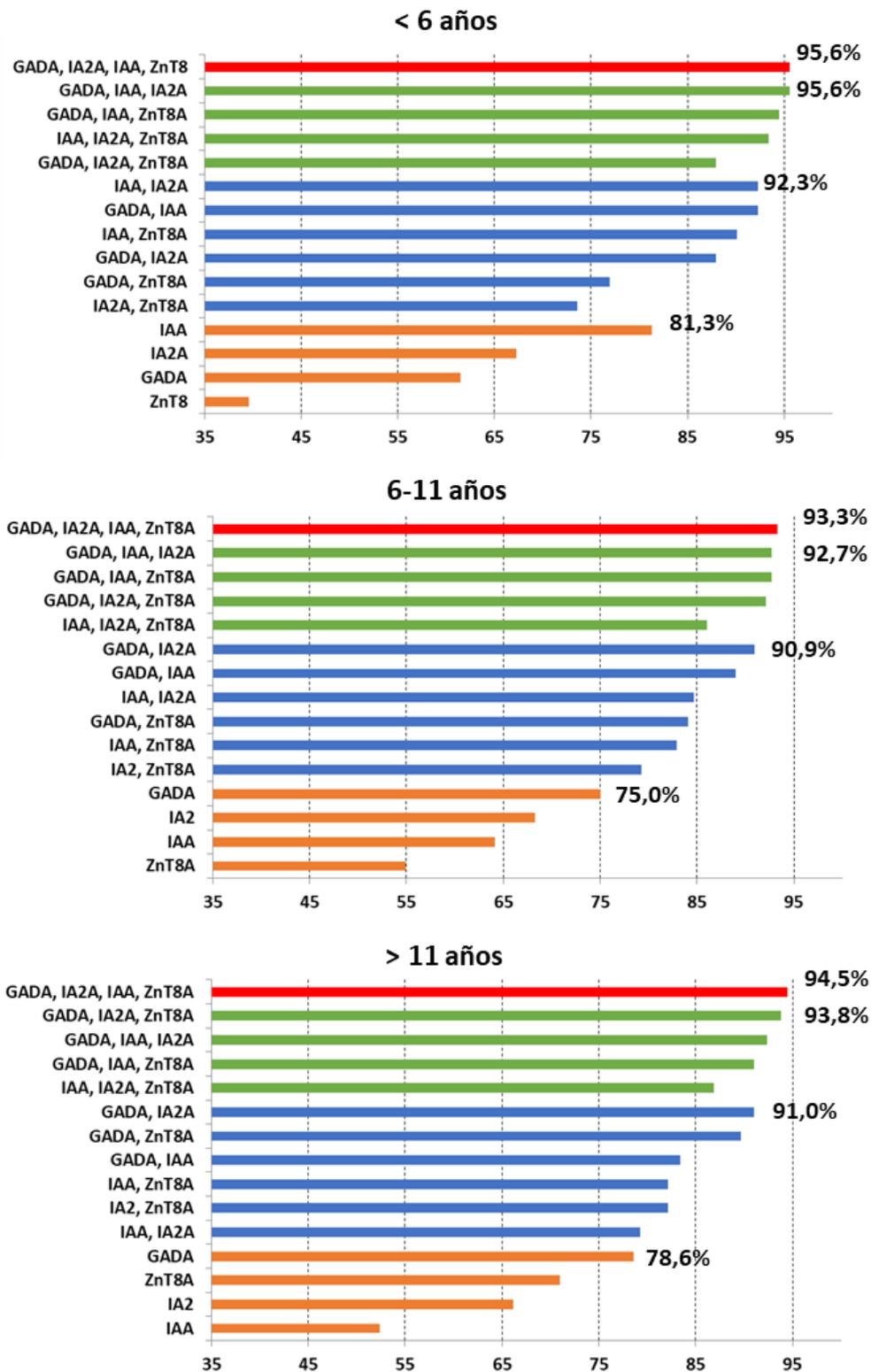
Se consideró autoinmunidad positiva la presencia de al menos 1 autoanticuerpo positivo. El sombreado indica el mayor porcentaje de positivos alcanzado para cada combinación de autoanticuerpos y cada grupo de edad.

En lo que respecta al análisis de la combinación de ensayos más eficaz en el diagnóstico de diabetes tipo 1 según los grupos de edad considerados, se observó que en la franja de edad más joven (menores de 6 años) los autoanticuerpos más frecuentes fueron los IAA que permitieron, de forma aislada, el diagnóstico de un 81% de los pacientes. La combinación de dos autoanticuerpos más efectiva fue la utilización de IAA junto con IA2A o junto con GADA, alcanzándose en ambos casos el 92% del diagnóstico. Y la combinación de IAA, GADA e IA2A, fue la que permitió el máximo de diagnósticos de diabetes tipo 1 en menores de 6 años con un 95,6% de sensibilidad.

En los pacientes mayores de 6 años fue el GADA el que proporcionó mejores datos de sensibilidad, alcanzando en el grupo de 6 a 11 años un 75% de sensibilidad y en el de mayores de 11 años un 78%. La utilización de GADA junto con IA2A fue la combinación de dos ensayos más efectiva en los dos grupos de mayores de 6 años considerados, llegando a una sensibilidad diagnóstica del 91% en ambos grupos de edad. Con los tres ensayos GADA, IAA e IA2A o GADA, IAA y ZnT8A se alcanzó el 92% de detección de autoinmunidad entre los 6 y 11 años de edad, mientras que en los mayores de 11 años fue la combinación GADA, IA2A y ZnT8A la que alcanzó el máximo de sensibilidad llegando al 93%.

La incorporación del análisis del ZnT8A a los tres autoanticuerpos clásicos en los menores de 6 años, no mejoró el porcentaje de diagnóstico, que alcanzó un máximo de 95,6% con el análisis de GADA, IAA e IA2A. Este hecho es la consecuencia de que el ZnT8A es el autoanticuerpo menos prevalente en edades de diagnóstico tempranas. La inclusión del ZnT8A como marcador de autoinmunidad adquiere importancia principalmente en diagnósticos más tardíos, en los que sí se mejoró el porcentaje de diagnóstico de un 92,7% a un 93,3% en pacientes entre 6 y 11 años, y de un 93,8% a un 94,5% en pacientes mayores de 11 años.

A continuación, en la figura 23, se muestra una representación gráfica de todas las combinaciones posibles de los cuatro ensayos para cada grupo de edad considerado en el estudio. En cada gráfica, las combinaciones de ensayos están ordenadas de abajo hacia arriba según aumenta su efectividad para la detección de la autoinmunidad.



**Figura 23.** Porcentaje de pacientes positivos para todas las combinaciones posibles de los 4 ensayos. Las combinaciones de ensayos están ordenadas de menor a mayor según su efectividad para la detección de autoinmunidad. El color naranja, azul, verde y rojo representan las combinaciones de 1, 2, 3 y 4 ensayos respectivamente.

### **3. ESTUDIO GENÉTICO ORIENTADO AL DIAGNÓSTICO DE DIABETES MONOGÉNICA**

El tercer objetivo de este trabajo de investigación planteó hacer un estudio genético a todos los pacientes con sospecha de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa identificados en nuestra cohorte, para descartar una posible diabetes monogénica. Para realizar el análisis molecular se eligió una estrategia de secuenciación masiva dirigida que consistió en el desarrollo de un panel de 12 genes, los más relevantes en la diabetes monogénica. El primer paso del proceso fue la validación del panel. Se realizó, por un lado, una validación técnica con el fin de evaluar la calidad del diseño del panel y detectar las regiones que queden mal cubiertas y, por otro lado, la validación analítica, que nos permitió evaluar la capacidad del panel para detectar variantes de interés. A continuación, se realizó el análisis molecular a los 23 pacientes con diabetes y autoinmunidad negativa, que se identificaron en el estudio de la autoinmunidad al debut (primera fase del estudio). También se realizó el estudio genético a los cuatro pacientes que sólo presentaron autoinmunidad para el ZnT8A con el propósito de afianzar la utilidad del ZnT8A como marcador de diabetes autoinmune en caso de no detectarse una diabetes monogénica en estos pacientes.

#### **3.1. Validación técnica del panel de genes**

La evaluación de los parámetros de calidad de cada librería nos ofrece una visión de la calidad del diseño del panel de genes. En todas las librerías se consiguió una media de lecturas por base y por paciente de 500 lecturas, con una uniformidad por muestra del 92%. El mínimo establecido para dar por válida la secuencia de una base fue de 20 lecturas llegando el 98% de las bases al mínimo de lecturas establecido. El 91% de las bases superó las 100 lecturas. En cada muestra se examinó exhaustivamente la cobertura, y toda zona de interés que no se leyó al menos 20 veces se secuenció por Sanger. Las zonas cuya cobertura no llegó al mínimo establecido correspondieron fundamentalmente a zonas intrónicas, a excepción del promotor y exón 1 del gen *ABCC8* que generalmente no presentó buena cobertura y por ser una zona de interés se secuenció por Sanger.

### 3.2. Validación analítica con muestras conocidas

Para comprobar la exactitud con la que el panel de genes identifica variantes genéticas de interés se seleccionaron muestras de 30 pacientes diagnosticados de diabetes monogénica por nuestro equipo. En todas las muestras el estudio molecular se realizó en nuestro laboratorio por secuenciación Sanger y/o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) según el caso: 1 *HNF4A*, 12 *GCK*, 4 *HNF1A*, 5 *HNF1B*, 4 *INS*, 1 *KCNJ11*, 3 *ABCC8*. En total se trabajó con 35 mutaciones localizadas en regiones exónicas, reguladoras y zonas de *splice* de los genes responsables de las formas monogénicas más frecuentes: 15 mutaciones puntuales, 13 pequeñas inserciones o deleciones (1 a 15 bases) y 7 grandes deleciones o CNVs (*Copy Number Variations*). En la tabla 13 se presentan todas las variantes patogénicas diferentes utilizadas en la validación analítica del panel y se muestra en la última columna de la tabla si el resultado por NGS coincidió con el resultado detectado anteriormente por las técnicas moleculares convencionales, Sanger o MLPA.

**Tabla 13.** Variantes patogénicas utilizadas en la validación analítica del panel de genes.

Paciente ID	Gen	Localización	Cambio a nivel de ADNc	Cambio a nivel de proteína	NGS
Lib 3_BC7	<i>ABCC8</i>	exón 29	c.3577delG	p.Asp1193Metfs*16	SI
	<i>ABCC8</i>	exón 29	c.3626_3628delAAG	p.Glu1209del	SI
Lib 3_BC9	<i>ABCC8</i>	exón 12	c.1732_1746dup15	p.Ala578_Leu582dup5	SI
	<i>ABCC8</i>	exón 39	c.4723G>C	p.Ala1575Pro	SI
Lib 4_BC1	<i>ABCC8</i>	exón 8	c.1317G>A	p.[Trp439*]	SI
	<i>ABCC8</i>	intrón 38	c.4609-2A>T	-	SI
Lib 3_BC5	<i>GCK</i>	exón 2	c.197delC	p.Pro66Glnfs*22	SI
Lib 3_BC10	<i>GCK</i>	exón 5	c.556C>T	p.Arg186*	SI
Lib 3_BC11	<i>GCK</i>	exón 6	c.679+1G>A	-	SI
Lib 3_BC14	<i>GCK</i>	exón 9	c.1076C>T	p.Pro359Leu	SI
Lib 4_BC2	<i>GCK</i>	exón 7	c.713delT	p.Met238Serfs*56	SI
Lib 4_BC3	<i>GCK</i>	exón 5	c.563_564delCTinAA	p.Ala188Glu	SI
Lib 4_BC28	<i>GCK</i>	exón 4	c.480_482dupTAA	p.Asp160_Lys161insAsn	SI

Lib 4_BC29	<i>GCK</i>	exón 7	c.769dupT	p.Trp257Leufs*18	SI
Lib 1_BC2	<i>HNF1A</i>	exón 4	c.872dupC	p.Gly292fs	<b>NO</b>
Lib 2_BC3	<i>HNF1A</i>	exón 4	c.942delC	p.Ser315fs	SI
Lib 2_BC15	<i>HNF1A</i>	exón 2	c.493T>C	p.Trp165Arg	SI
Lib 4_BC27	<i>HNF1A</i>	exón 5	c.1006dupA	p.Ser336fs	SI
Lib 3_BC2	<i>HNF1B</i>	exón 1	c.207_211delCGCCA	p.His69fs	SI
Lib 3_BC3	<i>HNF1B</i>	exón 5	c.1144C>T	p.Gln382*	SI
Lib 3_BC6	<i>HNF1B</i>	exón 2	c.513G>C	p.Trp171Cys	SI
Lib 2_BC10	<i>HNF4A</i>	exón 2	c.187C>T	p.Arg63Trp	SI
Lib 3_BC4	<i>INS</i>	promotor	c.-331C>G	-	SI
Lib 3_BC8	<i>INS</i>	intrón 2	c.188-31G>A	-	SI
Lib 3_BC13	<i>INS</i>	exón 3	c. 324_328delCTGCA	p.Tyr108*	SI
Lib 4_BC5	<i>INS</i>	exón 3	c.265C>T	p.Arg89Cys	SI
Lib 1_BC1	<i>KCNJ11</i>	exón 1	c.[295G>A]	p.[Asp99Asn]	SI
	<i>KCNJ11</i>	exón 1	c.[761C>T]	p.[Pro254Leu]	SI
Lib 9_BC25	<i>GCK</i>	exones 1-10	c.1-?_1395+?del		SI
Lib 8_BC25	<i>GCK</i>	exones 8-10	c.(863+1_864-1)_(1395+?)del		SI
Lib10_BC22	<i>GCK</i>	5`UTR-exón 1	c.1-?_(45+1_46-1)del		SI
Lib7_BC04	<i>GCK</i>	exones 8-9	c.(863+1_864-1)_(1253+1_1254-1)del		<b>NO</b>
Lib3_BC12	<i>HNF1B</i>	exones 1-9	c.1-?_1671+?del		SI
Lib10_BC23	<i>HNF1B</i>	exones 3-8	c.(544+1_545-1)_(1653+1_1654-1)del		SI
Lib13_BC37	<i>HNF4A</i>	exones 8-10	c.(826+1_827-1)_(1356+?)del		SI

Descripción de todas las variantes de acuerdo a las recomendaciones de la HGVS (*Human Genome Variation Society*). En el caso de las CNVs la descripción se basa en los exones que comprende la delección según recomienda la HGVs para delecciones identificadas por MLPA. Secuencias de referencia: *ABCC8*, NM\_001287174.1; *GCK*, NM\_000162.2; *HNF1A*, NM\_000545; *HNF1B*, NM\_000458.2; *HNF4A*, NM\_175914.4; *INS*, NM\_001185098; *KCNJ11*, NM\_000525.

La evaluación del panel se hizo en términos de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad entre ensayos diferenciando, por un lado, cambios puntuales y pequeñas inserciones o delecciones (de 1 a 15 bases) y, por otro, grandes delecciones o CNVs.

Se definió la sensibilidad analítica del panel de genes como el porcentaje de variantes previamente detectadas por Sanger o MLPA que el panel fue capaz de detectar. La especificidad analítica se definió como el porcentaje de variantes detectadas por el panel (que cumplían los criterios de calidad,  $p < 0,001$ ) y que fueron confirmadas por Sanger o MLPA y, por tanto, fueron variantes reales. Y la reproducibilidad analítica se definió como el porcentaje de variantes detectadas para un paciente en una librería que se repitieron en otras dos librerías diferentes. El análisis bioinformático se realizó con el software *Ion Reporter*<sup>TM</sup> de Thermo Fisher Scientific.

### 3.2.1. Cambios puntuales y pequeñas deleciones o inserciones

Para la estimación de la sensibilidad analítica del panel de genes se tuvo en cuenta no sólo las variantes patogénicas indicadas en la tabla 13, sino todas las variantes identificadas por Sanger en el exón en el que se localizó la mutación. Por Sanger se identificaron un total de 64 variantes (28 patogénicas y 36 SNPs) de las cuales sólo una no fue detectada por el panel. Por tanto, se estimó una sensibilidad para el panel del 98,4%.

Como se indica en la tabla 13, el cambio no detectado por el panel fue una variante patogénica localizada en una región con ocho citosinas seguidas en el exón 4 del gen *HNF1A*. Esta plataforma no secuencía con exactitud regiones de homopolímeros ya que carece de precisión de una sola base en la medición de regiones repetitivas de dNTPs mayores de 6-8 pb. Esta es la razón por la cual la variante patogénica del exón 4 del gen *HNF1A* no fue detectada por NGS. Como se trata de un conocido *Hot Spot* descrito ampliamente en la bibliografía, el exón 4 del *HNF1A* siempre se secuenció por Sanger en todas las muestras.

Para la estimación de la especificidad analítica del panel se seleccionaron quince casos de la tabla 13 en los que disponíamos de la secuencia Sanger del gen completo que portaba la mutación, y de esta forma se pudo comparar la secuencia completa del gen por ambos métodos. Por NGS se detectaron un total de 57 variantes (18 patogénicas y

39 SNPs) de las cuales sólo 2 no se confirmaron por Sanger. Con este resultado se estimó un 3.5% de falsos positivos y por tanto una especificidad de 96,5%.

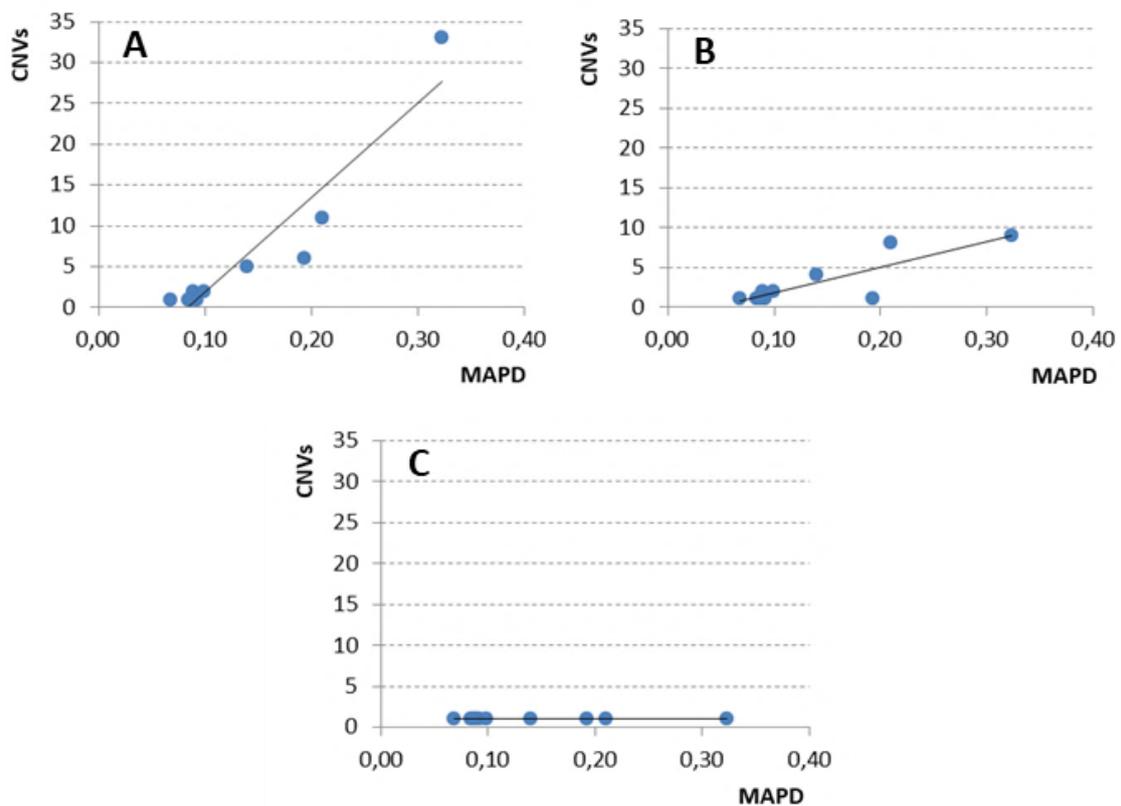
Para comprobar la reproducibilidad del panel entre ensayos se incluyeron tres casos diferentes en tres librerías diferentes y se analizó la concordancia de los resultados. Por NGS se identificaron un total de 32 variantes correspondientes a las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes de los genes *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B*, *INS*, *KCNJ11*, *ABCC8*. Todas las variantes excepto 2 se confirmaron por Sanger y se identificaron en las tres librerías. Las 2 variantes discordantes fueron falsos positivos. Con este resultado se estima que la reproducibilidad entre ensayos de nuestro panel de genes para las variantes reales (cambios puntuales y pequeñas inserciones o deleciones) es del 100%.

### **3.2.2. CNVs (*Copy Number Variations*)**

Para analizar las CNVs en un panel de genes es importante tener en cuenta el valor del MAPD (*Median of the Absolute values of all Pairwise Differences*) de la carrera. Es un parámetro de control de calidad que sirve para estimar la uniformidad de la librería y valorar si el resultado de la carrera es útil o no para el análisis de CNVs. Este coeficiente no debe superar el valor 0,4 para que la detección de CNVs sea fiable. También es importante para el análisis de grandes deleciones que el diseño del *workflow* de análisis incluya una línea base de al menos 10 controles sin anomalías estructurales en el ADN, y que se aplique un filtro de variantes que permita seleccionar las CNVs con mayor probabilidad de que sean reales.

En la figura 24 se representa el número de CNVs detectadas por NGS en diez pacientes con diabetes monogénica causada por una deleción grande en heterocigosis en *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B* o *HNF4A* detectada previamente por MLPA. Los diez pacientes se estudiaron en 10 librerías diferentes, cada una con su correspondiente valor MAPD. En las gráficas se representa el número de CNVs detectadas en cada paciente en relación al coeficiente MAPD de cada librería. Cada una de las gráficas (A, B y C) muestra el resultado obtenido al emplear un filtro de análisis con un grado de restricción para la

identificación de CNVs diferente. El orden de menor a mayor restricción del filtro es  $A < B < C$ . En las gráficas A y B se observa que la uniformidad de la librería es un factor muy importante para analizar CNVs ya que a mayor MAPD es mayor el número de falsas CNVs que detecta la NGS. Cuando se aplica el filtro de mayor restricción, gráfica C, desaparecen las falsas CNVs y la única delección que detecta la NGS es la real, es decir, la detectada previamente por MLPA. Al aplicar el filtro de mayor restricción, en ningún caso ha desaparecido la CNV real y se minimiza el efecto de la insuficiente uniformidad de la librería.



**Figura 24.** Número de CNVs detectadas por NGS en diez pacientes previamente diagnosticados de diabetes monogénica por MLPA. Cada gráfica corresponde a un filtro de análisis de CNVs diferente (de menor a mayor restricción  $A < B < C$ ).

La sensibilidad analítica del panel para la detección de CNVs se estimó a partir de los siete casos en los que la variante patogénica, identificada por MLPA (genes *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, y *HNF1B*) fue una CNV en heterocigosis: tres deleciones parciales y una total del gen *GCK*, una delección parcial y una total del gen *HNF1B* y una parcial del gen *HNF4A* (Tabla 13). De las siete CNVs hubo una, la delección correspondiente a los

exones 8 y 9 del gen *GCK* (1,2 kb aproximadamente), que no pudo ser identificada por el panel, por tanto, la sensibilidad analítica estimada para la detección de CNVs fue de un 85,7% (Tabla 14). Debido a la inexactitud de la plataforma para detectar deleciones de pequeño tamaño, a todas las muestras, además del análisis de CNVs mediante NGS, se les hizo un estudio de MLPA para detectar posibles grandes deleciones-duplicaciones en los genes *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A* y *HNF1B*.

**Tabla 14** Resultado del estudio mediante el panel de genes de la presencia de CNVs en siete pacientes que habían sido previamente diagnosticados por MLPA.

Paciente ID	MAPD	Gen	Tamaño de la deleción	Localización genómica	Región que comprende
Lib 9_BC25	0,089	<i>GCK</i>	45,748kb	7p13(44183817-44229565)x1	Ex 1-10
Lib 8_BC25	0,099	<i>GCK</i>	2,541kb	7p13(44183817-44186358)x1	Ex 8-10
Lib10_BC22	0,084	<i>GCK</i>	1,133kb	7p13(44228432-44229565)x1	5`UTR-Ex 1
Lib7_BC04	0,210	-	-	-	-
Lib3_BC12	0,068	<i>HNF1B</i>	59,837kb	17q12(36046128-36105965)x1	Ex 1-9
Lib10_BC23	0,087	<i>HNF1B</i>	34,931kb	17q12(36058951-36093882)x1	Ex 3-8
Lib13_BC37	0,132	<i>HNF4A</i>	9,059kb	20q13.12(43052534-43061593)x1	Ex 8-10

MAPD *Median of the Absolute values of all Pairwise Differences*

Para la estimación de la especificidad analítica del panel se siguieron dos procedimientos diferentes. El primero de ellos consistió en seleccionar 94 pacientes con estudio MLPA negativo para los genes *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* y *HNF1B* a los que también se les había hecho un estudio genético por NGS. Sólo en un caso la NGS detecta una CNV en el gen *GCK* que no fue real, por tanto, la especificidad estimada para la detección de CNVs fue de un 98,9%. El segundo procedimiento consistió en analizar si la NGS detectó CNVs en los 21 pacientes previamente diagnosticados de diabetes monogénica por Sanger identificados en la tabla 13 (se excluyeron tres casos en los que el coeficiente MADP fue mayor a 0,4). En los 21 pacientes se esperaba que el número de CNVs detectadas fuese 0 y, por tanto, toda CNV detectada en el análisis bioinformático sería un falso positivo. En los 21 pacientes el análisis no detectó

ninguna CNV en los genes *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* y *HNF1B*, por tanto, la especificidad estimada para la detección de CNVs fue de un 100%. Teniendo en cuenta los 2 resultados podemos estimar una especificidad analítica del panel de genes para las CNVs entre el 99 y el 100%.

Para comprobar la reproducibilidad del panel entre ensayos para la detección de CNVs se incluyó un mismo caso, portador de una delección total del gen *GCK*, en tres librerías diferentes. En dos de las tres librerías en las que el valor de MAPD fue de 0.089 y 0.092 sólo se identificó una delección completa del gen *GCK* en heterocigosis. Sin embargo, en la tercera librería (MAPD = 0.140) se identificó la CNV real y 4 falsas que no se confirmaron por MLPA. Con este resultado se estima que la reproducibilidad de nuestro panel de genes para las CNVs reales es del 100% y apoya la necesidad de tener valores de MAPD por debajo de 0.1 para reducir al máximo la aparición de falsos positivos.

En resumen, el panel de genes desarrollado para el diagnóstico de diabetes monogénica presentó una sensibilidad de 98% y una especificidad de 96% para cambios puntuales y pequeñas inserciones-delecciones a una cobertura mínima de 20x. Respecto a las variantes en el número de copias, presentó una sensibilidad del 86% y una especificidad mayor del 99%. La reproducibilidad entre ensayos para las variantes reales fue del 100%.

### 3.3. Resultados del estudio genético

El resultado del estudio genético realizado a los 23 pacientes con autoinmunidad negativa de acuerdo al análisis de los cuatro anticuerpos desarrollado en la primera fase del estudio, se muestra en la tabla 15. Se encontró en 6 pacientes un total de cinco variantes raras diferentes (MAF < 0,01); todas las variantes estaban presentes en heterocigosis. Dos de ellas fueron clasificadas como variantes probablemente benignas, una de ellas como variante de significado incierto o VUS y otras dos fueron clasificadas como variantes patogénicas. El resultado del MLPA no mostró delecciones o duplicaciones parciales o totales de genes.

También se realizó el estudio genético por NGS y MLPA a los 4 pacientes con sólo autoinmunidad positiva para el ZnT8A. No se encontró ninguna variante sospechosa de diabetes monogénica en ninguno de ellos.

**Tabla 15.** Variantes genéticas raras identificadas en pacientes con sospecha de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa.

ID	Gen	Exón	Variante	Tipo	dbSNP	MAF_ALL GnomADe	Efecto
11	<i>INS</i>	2	c.94G>A; p.Gly32Ser	<i>Missense</i>	rs80356664	0	PAT
18	<i>HNF1A</i>	4	c.789dupT; p.Val264fs	<i>Frameshift</i>	-	0	PAT
14	<i>HNF1B</i>	4	c.1006C>G; p.His336Asp	<i>Missense</i>	rs138986885	0.0002	VUS
17	<i>HNF1A</i>	1	c.92G>A; p.Gly31Asp	<i>Missense</i>	rs137853247	0.001	P-BEN
9 & 22	<i>HNF1B</i>	1	c.226G>T; p.Gly76Cys	<i>Missense</i>	rs144425830	0.001	P-BEN

dbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism Database*. MAF\_ALL in GnomADe: Frecuencia del alelo menos común en la base de datos *The Exome Genome Aggregation Database*. PAT: Variante patológica; VUS: Variante de significado incierto; P-BEN: Variante probablemente benigna. Secuencias de referencia: *INS*, NM\_000207.2; *HNF1A*, NM\_000545.5; *HNF1B*, NM\_000458.2.

Como se muestra en la tabla 15 se han detectado dos variantes patológicas: una en el gen *INS* y otra en el gen *HNF1A*. La variante patológica p.Gly32Ser en el gen *INS* (paciente 11) afecta al correcto plegamiento de la proinsulina en la ruta secretora de insulina (Rajan *et al.*, 2010). Ha sido descrita previamente en pacientes con diabetes neonatal permanente (Stoy *et al.*, 2007) y también en pacientes con un inicio de diabetes durante la infancia, la adolescencia o en la edad adulta (Bonfanti *et al.*, 2009; Brahm *et al.*, 2016; Wasserman *et al.*, 2016). Es probable que se trate de una variante *de novo* ya que ninguno de los progenitores tenía la enfermedad, pero no se pudo demostrar ya que no hubo muestra disponible de los progenitores para realizar el estudio genético. También se identificó una nueva variante patológica, p.Val264fs, en el gen *HNF1A* (paciente 18) que, hasta el momento, no ha sido publicada. Esta variante implica la duplicación de timina en el nucleótido 789, lo que ocasiona un

desplazamiento de la pauta de lectura generando un codón de parada prematuro en la posición 53 de la nueva pauta de lectura. Por lo tanto, se espera que resulte una proteína truncada con pérdida de la función normal. Además, la variante co-segrega con la diabetes de aparición temprana en los familiares del paciente. Se identificó en el hermano menor del índice que fue diagnosticado posteriormente con diabetes a la edad de 10 años. Su madre, a quien se le diagnosticó diabetes gestacional y posteriormente no remitió diabetes, también porta la misma variante.

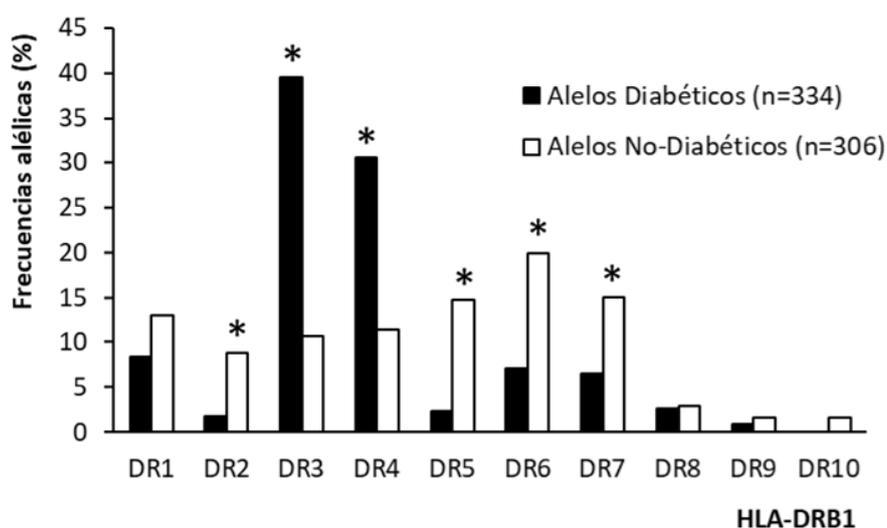
Asimismo, se detectaron otras tres variantes raras. En el paciente 14 se encontró una variante de significado incierto, VUS, en el gen *HNF1B* (p.His336Asp). No hubo posibilidad de disponer de muestra de los padres para realizar el análisis genético, ni de información sobre complicaciones extra-pancreáticas. Además, los análisis *in silico* fueron discordantes (Panther, Mutation taster y SNP&GO predijeron patogénico y SIFT, PROVEAN, PolyPhen2, MutPred predijeron benigna). Las otras dos variantes raras han sido reclasificadas recientemente como posibles variantes benignas. En el paciente 17 se encontró la variante p.Gly31Asp en el gen *HNF1A*. El análisis genético de los progenitores reveló que la madre asintomática portaba la variante y el análisis *in silico* predijo resultados contradictorios (Panther, Mutation taster y SNP&GO predijeron patogénico o probablemente patogénico y SIFT, PROVEAN, PolyPhen2, MutPred predijeron benigna). Finalmente, los pacientes 9 y 22 presentaron la variante p.Gly76Cys en el gen *HNF1B*. En ambos casos, la variante se heredó de padres asintomáticos que aparentemente no tenían complicaciones extra-pancreáticas asociadas con el *HNF1B*. Sin embargo, todos los algoritmos *in silico* predijeron un impacto en la funcionalidad de la proteína.

#### 4. ESTUDIO DEL GENOTIPO HLA-DRB1

Una vez realizado el estudio genético a los 23 pacientes con sospecha de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa, se planteó si la caracterización molecular del HLA-DRB1 podría haber servido para seleccionar los pacientes a los que realizar el estudio genético y así evitar hacer estudios innecesarios. Con esa finalidad, en primer lugar, se determinaron los alelos HLA-DRB1 de riesgo a diabetes tipo 1 en nuestra cohorte para, posteriormente, analizar su capacidad como biomarcador para identificar diabetes monogénica en pediatría.

##### 4.1. Alelos HLA-DRB1 asociados a diabetes tipo 1 en nuestra cohorte

Para identificar los alelos HLA-DRB1 asociados a diabetes tipo 1 en nuestra cohorte, se realizó un análisis tipo AFBAC con 160 familias formadas por un paciente diagnosticado de diabetes tipo 1 en edad pediátrica, con autoinmunidad positiva confirmada al debut, y sus progenitores (métodos pág. 131-4). En un primer análisis tipo AFBAC del *locus* HLA-DRB1 se consideraron los grupos DRB1 genéricos. Se identificaron 10 grupos DRB1 diferentes como se muestra en la figura 25.



**Figura 25.** Distribución de las frecuencias de los alelos HLA-DRB1 diabéticos y no diabéticos definidos en el análisis AFBAC. Los asteriscos indican los casos en los que la diferencia de frecuencias entre los 2 grupos comparados fue estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

Los alelos DR8, DR9 y DR10 fueron los menos representados en nuestra población con frecuencias inferiores al 5% en los dos grupos de alelos definidos en el análisis AFBAC. Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16.** Comparación de las frecuencias de cada grupo genérico HLA-DRB1 entre las dos clases de alelos derivados del análisis AFBAC (diabéticos y no diabéticos).

HLA_DRB1	Alelos diabéticos (n = 334)		Alelos no diabéticos (n = 306)		valor-p	OR (IC 95%)
	n	%	n	%		
DR1	28	8,4	40	13,1	0,055	-
DR2	6	1,8	27	8,8	<0,001	0,189 (0,077-0,464)
DR3	132	39,5	33	10,8	<0,001	5,406 (3,543-8,249)
DR4	102	30,5	35	11,4	<0,001	3,404 (2,232-5,192)
DR5	8	2,4	45	14,7	<0,001	0,142 (0,066-0,307)
DR6	24	7,2	61	19,9	<0,001	0,311 (0,188-0,513)
DR7	22	6,6	46	15,0	0,001	0,399 (0,234-0,680)
DR8	9	2,7	9	2,9	0,851	-
DR9	3	0,9	5	1,6	0,489	-
DR10	0	0,0	5	1,6	0,050	-

Se compara la frecuencia de cada grupo genérico por separado frente al resto. Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

El análisis estadístico mostró un incremento significativo de alelos DR3 y DR4 en el grupo de alelos AFBAC diabéticos cuando se comparan con el grupo de alelos AFBAC no diabéticos. Por el contrario, las frecuencias de alelos DR2, DR5, DR6 y DR7 fueron mayores en el grupo de alelos AFBAC no diabéticos, siendo también las diferencias estadísticamente significativas. Los grupos de alelos DR1, DR8, DR9 y DR10 no se distribuyeron de forma diferente en función de la enfermedad.

En un segundo análisis se consideraron los subtipos específicos de cada grupo genérico DRB1. Se obtuvieron 34 subtipos diferentes como se muestra en la tabla 17.

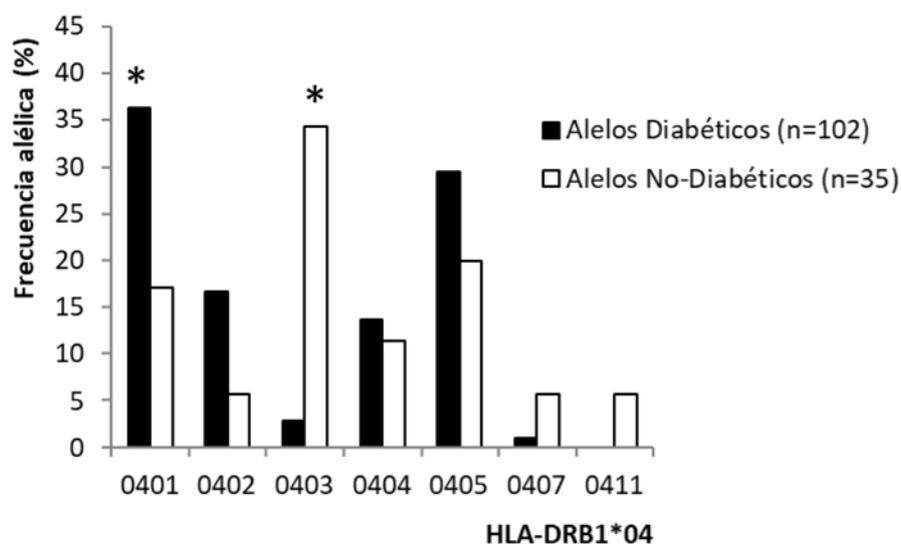
**Tabla 17.** Comparación de las frecuencias de cada subtipo HLA-DRB1 entre las dos clases de alelos derivados del análisis AFBAC (diabéticos y no diabéticos).

		Alelos diabéticos		Alelos no diabético:		valor- <i>p</i>	OR (IC 95%)
		n	%	n	%		
DRB1*01	0101	18	64,3	22	55,0	0,44	-
	0102	8	28,6	12	30,0	0,90	-
	0103	2	7,1	6	15,0	0,46	-
DRB1*02	1501	2	33,3	21	77,8	0,05	-
	1502	0	0,0	2	7,4	1,00	-
	1601	3	50,0	4	14,8	0,09	-
	1602	1	16,7	0	0,0	0,18	-
DRB1*03	0301	132	100,0	33	100,0		
DRB1*04	0401	37	36,3	6	17,1	0,04	2,751 (1,046-7,238)
	0402	17	16,7	2	5,7	0,16	-
	0403	3	2,9	12	34,3	<0,001	0,058 (0,015-0,223)
	0404	14	13,7	4	11,4	1,00	-
	0405	30	29,4	7	20,0	0,28	-
	0407	1	1,0	2	5,7	0,16	-
	0411	0	0,0	2	5,7	0,06	-
DRB1*05	1101	2	25,0	20	44,4	0,45	-
	1102	1	12,5	3	6,7	0,49	-
	1103	0	0,0	2	4,4	1,00	-
	1104	3	37,5	18	40,0	1,00	-
	1201	2	25,0	2	4,4	0,10	-
DRB1*06	1301	11	45,8	30	49,2	0,78	-
	1302	8	33,3	12	19,7	0,18	-
	1303	2	8,3	6	9,8	1,00	-
	1305	0	0,0	1	1,6	1,00	-
	1308	1	4,2	1	1,6	0,49	-
	1401	0	0,0	8	13,1	0,10	-
	1404	1	4,2	1	1,6	0,49	-
	1406	1	4,2	2	3,3	1,00	-
DRB1*07	0701	22	100,0	46	100,0		
DRB1*08	0801	9	100,0	5	55,6	0,08	-
	0803	0	0,0	2	22,2	0,47	-
	0804	0	0,0	2	22,2	0,47	-
DRB1*09	0901	3	100,0	5	100,0		
DRB1*10	1001	0	100,0	5	100,0		

Se compara cada subtipo frente al resto de subtipos dentro del mismo grupo genérico. Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

Se comparó, dentro de cada grupo genérico por separado, la distribución de las frecuencias de los subtipos DRB1 entre los alelos AFBAC diabéticos y los no diabéticos.

La comparación no reveló diferencias estadísticamente significativas, a excepción del grupo DR4. El subtipo \*0403 presentó un comportamiento atípico respecto al resto de subtipos dentro del grupo genérico DR4 al encontrarse, de forma significativa, más representado en el grupo de alelos AFBAC no diabéticos (tabla 17, figura 26). Por esta razón, el alelo \*0403 se excluyó del grupo de alelos DR4 en los análisis posteriores, ya que este subtipo no confiere susceptibilidad a diabetes tipo 1.



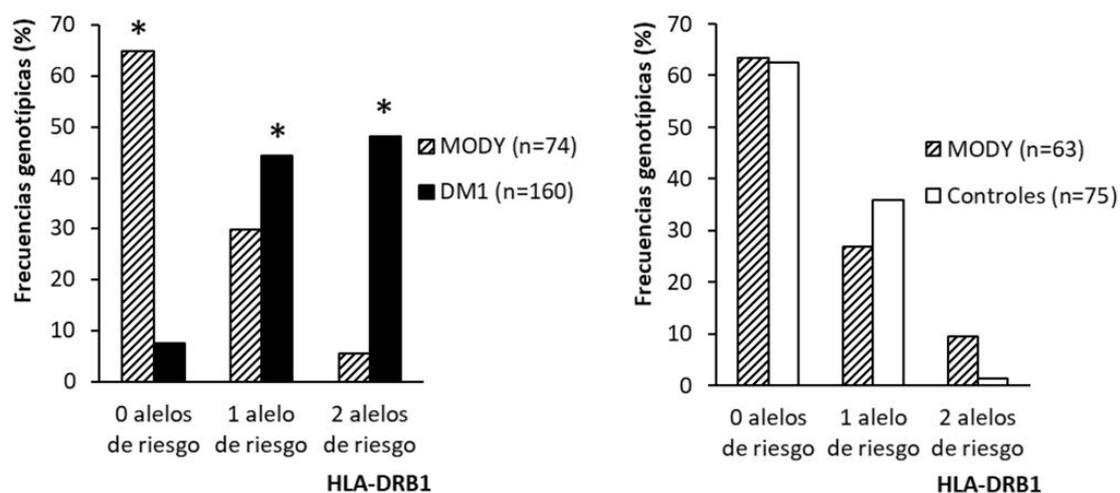
**Figura 26.** Distribución de las frecuencias de los subtipos de alelos HLA-DRB1\*04 diabéticos y no diabéticos definidos en el análisis AFBAC. Los asteriscos indican los casos en los que la diferencia de frecuencias entre los 2 grupos comparados fue estadísticamente significativa. Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

#### 4.2. Comparación de frecuencias de alelos HLA-DRB1 entre diabetes tipo 1 y diabetes monogénica

Para comprobar si existen diferencias en el perfil HLA-DRB1 de los pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 y los pacientes con diabetes monogénica se desarrolló un análisis tipo caso-control (métodos pág. 133-4). Se incluyeron 160 pacientes en edad pediátrica con diabetes tipo 1 y autoinmunidad positiva confirmada al debut, pacientes con diagnóstico genético de diabetes monogénica y 75 controles sanos (métodos pág. 84-5).

Los genotipos se agruparon en tres categorías en función de la presencia o ausencia de los alelos HLA-DRB1 asociados a diabetes tipo 1: 0 alelos de riesgo (DR3 y DR4 ausentes en el genotipo); 1 alelo de riesgo (solo un alelo DR3 o DR4 presente en el genotipo); 2 alelos de riesgo (heterocigoto para ambos alelos de riesgo u homocigoto para DR3 o DR4). Se excluyó el alelo \*0403 del grupo de alelos DR4 de riesgo.

En la figura 27 se muestra la distribución de las frecuencias de los genotipos HLA-DRB1 en los pacientes con diabetes tipo 1, los pacientes con diabetes monogénica y los controles sanos.



**Figura 27.** Distribución de las frecuencias de los genotipos HLA-DRB1 en pacientes con diabetes tipo 1, pacientes con diabetes monogénica y controles sanos. Los asteriscos indican los casos en los que la diferencia de frecuencias entre los 2 grupos comparados fue estadísticamente significativa. Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

El resultado del análisis estadístico para comparar las distribuciones de las frecuencias genotípicas entre los pacientes con diabetes tipo 1 o con diabetes monogénica se muestra en la tabla 18. La frecuencia de los genotipos con dos alelos de riesgo resultó significativamente superior en los pacientes con diabetes tipo 1 comparada con la de los pacientes con diabetes tipo MODY. Igualmente, la frecuencia de los genotipos portadores de un único alelo de riesgo también fue mayor en los pacientes con diabetes tipo 1, aunque la diferencia fue más pequeña. Sin embargo, destacó la proporción de genotipos sin alelos de riesgo, marcadamente inferior en los pacientes con diabetes tipo 1 respecto a los pacientes con MODY.

**Tabla 18.** Comparación de la distribución de los genotipos HLA-DRB1 entre los pacientes con diabetes tipo 1 y los pacientes con diabetes monogénica.

Genotipos	DM tipo 1 (n = 160)		DM monogénica (n = 74)		valor- <i>p</i>	OR (IC 95%)
	n	%	n	%		
2 alelos de riesgo	77	48,1	4	5,4	<0,001	16,235 (5,657-46,591)
1 alelo de riesgo	71	44,4	22	29,7	0,033	1,886 (1,047-3,395)
0 alelos de riesgo	12	7,5	48	64,9	<0,001	0,044 (0,021-0,094)

Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

Asimismo, como se muestra en la tabla 19, la distribución de las frecuencias de los genotipos HLA-DRB1 en los pacientes con diabetes monogénica fue comparable a la de los controles sanos.

**Tabla 19.** Comparación de la distribución de los genotipos HLA-DRB1 entre los pacientes con diabetes monogénica y los controles sanos.

Genotipos	DM monogénica (n = 63)		Controles (n = 75)		valor- <i>p</i>	OR (IC 95%)
	n	%	n	%		
2 alelos de riesgo	5	7,9	1	1,3	0,058	-
1 alelo de riesgo	18	28,6	27	36,0	0,354	-
0 alelos de riesgo	40	63,5	47	62,7	0,920	-

Prueba Chi-cuadrado. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ .

A continuación, en la tabla 20, se muestran los resultados de la caracterización molecular del *locus* HLA-DRB1 en los 23 pacientes con sospecha de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa de nuestra cohorte, junto con el resultado del diagnóstico molecular de diabetes monogénica mediante NGS que se ha llevado a cabo en estos pacientes en la segunda fase del estudio.

El paciente 11, portador de una variante patogénica en el gen *INS*, presentó un alelo HLA-DRB1 de riesgo (DR4/DR6). Y el paciente 18, portador de una variante patogénica en el gen *HNF1A*, presentó dos (DR3/DR4). Este resultado evidenció una escasa validez del HLA-DRB1, analizado de forma aislada, para diferenciar entre los dos tipos de diabetes y, por lo tanto, para seleccionar los pacientes que podrían beneficiarse de un estudio genético para descartar un tipo monogénico de diabetes.

**Tabla 20.** Caracterización molecular del *locus* HLA-DRB1 en los 23 pacientes con sospecha de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa de nuestra cohorte.

ID	Estudio molecular del <i>locus</i> HLA-DRB1		Diagnóstico molecular de diabetes monogénica		
	Alelo1 /Alelo 2	Nº alelos de riesgo	Gen	Variante encontrada	Efecto de la variante
1	0301 / 0301	2	–	–	–
2	0102 / 1101	0	–	–	–
3	0404 / 0802	1	–	–	–
4	0403 / 1102	0	–	–	–
5	0301 / 1601	1	–	–	–
6	0301 / 0301	2	–	–	–
7	0301 / 1601	1	–	–	–
8	0404 / 0901	1	–	–	–
9	0301 / 0405	2	<i>HNF1B</i>	p.Gly76Cys	Prob. benigna
10	0301 / 0403	1	–	–	–
11	0405 / 1401	1	<i>INS</i>	p.Gly32Ser	Patogénica
12	0301 / 0701	1	–	–	–
13	0301 / 0801	1	–	–	–
14	0101 / 0401	1	<i>HNF1B</i>	p.His336Asp	VUS
15	0401 / 0701	1	–	–	–
16	03 / 04	2	–	–	–
17	0301 / 0405	2	<i>HNF1A</i>	p.Gly31Asp	Prob. benigna
18	0301 / 0402	2	<i>HNF1A</i>	p.Val264fs	Patogénica
19	0301 / 0301	2	–	–	–
20	0301 / 0404	2	–	–	–
21	0301 / 0401	2	–	–	–
22	0301 / 0401	2	<i>HNF1B</i>	p.Gly76Cys	Prob. benigna
23	0301 / 0404	2	–	–	–

ID: Identificación del paciente. VUS: variable de significado incierto. Prob. Benigna: variable probablemente benigna.

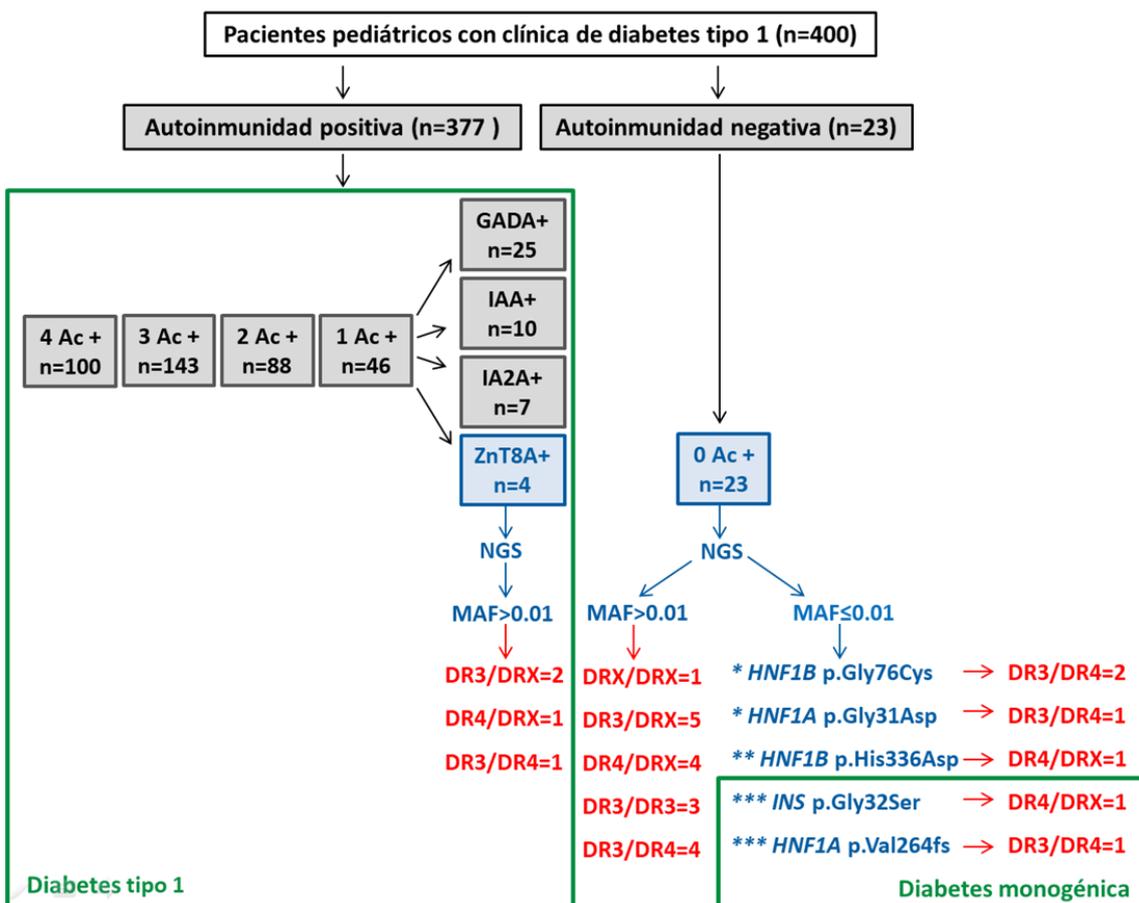
## 5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

A continuación, se muestra un esquema que resume los principales resultados obtenidos en los diferentes aspectos abordados a lo largo de la investigación (Figura 28). En gris se representan los resultados de la primera fase del trabajo relativa a la autoinmunidad. De los 400 pacientes pediátricos incluidos en el estudio, en el 94% de los casos (377/400) se detectó autoinmunidad. El 27% (100/377) presentó los cuatro autoanticuerpos positivos, el 38% (143/377) fue positivo para tres autoanticuerpos, el 23% (88/377) para dos y el 12% (46/377) presentó autoinmunidad para un solo autoanticuerpo. En este último grupo fueron cuatro pacientes los que presentaron autoinmunidad exclusiva para el ZnT8A. De toda la cohorte, sólo en el 6% (23/400) de los pacientes pediátricos con sospecha de diabetes tipo 1 no se detectó autoinmunidad.

En azul se representan los resultados de la segunda fase del trabajo referido al estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica. Se realizó el estudio genético mediante NGS a los 23 pacientes con autoinmunidad negativa y a los cuatro pacientes que sólo presentaron autoinmunidad para el ZnT8A. En seis de los 23 pacientes con autoinmunidad negativa, se encontraron cinco variantes raras diferentes ( $MAF \leq 0,01$ ). Dos de las variantes fueron clasificadas como probablemente benignas, una de ellas fue de significado incierto (VUS) y dos fueron clasificadas como patogénicas. Por tanto, el estudio genético demostró que al menos un 8% (2/23) de los pacientes pediátricos incluidos en el estudio con sospecha de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa, padecían, en realidad, una diabetes monogénica. En los cuatro pacientes con autoinmunidad positiva sólo para ZnT8A no se encontró ninguna variante sospechosa de diabetes monogénica, lo que corroboró el valor predictivo y diagnóstico del ZnT8A para la diabetes autoinmune.

En rojo se representan los resultados de la tercera fase del trabajo que valoró la utilidad del HLA-DRB1 como biomarcador para seleccionar los pacientes pediátricos con clínica de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa a los que hacer un estudio genético para descartar diabetes monogénica. Como se mostró en la tabla 18, la

comparación del genotipo HLA-DRB1 entre un grupo de pacientes con diabetes autoinmune y otro con diabetes monogénica, demostró que la presencia de dos alelos HLA-DRB1 de riesgo disminuye la probabilidad de que el tipo de diabetes sea monogénica. Sin embargo, los dos pacientes diagnosticados de diabetes monogénica en nuestra cohorte presentaron un alelo HLA-DRB1 de riesgo en uno de los casos y en el otro dos, lo que evidenció una escasa validez del HLA-DRB1, analizado de forma aislada, para diferenciar entre los dos tipos de diabetes. Esto podría deberse a que el perfil HLA-DRB1 de pacientes con diabetes monogénica no es diferente al de la población control, donde existe un bajo porcentaje de personas sanas con dos alelos HLA de riesgo (Tabla 19). Los resultados más relevantes del proceso de investigación quedan reflejados en el siguiente diagrama de flujo:



**Figura 28.** Resumen del proceso de investigación seguido en este trabajo y los resultados obtenidos. Ac: Autoanticuerpos; MAF: Frecuencia del alelo menos común. NGS: Secuenciación de nueva generación. \*Variante probablemente benigna; \*\*Variante de significado incierto (VUS); \*\*\*Variante patogénica.

## **VI. DISCUSIÓN**



## 1. EL AUTOANTICUERPO ZnT8A COMO NUEVO MARCADOR DE AUTOINMUNIDAD

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad crónica frecuente en pediatría (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014). Se trata de un trastorno autoinmune que causa la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas productoras de insulina, lo que conduce a una deficiencia absoluta de esta hormona en el paciente. Según los conocimientos actuales, el proceso de destrucción de las células productoras de insulina cursa con una inflamación linfocitaria de los islotes y estaría mediada por linfocitos T. Esta fase asintomática, conocida como prediabetes, se puede prolongar durante varios años, y en este periodo, la pérdida de tolerancia hacia la célula  $\beta$ -pancreática se pone de manifiesto por la presencia de autoanticuerpos circulantes en la sangre contra varias moléculas de los islotes pancreáticos en respuesta al proceso autoinmune (Regnell and Lernmark, 2017).

Hasta la fecha, la detección de autoanticuerpos es el mejor marcador predictivo y diagnóstico para la diabetes tipo 1 (Knip *et al.*, 2016; Lampasona and Liberati, 2016). Así, se han definido autoanticuerpos contra moléculas inespecíficas del islote de Langerhans (ICAs del inglés *Islet Cell Antibodies*) y autoanticuerpos que reconocen moléculas específicas del páncreas como la insulina (IAA), la enzima GAD<sub>65</sub> (GADA) y la tirosina fosfatasa (IA2A). Sin embargo, no todos los pacientes pediátricos con diabetes muestran evidencia de autoinmunidad frente a los marcadores clásicos mencionados anteriormente. El autoanticuerpo de más reciente identificación es el que reconoce al transportador de Zinc 8 (ZnT8), localizado en la membrana de los gránulos de secreción de insulina de la célula  $\beta$ -pancreática. Se ha propuesto como nuevo antígeno de autoanticuerpos en la diabetes mellitus tipo 1, sugiriendo su potencial como marcador predictivo y diagnóstico de diabetes autoinmune que complementaría los descubiertos previamente: IAA, GADA e IA2A (Wenzlau *et al.*, 2007).

El primer objetivo que se planteó en este estudio fue desarrollar la metodología del análisis del autoanticuerpo anti-ZnT8 (ZnT8A), con el propósito de mejorar la precisión del diagnóstico de diabetes tipo 1 en pediatría al incorporar un nuevo marcador de autoinmunidad.

La elección del método de análisis se basó en los resultados que se obtuvieron en la primera evaluación internacional de diferentes ensayos para la detección de autoanticuerpos anti-ZnT8 (Lampasona *et al.*, 2011), organizado por el programa de estandarización de detección de anticuerpos contra la diabetes, DASP (*Diabetes Antibody Standardization Program*). La metodología que consiguió mejor sensibilidad y especificidad en este estudio comparativo, y se consideró más adecuada para la práctica clínica, fue el radioinmunoensayo que utiliza como antígeno humano recombinante una construcción heterodimérica que incluye las dos variantes polimórficas del dominio carboxilo terminal del transportador de zinc 8 (Arg-Trp). Los buenos resultados obtenidos con este diseño de radioinmunoensayo, determinaron la elección de esta metodología para el análisis de los ZnT8A.

La participación en programas internacionales de estandarización de las técnicas de detección de anticuerpos contra los islotes pancreáticos ha sido interesante para evaluar la concordancia de nuestros resultados con los de los diferentes ensayos utilizados por los laboratorios participantes. Los resultados que se obtuvieron en el IASP (*Islet Autoantibody Standardization Program*) celebrado en 2018 para el radioinmunoensayo puesto a punto para la detección de ZnT8A fueron buenos, con una sensibilidad del 62% y una especificidad del 100% que supera la mediana de los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos por los ensayos evaluados en el *workshop* (Me = 60%; RIQ = 50 - 68% para la sensibilidad y Me = 98%, RIQ = 95 - 100% para la especificidad). Estos resultados ponen de manifiesto la calidad de nuestro método para analizar el ZnT8A en comparación con los otros laboratorios participantes.

La eficacia de los ensayos de IA2A y GADA, con unos valores de sensibilidad del 62 y 68% respectivamente, y una especificidad del 100% en ambos casos, es también acorde a la mediana de los valores de sensibilidad y especificidad de los ensayos evaluados en el IASP de 2018 (resultados, pág. 142).

En cuanto a los IAA, el volumen alto de suero que se necesita para el ensayo (600  $\mu$ l) imposibilita la participación en los programas de estandarización que facilitan un

volumen máximo de suero de 100 µl. No obstante, los resultados de la evaluación de ensayos para la determinación de IAA publicada en 2010, pone en evidencia que los mejores valores de sensibilidad y especificidad se alcanzan con técnicas manuales y no con kits comerciales (Schlosser *et al.*, 2010). La sensibilidad y especificidad de nuestra técnica manual, calculadas a partir de una validación interna del laboratorio con muestras de pacientes menores de 35 años al debut de diabetes, son de 60% y 100% respectivamente. Estos datos superan la mediana de los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos por los ensayos evaluados en el IASP de 2018 (Me = 34%; RIQ = 20 - 49% para la sensibilidad y Me = 97%, RIQ = 90-99% para la especificidad).

Tras la puesta a punto de la metodología del ZnT8A, se procedió a determinar la presencia de los cuatro autoanticuerpos en nuestra cohorte de pacientes. En primer lugar, y teniendo en cuenta la evidencia de que las hormonas sexuales afectan al sistema inmune (Gleicher and Barad, 2007), se examinó la posible influencia del sexo del paciente en la autoinmunidad presente al diagnóstico. Es un hecho conocido que algunas enfermedades autoinmunes son, por lo general, más frecuentes en mujeres que en hombres. Esta circunstancia, que aún está por explicar, ha sido atribuida a diferencias genéticas y/u hormonales que probablemente se manifiestan tras la pubertad (Gale and Gillespie, 2001; Gleicher and Barad, 2007). En nuestra cohorte, con una edad máxima de 16 años y un 36% de adolescentes (pacientes entre 11 y 16 años), la influencia de los hipotéticos factores hormonales no queda reflejada en una diferencia de la autoinmunidad entre ambos sexos, ya que no se encontraron diferencias significativas ni en la clase ni en el número de autoanticuerpos positivos al debut de la enfermedad.

Además, la proporción de niñas de la muestra fue de un 47%, lo que corrobora el hecho de que en la mayoría de las poblaciones pediátricas estudiadas (menores de 15 años), la proporción de hombres frente a mujeres en la incidencia de diabetes, está cercana a la unidad (Karvonen *et al.*, 2000; Gale and Gillespie, 2001). Este hallazgo contrasta con los resultados de incidencia obtenidos en la mayoría de poblaciones adultas de origen europeo estudiadas (de 15 a 44 años), en los que la proporción estimada hombre/mujer está alrededor del 1,5 (Gale and Gillespie, 2001). Este ligero

predominio masculino de la diabetes autoinmune podría ser debido a razones genéticas inherentes a las poblaciones y/u hormonales, pero no hay que descartar que sea una tendencia debida a que en adultos es difícil diferenciar la diabetes autoinmune de la diabetes tipo 2 que es más prevalente en los hombres por su mayor predisposición a la obesidad abdominal y a la resistencia a la insulina (Gale and Gillespie, 2001).

De los cuatro autoanticuerpos analizados, el ZnT8A fue el menos prevalente con un 57,3% de pacientes pediátricos que presentaron positividad para este autoanticuerpo al inicio clínico de la enfermedad. Cabe destacar la variabilidad que existe en las estimaciones de prevalencia de este autoanticuerpo en población pediátrica. Así, hay publicaciones que muestran valores semejantes al de nuestra cohorte, como es el caso de un estudio reciente en población francesa, que encuentra una prevalencia del 63,9% en niños en los que se analizó el ZnT8A en un periodo transcurrido desde el debut de la enfermedad menor de 6 meses (Garnier *et al.*, 2018). Del mismo modo, un estudio multicéntrico realizado en Italia estima una prevalencia del 61,1% en población pediátrica en el momento del diagnóstico de la diabetes (Fabris *et al.*, 2015). Otra publicación reciente, en este caso sobre población pediátrica turca, muestra un porcentaje de 58,6% de pacientes con ZnT8A positivo al debut (Elmaoğulları *et al.*, 2018), y un estudio realizado con la importante base de datos del registro finlandés de diabetes en pediatría (*Finnish Pediatric Diabetes Register*) hace una estimación de ZnT8A positivo al diagnóstico del 62,7% (Salonen *et al.*, 2013). Otros trabajos, sin embargo, muestran valores de prevalencia de ZnT8A ligeramente superiores al de nuestra cohorte, como es el caso del estudio llevado a cabo en la República Checa con una estimación del 72% (Petruzekova *et al.*, 2014), o un estudio de reciente publicación en población polaca, en el que la prevalencia de ZnT8A al debut de la diabetes en pediatría alcanza un 81,1% (Niechciał *et al.*, 2018). En cambio, en población pediátrica china es donde se han encontrado los valores de prevalencia para el ZnT8A más bajos, en torno a un 28% (Yang *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios en otras poblaciones asiáticas como la japonesa (Kawasaki, 2014), tailandesa (Trisorus *et al.*, 2018) e india (Shivaprasad *et al.*, 2014), encuentran valores de prevalencia del

ZnT8A en pediatría del 61%, 54,3% y 45% respectivamente, comparables al porcentaje obtenido en nuestra población española.

Asimismo, de acuerdo con trabajos publicados previamente (Wenzlau *et al.*, 2007; Salonen *et al.*, 2013), la prevalencia de ZnT8A mostró una correlación directa con la edad en el momento del diagnóstico, presentando los valores más elevados en la adolescencia. Por el contrario, la presencia de IAA fue mucho menor entre los pacientes con un inicio clínico de la enfermedad más tardío y, como ya se ha descrito previamente, son especialmente útiles entre pacientes que debutan en edades tempranas (Graham *et al.*, 2002; Wenzlau *et al.*, 2007). Sin embargo, los IAA presentan la desventaja de no poder ser utilizados en los pacientes que ya se encuentran en tratamiento con insulina, ya que esto implica la posible existencia de falsos positivos por la presencia de anticuerpos frente a la insulina exógena.

Al igual que en el caso de los ZnT8A, se encontró que la detección de GADA es más común en pacientes mayores que en pacientes más jóvenes, pero a diferencia de los ZnT8A, la variabilidad en las frecuencias fue mucho menor, lo que le da la ventaja de presentar una prevalencia mayor que el ZnT8A en todo el intervalo de edad considerada en este estudio. Esta tendencia está de acuerdo con otros estudios realizados en caucásicos (Graham *et al.*, 2002; Plagnol *et al.*, 2011) pero difiere de los resultados obtenidos en poblaciones asiáticas (Cheng *et al.*, 2018) donde no se han descrito correlaciones del GADA con la edad al diagnóstico.

Respecto al autoanticuerpo IA2A, no se detectó ninguna relación entre su presencia y la edad de inicio de la diabetes. Esto le otorga la ventaja, junto con los GADA, de ser detectados con una frecuencia estable, en torno al 67%, durante toda la edad pediátrica. En cambio, otras publicaciones describen correlaciones de IA2A con la edad al diagnóstico tanto positivas (Plagnol *et al.*, 2011) como negativas (Graham *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2018). Estas discrepancias encontradas entre las prevalencias de los autoanticuerpos podrían ser la consecuencia de las diferencias que existen entre los trabajos publicados, no sólo en la precisión de la metodología utilizada para la determinación de los autoanticuerpos y del tiempo transcurrido desde el debut de la

enfermedad hasta el análisis, sino también en las diferentes características de las poblaciones analizadas. De hecho, las diferencias encontradas en la respuesta autoinmune contra la célula  $\beta$ -pancreática en las personas con diabetes tipo 1, podrían ser el reflejo de una etiopatogenia variable de la enfermedad en la que la edad y el origen étnico juegan un papel importante (Grulich-Henn and Klose, 2018).

A la vista de los resultados obtenidos, la combinación de ensayos más efectiva para el diagnóstico de diabetes tipo 1 en nuestra población pediátrica, no depende del sexo del paciente, pero sí de la edad al diagnóstico. Así, atendiendo a los resultados de prevalencia de autoanticuerpos en los diferentes grupos de edad al diagnóstico considerados, se observa que la sensibilidad de las cuatro técnicas en conjunto, supera la sensibilidad de cualquier combinación de dos o tres ensayos, excepto para las edades de diagnóstico más tempranas donde la incorporación del ensayo ZnT8A a los tres ensayos clásicos no mejora el porcentaje de diagnósticos positivos que es de un 95,6%.

Es precisamente en el grupo de menor edad donde el porcentaje de detección de autoinmunidad es mayor, y donde las combinaciones de ensayos más efectivas son diferentes respecto al resto de edades consideradas. Así, por ejemplo, el autoanticuerpo GADA es más importante tenerlo en cuenta a partir de los 6 años de edad que en edades más tempranas, ya que en los grupos de mayor edad se consigue un porcentaje de autoinmunidad positiva superior al 75% con el análisis exclusivo de este autoanticuerpo. Sin embargo, en la franja de edad más joven tiene más importancia el autoanticuerpo IAA que el GADA, ya que un análisis aislado de IAA permite el diagnóstico del 81% de los pacientes, superando a combinaciones de dos autoanticuerpos como ZnT8A con IA2A o ZnT8A con GADA.

Realmente, el ZnT8A en las edades tempranas tiene una aportación débil al despistaje de diabetes tipo 1, muy diferente a la contribución del ZnT8A en los mayores de 11 años donde el análisis exclusivo de este autoanticuerpo permite la detección de autoinmunidad en un 71% de los pacientes, valor equiparable al del GADA. En el grupo de mayor edad, la incorporación del análisis del ZnT8A a los tres anticuerpos clásicos,

permite mejorar la detección de autoinmunidad al debut de un 93,8% a un 94,5%. En el grupo de edad intermedio, entre 6 y 11 años, la incorporación del análisis del ZnT8A, también permite mejorar la detección de autoinmunidad al debut de un 92,7% a un 93,3%.

Los cuatro pacientes con ZnT8A positivo que fueron negativos para el resto de anticuerpos analizados, representan un 15% de pacientes (4/27) que fueron diagnosticados correctamente de diabetes tipo 1 gracias al análisis del ZnT8A. Este resultado es comparable al de otros estudios que confirman porcentajes entre el 13% y el 26% (Wenzlau *et al.*, 2007; Vermeulen *et al.*, 2011; Elmaoğulları *et al.*, 2018). Asimismo, la incorporación del nuevo autoanticuerpo al despistaje de diabetes tipo 1, reduce el número de pacientes con un solo autoanticuerpo positivo de un 18,5% (74/400) a un 11,5% (46/400). La reducción es mayor entre pacientes de mayor edad al diagnóstico, de 23,4% (34/145) a un 13,8% (20/145), que entre los pacientes menores de 6 años, de 14,3% (13/91) a un 11% (10/91). Por lo tanto, la inclusión del ZnT8A aporta no solo una mayor sensibilidad diagnóstica, sino también una mayor seguridad en el diagnóstico de diabetes tipo 1, ya que ser positivo a dos autoanticuerpos diferentes es una condición extremadamente rara en ausencia de esta patología (Vermeulen *et al.*, 2011). Por lo tanto, añadir el ZnT8A al conjunto tradicional de autoanticuerpos asociados a la diabetes debería tenerse en cuenta para mejorar la detección de la autoinmunidad, especialmente en adolescentes.

## 2. VARIANTES GENÉTICAS IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON AUTOINMUNIDAD NEGATIVA

Diferentes trabajos de investigación sobre pacientes pediátricos con diabetes, indican que entre el 2 y el 18% de los niños y adolescentes con una clínica compatible con diabetes tipo 1, no muestra evidencia de autoinmunidad al inicio de la enfermedad (Wang *et al.*, 2007; Andersson *et al.*, 2014; Knip *et al.*, 2016; Verkauskiene *et al.*, 2016). Nuestro estudio, con un 6% (23/400) de pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de diabetes tipo 1 y autoinmunidad indetectable, corrobora estos resultados. Teniendo en cuenta que la mayor parte de las características clínicas de la diabetes monogénica no son específicas, y que se estima que un alto porcentaje de casos permanecen sin diagnosticar, el siguiente objetivo del presente trabajo fue investigar la posible existencia de diabetes monogénica entre los pacientes con estas características específicas de nuestra cohorte. Para ello, mediante la tecnología de secuenciación masiva (NGS), pusimos a punto un panel de secuenciación que incluye los doce genes más relevantes asociados con diabetes monogénica. Los resultados de la validación analítica del panel muestran buenos valores de sensibilidad (98%), especificidad (96%) y reproducibilidad (100%) para cambios puntuales y pequeñas inserciones-deleciones, lo que nos permite utilizar esta tecnología con fiabilidad para el estudio genético de los pacientes en los que no se detectó autoinmunidad. El valor bajo de sensibilidad (86%) que se estima para la detección de CNVs hace que optemos por la tecnología MLPA para detectar este tipo de cambios.

Se realizó el estudio genético a los 23 pacientes con autoinmunidad negativa de nuestra cohorte, y se descubrió en seis pacientes cinco variantes raras diferentes en heterocigosis. Al menos dos de las variantes encontradas fueron claramente alteraciones patogénicas responsables de diabetes monogénica: p.Gly32Ser en el gen *INS* y p.Val264fs en el gen *HNF1A*. Por tanto, se identificó una diabetes monogénica en al menos el 8% (2/23) de los pacientes pediátricos con clínica de diabetes tipo 1 y autoinmunidad negativa. Otros estudios publicados con enfoques diferentes, han estimado una prevalencia comparable a la de nuestra cohorte (Rubio-Cabezas *et al.*, 2009; Gandica *et al.*, 2015; Johansson *et al.*, 2017; Ushijima *et al.*, 2018).

La variante patogénica p.Gly32Ser localizada en el gen *INS*, se trata de un cambio que ha sido descrito previamente tanto en pacientes con diabetes neonatal permanente (Stoy *et al.*, 2007) como en pacientes con un inicio de diabetes durante la infancia, la adolescencia o en la edad adulta (Bonfanti *et al.*, 2009; Brahm *et al.*, 2016; Wasserman *et al.*, 2016). El cambio sólo se encontró en el índice de la familia y en este caso el hallazgo genético no contribuyó a cambiar el tratamiento del paciente.

Por otro lado, la variante p.Val264fs, localizado en el gen *HNF1A*, se trata de un cambio no descrito hasta el momento en la literatura. Tres miembros de la familia con diabetes fueron portadores de la misma variante patogénica: el índice, su madre y su hermano menor. El hallazgo genético permitió ajustar el tratamiento de la madre con sulfonilureas y prescribir también sulfonilureas al hermano menor desde el inicio de la enfermedad. Simultáneamente, se cambió el tratamiento del índice de insulina a antidiabéticos orales. La madre y el hermano menor demostraron una respuesta satisfactoria al tratamiento. Sin embargo, el índice, debido al aparente incumplimiento de la terapia, mostró un control de la diabetes inestable.

En relación a la variante p.His336Asp localizada en el gen *HNF1B*, no está claro que sea responsable de la diabetes en el paciente, ya que los datos publicados sobre esta variante no muestran pruebas claras de patogenicidad (Weber *et al.*, 2006; Karges *et al.*, 2007). Asimismo, en una publicación reciente se ha clasificado como una variante de significado incierto (Nicolaou *et al.*, 2016). Es importante tener en cuenta que la categorización de una variante en el momento del diagnóstico está basada, fundamentalmente, en los registros de las bases de datos consultadas y en la literatura disponible en el momento de la realización del estudio. En revisiones posteriores, la identificación recurrente de una variante, variaciones en la frecuencia poblacional o nuevos datos sobre la funcionalidad de un gen pueden ser determinantes para su reclasificación.

Las otras dos variantes raras encontradas, p.Gly31Asp en el gen *HNF1A* y p.Gly76Cys en el gen *HNF1B*, han sido recientemente reclasificadas como posibles polimorfismos (Chambers *et al.*, 2016). Aunque el cambio p.Gly31Asp se describió previamente en la

literatura asociado a diabetes monogénica (Chèvre *et al.*, 1998), actualmente se cuestiona la patogenicidad de esta variante atendiendo, por un lado, a la frecuencia alélica de esta variante en la población general europea (Colclough *et al.*, 2013; Flannick *et al.*, 2013) y, por otro lado, a los estudios funcionales realizados que no demuestran un claro deterioro de la funcionalidad de la proteína (Najmi *et al.*, 2017). Además, nuestro estudio familiar mostró que la variante la heredó el índice de su madre sana. Por lo tanto, en base a esta información, interpretamos la variante p.Gly31Asp como una variante probablemente benigna.

La situación es similar en el caso de la variante p.Gly76Cys localizada en el gen *HNF1B* que, aunque se describió inicialmente en la literatura asociada a diabetes monogénica (Bellanné-Chantelot *et al.*, 2005), se ha encontrado recientemente con una frecuencia del 0,5% en población española sana (Dopazo *et al.*, 2016) y superior al 8% en población norteafricana (Faguer *et al.*, 2011; Madariaga *et al.*, 2013). Esta frecuencia alélica es superior a la esperada para una variante patogénica, teniendo en cuenta la baja prevalencia estimada de diabetes monogénica en la población. Además, nuestro estudio familiar mostró que los progenitores sanos eran portadores de la variante, por lo que de acuerdo a esta información interpretamos la p.Gly76Cys como una variante probablemente benigna.

Por otra parte, nuestro estudio proporciona una evidencia adicional de que las variantes patogénicas en el gen *INS* y en los genes que codifican proteínas que actúan como factores de transcripción hepato-nucleares (HNF), juegan un papel decisivo en pacientes pediátricos con diabetes insulino dependiente y anticuerpos negativos. Asimismo, no se encontró ninguna variante patogénica en el gen *GCK* a pesar de que las variantes patogénicas en heterocigosis en este gen son las más prevalentes en la diabetes monogénica. No es un resultado inesperado, ya que estas variantes provocan una diabetes moderada que no coincide con las características clínicas típicas de la diabetes tipo 1 en las que se centró nuestro estudio.

Aparte de realizar el estudio genético a los 23 pacientes con autoinmunidad negativa, también se realizó en los cuatro pacientes en los que sólo se detectó el ZnT8A positivo.

La ausencia de variantes patogénicas en estos cuatro pacientes, apoya los datos recientemente publicados que confirman que el ZnT8A es otro autoanticuerpo que sirve para identificar una diabetes autoinmune (Patel *et al.*, 2018).

En la actualidad, la medición de autoanticuerpos al debut se considera el mejor biomarcador para discriminar entre diabetes tipo 1 y monogénica (McDonald *et al.*, 2011; Carlsson *et al.*, 2020). No obstante, no podemos asegurar que no haya diabetes monogénica entre los pacientes pediátricos con autoinmunidad positiva en el momento del diagnóstico. De hecho, hay descritos casos aislados de pacientes en los que coexisten diferentes tipos de diabetes (Ortega-Rodríguez *et al.*, 2001; Bowden and Hoffman, 2008; Calcaterra *et al.*, 2012; Maltoni *et al.*, 2012; Urbanová *et al.*, 2013). Sin embargo, teniendo en cuenta tanto nuestra propia experiencia como resultados de estudios publicados recientemente (McDonald *et al.*, 2011; Johnson, Ellis, *et al.*, 2019; Carlsson *et al.*, 2020), el porcentaje de pacientes con autoinmunidad positiva y diagnóstico molecular de diabetes monogénica está en torno al 1%, el mismo que el esperado en la población control. En contraste con estos resultados, un trabajo a gran escala realizado en población alemana y austriaca sobre características clínicas de pacientes pediátricos con MODY y con diabetes tipo 2, encuentra una prevalencia de autoanticuerpos positivos en pacientes con MODY del 17% (Schober *et al.*, 2009). Este dato podría estar sobreestimado ya que en este trabajo el diagnóstico de MODY no está confirmado por pruebas genéticas en el 20% de los pacientes estudiados. Por tanto, es muy probable que los pacientes con autoinmunidad positiva de este estudio, sufran realmente una diabetes tipo 1 y no una monogénica.

Otro hallazgo importante de este trabajo de investigación, es que los datos clínicos y analíticos de los pacientes con diabetes y sin autoinmunidad detectable en nuestra cohorte apoyaron el diagnóstico de diabetes tipo 1 y, salvo por la ausencia de autoanticuerpos, no sugerían específicamente una diabetes monogénica.

El péptido C es una corta cadena de 31 aminoácidos que forma parte de la molécula de proinsulina. En el procesamiento de la proinsulina a insulina, es escindido y liberado a la sangre por la célula  $\beta$ -pancreática junto con la Insulina en cantidades

equimoleculares. Por esta razón, su medición es ampliamente utilizada como medida del funcionamiento de la célula  $\beta$ -pancreática del paciente con diabetes. Así, los valores bajos en suero de péptido C medido en ayunas al inicio de la enfermedad (menores de 0,2 nmol/l) denotan una baja producción endógena de insulina y se correlacionan con una diabetes tipo 1 (Leighton, Sainsbury and Jones, 2017). En nuestra cohorte, el 55% (11/20) de los niños con autoinmunidad negativa tuvieron niveles bajos de péptido C junto con hiperglucemia en el momento del diagnóstico. La presencia de niveles ligeramente más altos en el resto de los pacientes podría estar relacionada con una mayor reserva pancreática al inicio de la enfermedad. En una publicación reciente, se ha propuesto que la presencia de péptido C en suero medido al azar transcurridos más de 6 meses desde el diagnóstico, puede ser un buen marcador para identificar, entre los pacientes con diabetes sin autoinmunidad detectable, los posibles casos a los que se debería de realizar un estudio genético para descartar MODY (Majidi *et al.*, 2018). No obstante, el período en el que un paciente pediátrico puede disponer de reserva pancreática después del diagnóstico de la diabetes puede prolongarse hasta más de 6 años (Sørensen *et al.*, 2013; Shields *et al.*, 2018) lo que puede interferir en la interpretación de los resultados del análisis de péptido C y sospechar de una forma monogénica de diabetes cuando realmente no lo es.

Por otro lado, sólo se encontró entre los participantes dos pacientes con obesidad (pacientes 2 y 8) en los que se podría haber sospechado que padeciesen una diabetes tipo 2. Sin embargo, la probabilidad de que se hubiese tratado de una diabetes tipo 2 se descartó ya que es una enfermedad muy poco frecuente en pediatría en caucásicos (Aguayo *et al.*, 2013; Reinehr, 2013). Ambos pacientes eran caucásicos, con padres sanos, con síntomas claros de diabetes en el momento del diagnóstico, niveles no demasiado altos de péptido C y ninguna evidencia clínica o analítica de resistencia a la insulina. Además, uno de ellos tenía tiroiditis autoinmune.

Aunque la ausencia de autoanticuerpos pancreáticos positivos sugiere una diabetes monogénica, atendiendo a los datos clínicos y analíticos de los pacientes en los que no pudimos detectar autoinmunidad, no se debe descartar definitivamente un

diagnóstico de diabetes tipo 1. Es posible que en estos pacientes exista una respuesta autoinmune contra antígenos de las células  $\beta$ -pancráticas no identificados hasta el momento (Massa *et al.*, 2013; Andersson *et al.*, 2014) o incluso en algunos pacientes con autoinmunidad levemente positiva, ésta podría no haber sido detectada por un problema de sensibilidad de los ensayos. Este error se minimizó en nuestro estudio gracias a la medición combinada de cuatro anticuerpos pancreáticos para el diagnóstico, logrando una tasa de detección de autoinmunidad del 94,3% al inicio de la enfermedad comparable a la mayor parte de los estudios sobre diabetes tipo 1 en pediatría reseñados en la literatura (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014).

Un hallazgo interesante relacionado con los datos clínicos fue que, entre los pacientes con autoinmunidad negativa, se encontró un número de casos significativamente menor de cetoacidosis en el momento del diagnóstico, lo que reflejó un comienzo menos agresivo de la diabetes en este subconjunto de pacientes. Los factores que intervienen en el desarrollo de la cetoacidosis aún no están claros. Una publicación reciente ha encontrado una correlación directa entre el número de autoanticuerpos positivos y la gravedad de la cetoacidosis (Niechciał *et al.*, 2018), lo que apoyaría la relación de este parámetro con la intensidad de la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas. Igualmente, otros trabajos han encontrado un mayor riesgo de cetoacidosis asociado a diferentes autoanticuerpos específicos (Niechciał *et al.*, 2018; Vicinanza *et al.*, 2019). Sin embargo, la mayoría de los datos publicados no encuentran diferencias en las tasas de cetoacidosis y la presencia o ausencia de autoinmunidad (Östman *et al.*, 2000; Bravis *et al.*, 2018), lo que corroboraría más la relación de la cetoacidosis con el diagnóstico tardío que con la expresión de la antigenicidad.

Aparte de la cetoacidosis, menos presente en pacientes con autoinmunidad negativa, nuestro estudio no tuvo la capacidad de encontrar otras diferencias clínicas entre pacientes con autoinmunidad positiva y negativa, y entre portadores y no portadores de variantes patogénicas, probablemente debido al reducido número de pacientes con estas características particulares.

### 3. EL HLA-DRB1 COMO MARCADOR EN LA SELECCIÓN DE PACIENTES A LOS QUE REALIZAR UN ESTUDIO GENÉTICO PARA DESCARTAR DIABETES MONOGENICA

La etiología de la diabetes tipo 1 es hasta el momento desconocida, pero las evidencias acumuladas durante los últimos años apuntan hacia un origen multifactorial de la enfermedad, en la que estarían involucrados tanto factores genéticos como ambientales. Aunque presenta un patrón de herencia poligénico desconocido, se sabe que los genes con mayor influencia en la susceptibilidad a desarrollar esta patología están localizados en el cromosoma 6, en concreto, en la región HLA que codifica los antígenos leucocitarios humanos (Atkinson, Eisenbarth and Michels, 2014). Teniendo en consideración este hecho, se planteó como último objetivo del trabajo valorar la utilidad del genotipo HLA-DRB1 como marcador que ayude a seleccionar, entre los pacientes pediátricos con diabetes y autoinmunidad negativa, a los que se podrían beneficiar de un estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica y, de esta forma, evitar hacer estudios genéticos innecesarios.

Es un hecho bien documentado que los alelos HLA de clase II se asocian a la diabetes tipo 1, pero las variaciones significativas en las frecuencias de los alelos HLA entre diferentes poblaciones, hace que la asociación con la diabetes tipo 1 sea diferente entre los grupos étnicos. Como consecuencia, la evaluación del riesgo a la enfermedad en poblaciones afroamericanas (Noble *et al.*, 2013), difiere de la evaluación del riesgo en poblaciones europeas (Erich *et al.*, 2008) o en poblaciones asiáticas (Ikegami *et al.*, 2008). Por ejemplo, el haplotipo “DR3” específico africano, DRB1\*0302-DQA1\*0401-DQB1\*0402, que es protector para la diabetes tipo 1 en esta población, contrasta con el común y altamente susceptible “DR3” en caucásicos, DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201. En asiáticos, la baja frecuencia de los haplotipos DRB1\*0301-DQB1\*0201 y DRB1\*0401-DQB1\*0302 fuertemente asociados a diabetes tipo 1 en caucásicos, no dan susceptibilidad a diabetes, mientras que los haplotipos DRB1\*0405-DQB1\*0401 y DRB1\*0901-DQB1\*0303, prácticamente ausentes en caucásicos, contribuyen a la susceptibilidad a diabetes tipo 1 en esta población.

Asimismo, el riesgo que confiere el *locus* DRB1 puede estar influenciado por la variación alélica en otros *loci* HLA (fenómeno conocido en genética como interacción epistática). Esta interacción se pone en evidencia en un trabajo publicado en 2008 por Erlich *et al.* en el que mediante un estudio de asociación tipo AFBAC con 607 familias, se determinan los haplotipos HLA de riesgo (DRB1-DQA1-DQB1) en caucásicos (Erlich *et al.*, 2008). Así, el análisis de asociación muestra que el haplotipo DRB1\*0401-DQA1\*0301-DQB1\*0302 presenta una OR de 8,3 a favor de la diabetes tipo 1, mientras que el DRB1\*0401-DQA1\*0301-DQB1\*0301 presenta una OR de 0,35. Ambos haplotipos se diferencian en el alelo DQB1, por lo tanto, el DQB1\*0302 es un alelo que de alguna forma modula la susceptibilidad del DRB1\*0401. Sin embargo, al comparar el riesgo del haplotipo DRB1\*0401-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (OR = 8,3) con el haplotipo DRB1\*0403-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (OR = 0,27), que sólo se diferencian en el alelo DRB1, constata el riesgo que confieren los alelos DRB1. Estas comparaciones evidencian la importancia de ambos alelos DRB1 y DQB1 para determinar el riesgo de diabetes tipo 1.

Teniendo en cuenta estos aspectos, el primer paso que se dio para valorar la utilidad del genotipo HLA-DRB1 como marcador diferenciador de diabetes en pediatría, fue el de identificar los alelos HLA-DRB1 asociados a diabetes tipo 1 en nuestra cohorte. Este estudio se ha centrado exclusivamente en la susceptibilidad que confiere el *locus* HLA-DRB1 sin tener en cuenta la posible acción epistática de otros genes ligados a él. No obstante, se ha llevado a cabo una caracterización molecular de alta resolución que ha permitido diferenciar los alelos que incluye cada grupo genérico y que pueden presentar diferente grado de susceptibilidad.

El análisis de los resultados del estudio de asociación tipo AFBAC en nuestra cohorte, apoyaron la asociación con la diabetes tipo 1 de los alelos DR3 y DR4 descrita en poblaciones caucásicas (Erlich *et al.*, 2008). En el caso del grupo genérico DR3 solamente se detectó un alelo, el \*0301, situación muy diferente a la del grupo DR4 en la que la caracterización de alta resolución diferenció siete alelos. La comparación de cada alelo DR4 frente al resto de alelos dentro del mismo grupo genérico, puso en evidencia el comportamiento atípico del alelo DRB1\*0403 que no se asoció al

desarrollo de diabetes, como ya se ha descrito previamente en otras poblaciones caucásicas (Escribano-De-Diego *et al.*, 1999; Erlich *et al.*, 2008; Soria *et al.*, 2008). Otros alelos que también estuvieron más representados en el grupo de alelos no-diabéticos fueron el \*0407 y el \*0411 pero, a diferencia del alelo \*0403, las diferencias no presentaron significación estadística, posiblemente debido a la escasa representación que tuvieron estos alelos en nuestra cohorte. El resto de los alelos DR4, \*0401, \*0402, \*0404 y \*0405 estuvieron más representados en el grupo de alelos diabéticos. En nuestro estudio, que sólo implica al *locus* DRB1, no se pudo diferenciar el haplotipo DRB1\*0401-DQA1\*0301-DQB1\*0301 que no confiere susceptibilidad en caucásicos (Erlich *et al.*, 2008). Sin embargo, entre todos los alelos DR4 de nuestra cohorte, es precisamente el \*0401 el que mostró una mayor asociación con la enfermedad, por lo que es posible que el haplotipo DRB1\*0401-DQA1\*0301-DQB1\*0301 esté poco representado en nuestra muestra poblacional.

Tras definir los alelos de riesgo en nuestra cohorte, se procedió a la comparación de las frecuencias de los genotipos HLA-DRB1 entre pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 y pacientes con diabetes monogénica. Los resultados de la comparación mostraron diferencias significativas. Los genotipos HLA-DRB1 con dos alelos de riesgo (DR3 y/o DR4) fueron considerablemente más frecuentes en pacientes con diabetes autoinmune que en pacientes con diabetes monogénica y, al contrario, la proporción de genotipos HLA-DRB1 sin alelos de riesgo (ni DR3, ni DR4) fue marcadamente inferior en pacientes con diabetes tipo 1. Por otro lado, la distribución de los genotipos HLA-DRB1 fue similar entre los pacientes con diabetes monogénica y la población control. Este hecho demuestra que, a diferencia de la diabetes tipo 1, el desarrollo de las formas monogénicas de diabetes no está asociado con el genotipo HLA-DRB1 del paciente.

Estos resultados sugirieron que podría ser interesante genotipar el HLA-DRB1 de un paciente con diabetes y autoinmunidad negativa antes de plantear un estudio genético orientado a descartar alguna variante patogénica causante de su enfermedad. Así, teniendo en cuenta las diferencias anteriormente señaladas, lo más probable es que el paciente con dos alelos HLA-DRB1 de riesgo haya desarrollado una diabetes tipo 1

aunque no se haya podido detectar la autoinmunidad y, por tanto, la prueba genética no debería realizarse, salvo que lo indicaran otros datos clínicos y/o analíticos disponibles. Del mismo modo, la ausencia de alelos HLA-DRB1 de riesgo en el paciente, indicaría que es más probable que se trate de una diabetes monogénica y, por tanto, sería conveniente proponer un estudio genético para completar el diagnóstico. La presencia de un único alelo de riesgo no es una característica suficiente para diferenciar entre ambos tipos de diabetes ya que, aunque la presencia de este genotipo es mayor en la diabetes autoinmune, está presente también de una manera significativa en la diabetes monogénica.

El genotipado del HLA-DRB1 en los 23 pacientes con autoinmunidad negativa detectados en nuestra cohorte, no muestra diferencias en el perfil HLA entre los que tienen una diabetes monogénica confirmada (2 casos) y los que no la tienen (21 casos). De hecho, el paciente que porta una variante patogénica en el gen *INS* tiene un alelo HLA-DRB1\*04 de riesgo y otro HLA-DRB1\*06 que no da riesgo (0405/1401), y el portador de la variante patogénica en el gen *HNF1A* tiene dos alelos HLA-DRB1 de riesgo, un HLA-DRB1\*03 y un HLA-DRB1\*04 (0301/0402). Por tanto, a pesar de la diferencia claramente demostrada del perfil HLA entre la diabetes autoinmune y la monogénica, a la vista de los resultados obtenidos en nuestra cohorte, la eficacia del HLA-DRB1 considerado de forma aislada para seleccionar, entre los pacientes con clínica de diabetes tipo 1 y autoinmunidad no detectable, a quiénes hacer un estudio genético para descartar una forma monogénica de diabetes, es muy débil. Esto podría deberse a que el perfil HLA-DRB1 de pacientes con diabetes monogénica no es diferente al de la población control, donde existe un bajo porcentaje de personas sanas con dos alelos HLA de riesgo. No obstante, como la presencia de dos alelos de riesgo HLA-DRB1 aumenta la probabilidad de desarrollar diabetes autoinmune, no podemos descartar la posibilidad de que el paciente portador de la variante patogénica en *HNF1A*, que además tiene dos alelos de riesgo HLA-DRB1, pueda también desarrollar diabetes autoinmune en el futuro. De hecho, hay descritos casos aislados de pacientes en los que coexisten diferentes tipos de diabetes (Ortega-Rodríguez *et al.*, 2001; Bowden and Hoffman, 2008; Calcaterra *et al.*, 2012; Maltoni *et al.*, 2012; Urbanová *et al.*, 2013).

Además, es importante tener en cuenta que en nuestra cohorte el tamaño de la muestra es insuficiente para poder confirmar o desestimar la utilidad del HLA-DRB1 como biomarcador en este tipo de pacientes, y es probable que la escasa validez del marcador que se ha encontrado en este estudio concreto sea el reflejo del pequeño tamaño de la muestra. Un estudio de reciente publicación, aunque también con un reconocido tamaño de muestra insuficiente, corrobora nuestro resultado (Majidi *et al.*, 2018). En consecuencia, se puede deducir que es de suma importancia no considerar la información del genotipo HLA-DRB1 de un paciente de una forma aislada, sino que siempre hay que tener en cuenta todos los datos clínicos y analíticos disponibles para apoyar la decisión de incluir o no al paciente en un estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica.

Igualmente, para el correcto uso del HLA como marcador para seleccionar pacientes a los que hacer un estudio genético, es también muy importante tener en cuenta la posible existencia de diabetes tipo 2 en la población, ya que es poco probable que el HLA-DRB1 pueda desempeñar algún papel en la discriminación entre diabetes monogénica y diabetes tipo 2. Los resultados de este estudio se pueden extrapolar a otras poblaciones pediátricas caucásicas, porque la prevalencia actual de diabetes tipo 2 en población juvenil caucásica es muy baja (Bahillo-Curieses *et al.*, 2012; Aguayo *et al.*, 2013). Sin embargo, este marcador debe aplicarse con cautela al considerar otros grupos étnicos o poblaciones adultas donde la diabetes tipo 2 es más prevalente. Además, no hay que olvidar el aspecto comentado al comienzo de este apartado de la discusión y es que las frecuencias de los alelos HLA varían entre etnias lo que puede hacer que la asociación con la diabetes de tipo 1 no sea la misma dependiendo de la población estudiada.

#### 4. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal fortaleza de este estudio es la buena caracterización de la cohorte de 400 pacientes pediátricos con diabetes tipo 1 basada en la combinación de cuatro ensayos de autoanticuerpos, el principal marcador de autoinmunidad descrito hasta el momento. Los ensayos están validados en programas de estandarización internacionales con buenos resultados de sensibilidad y especificidad. Este hecho nos permitió definir con precisión el grupo de pacientes con autoinmunidad negativa que fue el objetivo principal de la prueba molecular.

Otro aspecto que le da solidez a los resultados es el enfoque que se dio al estudio genético utilizando nuevas tecnologías de secuenciación masiva, lo que permitió extender la búsqueda de variantes genéticas a los doce genes más frecuentes relacionados con diabetes monogénica. Sin embargo, no se excluye por completo la posibilidad de que entre los pacientes con autoinmunidad negativa pueda haber alguno que sea portador de una variante patogénica en otro gen conocido que no haya sido incluido en el panel, o incluso en algún otro gen que aún no haya sido identificado como causante de una diabetes monogénica.

En resumen, en este estudio se demuestra que el ZnT8A es un autoanticuerpo a tener en cuenta para mejorar el diagnóstico de la diabetes autoinmune en pediatría, especialmente en adolescentes. Asimismo, un hallazgo de suma importancia es que al menos el 8% de los pacientes pediátricos con sospecha de padecer una diabetes tipo 1 pero con autoinmunidad indetectable, tienen realmente una diabetes monogénica y pueden beneficiarse de un tratamiento personalizado y de un adecuado consejo genético que defina el riesgo que tienen las generaciones posteriores de padecer la enfermedad.

Es importante resaltar que los dos pacientes de nuestra cohorte diagnosticados de diabetes monogénica tras el estudio genético, habían sido previamente diagnosticados de diabetes tipo 1. En estos dos casos particulares, salvo por la ausencia de autoinmunidad, ni los datos clínicos ni el HLA-DRB1 ayudaron a diferenciar la diabetes

monogénica. De hecho, ambos pacientes portaban alelos HLA-DRB1 de riesgo para diabetes tipo 1, en un caso un alelo de riesgo (DR4/DRX) y en el otro dos (DR3/DR4). Esta situación peculiar nos permite tener una idea de la importancia de no considerar la información del genotipo HLA-DRB1 de una forma aislada, sino que siempre hay que evaluar todos los datos clínicos y analíticos disponibles para apoyar la decisión de incluir o no al paciente en un estudio genético orientado al diagnóstico de diabetes monogénica, y así poder beneficiar al paciente del correcto diagnóstico de la enfermedad. De todas formas, ante la imposibilidad de diferenciar eficazmente en el momento del diagnóstico una diabetes monogénica con los biomarcadores hasta ahora conocidos, en todos los pacientes pediátricos con diabetes y autoinmunidad negativa para los cuatro autoanticuerpos (IAA, GADA, IA2A y ZnT8A analizados al debut con técnicas debidamente estandarizadas), podría plantearse hacer un estudio genético para descartar una forma monogénica de diabetes.

## **VII. CONCLUSIONES**



1. El radioinmunoensayo desarrollado en este trabajo para la detección del autoanticuerpo ZnT8A presenta una buena relación de sensibilidad y especificidad, comparable a las de los ensayos evaluados en el programa internacional de estandarización de autoanticuerpos celebrado en 2018, lo que demuestra la validez de nuestra técnica.
2. La incorporación del análisis de ZnT8A al conjunto tradicional de autoanticuerpos empleados para la detección de autoinmunidad incrementa la sensibilidad diagnóstica de la diabetes tipo 1, especialmente en adolescentes. En esta franja de edad el ZnT8A es el segundo autoanticuerpo más prevalente.
3. El autoanticuerpo ZnT8A puede ser un buen marcador de autoinmunidad en los niños mayores y los adolescentes, ya que su frecuencia muestra una correlación directa con la edad al diagnóstico, de forma similar a los GADA y contraria al patrón detectado en los IAA, que son más prevalentes en los niños de menor edad. La frecuencia de IA2A positivo no varía con la edad al diagnóstico de la diabetes.
4. La utilización combinada de los cuatro ensayos de detección de autoanticuerpos (IAA, GADA, IA2A y ZnT8A) permite detectar autoinmunidad, con una especificidad del 100%, en un 94% de la población pediátrica con diabetes.
5. Respecto a la tecnología de secuenciación masiva desarrollada para el diagnóstico de diabetes monogénica, el panel de genes ha demostrado ser un método eficiente y fiable en el diagnóstico de esta patología, con una buena sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para cambios puntuales y pequeñas inserciones o deleciones.
6. Al menos un 8% de pacientes pediátricos con sospecha de diabetes tipo 1 y autoinmunidad indetectable es portador de una variante patogénica en heterocigosis causante de diabetes monogénica. El conocimiento de la etiología de

la enfermedad, ha permitido personalizar el tratamiento y realizar un adecuado consejo genético. Asimismo, la ausencia de variantes patogénicas en los cuatro pacientes con solo ZnT8A positivo, confirma que el ZnT8A es otro autoanticuerpo con valor predictivo y diagnóstico en la diabetes autoinmune.

7. En niños y adolescentes caucásicos la presencia de dos alelos HLA-DRB1 de riesgo aumenta la probabilidad de desarrollar una diabetes autoinmune y su ausencia la disminuye. No obstante, la información que proporciona el genotipo HLA-DRB1 sobre el tipo de diabetes de un paciente debe considerarse como una información adicional a otros datos clínicos y analíticos, ya que el HLA-DRB1, analizado de forma aislada, no ha conseguido diferenciar la diabetes monogénica en los pacientes pediátricos con diabetes y autoinmunidad negativa de nuestra cohorte.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Aanstoot, H. J. *et al.* (1996) 'Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes', *Journal of Clinical Investigation*, 97(12), pp. 2772–2783. doi: 10.1172/JCI118732.
- Achenbach, P. *et al.* (2004) 'Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes', *Journal of Clinical Investigation*, 114(4), pp. 589–597. doi: 10.1172/JCI200421307.
- Aguayo, A. *et al.* (2013) 'Absence of diabetes mellitus type 2 in obese children and adolescents in the north of Spain', *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 26(1–2), pp. 25–29. Available at: doi: 10.1515/jpem-2012-0200.
- Akirav, E. M., Ruddle, N. H. and Herold, K. C. (2011) 'The role of AIRE in human autoimmune disease', *Nature Reviews Endocrinology*, 7(1), pp. 25–33. doi: 10.1038/nrendo.2010.200.
- Alberti, K. G. M. M. and Zimmet, P. Z. (1998) 'Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation.', *Diabetic medicine*, 15(7), pp. 539–553. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S.
- Alkorta-Aranburu, G. *et al.* (2014) 'Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: The clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach', *Molecular Genetics and Metabolism*, 113(4), pp. 315–320. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.09.007.
- American Diabetes Association (2018) '2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetes-2018', *Diabetes Care*, 41(suppl 1), pp. S13–S27. doi: 10.2337/dc18-S002.
- Andersson, C. *et al.* (2014) 'Islet cell antibodies (ICA) identify autoimmunity in children with new onset diabetes mellitus negative for other islet cell antibodies', *Pediatric Diabetes*, 15(5), pp. 336–344. doi: 10.1111/pedi.12093.
- Atkinson, M., Eisenbarth, G. and Michels, A. (2014) 'Type 1 diabetes', *Lancet*, 383(9911), pp. 69–82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7.
- Awa, W. L. *et al.* (2011) 'Reclassification of diabetes type in pediatric patients initially classified as type 2 diabetes mellitus: 15 years follow-up using routine data from the German/Austrian DPV database', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(3), pp. 463–467. doi: 10.1016/j.diabres.2011.09.011.
- Bach, J. F. and Chatenoud, L. (2012) 'The hygiene hypothesis: An explanation for the increased frequency of insulin-dependent diabetes', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), p. a007799. doi: 10.1101/cshperspect.a007799.
- Bacon, S. *et al.* (2016) 'Successful maintenance on sulphonylurea therapy and low diabetes complication rates in a HNF1A – MODY cohort', *Diabetic Medicine*, 33(7), pp. 976–984. doi: 10.1111/dme.12992.

- Baekkeskov, S. *et al.* (1990) 'Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase', *Nature*, 347(6289), pp. 151–156. doi: 10.1038/347151a0.
- Bahillo-Curieses, M. P. *et al.* (2012) 'Prevalence of insulin resistance and impaired glucose tolerance in a sample of obese Spanish children and adolescents', *Endocrine*, 41(2), pp. 289–295. doi: 10.1007/s12020-011-9540-8.
- Bakay, M. *et al.* (2019) 'The Genetic Contribution to Type 1 Diabetes', *Current Diabetes Reports*, 19(11), p. 116. doi: 10.1007/s11892-019-1235-1.
- Bancila, V. *et al.* (2005) 'Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat KATP channel', *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), pp. 8793–8799. doi: 10.1074/jbc.M413426200.
- Barker, J. M. *et al.* (2004) 'Prediction of Autoantibody Positivity and Progression to Type 1 Diabetes : Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(8), pp. 3896–3902. doi: 10.1210/jc.2003-031887.
- Barrett, T. (2007) 'Differential diagnosis of type 1 diabetes : which genetic syndromes need to be considered ?', *Pediatric Diabetes*, 8(Suppl 6), pp. 15–23. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00278.x.
- Barrett, T. *et al.* (2020) 'Rapid progression of type 2 diabetes and related complications in children and young people—A literature review', *Pediatric Diabetes*, 21(2), pp. 158–172. doi: 10.1111/pedi.12953.
- Barrio, R. (2015) 'Cystic fibrosis-related diabetes : novel pathogenic insights opening new therapeutic avenues', *European Journal of Endocrinology*, 172(4), pp. R131–R141. doi: 10.1530/EJE-14-0644.
- Bell, G. I., Horita, S. and Karam, J. H. (1984) 'A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus', *Diabetes*, 33(2), pp. 176–183. doi: 10.2337/diab.33.2.176.
- Bellanné-Chantelot, C. *et al.* (2005) 'Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5', *Diabetes*, 54(11), pp. 3126–3132. doi: 10.2337/diabetes.54.11.3126.
- Beltrand, J. *et al.* (2020) 'Neonatal Diabetes Mellitus', *Frontiers in Pediatrics*, 8(540718), pp. 1–9. doi: 10.3389/fped.2020.540718.
- Bennett, C. L. *et al.* (2001) 'The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3', *Nature Genetics*, 27(1), pp. 20–21. doi: 10.1038/83713.
- Bennett, S. *et al.* (1995) 'Susceptibility to Human Type 1 Diabetes at IDDM2 Is

Determined by Tandem Repeat Variation at the Insulin Gene Minisatellite Locus', *Nature Genetics*, 9(3), pp. 284–292. doi: 10.1038/ng0395-284.

Bingley, P. J. and Williams, A. J. K. (2004) 'Validation of autoantibody assays in type 1 diabetes: Workshop programme', *Autoimmunity*, 37(4), pp. 257–260. doi: 10.1080/08916930410001710677.

Blanton, D. *et al.* (2011) 'Reduced Serum Vitamin D – Binding Protein Levels Are Associated With Type 1 Diabetes', *Diabetes*, 60(10), pp. 2566–2570. doi: 10.2337/db11-0576.

Boerner, B. P. and Sarvetnick, N. E. (2011) 'Type 1 diabetes : role of intestinal microbiome in humans and mice', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1243, pp. 103–118. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06340.x.

Bonfanti, R. *et al.* (2009) 'Insulin gene mutations as cause of diabetes in children negative for five type 1 diabetes autoantibodies', *Diabetes Care*, 32(1), pp. 123–125. doi: 10.2337/dc08-0783.

Bonnefond, A. *et al.* (2012) 'Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene', *PLoS ONE*, 7(6), p. e37423. doi: 10.1371/journal.pone.0037423.

Borowiec, M. *et al.* (2009) 'Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and  $\beta$ -cell dysfunction', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), pp. 14460–14465. doi: 10.1073/pnas.0906474106.

Bottazzo, G. F., Florin-Christensen, A. and Doniach, D. (1974) 'Islet-Cell Antibodies in Diabetes Mellitus With Autoimmune Polyendocrine Deficiencies', *Lancet*, 2(7892), pp. 1279–1283. doi: 10.1016/S0140-6736(74)90140-8.

Bottini, N. *et al.* (2004) 'A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes', *Nature Genetics*, 36(4), pp. 337–338. doi: 10.1038/ng1323.

Bowden, S. A. and Hoffman, R. P. (2008) 'Triple diabetes: Coexistence of type 1 diabetes mellitus and a novel mutation in the gene responsible for MODY3 in an overweight adolescent', *Pediatric Diabetes*, 9(2), pp. 162–164. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00335.x.

Bowman, P. *et al.* (2012) 'Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY', *Diabetologia*, 55(1), pp. 123–127. doi: 10.1007/s00125-011-2319-x.

Brahm, A. J. *et al.* (2016) 'Genetic Confirmation Rate in Clinically Suspected Maturity-Onset Diabetes of the Young', *Canadian Journal of Diabetes*, 40(6), pp. 555–560. doi: 10.1016/j.cjcd.2016.05.010.

Bravis, V. *et al.* (2018) 'Relationship between islet autoantibody status and the clinical

characteristics of children and adults with incident type 1 diabetes in a UK cohort', *BMJ Open*, 8(4), p. e020904. doi: 10.1136/bmjopen-2017-020904.

Cabrera-Rode, E. *et al.* (1995) 'Glycolipids as the major autoantigens of cytoplasmatic islet cell antibodies', *Autoimmunity*, 20(3), pp. 145–151. doi: 10.3109/08916939508993345.

Calcaterra, V. *et al.* (2012) 'The coexistence of type 1 diabetes, MODY2 and metabolic syndrome in a young girl', *Acta Diabetologica*, 49(5), pp. 401–404. doi: 10.1007/s00592-011-0300-2.

Cardwell, C. R., Stene, L. C., Joner, G., Davis, E. A., *et al.* (2010) 'Birthweight and the risk of childhood-onset type 1 diabetes: A meta-analysis of observational studies using individual patient data', *Diabetologia*, 53(4), pp. 641–651. doi: 10.1007/s00125-009-1648-5.

Cardwell, C. R., Stene, L. C., Joner, G., Bulsara, M. K., *et al.* (2010) 'Maternal age at birth and childhood type 1 diabetes: A pooled analysis of 30 observational studies', *Diabetes*, 59(2), pp. 486–494. doi: 10.2337/db09-1166.

Carlsson, A. *et al.* (2020) 'Absence of Islet Autoantibodies and Modestly Raised Glucose Values at Diabetes Diagnosis Should Lead to Testing for MODY : Lessons From a 5-Year Pediatric Swedish National Cohort Study', *Diabetes Care*, 43(1), pp. 82–89. doi: 10.2337/dc19-0747.

Castaño, L. *et al.* (1991) 'Identification and cloning of a granule autoantigen (Carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73(6), pp. 1197–1201. doi: 10.1210/jcem-73-6-1197.

Caudy, A. A. *et al.* (2007) 'CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(2), pp. 482–487. doi: 10.1016/j.jaci.2006.10.007.

Chambers, C. *et al.* (2016) 'Characteristics of maturity onset diabetes of the young in a large diabetes center', *Pediatric Diabetes*, 17(5), pp. 360–367. doi: 10.1111/pedi.12289.

Chang, Y. H. *et al.* (1996) 'Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM', *Diabetes*, 45(4), pp. 408–414. doi: 10.2337/diab.45.4.408.

Cheng, B. *et al.* (2018) 'Autoantibodies against islet cell antigens in children with type 1 diabetes mellitus', *Oncotarget*, 9(23), pp. 16275–16283. doi: 10.18632/oncotarget.24527.

Chèvre, J. *et al.* (1998) 'Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes', *Diabetologia*, 41(9), pp. 1017–1023. doi: 10.1007/s001250051025.

- Chiarelli, F., Giannini, C. and Primavera, M. (2019) 'Prediction and prevention of type 1 diabetes in children', *Clinical Pediatric Endocrinology*, 28(3), pp. 43–57. doi: 10.1297/cpe.28.43.
- Chimienti, F. *et al.* (2004) 'Identification and cloning of a  $\beta$ -cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules', *Diabetes*, 53(9), pp. 2330–2337. doi: 10.2337/diabetes.53.9.2330.
- Chimienti, F., Favier, A. and Seve, M. (2005) 'ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter', *BioMetals*, 18(4), pp. 313–317. doi: 10.1007/s10534-005-3687-9.
- Clark, R. H. *et al.* (2010) 'Muscle dysfunction caused by a KATP channel mutation in neonatal diabetes is neuronal in origin', *Science*, 329(5990), pp. 458–461. doi: 10.1126/science.1186146.
- Clissold, R. L. *et al.* (2015) 'HNF1B-associated renal and extra-renal disease - An expanding clinical spectrum', *Nature Reviews Nephrology*, 11(2), pp. 102–112. doi: 10.1038/nrneph.2014.232.
- Clore, J. N. and Thurby-Hay, L. (2009) 'Glucocorticoid-induced hyperglycemia', *Endocrine Practice*, 15(5), pp. 469–474. doi: 10.4158/EP08331.RAR.
- Colclough, K. *et al.* (2013) 'Mutations in the Genes Encoding the Transcription Factors Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha and 4 Alpha in Maturity-Onset Diabetes of the Young and Hyperinsulinemic Hypoglycemia', *Human Mutation*, 34(5), pp. 669–685. doi: 10.1002/humu.22279.
- Correl, C. U. *et al.* (2015) 'Effects of antipsychotics, antidepressants and mood stabilizers on risk for physical diseases in people with schizophrenia, depression and bipolar disorder', *World Psychiatry*, 14(2), pp. 119–136. doi: 10.1002/wps.20204.
- Dabelea, D. (2009) 'The accelerating epidemic of childhood diabetes', *Lancet*, 373(9680), pp. 1999–2000. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60874-6.
- Dabelea, D. *et al.* (2014) 'Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 311(17), pp. 1778–1786. doi: 10.1001/jama.2014.3201.
- Delvecchio, M. *et al.* (2017) 'Monogenic diabetes accounts for 6.3% of cases referred to 15 Italian pediatric diabetes centers during 2007 to 2012', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(6), pp. 1826–1834. doi: 10.1210/jc.2016-2490.
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C. and Oram, R. A. (2018) 'Type 1 diabetes', *Lancet*, 391(10138), pp. 2449–2462. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.
- Dimitri, P. (2017) 'The role of GLIS3 in thyroid disease as part of a multisystem disorder', *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(2), pp. 175–182. doi: 10.1016/j.beem.2017.04.007.

- Dodson, G. and Steiner, D. (1998) 'The role of assembly in insulin's biosynthesis', *Current Opinion in Structural Biology*, 8(2), pp. 189–194. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80037-7.
- Donaghue, K. *et al.* (2007) 'ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. Microvascular and macrovascular complications', *Pediatric Diabetes*, 8(3), pp. 163–170. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00250.x.
- Dopazo, J. *et al.* (2016) '267 Spanish Exomes Reveal Population-Specific Differences in Disease-Related Genetic Variation', *Molecular Biology and Evolution*, 33(5), pp. 1205–1218. doi: 10.1093/molbev/msw005.
- Dotta, F. *et al.* (1997) 'Autoantibodies to the GM2-1 islet ganglioside and to GAD-65 at type 1 diabetes onset', *Journal of Autoimmunity*, 10(6), pp. 585–588. doi: 10.1006/jaut.1997.0166.
- Edghill, E. L., Bingham, C., *et al.* (2006) 'Hepatocyte nuclear factor-1 beta mutations cause neonatal diabetes and intrauterine growth retardation: Support for a critical role of HNF-1 $\beta$  in human pancreatic development', *Diabetic Medicine*, 23(12), pp. 1301–1306. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01999.x.
- Edghill, E. L., Dix, R. J., *et al.* (2006) 'HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months', *Diabetes*, 55(6), pp. 1895–1898. doi: 10.2337/db06-0094.
- El-Hattab, A. W. *et al.* (2015) 'MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options', *Molecular Genetics and Metabolism*, 116(1–2), pp. 4–12. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.06.004.
- Ellard, S. *et al.* (2007) 'Permanent neonatal diabetes caused by dominant, recessive, or compound heterozygous SUR1 mutations with opposite functional effects', *American Journal of Human Genetics*, 81(2), pp. 375–382. doi: 10.1086/519174.
- Ellard, S. *et al.* (2013) 'Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing', *Diabetologia*, 56(9), pp. 1958–1963. doi: 10.1007/s00125-013-2962-5.
- Elmaoğulları, S. *et al.* (2018) 'Prevalence of ZnT8 antibody in Turkish children and adolescents with new onset type 1 diabetes', *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 10(2), pp. 108–112. doi: 10.4274/jcrpe.5020.
- Erlich, H. *et al.* (2008) 'HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk', *Diabetes*, 57(4), pp. 1084–1092. doi: 10.2337/db07-1331.
- Escribano-De-Diego, J. *et al.* (1999) 'HLA class II immunogenetics and incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in the population of Cantabria (Northern Spain)', *Human Immunology*, 60(10), pp. 990–1000. doi: 10.1016/S0198-8859(99)00077-4.
- Estalella, I. *et al.* (2007) 'Mutations in GCK and HNF-1  $\alpha$  explain the majority of cases

with clinical diagnosis of MODY in Spain', *Clinical Endocrinology*, 67(4), pp. 538–546. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.02921.x.

EURODIAB ACE Study Group (2000) 'Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe', *Lancet*, 355(9207), pp. 873–876. doi: 10.1016/S0140-6736(99)07125-1.

Fabris, M. *et al.* (2015) 'Anti-zinc transporter protein 8 autoantibodies significantly improve the diagnostic approach to type 1 diabetes: an Italian multicentre study on paediatric patients', *Autoimmunity Highlights*, 6(1–2), pp. 17–22. doi: 10.1007/s13317-015-0068-4.

Faccinetti, N. I. *et al.* (2016) 'Detección y caracterización de autoanticuerpos anti-ZnT8 en pacientes argentinos con diabetes mellitus tipo 1', *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 53(3), pp. 77–83. doi: 10.1016/j.raem.2016.09.001.

Faguer, S. *et al.* (2011) 'Diagnosis, management, and prognosis of HNF1B nephropathy in adulthood', *Kidney International*, 80(7), pp. 768–776. doi: 10.1038/ki.2011.225.

Fendler, W. *et al.* (2012) 'Prevalence of monogenic diabetes amongst Polish children after a nationwide genetic screening campaign', *Diabetologia*, 55(10), pp. 2631–2635. doi: 10.1007/s00125-012-2621-2.

Ferrara-Cook, C. *et al.* (2020) 'Excess BMI Accelerates Islet Autoimmunity in Older Children and Adolescents', *Diabetes Care*, 43(3), pp. 580–587. doi: 10.2337/dc19-1167.

Flanagan, S. E. *et al.* (2007) 'Mutations in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood', *Diabetes*, 56(7), pp. 1930–1937. doi: 10.2337/db07-0043.

Flanagan, S. E. *et al.* (2014) 'Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease', *Nature Genetics*, 46(8), pp. 812–814. doi: 10.1038/ng.3040.

Flannick, J. *et al.* (2013) 'Assessing the phenotypic effects in the general population of rare variants in genes for a dominant Mendelian form of diabetes', *Nature Genetics*, 45(11), pp. 1380–1387. doi: 10.1038/ng.2794.

De Franco, E. *et al.* (2013) 'GATA6 Mutations Cause a Broad Phenotypic Spectrum of Diabetes From Pancreatic Agenesis to Adult-Onset Diabetes Without Exocrine Insufficiency', *Diabetes*, 62(3), pp. 993–997. doi: 10.2337/db12-0885.

Gabbay, M. *et al.* (2017) 'Pancreatic Agenesis due to Compound Heterozygosity for a Novel Enhancer and Truncating Mutation in the PTF1A Gene', *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 9(3), pp. 274–277. doi: 10.4274/jcrpe.4494.

Gale, E. A. M. and Gillespie, K. M. (2001) 'Diabetes and gender', *Diabetologia*, 44(1), pp. 3–15. doi: 10.1007/s001250051573.

- Gandica, R. G. *et al.* (2015) 'Identifying monogenic diabetes in a pediatric cohort with presumed type 1 diabetes', *Pediatric Diabetes*, 16(3), pp. 227–233. doi: 10.1111/pedi.12150.
- Garcin, L. *et al.* (2018) 'Successful off-label sulfonylurea treatment of neonatal diabetes mellitus due to chromosome 6 abnormalities', *Pediatric Diabetes*, 19(4), pp. 663–669. doi: 10.1111/pedi.12635.
- Garg, A. (2004) 'Acquired and Inherited Lipodystrophies', *The New England Journal of Medicine*, 350(12), pp. 1220–1234. doi: 10.1056/NEJMra025261.
- Garin, I. *et al.* (2010) 'Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), pp. 3105–3110. doi: 10.1073/pnas.0910533107.
- Garnier, L. *et al.* (2018) 'Screening of ZnT8 autoantibodies in the diagnosis of autoimmune diabetes in a large French cohort', *Clinica Chimica Acta*, 478(December 2017), pp. 162–165. doi: 10.1016/j.cca.2017.12.043.
- Gleicher, N. and Barad, D. H. (2007) 'Gender as risk factor for autoimmune diseases', *Journal of Autoimmunity*, 28(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.jaut.2006.12.004.
- Gloyn, A. L. *et al.* (2006) 'KCNJ11 activating mutations are associated with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes syndrome and other neurological features', *European Journal of Human Genetics*, 14(7), pp. 824–830. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201629.
- Gragnoli, C. *et al.* (2005) 'IPF-1/MODY4 gene missense mutation in an Italian family with type 2 and gestational diabetes', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 54(8), pp. 983–988. doi: 10.1016/j.metabol.2005.01.037.
- Graham, J. *et al.* (2002) 'Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes', *Diabetes*, 51(5), pp. 1346–1355. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1346.
- Greeley, S. A. W. *et al.* (2011) 'Neonatal diabetes: An expanding list of genes allows for improved diagnosis and treatment', *Current Diabetes Reports*, 11(6), pp. 519–532. doi: 10.1007/s11892-011-0234-7.
- Grulich-Henn, J. and Klose, D. (2018) 'Understanding childhood diabetes mellitus: new pathophysiological aspects', *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(1), pp. 19–27. doi: 10.1007/s10545-017-0120-9.
- Hannon, T. S. and Arslanian, S. A. (2015) 'The changing face of diabetes in youth: Lessons learned from studies of type 2 diabetes', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1353(1), pp. 113–137. doi: 10.1111/nyas.12939.
- Harjutsalo, V., Sjöberg, L. and Tuomilehto, J. (2008) 'Time trends in the incidence of

type 1 diabetes in Finnish children : a cohort study', *Lancet*, 371(9626), pp. 1777–1782. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60765-5.

Hattersley, A. T. *et al.* (2018) 'ISPAD 2018 Consensus Guidelines: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents', *Pediatric Diabetes*, 19(Suppl. 27), pp. 47–63. doi: 10.1111/pedi.12772.

Hattersley, A. T. and Patel, K. A. (2017) 'Precision diabetes: learning from monogenic diabetes', *Diabetologia*, 60(5), pp. 769–777. doi: 10.1007/s00125-017-4226-2.

Hu, Y. F. *et al.* (2005) 'The IA-2 interactome', *Diabetologia*, 48(12), pp. 2576–2581. doi: 10.1007/s00125-005-0037-y.

Ikegami, H. *et al.* (2008) 'Genetic basis of type 1 diabetes: Similarities and differences between east and west', *Review of Diabetic Studies*, 5(2), pp. 64–72. doi: 10.1900/RDS.2008.5.64.

Ilonen, J., Lempainen, J. and Veijola, R. (2019) 'The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus', *Nature Reviews Endocrinology*, 15(11), pp. 635–650. doi: 10.1038/s41574-019-0254-y.

Irgens, H. U. *et al.* (2013) 'Prevalence of monogenic diabetes in the population-based Norwegian Childhood Diabetes Registry', *Diabetologia*, 56(7), pp. 1512–1519. doi: 10.1007/s00125-013-2916-y.

Ishihara, H. *et al.* (2003) 'Islet  $\beta$ -cell secretion determines glucagon release from neighbouring  $\alpha$ -cells', *Nature Cell Biology*, 5(4), pp. 330–335. doi: 10.1038/ncb951.

Ize-ludlow, D. and Sperling, M. A. (2005) 'The Classification of Diabetes Mellitus : A Conceptual Framework', *Pediatric Clinics of North America*, 52, pp. 1533–1552. doi: 10.1016/j.pcl.2005.07.001.

Johansson, B. B. *et al.* (2017) 'Targeted next-generation sequencing reveals MODY in up to 6.5% of antibody-negative diabetes cases listed in the Norwegian Childhood Diabetes Registry', *Diabetologia*, 60(4), pp. 625–635. doi: 10.1007/s00125-016-4167-1.

Johnson, J. *et al.* (1990) 'Inhibition of Glucose Transport Into Rat Islet Cells by Immunoglobulins From Patients With New-Onset Insulin-Dependent Diabetes Mellitus', *The New England Journal of Medicine*, 322(10), pp. 653–659. doi: 10.1056/NEJM199003083221003.

Johnson, M. B. *et al.* (2017) 'Recessively inherited LRBA mutations cause autoimmunity presenting as neonatal diabetes', *Diabetes*, 66(8), pp. 2316–2322. doi: 10.2337/db17-0040.

Johnson, S. R., Ellis, J. J., *et al.* (2019) 'Comprehensive genetic screening: The prevalence of maturity-onset diabetes of the young gene variants in a population-based childhood diabetes cohort', *Pediatric Diabetes*, 20(1), pp. 57–64. doi: 10.1111/pedi.12766.

- Johnson, S. R., Carter, H. E., *et al.* (2019) 'Cost-effectiveness Analysis of Routine Screening Using Massively Parallel Sequencing for Maturity-Onset Diabetes of the Young in a Pediatric Diabetes Cohort : Reduced Health System Costs and Improved Patient Quality of Life', *Diabetes Care*, 42(1), pp. 69–76. doi: 10.2337/dc18-0261.
- Jones, D., Hunter, N. and Duff, G. (1990) 'Heat-shock Protein 65 as a Beta Cell Antigen of Insulin-Dependent Diabetes', *Lancet*, 336(8715), pp. 583–585. doi: 10.1016/0140-6736(90)93390-b.
- Kanakatti Shankar, R. *et al.* (2013) 'Permanent neonatal diabetes mellitus: Prevalence and genetic diagnosis in the SEARCH for Diabetes in Youth Study', *Pediatric Diabetes*, 14(3), pp. 174–180. doi: 10.1111/pedi.12003.
- Karges, B. *et al.* (2007) 'Digenic inheritance of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  with maturity-onset diabetes of the young, polycystic thyroid, and urogenital malformations', *Diabetes Care*, 30(6), pp. 1613–1614. doi: 10.2337/dc06-2618.
- Karvonen, M. *et al.* (2000) 'Incidence of Childhood Type 1 Diabetes Worldwide', *Diabetes Care*, 23(10), pp. 1516–26. doi: 10.2337/diacare.23.10.1516.
- Kawasaki, E. *et al.* (1996) 'Autoantibodies to Protein Tyrosine Phosphatase-Like Proteins in Type I Diabetes Overlapping Specificities to Phogrin and ICA512/IA-2', *Diabetes*, 45(10), pp. 1344–1349. doi: 10.2337/diab.45.10.1344.
- Kawasaki, E. *et al.* (2008) 'Association between anti-ZnT8 autoantibody specificities and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese patients with type 1 diabetes', *Diabetologia*, 51(12), pp. 2299–2302. doi: 10.1007/s00125-008-1165-y.
- Kawasaki, E. (2014) 'Type 1 diabetes and autoimmunity', *Clinical Pediatric Endocrinology*, 23(4), pp. 99–105. doi: 10.1297/cpe.23.99.
- Kawasaki, E., Hutton, J. C. and Eisenbarth, G. S. (1996) 'Molecular Cloning and Characterization of the Human Transmembrane Protein Tyrosine Phosphatase Homologue , Phogrin, an Autoantigen of Type 1 Diabetes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227, pp. 440–447. doi: 10.1006/bbrc.1996.1526.
- Kennedy, G. C., German, M. S. and Rutter, W. J. (1995) 'The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription', *Nature Genetics*, 9(3), pp. 293–298. doi: 10.1038/ng0395-293.
- Kent, S. C. *et al.* (2005) 'Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope', *Nature*, 435(7039), pp. 224–228. doi: 10.1038/nature03625.
- Kim, Y. J. *et al.* (1993) 'IDDM patients' sera recognize a novel 30-KD pancreatic autoantigen related to chymotrypsinogen', *Immunological Investigations*, 22(3), pp. 219–227. doi: 10.3109/08820139309063404.
- Kleinberger, J. W. *et al.* (2018) 'Monogenic diabetes in overweight and obese youth

- diagnosed with type 2 diabetes: The TODAY clinical trial', *Genetics in Medicine*, 20(6), pp. 583–590. doi: 10.1038/gim.2017.150.
- Kleinberger, J. W. and Pollin, T. I. (2015) 'Undiagnosed MODY: Time for Action', *Current Diabetes Reports*, 15(12), p. 110. doi: 10.1007/s11892-015-0681-7.
- Klingensmith, G. J. *et al.* (2016) 'Presentation of youth with type 2 diabetes in the Pediatric Diabetes Consortium', *Pediatric Diabetes*, 17(4), pp. 266–273. doi: 10.1111/pedi.12281.
- Knip, M. *et al.* (2016) 'Role of humoral beta-cell autoimmunity in type 1 diabetes', *Pediatric Diabetes*, 17(Suppl. 22), pp. 17–24. doi: 10.1111/pedi.12386.
- Knip, M., Virtanen, S. M. and Akerblom, H. K. (2010) 'Infant feeding and the risk of type 1 diabetes', *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), pp. 1506–1513. doi: 10.3945/ajcn.2010.28701C.
- Kordonouri, O. *et al.* (2007) 'ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006–2007 Other complications and associated conditions', *Pediatric Diabetes*, 8(3), pp. 171–176. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00249.x.
- Kristiansen, O. P., Larsen, Z. M. and Pociot, F. (2000) 'CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity?', *Genes and Immunity*, 1(3), pp. 170–184. doi: 10.1038/sj.gene.6363655.
- Kristinsson, S. Y. *et al.* (2001) 'MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1 a and a novel mutation in NeuroD1', *Diabetologia*, 44(11), pp. 2098–2103. doi: 10.1007/s001250100016.
- Kuehn, H. S. *et al.* (2014) 'Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4', *Science*, 345(6204), pp. 1623–1627. doi: 10.1126/science.1255904.
- Kuglin, B. *et al.* (1990) 'Proinsulin Autoantibodies : Association with Type I Diabetes but not with islet cell antidodies, Insulin autoantibodies or HLA-DR type', *Journal of Autoimmunity*, 3, pp. 573–577. doi: 10.1016/s0896-8411(05)80023-x.
- Kumar, N. *et al.* (2012) 'Tumor necrosis factor-associated susceptibility to type 1 diabetes is caused by linkage disequilibrium with HLA-DR3 haplotypes', *Human Immunology*, 73(5), pp. 566–573. doi: 10.1016/j.humimm.2012.01.012.
- Laloi-Michelin, M. *et al.* (2006) 'Kearns Sayre syndrome: An unusual form of mitochondrial diabetes', *Diabetes and Metabolism*, 32(2), pp. 182–186. doi: 10.1016/S1262-3636(07)70267-7.
- Lampasona, V. *et al.* (2011) 'Diabetes antibody standardization program: First proficiency evaluation of assays for autoantibodies to zinc transporter 8', *Clinical Chemistry*, 57(12), pp. 1693–1702. doi: 10.1373/clinchem.2011.170662.

- Lampasona, V. and Liberati, D. (2016) 'Islet Autoantibodies', *Current Diabetes Reports*, 16(6), p. 53. doi: 10.1007/s11892-016-0738-2.
- Lan, M. S. *et al.* (1994) 'Molecular Cloning and Identification of a Receptor-Type', *DNA and Cell Biology*, 13(5), pp. 505–514. doi: 10.1089/dna.1994.13.505.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L. and Fernández-Mejía, C. (2009) 'Factores transcripcionales en la célula  $\beta$  adulta', *Revista de Investigación clínica*, 61(5), pp. 428–446.
- Lee, H. S. and Hwang, J. S. (2019) 'Genetic aspects of type 1 diabetes', *Annals of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 24(3), pp. 143–148. doi: 10.6065/apem.2019.24.3.143.
- Leighton, E., Sainsbury, C. A. and Jones, G. C. (2017) 'A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes', *Diabetes Therapy*, 8(3), pp. 475–487. doi: 10.1007/s13300-017-0265-4.
- Ling, Q. *et al.* (2018) 'Risk of beta-cell autoimmunity presence for progression to type 1 diabetes : A systematic review and meta-analysis', *Journal of Autoimmunity*, 86, pp. 9–18. doi: 10.1016/j.jaut.2017.09.012.
- Lorenzo, P. I. *et al.* (2017) 'The diabetes-linked transcription factor PAX4: From gene to functional consequences', *Genes*, 8(3), p. 101. doi: 10.3390/genes8030101.
- Ludvigsson, J. *et al.* (2008) 'GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes', *New England Journal of Medicine*, 359(18), pp. 1909–1920. doi: 10.1056/NEJMoa0804328.
- Madariaga, L. *et al.* (2013) 'Severe prenatal renal anomalies associated with mutations in HNF1B or PAX2 genes', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(7), pp. 1179–1187. doi: 10.2215/CJN.10221012.
- Maestro, M. *et al.* (2007) 'Distinct roles of HNF1 $\beta$ , HNF1 $\alpha$ , and HNF4 $\alpha$  in regulating pancreas development,  $\beta$ -cell function and growth', *Endocrine Development*, 12, pp. 33–45. doi: 10.1159/000109603.
- Majidi, S. *et al.* (2018) 'Can Biomarkers Help Target Maturity-Onset Diabetes of the Young Genetic Testing in Antibody-Negative Diabetes?', *Diabetes Technology and Therapeutics*, 20(2), pp. 106–112. doi: 10.1089/dia.2017.0317.
- Maltoni, G. *et al.* (2012) 'Onset of type 1 diabetes mellitus in two patients with maturity onset diabetes of the young', *Pediatric Diabetes*, 13(2), pp. 208–212. doi: 10.1111/j.1399-5448.2011.00788.x.
- Massa, O. *et al.* (2013) 'Serological Proteome Analysis (SERPA) as a tool for the identification of new candidate autoantigens in type 1 diabetes', *Journal of Proteomics*, 82, pp. 263–273. doi: 10.1016/j.jprot.2013.02.030.

- Matschinsky, F. M. (2002) 'Regulation of Pancreatic  $\beta$ -Cell Glucokinase', *Diabetes*, 51(Suppl 3), pp. S394-404. doi: 10.2337/diabetes.51.2007.s394.
- Mayer-Davis, E. J. *et al.* (2017) 'Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002–2012', *The New England Journal of Medicine*, 376(15), pp. 1419–1429. doi: 10.1056/NEJMoa1610187.
- Mayer-Davis, E. J. *et al.* (2018) 'ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents', *Pediatric Diabetes*, 19(S27), pp. 7–19. doi: 10.1111/pedi.12773.
- McDonald, T. *et al.* (2011) 'Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type1 diabetes', *Diabetic Medicine*, 28(9), pp. 1028–1033. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03287.x.
- Meier, J. J. and Giese, A. (2015) 'Diabetes associated with pancreatic diseases', *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(5), pp. 400–406. doi: 10.1097/MOG.000000000000199.
- Michels, A. *et al.* (2015) 'Prediction and prevention of type 1 diabetes: Update on success of prediction and struggles at prevention', *Pediatric Diabetes*, 16(7), pp. 465–484. doi: 10.1111/pedi.12299.
- Molven, A. *et al.* (2008) 'Mutations in the Insulin Gene Can Cause MODY and Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes', *Diabetes*, 57(4), pp. 1131–1135. doi: 10.2337/db07-1467.
- Najmi, L. A. *et al.* (2017) 'Functional investigations of HNF1A identify rare variants as risk factors for type 2 diabetes in the general population', *Diabetes*, 66(2), pp. 335–346. doi: 10.2337/db16-0460.
- Nakayasu, E. S. *et al.* (2019) 'The role of proteomics in assessing beta-cell dysfunction and death in type 1 diabetes diabetes', *Expert Review of Proteomics*, 16(7), pp. 569–582. doi: 10.1080/14789450.2019.1634548.
- Näntö-Salonen, K. *et al.* (2008) 'Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial', *Lancet*, 372(9651), pp. 1746–1755. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61309-4.
- Naylor, R. N. *et al.* (2011) 'Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus', *Journal of Diabetes Investigation*, 2(3), pp. 158–169. doi: 10.1111/j.2040-1124.2011.00106.x.
- Neve, B. *et al.* (2005) 'Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), pp. 4807–4812. doi: 10.1073/pnas.0409177102.

- Nicolaou, N. *et al.* (2016) 'Prioritization and burden analysis of rare variants in 208 candidate genes suggest they do not play a major role in CAKUT', *Kidney International*, 89(2), pp. 476–486. doi: 10.1038/ki.2015.319.
- Niechciał, E. *et al.* (2018) 'Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age and metabolic state in patients with newly diagnosed autoimmune diabetes', *Acta Diabetologica*, 55(3), pp. 287–294. doi: 10.1007/s00592-017-1091-x.
- Nisticò, L. *et al.* (1996) 'The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes', *Human Molecular Genetics*, 5(7), pp. 1075–1080. doi: 10.1093/hmg/5.7.1075.
- Noble, J. A. *et al.* (2013) 'HLA class II genotyping of African American type 1 diabetic patients reveals associations unique to African haplotypes', *Diabetes*, 62(9), pp. 3292–3299. doi: 10.2337/db13-0094.
- Notkins, A. L. (2002) 'Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(46), pp. 43545–43548. doi: 10.1074/jbc.R200012200.
- Nyaga, D. M. *et al.* (2018) 'The genetic architecture of type 1 diabetes mellitus', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 477, pp. 70–80. doi: 10.1016/j.mce.2018.06.002.
- Ortega-Rodriguez, E. *et al.* (2001) 'β Cell autoimmunity a child with MODY (Maturity Onset Diabetes in the Young)', *Diabetes and Metabolism*, 27(1), pp. 59–61.
- Östman, J. *et al.* (2000) 'Ketoacidosis in young adults is not related to the islet antibodies at the diagnosis of Type 1 diabetes mellitus--a nationwide study.', *Diabetic Medicine*, 17(4), pp. 269–274. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-5491.2000.00265.x>.
- Pak, C. *et al.* (1990) 'Human pancreatic islet cell specific 38 kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell autoantibody', *Diabetologia*, 33, pp. 569–572. doi: 10.1007/BF00404146.
- Palmer, J. P. *et al.* (1983) 'Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment', *Science*, 222(4630), pp. 1337–1339. doi: 10.1126/science.6362005.
- Park, S. G. *et al.* (2010) 'Autoantibodies against aminoacyl-tRNA synthetase: Novel diagnostic marker for type 1 diabetes mellitus', *Biomarkers*, 15(4), pp. 358–366. doi: 10.3109/13547501003777823.
- Patel, K. A. *et al.* (2018) 'Zinc Transporter 8 Autoantibodies (ZnT8A) and a Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Can Exclude Individuals With Type 1 Diabetes From Inappropriate Genetic Testing for Monogenic Diabetes', *Diabetes Care*, 42(2), pp. e16–e17. doi: 10.2337/dc18-0373.
- Pav, J., Jezkova, Z. and Skrha, F. (1963) 'Insulin antibodies', *Lancet*, 2(7301), pp. 221–222. doi: 10.1016/s0140-6736(63)90117-x.

- Payton, M. A., Hawkes, C. J. and Christie, M. R. (1995) 'Relationship of the 37,000- and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-independent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512).', *Journal of Clinical Investigation*, 96(3), pp. 1506–1511. doi: 10.1172/JCI118188.
- Pearson, E. R. *et al.* (2005) 'Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  mutations in a large European collection', *Diabetologia*, 48(5), pp. 878–885. doi: 10.1007/s00125-005-1738-y.
- Pearson, E. R. *et al.* (2007) 'Macrosomia and Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia in Patients with Heterozygous Mutations in the HNF4A Gene', *PloS Med*, 4(4), p. e118. doi: 10.1371/journal.pmed.0040118.
- Pescovitz, M. *et al.* (2009) 'Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function', *New England Journal of Medicine*, 361(22), pp. 2143–2152. doi: 10.1056/NEJMoa0904452.
- Petruzelkova, L. *et al.* (2014) 'The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children from the onset of Type 1 diabetes mellitus', *Diabetic Medicine*, 31(2), pp. 165–171. doi: 10.1111/dme.12308.
- Pietro Paolo, M., Hutton, J. C. and Eisenbarth, G. S. (1997) 'Protein tyrosine phosphatase-like proteins: Link with IDDM', *Diabetes Care*, 20(2), pp. 208–214. doi: 10.2337/diacare.20.2.208.
- Pihoker, C. *et al.* (2013) 'Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: Results from the SEARCH for diabetes in Youth', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(10), pp. 4055–4062. doi: 10.1210/jc.2013-1279.
- Plagnol, V. *et al.* (2011) 'Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases', *PLoS Genetics*, 7(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1002216.
- Plengvidhya, N. *et al.* (2007) 'PAX4 Mutations in Thais with Maturity Onset Diabetes of the Young', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(7), pp. 2821–2826. doi: 10.1210/jc.2006-1927.
- Pociot, F. *et al.* (2010) 'Genetics of Type 1 Diabetes : What 's Next ?', *Diabetes*, 59, pp. 1561–1571. doi: 10.2337/db10-0076.
- Podar, T. *et al.* (2001) 'Increasing incidence of childhood-onset Type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983-1998', *Diabetologia*, 44(Suppl 3), pp. 17–20. doi: 10.1007/pl00002947.
- Pontoglio, M. *et al.* (2000) 'HNF1A controls renal glucose reabsorption in mouse and man', *European Molecular Biology Organization Reports*, 1(4), pp. 359–365. doi: 10.1093/embo-reports/kvd071.
- Prudente, S. *et al.* (2015) 'Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes

- Mellitus', *The American Journal of Human Genetics*, 97(1), pp. 177–185. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.05.011.
- Qian, W. J. *et al.* (2000) 'Detection of secretion from single pancreatic  $\beta$ -cells using extracellular fluorogenic reactions and confocal fluorescence microscopy', *Analytical Chemistry*, 72(4), pp. 711–717. doi: 10.1021/ac991085t.
- Rabin, D. U. *et al.* (1992) 'Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens', *Diabetes*, 41(2), pp. 183–186. doi: 10.2337/diab.41.2.183.
- Raeder, H. *et al.* (2006) 'Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction', *Nature Genetics*, 38(1), pp. 54–62. doi: 10.1038/ng1708.
- Rajan, S. *et al.* (2010) 'In vitro processing and secretion of mutant insulin proteins that cause permanent neonatal diabetes', *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 298(3), pp. E403–E410. doi: 10.1152/ajpendo.00592.2009.
- Redondo, M. J. *et al.* (2000) 'DR- and DQ-associated protection from type 1A diabetes: Comparison of DRB1\*1401 and DQA1\*0102-DQB1\*0602', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(10), pp. 3793–3797. doi: 10.1210/jc.85.10.3793.
- Redondo, M. J., Steck, A. K. and Pugliese, A. (2018) 'Genetics of type 1 diabetes', *Pediatric Diabetes*, 19(3), pp. 346–353. doi: 10.1111/pedi.12597.
- Regnell, S. E. and Lernmark, Å. (2017) 'Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes', *Diabetologia*, 60(8), pp. 1370–1381. doi: 10.1007/s00125-017-4308-1.
- Reinehr, T. (2013) 'Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents', *World Journal of Diabetes*, 4(6), pp. 270–281. doi: 10.4239/wjd.v4.i6.270.
- Resmini, E. *et al.* (2009) 'Secondary diabetes associated with principal endocrinopathies: The impact of new treatment modalities', *Acta Diabetologica*, 46(2), pp. 85–95. doi: 10.1007/s00592-009-0112-9.
- Rewers, M. and Ludvigsson, J. (2016) 'Environmental risk factors for type 1 diabetes', *Lancet*, 387(10035), pp. 2340–2348. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30507-4.
- Richards, S. *et al.* (2015) 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology', *Genetics in Medicine*, 17(5), pp. 405–424. doi: 10.1007/s001250051025.
- Rigoli, L. and Bella, C. Di (2012) 'Wolfram syndrome 1 and Wolfram syndrome 2', *Current Opinion in Pediatrics*, 24(4), pp. 512–517. doi: 10.1097/MOP.0b013e328354ccdf.
- Robertson, R. P. *et al.* (2004) 'Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes', *Diabetes*, 53(Suppl 1), pp. 119–124. doi:

10.2337/diabetes.53.2007.s119.

Robinson, K. N. *et al.* (2020) 'The role of heteroplasmy in the diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness', *Endocrine Practice*, 26(2), pp. 241–246. doi: 10.4158/EP-2019-0270.

Rorsman, F. *et al.* (1995) 'Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a  $\beta$ -cell autoantigen', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), pp. 8626–8629. doi: 10.1073/pnas.92.19.8626.

Rosenbloom, A. L. *et al.* (2008) 'Type 2 diabetes mellitus in the child and adolescent', *Pediatric Diabetes*, 9(5), pp. 512–526. doi: 10.1111/j.1399-5448.2008.00429.x.

Rubio-Cabezas, O. *et al.* (2009) 'Testing for monogenic diabetes among children and adolescents with antibody-negative clinically defined Type 1 diabetes', *Diabetic Medicine*, 26(10), pp. 1070–1074. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02812.x.

Rubio-Cabezas, O. *et al.* (2010) 'Homozygous Mutations in NEUROD1 Are Responsible for a Novel Syndrome of Permanent Neonatal Diabetes and Neurological Abnormalities', *Diabetes*, 59(9), pp. 2326–2331. doi: 10.2337/db10-0011.

Rubio Cabezas, Ó. and Argente, J. (2012) 'Diabetes mellitus: formas de presentación clínica y diagnóstico diferencial de la hiperglucemia en la infancia y adolescencia', *Anales de Pediatría*, 77(5), pp. 344.e1-344.e16. doi: 10.1016/j.anpedi.2012.06.013.

Salonen, K. *et al.* (2013) 'Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age, metabolic state and HLA DR genotype in children with newly diagnosed type 1 diabetes', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 29, pp. 646–654. doi: 10.1002/dmrr.2440.

Sánchez González, E. *et al.* (2011) 'Spanish growth studies: the current situation, their effectiveness and recommendations for their use', *Anales de Pediatría*, 74(3), pp. 193.e1-e16. doi: 10.1016/j.anpedi.2010.10.005.

Sanyoura, M., Philipson, L. H. and Naylor, R. (2018) 'Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options', *Current Diabetes Reports*, 18(8), p. 58. doi: 10.1007/s11892-018-1024-2.

Sanzana G., M. G. and Durruty A., P. (2016) 'Otros Tipos Específicos De Diabetes Mellitus', *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(2), pp. 160–170. doi: 10.1016/j.rmclc.2016.04.005.

Sattar, N. *et al.* (2010) 'Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials', *Lancet*, 375(9716), pp. 735–742. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61965-6.

Schlosser, M. *et al.* (2010) 'Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies', *Diabetologia*, 53, pp. 2611–2620. doi:

10.1007/s00125-010-1915-5.

Schober, E. *et al.* (2009) 'Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: Experience from a large multicentre database', *Diabetic Medicine*, 26(5), pp. 466–473. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02720.x.

Schwitzgebel, V. M. *et al.* (2003) 'Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(9), pp. 4398–4406. doi: 10.1210/jc.2003-030046.

Semple, R. K. *et al.* (2011) 'Genetic Syndromes of Severe Insulin Resistance', *Endocrine Reviews*, 32(4), pp. 498–514. doi: 10.1210/er.2010-0020.

Serreze, D. *et al.* (1996) 'B Lymphocytes Are Essential for the Initiation of T Cell-mediated Autoimmune Diabetes: Analysis of a New "Speed Congenic" Stock of NOD.Ignull Mice', *Journal of Experimental Medicine*, 184(5), pp. 2049–2053. doi: 10.1084/jem.184.5.2049.

Shah, A. S. and Nadeau, K. J. (2020) 'The changing face of paediatric diabetes', *Diabetologia*, 63(4), pp. 683–691. doi: 10.1007/s00125-019-05075-6.

Shaw-Smith, C. *et al.* (2014) 'GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes', *Diabetes*, 63(8), pp. 2888–2894. doi: 10.2337/db14-0061.

Shepherd, M. *et al.* (2003) 'No deterioration in glycemic control in HNF-1alpha maturity-onset diabetes of the young following transfer from long-term insulin to sulphonylureas', *Diabetes Care*, 26(11), pp. 3191–3192. doi: 10.2337/diacare.26.11.3191-a.

Shepherd, M. *et al.* (2016) 'Systematic Population Screening, Using Biomarkers and Genetic Testing, Identifies 2.5 % of the U.K. Pediatric Diabetes Population With Monogenic Diabetes', *Diabetes Care*, 39(11), pp. 1879–1888. doi: 10.2337/dc16-0645.

Shields, B. M. *et al.* (2010) 'Maturity-onset diabetes of the young (MODY): How many cases are we missing?', *Diabetologia*, 53(12), pp. 2504–2508. doi: 10.1007/s00125-010-1799-4.

Shields, B. M. *et al.* (2018) 'C-peptide decline in type 1 diabetes has two phases: An initial exponential fall and a subsequent stable phase', *Diabetes Care*, 41(7), pp. 1486–1492. doi: 10.2337/dc18-0465.

Shih, D. Q. *et al.* (2001) 'Hepatocyte nuclear factor-1  $\alpha$  is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism', *Nature Genetics*, 27(4), pp. 375–382. doi: 10.1038/86871.

Shivaprasad, C. *et al.* (2014) 'Zinc transporter-8 autoantibodies can replace IA-2 autoantibodies as a serological marker for juvenile onset type 1 diabetes in India', *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 18(3), pp. 345–349. doi:

10.4103/2230-8210.131174.

Singal, D. P. and Blajchman, M. A. (1973) 'Histocompatibility (HL A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus', *Diabetes*, 22(6), pp. 429–432. doi: 10.2337/diab.22.6.429.

Smyth, D. J. *et al.* (2006) 'A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region', *Nature Genetics*, 38(6), pp. 617–619. doi: 10.1038/ng1800.

Solimena, M. *et al.* (1988) 'Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus', *The New England Journal of Medicine*, 318(16), pp. 1012–1020. doi: 10.1056/NEJM198804213181602.

Sørensen, J. S. *et al.* (2013) 'Residual  $\beta$ -cell function 3–6 years after onset of type 1 diabetes reduces risk of severe hypoglycemia in children and adolescents', *Diabetes Care*, 36(11), pp. 3454–3459. doi: 10.2337/dc13-0418.

Soria, J. *et al.* (2008) 'Epidemiology and genetic risk of type 1 diabetes among children in Aragon community, Spain', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 79(1), pp. 112–116. doi: 10.1016/j.diabres.2007.06.013.

Sosenko, J. M. (2016) 'Staging the progression to type 1 diabetes with prediagnostic markers', *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 23(4), pp. 297–305. doi: 10.1097/MED.0000000000000267.

Stanescu, D. E., Lord, K. and Lipman, T. H. (2012) 'The Epidemiology of Type 1 Diabetes in Children', *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 41(4), pp. 679–694. doi: 10.1016/j.ecl.2012.08.001.

Steele, A. M. *et al.* (2010) 'Increased all-cause and cardiovascular mortality in monogenic diabetes as a result of mutations in the HNF1A gene', *Diabetic Medicine*, 27(2), pp. 157–161. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02913.x.

Steele, A. M. *et al.* (2014) 'Prevalence of vascular complications among patients with glucokinase mutations and prolonged, mild hyperglycemia', *Journal of the American Medical Association*, 311(3), pp. 279–286. doi: 10.1001/jama.2013.283980.

Stoy, J. *et al.* (2007) 'Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(38), pp. 15040–4. doi: 10.1073/pnas.0707291104.

Stoy, J. *et al.* (2010) 'Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene', *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(3), pp. 205–215. doi: 10.1007/s11154-010-9151-3.

Strakova, V. *et al.* (2019) 'Screening of monogenic autoimmune diabetes among children with type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases: is it worth doing?', *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 32(10), pp. 1147–1153. doi:

10.1515/jpem-2019-0261.

Tang, S. tao *et al.* (2012) 'Association of cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus: A meta-analysis', *Gene*, 508(2), pp. 165–187. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.044.

Taniguchi, T. *et al.* (2003) 'High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: Concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas', *Pancreas*, 27(1), pp. 26–30. doi: 10.1097/00006676-200307000-00004.

Tattersall, R. B., Fajans, S. S. and Arbor, A. (1975) 'A Difference Between the Inheritance of Classical Juvenile-onset and Maturity-onset Type Diabetes of Young People', *Diabetes*, 24(1), pp. 44–53. doi: 10.2337/diab.24.1.44.

Thanabalasingham, G. *et al.* (2012) 'Systematic Assessment of Etiology in Young-Onset Type 2 Diabetes Is a Maturity-Onset Diabetes of the Young', *Diabetes Care*, 35(6), pp. 1206–1212. doi: 10.2337/dc11-1243.

The Diamond Project Group (2006) 'Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990 – 1999', *Diabetic Medicine*, 23(8), pp. 857–866. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01925.x.

Torsvik, J. *et al.* (2010) 'Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (CEL) are a rare cause of monogenic diabetes', *Human Genetics*, 127(1), pp. 55–64. doi: 10.1007/s00439-009-0740-8.

Toubiana, J. *et al.* (2016) 'Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype', *Blood*, 127(25), pp. 3154–3164. doi: 10.1182/blood-2015-11-679902.

Trisorus, C. *et al.* (2018) 'Prevalence of islet autoantibodies in Thai juvenile-onset type 1 diabetes', *Pediatrics International*, 60(11), pp. 1002–1007. doi: 10.1111/ped.13687.

Urakami, T. (2019) 'Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment', *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 12, pp. 1047–1056. doi: 10.2147/DMSO.S179793.

Urbanová, J. *et al.* (2013) 'Should the negativity for islet cell autoantibodies be used in a prescreening for genetic testing in maturity-onset diabetes of the young? The case of autoimmunity-associated destruction of pancreatic  $\beta$ -cells in a family of HNF1A-MODY subjects', *International Archives of Allergy and Immunology*, 161(3), pp. 279–284. doi: 10.1159/000346906.

Urrutia, I. *et al.* (1998) 'Anomalous behaviour of the 5' insulin gene polymorphism allele 814 : lack of association with Type I diabetes in Basques', 41(9), pp. 1121–1123. doi: 10.1007/s001250051039.

Ushijima, K. *et al.* (2018) 'Comprehensive screening for monogenic diabetes in 89

- Japanese children with insulin-requiring antibody-negative type 1 diabetes', *Pediatric Diabetes*, 19(2), pp. 243–250. doi: 10.1111/pedi.12544.
- Valdes, A. M. and Thomson, G. (2009) 'Several loci in the HLA class III region are associated with T1D risk after adjusting for DRB1-DQB1', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11(Suppl. 1), pp. 46–52. doi: 10.1111/j.1463-1326.2008.01002.x.
- Vardi, P. *et al.* (1987) 'Competitive insulin autoantibody assay. Prospective evaluation of subjects at high risk for development of type I diabetes mellitus', *Diabetes*, 36(11), pp. 1286–1291. doi: 10.2337/diab.36.11.1286.
- Vaxillaire, M. and Froguel, P. (2016) 'Monogenic diabetes: Implementation of translational genomic research towards precision medicine', *Journal of Diabetes*, 8(6), pp. 782–795. doi: 10.1111/1753-0407.12446.
- Vaziri-Sani, F. *et al.* (2011) 'A novel triple mix radiobinding assay for the three ZnT8 (ZnT8RWQ) autoantibody variants in children with newly diagnosed diabetes', *Journal of Immunological Methods*, 371(1–2), pp. 25–37. doi: 10.1016/j.jim.2011.06.011.
- Vehik, K. *et al.* (2020) 'Hierarchical Order of Distinct Autoantibody Spreading and Progression to Type 1 Diabetes in the TEDDY Study', *Diabetes Care*. doi: 10.2337/dc19-2547.
- Vella, A. *et al.* (2005) 'Localization of a Type 1 Diabetes Locus in the IL2RA/CD25 Region by Use of Tag Single-Nucleotide Polymorphisms', *American Journal of Human Genetics*, 76(5), pp. 773–779. doi: 10.1086/429843.
- Verge, C. F. *et al.* (1996) 'Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies', *Diabetes*, 45(Suppl.3), pp. 926–933. doi: 10.2337/diabetes.45.7.926.
- Verkauskiene, R. *et al.* (2016) 'The course of diabetes in children, adolescents and young adults: Does the autoimmunity status matter?', *BMC Endocrine Disorders*. *BMC Endocrine Disorders*, 16(1), p. 61. doi: 10.1186/s12902-016-0145-3.
- Vermeulen, I. *et al.* (2011) 'Contribution of antibodies against IA-2 $\beta$  and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age', *Diabetes Care*, 34(8), pp. 1760–1765. doi: 10.2337/dc10-2268.
- Vicinanza, A. *et al.* (2019) 'Diabetic ketoacidosis in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus: Role of demographic, clinical, and biochemical features along with genetic and immunological markers as risk factors. A 20-year experience in a tertiary Belgian center', *Pediatric Diabetes*, 20(5), pp. 584–593. doi: 10.1111/pedi.12864.
- Vincent, S. R. *et al.* (1983) 'Immunohistochemical Studies of the GABA System in the Pancreas', *Neuroendocrinology*, 36(3), pp. 197–204. doi: 10.1159/000123456.
- Wang, J. *et al.* (2007) 'Prevalence of autoantibody-negative diabetes is not rare at all ages and increases with older age and obesity', *Journal of Clinical Endocrinology and*

*Metabolism*, 92(1), pp. 88–92. doi: 10.1210/jc.2006-1494.

Wasserman, H. *et al.* (2016) 'Bilateral cataracts in a 6-yr-old with new onset diabetes: a novel presentation of a known INS gene mutation', *Pediatric Diabetes*, 17(7), pp. 535–539. doi: 10.1111/pedi.12335.

Weber, S. *et al.* (2006) 'Prevalence of Mutations in Renal Developmental Genes in Children with Renal Hypodysplasia: Results of the ESCAPE Study', *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(10), pp. 2864–2870. doi: 10.1681/ASN.2006030277.

Wenzlau, J. *et al.* (2007) 'The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 104(43), pp. 17040–17045. doi: 10.1073/pnas.0705894104.

Wenzlau, J. M. *et al.* (2008) 'A Common Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphism in the SLC30A8 Gene Determines ZnT8 Autoantibody Specificity in Type 1 Diabetes', *Diabetes*, 57(10), pp. 2693–2697. doi: 10.2337/db08-0522.

Wing, K. *et al.* (2008) 'CTLA-4 Control over FOXP3+ Regulatory T Cell Function', *Science*, 322(5899), pp. 271–275. doi: 10.1126/science.1160062.

Winter, W. and Schatz, D. (2011) 'Autoimmune markers in diabetes', *Clinical Chemistry*, 57(2), pp. 168–175. doi: 10.1373/clinchem.2010.148205.

Wolfsdorf, J. I. *et al.* (2018) 'ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state', *Pediatric Diabetes*, 19(S27), pp. 155–177. doi: 10.1111/pedi.12701.

Yang, J. H. M. *et al.* (2015) 'Natural variation in IL-2 sensitivity influences regulatory T cell frequency and function in individuals with long-standing type 1 diabetes', *Diabetes*, 64(11), pp. 3891–3902. doi: 10.2337/db15-0516.

Yang, L. *et al.* (2010) 'The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 26(7), pp. 579–584. doi: 10.1002/dmrr.1128.

Yeung, W. G., Rawlinson, W. D. and Craig, M. E. (2011) 'Enterovirus Infection and Type 1 Diabetes Mellitus: Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Molecular Studies', *BMJ*, 342, pp. 1–9. doi: 10.1136/bmj.d35.

Zhang, L., Nakayama, M. and Eisenbarth, G. S. (2008) 'Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes', *Current Opinion in Immunology*, 20(1), pp. 111–118. doi: 10.1016/j.coi.2007.11.005.

Zhu, J. *et al.* (2017) 'The clinical characteristics of patients with mitochondrial tRNA Leu(UUR)m.3243A > G mutation: Compared with type 1 diabetes and early onset type 2 diabetes', *Journal of Diabetes and its Complications*, 31(8), pp. 1354–1359. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.04.001.

Ziegler, A. G. *et al.* (2013) 'Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children', *Journal of the American Medical Association*, 309(23), pp. 2473–2479. doi: 10.1001/jama.2013.6285.



## **IX. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO**



## RESEARCH ARTICLE

# Lower Frequency of HLA-DRB1 Type 1 Diabetes Risk Alleles in Pediatric Patients with MODY

Inés Urrutia<sup>✉</sup>, Rosa Martínez<sup>✉</sup>, Tamara López-Euba, Teresa Velayos, Idoia Martínez de LaPiscina, José Ramón Bilbao, Itxaso Rica, Luis Castaño\*, on behalf of The Spanish Group for the Study of MODY and Type 1 diabetes<sup>¶</sup>

BioCruces Health Research Institute, Cruces University Hospital, UPV-EHU, CIBERDEM, CIBERER, Barakaldo, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

¶ Membership of The Spanish Group for the Study of MODY and Type 1 diabetes is provided after the Acknowledgments

\* lcastano@osakidetza.eus



## OPEN ACCESS

**Citation:** Urrutia I, Martínez R, López-Euba T, Velayos T, Martínez de LaPiscina I, Bilbao JR, et al. (2017) Lower Frequency of HLA-DRB1 Type 1 Diabetes Risk Alleles in Pediatric Patients with MODY. PLoS ONE 12(1): e0169389. doi:10.1371/journal.pone.0169389

**Editor:** Güher Saruhan-Direskeneli, Istanbul University, TURKEY

**Received:** November 27, 2015

**Accepted:** December 15, 2016

**Published:** January 4, 2017

**Copyright:** © 2017 Urrutia et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was partially supported by grants from the University of the Basque Country, UPV/EHU (IT795-13), from the Department of Health of the Basque Government (GV2010111185) and from ISCIII (P114/01104) integrated into the National R&D&I Plan 2013-2016 and co-financed by FEDER (European Funds for Regional Development). The funders had no role in study design, data collection and analysis,

## Abstract

### Objective

The aim of this study was to determine the frequency of susceptible HLA-DRB1 alleles for type 1 diabetes in a cohort of pediatric patients with a confirmed genetic diagnosis of MODY.

### Materials and Methods

160 families with a proband diagnosed with type 1 diabetes and 74 families with a molecular diagnosis of MODY (61 *GCK*-MODY and 13 *HNF1A*-MODY) were categorized at high definition for HLA-DRB1 locus. According to the presence or absence of the susceptible HLA-DRB1 alleles for type 1 diabetes, we considered three different HLA-DRB1 genotypes: 0 risk alleles (no DR3 no DR4); 1 risk allele (DR3 or DR4); 2 risk alleles (DR3 and/or DR4).

### Results

Compared with type 1 diabetes, patients with MODY carried higher frequency of 0 risk alleles, OR 22.7 (95% CI: 10.7–48.6) and lower frequency of 1 or 2 risk alleles, OR 0.53 (95% CI: 0.29–0.96) and OR 0.06 (95% CI: 0.02–0.18), respectively.

### Conclusions

The frequency of HLA-DRB1 risk alleles for type 1 diabetes is significantly lower in patients with MODY. In children and adolescents with diabetes, the presence of 2 risk alleles (DR3 and/or DR4) reduces the probability of MODY diagnosis, whereas the lack of risk alleles increases it. Therefore, we might consider that HLA-DRB1 provides additional information for the selection of patients with high probability of monogenic diabetes.

decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Diabetes mellitus represents a group of metabolic disorders characterized by increased levels of blood glucose resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both.

Type 1 diabetes mellitus develops primarily in youth as a result of autoimmune destruction of the pancreatic beta-cells and is characterized by absolute insulin deficiency. In this disorder, glutamic acid decarboxylase (GADA), tyrosine phosphatase (IA2A), zinc transporter 8 (ZnT8A) and insulin autoantibodies (IAA) are currently recognized as autoimmune process markers [1, 2]. The pathogenesis of the disease is determined by complex interactions between several genetic loci and environmental factors. The first genetic contribution strongly associated with type 1 diabetes was found within the HLA region on chromosome 6p21. Susceptibility to, and protection against development of autoimmune diabetes are associated with the highly polymorphic sequences of the HLA class II genes. The strongest susceptibility haplotypes described are HLA DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201 and HLA DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302 especially when both are present in the genotype. [3]

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) refers to the most common form of monogenic diabetes characterized by early onset (usually before age 25), non-autoimmune diabetes with autosomal dominant inheritance and additional features unique to different MODY subtypes [4]. Although more than 10 different genes have been associated with MODY, mutations in the *GCK* and *HNF1A* genes are the most frequent causes of MODY in all populations studied, including the Spanish population. They account for approximately 80% of the cases [5, 6].

MODY can be undiagnosed or misdiagnosed as type 1 or type 2 diabetes [7]. Genetic testing to confirm the clinical diagnosis of MODY has important implications in patient management such as changes in treatment, improvement in the glycemic control avoiding complications and identification of asymptomatic family members [8].

As molecular genetic testing is expensive and arduous it should be limited to those cases more likely to be MODY [9]. In the last few years several analytical tests have been proposed in order to improve the selection of patients to whom the genetic study should be applied [10–14]. However, none of the markers described so far are able to differentiate definitely between these 2 distinct types of diabetes [15, 16].

The aim of this study was to identify susceptible HLA-DRB1 alleles for type 1 diabetes in a Spanish youth population and to determine their frequency in a cohort of pediatric patients with a confirmed genetic diagnosis of MODY.

## Materials and Methods

### Patients

This study included two different groups of Spanish pediatric patients with diabetes. The first group consisted of 160 unrelated families, comprising a new onset patient with type 1 diabetes and their parents. Diagnosis of the disease was done according to the World Health Organization (WHO) criteria [17]. All patients with type 1 diabetes (average onset age  $8.8 \pm 3.9$  years) were positive for one or more of the measured pancreatic autoantibodies (IAA, GADA and IA2A) determined in serum at diagnosis, using previously described standardized radio-assays [1].

The second group consisted of 74 unrelated families, comprising a new onset patient with MODY (61 *GCK*-MODY and 13 *HNF1A*-MODY) and their parents. All *GCK*-MODY (average onset age  $9.2 \pm 5.4$  years) and *HNF1A*-MODY (average onset age  $14.2 \pm 3.8$  years) new onset cases had negative pancreatic autoantibodies. Characteristics of the study population are shown in Table 1.

The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee (CEIC) from Cruces University Hospital, and written informed consent was obtained from all subjects or their parents.

### Genotyping Methods

DNA extraction was performed with QiAamp DNA blood kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany) according to manufacturer's protocol.

**HLA-DRB1 typing.** Polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide method (PCR-SSO) combined with Luminex technology was carried out using LABType RSSOH2B1 (HLA-DRB1-HD) commercial kit (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA). The protocol comprised the DNA amplification process using a group specific primer, hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes (SSO), reading on a special device (LABScan™100) and software interpretation (HLA Fusion™). All procedures were performed according to manufacturers' instructions.

**Mutation screening.** Genetic testing for mutations in *GCK* and *HNF1A* genes was performed by bidirectional Sanger sequencing (ABI 3130 xl Genetic Analyser, Applied Biosystems) as described [6].

### Statistical Analysis

To identify susceptible HLA-DRB1 alleles for type 1 diabetes in our population, an AFBAC study was performed. From the four parental HLA-DRB1 alleles in each family, those never transmitted to a member with type 1 diabetes were categorized as "non-diabetic alleles", and those carried by patients with type 1 diabetes were classified as "diabetic alleles".

To compare the distribution of HLA-DRB1 genotypes between MODY and type 1 diabetes, a case-control study was performed considering the new onset patients with MODY and with type 1 diabetes.

To compare the distribution of HLA-DRB1 genotypes between MODY patients and control subjects, a case-control study was performed. In this case, *GCK*-MODY or *HNF1A*-MODY mutation carriers were compared with healthy family members who did not carry the mutation (healthy controls), ensuring that there was no filial relationship (wives and husbands) among these individuals.

Frequencies were compared using Pearson's chi-square analysis and Fisher exact test when necessary. The significance level was defined as  $p < 0.05$ . We evaluated the results using SPSS software (version 21; SPSS Inc., Chicago, IL).

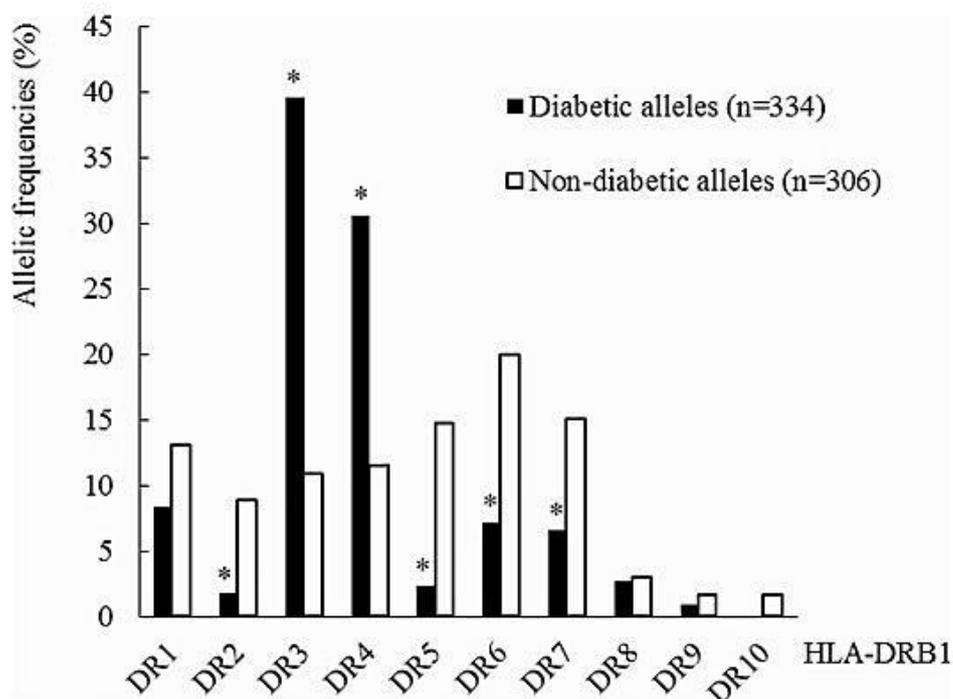
### Results

The distribution of the frequencies of diabetic and non-diabetic HLA-DRB1 alleles in Spanish youth population is shown in Fig 1. Our dataset showed an increase of DR3 and DR4 alleles in

**Table 1. Characteristics of the population included in the study stratified by HLA-DRB1 genotype.** Data are shown as % or mean  $\pm$  SD; T1D, type 1 diabetes; n/a, not applicable; DRX, corresponds to any HLA-DRB1 allele different from DR3 and DR4; DRB1\*0403 allele is considered DRX.

		T1D (n = 160)	MODY (n = 74)	Controls (n = 75)
<b>Females</b>		<b>53.7</b>	<b>56.7</b>	<b>49.3</b>
<b>Age at diagnosis (years)</b>		<b>8.8 <math>\pm</math> 3.9</b>	<b>10.0 <math>\pm</math> 5.9</b>	<b>n/a</b>
2 risk alleles	DR3/DR4	27.5	2.7	1.3
	DR3/DR3	13.7	0.0	0.0
	DR4/DR4	6.9	2.7	0.0
1 risk allele	DR3/DRX	25.6	16.2	18.7
	DR4/DRX	18.7	13.5	17.3
0 risk alleles	DRX/DRX	7.5	64.9	62.7

doi:10.1371/journal.pone.0169389.t001



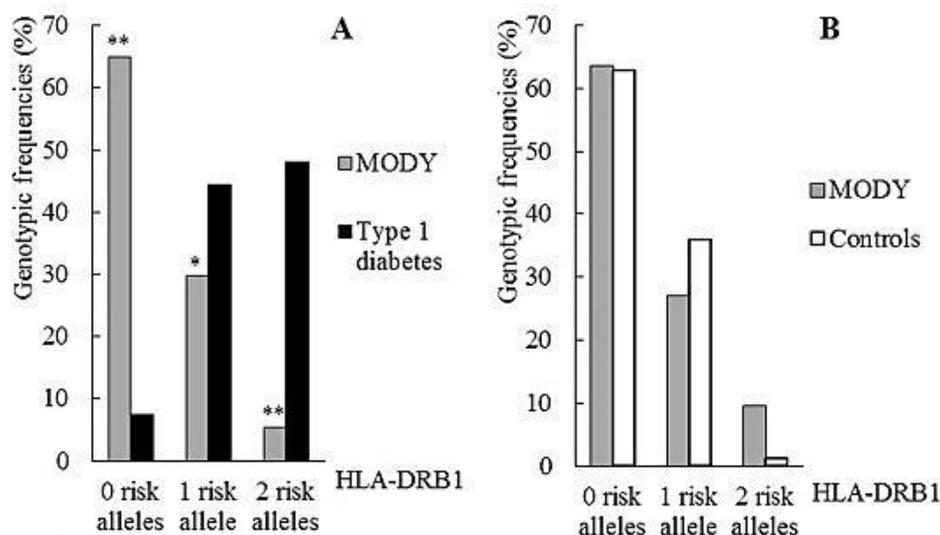
**Fig 1. Distribution of the frequencies of diabetic and non-diabetic HLA-DRB1 alleles in the Spanish population.** DR2 (DRB1\*15, DRB1\*16); DR5 (DRB1\*11, DRB1\*12); DR6 (DRB1\*13, DRB1\*14). Asterisks indicate cases in which differences in the allelic frequency are significant \* $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0169389.g001

the diabetic alleles group compared with the non-diabetic ones, OR 5.41 (95% CI: 3.48–8.44) and OR 3.40 (95% CI: 2.19–5.31), respectively. On the contrary, DR2, DR5, DR6 and DR7 allelic frequencies were higher in the non-diabetic alleles group, OR 0.19 (95% CI: 0.06–0.48); 0.14 (0.06–0.32); 0.31 (0.18–0.53); 0.40 (0.23–0.70), respectively.

Among the most prevalent HLA-DRB1\*04 subtypes, \*0401, \*0402, \*0404 and \*0405 were more represented in the diabetic alleles group. Conversely, subtype \*0403 was more represented in the non-diabetic alleles group (12/35, 34.3%) than in the diabetic alleles group (3/102, 2.9%)  $p < 0.001$ . Due to the fact that \*0403 did not confer susceptibility to type 1 diabetes, OR 0.06 (95% CI: 0.01–0.25), the \*0403 allele is excluded from the DR4 alleles group in the subsequent analysis.

HLA-DRB1 genotype frequency distribution in patients with type 1 diabetes, patients with MODY and healthy controls is shown in Fig 2. Depending on the presence or absence of the susceptible alleles for type 1 diabetes, DR3 and DR4, we have grouped the genotypes in 3 categories: 0 risk alleles (no DR3 no DR4 present); 1 risk allele (only one allele DR3 or DR4 is present); 2 risk alleles (individuals homozygous for DR3 or DR4, or DR3-DR4 heterozygous). As shown in Fig 2A, the distribution of frequencies of the HLA-DRB1 genotypes was significantly different in MODY compared to patients with type 1 diabetes ( $p < 0.001$ ). In this case, the comparison of each of the HLA-DRB1 genotypes versus the remaining categories, showed that the frequency of genotypes with two risk alleles was significantly lower in MODY than in patients with autoimmune diabetes, OR 0.06 (95% CI: 0.02–0.18). Furthermore, the frequency of genotypes carrying a single risk allele was also lower in MODY patients, OR 0.53 (95% CI: 0.29–0.96). A remarkable



**Fig 2. Distribution of HLA-DRB1 genotypes in patients with type 1 diabetes, patients with MODY and control subjects.** 0 risk alleles (no DR3 or DR4); 1 risk allele (DR3 or DR4); 2 risk alleles (DR3/3, DR4/4 or DR3/4). (A) Two groups are compared: probands with MODY (n = 74) and probands with type 1 diabetes (n = 160). HLA-DRB1 genotype frequencies differed significantly between groups ( $p < 0.001$ ). Comparisons of each of the genotypes separately showed significant differences in all cases (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.03$ ). (B) Two groups are compared: patients with MODY (n = 63) and healthy controls (n = 75). There were no significant differences between groups ( $p = 0.067$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0169389.g002

higher proportion of MODY patients carried genotypes without risk alleles when compared with patients with type 1 diabetes, OR 22.77 (95% CI: 10.7–48.6). There were no significant differences in the HLA-DRB1 genotype frequency distribution between MODY patients and healthy controls ( $p = 0.067$ ) Fig 2B.

To examine the validity of HLA-DRB1 genotyping in the selection of pediatric patients for genetic study of MODY, we categorized the groups as associated with MODY, when one or no risk alleles were present, and as associated with type 1 diabetes, when two risk alleles were present. This test showed a sensitivity of 94.6% with a specificity of 48.1% when discerning MODY from type 1 diabetes. The positive predictive value for the identification of MODY was 45.8% for one or no risk allele and the negative predictive value was 95.1% for two risk alleles. The test accuracy to detect monogenic diabetes was 62.8%

## Discussion

Our data support the association of DR3 and DR4 alleles with type 1 diabetes and also the protective role of the DRB1\*0403 allele, as already described in Caucasian populations [3, 18, 19]. Furthermore, the HLA-DRB1 genotype distribution is similar between MODY and control subjects. This fact provides evidence that, unlike type 1 diabetes, the development of MODY is not associated with HLA-DRB1 genotype.

The difference in HLA-DRB1 genotype distribution between MODY and type 1 diabetes is especially remarkable when patients carry two risk alleles (5.4% MODY vs. 48.1% type 1 diabetes) or none (64.9% MODY vs. 7.5% type 1 diabetes). When only one risk allele is present, the difference has less importance (29.7% MODY vs. 44.3% type 1 diabetes) so the presence of a single risk allele is not conclusive to differentiate between autoimmune diabetes and MODY.

and for this reason HLA-DRB1 genotyping has the low specificity shown before (48.1%). Other clinical and/or analytical data should be considered to achieve a better specificity.

These results suggest it might be interesting to perform HLA-DRB1 test before initiating the genetic study of MODY: as two risk alleles are present in just 5% of patients with monogenic diabetes, in this case genetic testing for MODY should be performed only if other clinical and/or analytical data suggest it. In the same way, the lack of risk alleles is found in just 7.5% of patients with type 1 diabetes. In this case, the possibility of proposing an unnecessary genetic study is low and we would recommend doing it. For the accurate interpretation of the test, it is important to note that the low prevalence of MODY in children with diabetes, 1–3% [20], shifts the diagnosis towards type 1 diabetes so that the presence of 2 risk alleles effectively rules out MODY. For the same reason, the probability to mistakenly select a patient for a genetic study increases. Nevertheless, to minimize this, it is of utmost importance to take into account all the available clinical and analytical data to support the decision to include a patient in a genetic study to confirm MODY.

Additionally, HLA-DRB1 typing might be useful in particular situations when clinical and/or analytical data are not conclusive. This can be the case when the family history of diabetes is not available or a patient carries a *de novo* mutation. It has been recently published that the prevalence of *de novo* mutations in MODY may be more frequent than previously assumed [21], and in our data set it is 6.7%. This situation could discourage medical doctors to perform genetic testing and therefore MODY could be misdiagnosed. Another particular situation includes unavailability of serum at the onset of the disease and/or negative pancreatic autoantibodies. Pancreatic autoantibody screening at the onset of the disease is, so far, the most specific test described for autoimmune diabetes differentiation. Although 10% of patients with type 1 diabetes may present negative pancreatic autoantibodies [5], we recommend this test as the first step for the differentiation of MODY. This analysis has to be made close to the moment of diagnosis because autoantibody titers decrease as a function of longer duration type 1 diabetes [22]. Inability to detect pancreatic autoantibodies could reject a type 1 diabetes diagnosis and could suggest the possibility of being MODY. If antibodies are positive and the patient has evident clinical features of autoimmune diabetes, the diagnosis would be type 1 diabetes and then, HLA-DRB1 genotyping could just confirm it.

A two-SNPs screening test to identify the highest risk HLA genotype for patients with type 1 diabetes has been published [23]. This method could be used to replace HLA-DRB1 typing even though it cannot identify the DR3 and DR4 homozygous genotypes that also confer a remarkable risk to type 1 diabetes and it may not be accessible everywhere. On the contrary, HLA typing is a well standardized technique in clinical practice, is available in most hospitals in Spain and is able to identify all HLA-DRB1 genotypes associated with type 1 diabetes.

There are several limitations of this study. It is well known that MODY can be misdiagnosed not only as type 1 but also as type 2 diabetes. Moreover, it is unlikely that HLA-DRB1 could play any role in discriminating MODY from type 2 diabetes. Thus, we could consider a limitation in our study not having included a group of patients with type 2 diabetes in the analysis. However, the current prevalence of type 2 diabetes in our Caucasian youth population is very low [24, 25]. Therefore, it is unlikely that MODY may be misdiagnosed as type 2 diabetes in this pediatric population. We should also point out that our study has been exclusively performed in Caucasian youth population, thus, results should be interpreted with caution when considering other ethnic groups or adult populations where type 2 diabetes is more prevalent. Finally, the type 1 diabetes group includes exclusively pediatric patients with positive pancreatic autoantibodies and we did not consider the C-peptide value.

In summary, the frequency of HLA-DRB1 risk alleles for type 1 diabetes is significantly lower in patients with MODY. In children and adolescents with diabetes, the presence of 2 risk

alleles (DR3 and/or DR4) reduces the probability of MODY diagnosis, whereas the lack of risk alleles increases it. HLA-DRB1 genotyping together with all known biomarkers, could be helpful in order to select pediatric patients with high probability of monogenic diabetes.

### Spanish Group for the Study of MODY and Type 1 Diabetes

H. Basurto—Bizkaia (Concepción Fernández-Ramos, Javier Núñez), H. Costa del Sol—Málaga (Leopoldo Tapia), H. Cruces—Bizkaia (Anibal Aguayo, Sonia Gaztambide, Teba González-Frutos, Gema Grau, Amaia Rodríguez-Estévez, Amaia Vela), H. Marqués de Valdecilla—Santander (Cristina Luzuriaga), H. Miguel Servet—Zaragoza (Gracia M Lou), Complejo Hospitalario de Navarra (María Chueca), H. Ramón y Cajal—Madrid (Raquel Barrio), H. Reina Sofía (Joaquín Gómez-Vázquez), H. San Pedro de Alcántara—Cáceres (Jesús González de Buitrago), H. Severo Ochoa—Madrid (Beatriz García-Cuartero), H. Son Espases—Palma de Mallorca (Diego de Sotto), H. Vall d'Hebron—Barcelona (Ariadna Campos), H. Virgen del Rocío—Sevilla (Ana L. Gómez-Gila)

### Acknowledgments

The authors thank JM Lima and R Coscojuela (RAFER, S.L) for HLA-DRB1 technical support. We are also grateful to patients who agreed to take part of this work and to A. Sanz, A. Etxaniz and G. Pérez-Nanclares for technical assistance.

### Author Contributions

**Conceptualization:** LC IR.

**Formal analysis:** IU RM TL TV IM JRB.

**Funding acquisition:** LC.

**Investigation:** IU RM TL TV IM.

**Methodology:** IU RM TL TV IM JRB.

**Project administration:** IR LC.

**Resources:** LC IR Spanish Group for the Study of MODY and T1D.

**Writing – original draft:** IU RM.

**Writing – review & editing:** IU RM IM JRB IR LC.

### References

1. Bilbao JR, Rica I, Vázquez JA, Busturia MA, Castaño L. Influence of sex and age at onset on autoantibodies against insulin, GAD65 and IA2 in recent onset type 1 diabetic patients. *Horm Res.* 2000; 54(4):181–185. PMID: 11416235
2. Giannopoulou EZ, Winkler C, Chmiel R, Matzke C, Scholz M, Beyerlein A, et al. Islet autoantibody phenotypes and incidence in children at increased risk for type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2015 Oct; 58(10):2317–2323. doi: 10.1007/s00125-015-3672-y PMID: 26138334
3. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Vamey M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes.* 2008; 57(4):1084–1092. doi: 10.2337/db07-1331 PMID: 18252895
4. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT; European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) MODY group. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia.* 2008; 51(4):546–553. doi: 10.1007/s00125-008-0942-y PMID: 18297260
5. McDonald TJ, Ellard S. Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2013; 50(5):403–415.

6. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, Bilbao JR, Vazquez JA, San Pedro JI, et al. Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007; 67(4):538–546.
7. Stone MA, Camosso-Stefinovic J, Wilkinson J, de Lusignan S, Hattersley AT, Khunti K. Incorrect and incomplete coding and classification of diabetes: a systematic review. *Diabet Med*. 2010; 27(5):491–497. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02920.x PMID: 20536944
8. Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT. A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients. *Diabet Med*. 2009; 26(4):437–441. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02690.x PMID: 19388975
9. Naylor RN, John PM, Winn AN, Carmody D, Greeley SA, Phillipson LH, et al. Cost-effectiveness of MODY genetic testing: translating genomic advances into practical health applications. *Diabetes Care*. 2014; 37(1):202–209. doi: 10.2337/dc13-0410 PMID: 24026547
10. McDonald TJ, Colclough K, Brown R, Shields B, Shepherd M, Bingley P, et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011; 28(9):1028–1033. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03287.x PMID: 21395678
11. Steele AM, Wensley KJ, Ellard S, Murphy R, Shepherd M, Colclough K, et al. Use of HbA1c in the identification of patients with hyperglycaemia caused by a glucokinase mutation: observational case control studies. *PLoS One*. 2013; 8(6):e65326. doi: 10.1371/journal.pone.0065326 PMID: 23799006
12. Jones AG, Hattersley AT. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet Med*. 2013; 30(7):803–817. doi: 10.1111/dme.12159 PMID: 23413806
13. Besser RE, Shepherd MH, McDonald TJ, Shields BM, Knight BA, Ellard S, et al. Urinary C-peptide creatinine ratio is a practical outpatient tool for identifying hepatocyte nuclear factor 1-(alpha)/hepatocyte nuclear factor 4-(alpha) maturity-onset diabetes of the young from long-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(2):286–291. doi: 10.2337/dc10-1293 PMID: 21270186
14. Thanabalasingham G, Shah N, Vaxillaire M, Hansen T, Tuomi T, Gašperiková D, et al. A large multi-centre European study validates high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) as a clinical biomarker for the diagnosis of diabetes subtypes. *Diabetologia*. 2011; 54(11):2801–2810. doi: 10.1007/s00125-011-2261-y PMID: 21814873
15. Urbanová J, Rypáčková B, Procházková Z, Kučera P, Cerná M, Anděl M, et al. Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA1c level. *Diabet Med*. 2014; 31(4):466–471. doi: 10.1111/dme.12314 PMID: 24102923
16. Urbanová J, Rypáčková B, Kučera P, Anděl M, Heneberg P. Should the negativity for islet cell autoantibodies be used in a prescreening for genetic testing in maturity-onset diabetes of the young? The case of autoimmunity-associated destruction of pancreatic  $\beta$ -cells in a family of HNF1A-MODY subjects. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 161(3):279–284. doi: 10.1159/000346906 PMID: 23548576
17. Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998; 15:539–553. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S PMID: 9686693
18. Escribano-de-Diego J, Sánchez-Velasco P, Luzuriaga C, Ocejo-Vinyals JG, Paz-Miguel JE, Leyva-Cobián F. HLA class II immunogenetics and incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in the population of Cantabria (Northern Spain). *Hum Immunol*. 1999; 60(10):990–1000. PMID: 10566601
19. Soria J, Garagorri JM, Rodríguez M, Rodríguez G, Larrad L, Elizalde M. Epidemiology and genetic risk of type 1 diabetes among children in Aragon community, Spain. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; 79(1):112–116. doi: 10.1016/j.diabres.2007.06.013 PMID: 17681393
20. Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, Davis C, Dolan LM, et al. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Oct; 98(10):4055–4062. doi: 10.1210/jc.2013-1279 PMID: 23771925
21. Stanik J, Dusatkova P, Cinek O, Valentinova L, Huckova M, Skopkova M, et al. De novo mutations of GCK, HNF1A and HNF4A may be more frequent in MODY than previously assumed. *Diabetologia*. 2014; 57(3):480–484. doi: 10.1007/s00125-013-3119-2 PMID: 24323243
22. Savola K, Sabbah E, Kulmala P, Vähäsalo P, Ilonen J, Knip M. Autoantibodies associated with Type 1 diabetes mellitus persist after diagnosis in children. *Diabetologia*. 1998; 41(11):1293–1297. doi: 10.1007/s001250051067 PMID: 9833935
23. Barker JM, Triolo TM, Aly TA, Baschal EE, Babu SR, Kretowski A, et al. Two single nucleotide polymorphisms identify the highest-risk diabetes HLA genotype: potential for rapid screening. *Diabetes*. 2008 Nov; 57(11):3152–3155. doi: 10.2337/db08-0605 PMID: 18694972
24. Bahillo-Curieses MP, Hemoso-López F, Martínez-Sopena MJ, Cobreros-García P, García-Saseta P, Tríguez-García M, et al. Prevalence of insulin resistance and impaired glucose tolerance in a sample of

- obese Spanish children and adolescents. *Endocrine*. 2012; 41(2):289–295. doi: 10.1007/s12020-011-9540-8 PMID: 21964644
25. Aguayo A, Vela A, Aniel-Quiroga A, Blarduni E, Fernández C, Grau G, et al. Absence of diabetes mellitus type 2 in obese children and adolescents in the north of Spain. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2013; 26(1–2):25–29. doi: 10.1515/jpem-2012-0200 PMID: 23329743

## RESEARCH ARTICLE

## Negative autoimmunity in a Spanish pediatric cohort suspected of type 1 diabetes, could it be monogenic diabetes?

Inés Urrutia<sup>1,2</sup>, Rosa Martínez<sup>1,2</sup>, Itxaso Rica<sup>1,2,3</sup>, Idoia Martínez de LaPiscina<sup>1,2</sup>, Alejandro García-Castaño<sup>1,2</sup>, Anibal Aguayo<sup>1,2</sup>, Begoña Calvo<sup>1</sup>, Luis Castaño<sup>1,2\*</sup>, on behalf of The Spanish Pediatric Diabetes Collaborative Group<sup>¶</sup>

**1** Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Cruces University Hospital, UPV-EHU, Bizkaia, Spain, **2** CIBERDEM, CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **3** Pediatric Endocrinology Service, Cruces University Hospital, Osakidetza, Bizkaia, Spain

☞ These authors contributed equally to this work.

¶ Membership of The Spanish Pediatric Diabetes Collaborative Group is provided in the Acknowledgments.

\* lcastano@osakidetza.eus



## OPEN ACCESS

**Citation:** Urrutia I, Martínez R, Rica I, Martínez de LaPiscina I, García-Castaño A, Aguayo A, et al. (2019) Negative autoimmunity in a Spanish pediatric cohort suspected of type 1 diabetes, could it be monogenic diabetes? PLoS ONE 14(7): e0220634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220634>

**Editor:** Lisa Swartz Topor, Brown University Warren Alpert Medical School, UNITED STATES

**Received:** March 15, 2019

**Accepted:** July 19, 2019

**Published:** July 31, 2019

**Copyright:** © 2019 Urrutia et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was partially supported by grants from Menarini Group Spain (BCA/16/030), University of the Basque Country, UPV/EHU (IT795-13), Department of Health of the Basque Government (GV2016111035) and ISCIII (PI14/01104) integrated into the National R&D&I Plan 2013-2016 and co-financed by FEDER (European

## Abstract

## Objective

Monogenic diabetes can be misdiagnosed as type 1 or type 2 diabetes in children. The right diagnosis is crucial for both therapeutic choice and prognosis and influences genetic counseling. The main objective of this study was to search for monogenic diabetes in Spanish pediatric patients suspected of type 1 diabetes with lack of autoimmunity at the onset of the disease. We also evaluated the extra value of ZnT8A in addition to the classical IAA, GADA and IA2A autoantibodies to improve the accuracy of type 1 diabetes diagnosis.

## Methods

Four hundred Spanish pediatric patients with recent-onset diabetes (mean age  $8.9 \pm 3.9$  years) were analyzed for IAA, GADA, IA2A and ZnT8A pancreatic-autoantibodies and HLA-DRB1 alleles. Patients without autoimmunity and those with only ZnT8A positive were screened for 12 monogenic diabetes genes by next generation sequencing.

## Results

ZnT8A testing increased the number of autoantibody-positive patients from 373 (93.3%) to 377 (94.3%). An isolated positivity for ZnT8A allowed diagnosing autoimmune diabetes in 14.8% (4/27) of pediatric patients negative for the rest of the antibodies tested. At least 2 of the 23 patients with no detectable autoimmunity (8%) carried heterozygous pathogenic variants: one previously reported missense variant in the *INS* gene (p.Gly32Ser) and one novel frameshift variant (p.Val264fs) in the *HNF1A* gene. One variant of uncertain significance was also found. Carriers of pathogenic variants had HLA-DRB1 risk alleles for autoimmune diabetes and clinical characteristics compatible with type 1 diabetes except for the absence of autoimmunity.

Funds for Regional Development). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Conclusion

ZnT8A determination improves the diagnosis of autoimmune diabetes in pediatrics. At least 8% of pediatric patients suspected of type 1 diabetes and with undetectable autoimmunity have monogenic diabetes and can benefit from the correct diagnosis of the disease by genetic study.

## Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an organ-specific autoimmune disorder caused by the destruction of insulin-producing pancreatic  $\beta$ -cells leading to an absolute insulin deficiency. Although T1D can be diagnosed at any age, it is one of the most common chronic diseases of childhood. Peaks in presentation occur between 5–7 years of age and at or near puberty [1]. The presence of autoantibodies against several pancreatic islet molecules in response to the autoimmune process is, to date, the best predictive and diagnostic marker for T1D [2]. The autoantibodies that have been of most interest from a clinical and research perspective are islet-cell cytoplasmic autoantibodies (ICA), those against the 65kD isoform of glutamic acid decarboxylase (GADA), the pancreatic tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (IA-2A) and insulin autoantibodies (IAA). More recently, Zinc transporter 8 protein islet autoantibodies (ZnT8A) have also been identified [3]. Nevertheless, not all patients with suspected T1D show evidence of autoimmunity on the basis of the above-mentioned markers [4].

The trigger of the autoimmune process associated with T1D is determined by complex interactions between several genetic loci (nearly 40 loci described so far) and environmental factors [1]. Susceptibility to and protection against the development of autoimmune diabetes are mainly associated with the highly polymorphic sequences of the HLA class II genes on chromosome 6p21. In Caucasians, HLA haplotypes DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 and DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02 confer the greatest susceptibility, while the DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 haplotype provides disease protection [5].

Monogenic diabetes (MD) is a clinically and genetically heterogeneous disease that includes maturity onset diabetes of the young (MODY) and infancy-onset and neonatal diabetes mellitus, which are characterized by functional defects of pancreatic  $\beta$ -cells resulting in insulin deficiency and moderate to severe hyperglycemia in early life [6]. It accounts for at least 1–2% of all cases of diabetes. MODY, the most common type of monogenic diabetes, is an autosomal-dominant form of non-autoimmune diabetes, typically diagnosed before 25 years of age. More than 12 different genes have been associated with MODY. Pathogenic variants in *GCK* and *HNF1A* genes account for approximately 80% of all MODY cases followed by *HNF4A* and *HNF1B* genes representing about 10% and 6% respectively, although percentages can differ dramatically country-to-country due to different recruitment biases. Pathogenic variants in the remainder of the genes are rare forms of MODY [7].

Given that the clinical features of MD are often non-specific, it is estimated that around 80% of MD cases remain undiagnosed or are misdiagnosed as type 1 or type 2 diabetes [7]. Identification of the correct etiology of diabetes is crucial for clinical management, therapeutic choice and prognosis, as well as for genetic counseling, when applicable [8].

The main objective of this study was to search, in a cohort of Spanish pediatric patients suspected of T1D, whether a monogenic form of diabetes could be identified in cases with absence of immunological markers at the onset of the disease. We also aimed to assess the further value

**Table 1.** Characteristics of the population included in the study according to antibody status.

	Antibody-positive (n = 377)	Antibody-negative (n = 23)	p-value
Gender (% female)	48.0	34.8	n.s. <sup>a</sup>
Age of onset (years)	8.9 ± 3.9	9.6 ± 4.2	n.s. <sup>c</sup>
1 <sup>st</sup> degree relatives with any DM	17.2	13.0	n.s. <sup>b</sup>
Presence of DKA	40.8	18.2	0.035 <sup>a</sup>
HLA-DRB1* 0 risk alleles	8.0	8.7	n.s. <sup>b</sup>
HLA-DRB1* 1 risk allele	42.4	43.5	n.s. <sup>a</sup>
HLA-DRB1* 2 risk alleles	49.6	47.8	n.s. <sup>a</sup>

Age is shown as mean ± SD. Rest of data is shown as %. 1<sup>st</sup> degree relatives: parents and/or siblings (Ab+ n = 372; Ab- n = 23). DKA: Diabetic Ketoacidosis (Ab+ n = 377; Ab- n = 22). HLA-DRB1 risk alleles are defined based on the report [11]: 0 risk alleles (no DR3 no DR4); 1 risk allele (DR3 or DR4); 2 risk alleles (DR3/3, DR4/4 or DR3/4).

<sup>a</sup> Pearson's chi-square test

<sup>b</sup> Fisher's exact test

<sup>c</sup> Mann-Whitney U-test

n.s.: no significant differences (p>0.05).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220634.t001>

of ZnT8A screening in addition to the classical IAA, GADA and IA2A autoantibodies for the diagnosis of autoimmune diabetes.

## Methods

### Patients

We recruited 400 unrelated pediatric patients with recent-onset type 1 diabetes diagnosed according to the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD) criteria [9] who were less than a week on insulin replacement therapy. Participants were recruited from seven referral hospitals in Spain between 2012 and 2017 (mean onset age 8.9 ± 3.9 years, 47.3% female). In all cases HLA-DRB1 alleles and IAA, GADA, IA2A and ZnT8A at diagnosis were analyzed. It was considered positive autoimmunity to have at least one positive antibody. Clinical data collected from all patients at diabetes onset included: age, presence of diabetic ketoacidosis (DKA) according to the ISPAD criteria [10] and family history of diabetes (Table 1 and S1 Table).

In cases with absence of autoimmunity, more detailed clinical data recorded at diagnosis and at the last check-up was added. These included: body mass index (BMI) expressed as z-score for children according to the 2010 Spanish growth charts [12], duration of diabetes symptoms (polydipsia, polyphagia, polyuria, weight loss and/or blurred vision), analytical data and insulin dose (Table 2). The study was approved by the corresponding Clinical Research Ethics Committee and written informed consent was obtained from all subjects and/or their parents.

### Antibody analyses

Pancreatic autoantibodies (IAA, GADA, IA2A and ZnT8A) were determined in serum at diagnosis, using previously described standardized radio-assays [13]. IAA were determined using a competitive fluid-phase radio-assay which uses [<sup>125</sup>I]-labelled, recombinant human insulin (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) as antigen. GADA, IA2A and ZnT8A were determined by means of standardized radio-binding assays using *in vitro* transcribed and translated [<sup>35</sup>S]-labelled recombinant human full-length GAD65, IA2ic (amino acids 605–979) and ZnT8 antigen. The ZnT8A assay simultaneously measures autoantibodies against both variants of

Table 2. Clinical characteristics and HLA-DRB1 typing of the 23 patients with suspected T1D and negative autoimmunity.

Patient ID	Background		Clinical features at diagnosis						Clinical features at last check-up						HLA-DRB1 Allele1/ Allele 2	
	Gender	1 <sup>st</sup> degree relatives with DM	Age at onset (years)	BMI z-score	DM Symptoms duration (days)	DKA	Glucose (mmol/L)	HbA1C (%)	C-Peptide (nmol/L)	Insulin dose (U/Kg/day)	Time of evolution (years)	BMI z-score	HbA1C (%)	Insulin dose (U/Kg/day)		Other autoimmune disease
1	F	0	9.3	-1.29	30	No	37.91	>15.0	<0.02	0.85	5.6	0.14	7.7	0.53	No	0301 / 0301
2	M	0	14.7	2.72	20	No	13.82	13.0	0.57	0.75	4.2	2.29	6.5	0.32	Thyroiditis	0102 / 1101
3	F	Mother	14.3	0.41	90	No	15.54	12.5	0.71	0.80	1.4	1.69	9.0	1.70	No	0404 / 0802
4	M	0	7.0	-0.74	14	Yes	23.42	11.7	0.10	0.90	5.0	-0.44	8.7	0.80	No	0403 / 1102
5	M	0	13.3	1.59	15	No	19.81	11.1	0.16	0.85	2.1	0.63	6.4	0.80	No	0301 / 1601
6	M	0	16.0	-0.12	30	No	28.80	11.0	0.10	0.65	2.7	-0.18	6.5	0.17	No	0301 / 0301
7	M	0	8.1	-2.02	21	Yes	41.96	13.1	N/D	1.00	2.2	-1.29	6.0	0.46	No	0301 / 1601
8	M	0	15.9	3.18	60	No	16.65	12.7	0.34	0.90	4.8	N/D	7.5	N/D	N/D	0404 / 0901
9	F	0	9.3	0.64	15	No	21.92	11.5	0.41	0.81	4.7	0.35	7.5	0.82	No	0301 / 0405
10	F	0	10.8	0.37	6	No	11.99	13.0	0.33	0.68	2.9	0.51	6.7	0.50	No	0301 / 0403
11	M	N/D	5.7	-0.41	5	No	8.82	8.7	0.38	0.33	2.9	-0.63	8.1	0.41	No	0405 / 1401
12	M	0	7.3	-0.39	3	No	12.88	5.9	0.61	0.40	2.9	-0.05	7.6	1.00	No	0301 / 0701
13	M	0	8.0	-1.25	7	No	25.20	13.0	0.10	1.02	2.7	-0.63	6.9	0.77	No	0301 / 0801
14	F	0	13.8	-0.41	180	Yes	>27.75	17.5	N/D	1.27	2.3	-0.42	11	0.49	No	0101 / 0401
15	M	0	7.4	-0.37	7	No	18.04	10.8	0.29	0.97	2.3	-0.20	8.2	0.84	No	0401 / 0701
16	M	0	9.9	-0.46	60	No	13.93	11.0	0.13	0.90	2.8	-0.63	6.7	0.79	Thyroiditis	03 / 04
17	F	0	8.5	-0.70	30	No	51.84	17.2	N/D	1.23	1.7	0.17	7.6	0.87	No	0301 / 0405
18	M	Mother	12.0	0.35	7	No	11.27	8.9	0.51	0.62	0.8	0.02	6.4	0.00	No	0301 / 0402
19	M	0	14.4	0.51	30	No	18.54	10.5	0.57	0.69	0.4	0.46	5.8	0.17	No	0301 / 0301
20	M	Mother	0.8	-1.16	7	Yes	18.34	8.8	0.04	0.76	0.7	-0.10	8.1	0.61	Celiac disease	0301 / 0404
21	F	0	2.2	-0.47	21	N/D	24.70	11.8	0.05	1.20	0.3	2.74	7.1	0.74	No	0301 / 0401
22	M	0	5.6	1.14	7	No	20.59	11.0	0.08	0.72	0.8	0.14	7.1	0.60	No	0301 / 0401
23	F	0	6.3	-0.68	60	No	40.13	13.6	0.15	1.20	0.9	0.23	8.4	0.56	No	0301 / 0404

F: Female; M: Male; 1<sup>st</sup> degree relatives: parents and/or siblings; BMI z-score: Body mass index expressed as z-score for children; Symptoms of DM: At least 2 of the classic symptoms associated with disease onset, that is, polydipsia, polyphagia, polyuria, weight loss and/or blurred vision; DKA: Diabetic Ketoacidosis. Normal range for: Glucose 3.72–6.1 mmol/L; Fasting Serum C-Peptide 0.26–1.39 nmol/L; HbA1C 4.8–6.2%; N/D: No data.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220634.t002>

the COOH-terminal domain (Arg325/Trp325). Antibody results for GADA, IA2A and ZnT8A are expressed as a semi-quantitative index calculated using a dilution curve of a positive sample. All cut-off values were set at the 99th percentile of the control population. Our laboratory has participated in different islet autoantibody standardization program (IASP) workshops, the last one in 2018. Specificity was 100% for all four antibody assays and sensitivity was 65% for IAA, 68% for GADA and 62% for IA2A and ZnT8A.

### Genetic analyses

DNA extraction was performed using the QiAamp DNA blood kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). DNA quality and quantification was assessed using both NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) consistent with the manufacturers' instructions.

**HLA-DRB1 typing.** Polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide method (PCR-SSO) combined with Luminex technology was carried out using the LABType RSOH2B1 (HLA-DRB1-HD) commercial kit (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA). All procedures were performed according to the manufacturers' instructions. HLA-DRB1 risk alleles for T1D were defined based on the previous report published by our group [11].

**Genetic screening.** Genetic testing was performed by next generation sequencing (NGS). A customized gene panel was designed with the Ion AmpliSeq Designer tool v.4.4.8 ([www.ampliseq.com](http://www.ampliseq.com)). The gene panel comprised the 3' and 5' UTR regions, promoters, the entire coding region and exon-intron boundaries ( $\pm 50$  bp) of 12 known genes related to monogenic diabetes, including the most frequent genes, such as *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11* and the infrequent ones, *PDX1*, *NEUROD1*, *KLF11*, *PAX4* and *BLK*. The target size was 69,220 bp (272 amplicons from 125 to 375 bp in size) with a theoretical coverage of 99.13% for the targeted regions.

Libraries were prepared in three pools per patient with the Ion AmpliSeq Library kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Sequencing was performed on a PGM Ion Torrent NGS sequencer using the Ion PGM Hi-Q View Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) and an Ion 316 chip to obtain an average coverage depth of 100 reads per base. Sequence alignment and variant calling were performed using Torrent Suite Software v.5.0.4. Resulting aligned reads (BAM files) and variant calling files (VCF files) were then transferred to Ion Reporter Software v.5.10.0 for variant annotation. Variants with low quality (Phred-like score  $\leq 30$  associated with a  $p$ -value  $> 0.001$ ) and Minor Allele Frequency (MAF)  $> 0.01$  in population databases were excluded. The minimal depth per base established to validate the sequence was 20 reads and any area of interest that did not reach at least 20 reads was sequenced by Sanger (ABI 3130xl Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific). The average coverage depth achieved per base and per patient was 508 reads (from 885 to 218 with a base coverage uniformity of 92%) and 98% of targeted bases were covered by more than 20 reads.

For the validation of this panel we included independent DNA samples from 29 patients with 64 previously sequenced variants. The analysis showed a sensitivity of 98.5% and a specificity of 96.5% for point variations and small indels (from 1 to 15 bases).

All variants of interest were confirmed by Sanger sequencing using the Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) and the ABI 3130xl DNA sequencing system (Thermo Fisher Scientific). When possible, parents and family members of positive patients were analyzed.

**Variant classification.** The pathogenicity of rare variants detected (MAF  $\leq 0.01$ ) was determined according to the recommendations of the American College of Medical Genetics

(ACMG) for variant classification and reporting [14]. These guidelines classify variants into five categories: pathogenic, likely pathogenic, variant of unknown significance (VUS), likely benign and benign. The ACMG criteria for variant classification are based on a set of different evaluation fields. Population data was determined from public genomic databases (1000 Genomes Project, GnomAD and dbSNP). Other criteria to consider were based on the type of variant (eg. frameshift, nonsense and essential splice variants) and on clinical, functional and genotype-phenotype data from the literature and disease databases (Human Gene Mutation Database Professional, PubMed). If such variants had not been reported previously, they were evaluated to predict their possible functional significance using *in silico* prediction tools such as SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), Panther (<http://pantherdb.org/tools/csnpscoreform.jsp>), MutPred2 (<http://mutpred.mutdb.org/>) and SNPs&GO (<https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>). Rare variants were considered to be a VUS if the available information had limited or contradictory evidence for pathogenicity.

**MLPA analysis.** Patients without pathogenic variants detected by NGS were analyzed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) to identify partial and whole gene deletions or duplications of *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* and *HNF1B* genes, using the SALSA MLPA MODY P241 Kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Fragments were separated by capillary electrophoresis (ABI 3130xl Genetic Analyzer) and analyzed using Gene-Mapper, v.4.0 software (Thermo Fisher Scientific).

### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS software (v.21; SPSS Inc., Chicago, IL). Quantitative variables were expressed as means and standard deviations and qualitative variables as frequencies and percentages. The Mann-Whitney U test was used to compare quantitative variables. Frequencies were compared using Pearson's chi-square analysis and Fisher's exact test when necessary. The significance level was defined as  $p < 0.05$ .

## Results

### Immunological data

As shown in Table 3, prevalence of GADA, IA2A, IAA and ZnT8A in the 400 new onset pediatric T1D patients was 73.3, 67.3, 64.8 and 57.3%, respectively. In 94.3% of the patients an autoimmune response against the pancreatic  $\beta$ -cells was detected and 82.8% of them had two or more positive antibodies. ZnT8A testing increased the number of autoantibody-positive patients from 373 (93.3%) to 377 (94.3%) and allowed us to diagnose T1D in 14.8% (4/27) of pediatric patients who were negative for the rest of the antibodies tested. Finally, 23 pediatric patients (23/400, 5.7%) with clinical T1D diagnosis had negative autoimmunity.

### Clinical data and HLA-DRB1 typing

The frequency of ketoacidosis at diagnosis was higher in patients with positive autoimmunity compared with patients who did not show autoimmunity (40.6% vs. 18.2%,  $p = 0.036$ ). There were no significant differences in the age at diagnosis, the family history of diabetes and the presence of HLA-DRB1 risk alleles for T1D between these two groups of patients (Table 1).

The clinical characteristics and HLA-DRB1 typing of the 23 autoimmune negative patients are detailed in Table 2. In these 23 patients the mean onset age was  $9.6 \pm 4.2$  years and 34.8% were female. At the time of diagnosis, the mean BMI z-score was  $0.02 \pm 1.24$ , only two patients

**Table 3. Patients with positive autoimmunity according to the number of antibodies evaluated.**

1 antibody	Patients with positive autoimmunity	%
ZnT8A	229	57.3
IAA	259	64.8
IA2A	269	67.3
GADA	293	73.3
2 antibodies		
IA2A, ZnT8A	316	79.0
IAA, IA2A	333	83.3
IAA, ZnT8A	337	84.3
GADA, ZnT8A	338	84.5
GADA, IAA	351	87.8
GADA, IA2A	361	90.3
3 antibodies		
IAA, IA2A, ZnT8A	352	88.0
GADA, IA2A, ZnT8A	367	91.8
GADA, IAA, ZnT8A	370	92.5
GADA, IAA, IA2A	373	93.3
4 antibodies		
GADA, IA2A, IAA, ZnT8A	377	94.3

In all patients (n = 400) IAA, GADA, IA2A and ZnT8A were analyzed at diagnosis. Data shows the results of the different combinations of one or more antibody detection assays. It is considered positive autoimmunity to have at least one antibody-positive.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220634.t003>

had obesity. All patients had hyperglycemia with a low mean C-peptide value of  $0.28 \pm 0.22$  nmol/l and symptoms of diabetes at disease onset lasting from 3 days to 6 months. However, ketoacidosis was identified at clinical presentation in only 18.2% (4/22) of them. HLA-DRB1 risk alleles for T1D were absent in two patients and the rest had 1 or 2 risk alleles.

### Genetic data

A customized panel of 12 MODY genes was tested in 23 patients with negative autoimmunity. The genetic screening revealed a total of five different rare variants (MAF < 0.01) in 6 patients; all variants were present in a heterozygous state (Table 4). Two of them were classified as pathogenic, representing 8% (2/23) of pediatric patients with suspected T1D and negative autoimmunity. No partial or whole gene deletions or duplications were detected.

We also performed the genetic study in the 4 patients with only ZnT8A positive autoimmunity. None of them were found to have any variant suspected of monogenic diabetes.

The p.Gly32Ser pathogenic variant in the *INS* gene (patient 11) is known to cause proinsulin misfolding [15] and has been previously reported in patients with permanent neonatal diabetes [16] and also in patients with diabetes onset during infancy, childhood or adulthood [17–19]. Parental samples were unavailable for genetic analysis. We also identified a novel pathogenic variant (p.Val264fs) in the *HNF1A* gene (patient 18) that, as far as we know, has not been published. This variant involves the thymine duplication at nucleotide 789, resulting in a frameshift that generates a premature stop codon at position 53 of the new reading frame. Thus, it is expected to result in a truncated protein with loss of normal function. The variant co-segregates with early-onset diabetes in the relatives of this family. It was identified in the younger brother of the proband who had been diagnosed later with diabetes at the age of 10

**Table 4. Rare genetic variants in MD genes identified in patients with suspected T1D and negative autoimmunity.**

Patient ID	Gene	Exon	Nucleotide change	AA change	Type	dbSNP	MAF_ALL GnomADe	Variant effect	Ref.
11	INS	2	c.94G>A	p.Gly32Ser	Missense	rs80356664	0	Pathogenic	[15–19]
18	HNF1A	4	c.789dupT	p.Val264fs	Frameshift	None	0	Pathogenic	
14	HNF1B	4	c.1006C>G	p.His336Asp	Missense	rs138986885	0.0002	VUS	[20–22]
17	HNF1A	1	c.92G>A	p.Gly31Asp	Missense	rs137853247	0.001	Likely benign	[23–27]
9 & 22	HNF1B	1	c.226G>T	p.Gly76Cys	Missense	rs144425830	0.001	Likely benign	[27–31]

Reference sequences: *INS*, NM\_000207.2; *HNF1A*, NM\_000545.5; *HNF1B*, NM\_000458.2. dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database. MAF\_ALL in GnomADe: Maximum Allele Frequency of the variant in the Exome Genome Aggregation Database. VUS: Variant of Uncertain Significance

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220634.t004>

years. His mother, who was diagnosed primarily with gestational diabetes and subsequently with diabetes, also carries the same variant.

In our cohort, three other rare variants were found. One VUS variant in the *HNF1B* gene (p.His336Asp) was found in patient 14. Parental samples were unavailable for genetic analysis and there is no information about extra-pancreatic complications. Additionally, *in silico* analyses were inconsistent. Two other rare variants have recently been re-classified as likely benign variants. The p.Gly31Asp variant in the *HNF1A* gene was found in patient 17. Parental analysis revealed that the variant is carried by her asymptomatic mother and *in silico* analysis predicted contradictory results. Finally, the p.Gly76Cys variant in the *HNF1B* gene is carried by patients 9 and 22. In both cases the variant was inherited from asymptomatic parents who had no apparent extra-pancreatic complications associated with *HNF1B*. All the *in silico* algorithms predicted a deleterious impact.

## Discussion

Different studies of newly diagnosed T1D patients indicate that 6–18% of children and adolescents with clinical T1D do not show evidence of humoral islet autoimmunity at disease onset [4,32,33]. Our study, with 6% (23/400) of pediatric patients with clinical diagnosis of T1D and undetectable autoimmunity, corroborates these results.

The molecular genetic screening performed in these autoimmune negative patients showed five different rare variants. At least two of them are clearly pathogenic alterations responsible for monogenic diabetes: p.Gly32Ser in the *INS* gene and p.Val264fs in the *HNF1A* gene. Consequently, monogenic diabetes was identified in at least 8% (2/23) of pediatric patients with suspected T1D and negative autoimmunity. Other studies with different approaches, have estimated a prevalence comparable to that of our cohort [34–37]. Furthermore, our study provides additional evidence that pathogenic variants in *INS* and *HNF* genes play critical roles in childhood-onset patients with antibody-negative but insulin-requiring diabetes. We did not find any pathogenic variant in the *GCK* gene despite its major role in MODY. It is not a surprising result because heterozygous *GCK* pathogenic variants result in moderate diabetes that does not match the typical clinical features of T1D onset on which our study is focused.

In the *HNF1A*-MODY case (p.Val264fs), three family members carried the same pathogenic variant, the proband, his mother and the younger brother. The genetic finding allowed

us to adjust the treatment of the mother with oral anti-diabetic agents and to prescribe sulfonylureas for the younger brother from the onset of the disease. We simultaneously changed the treatment of the proband from insulin to sulfonylureas. Mother and younger brother demonstrated a successful response to sulfonylureas. Due to the non-compliance with therapy, the proband exhibited unstable diabetes control.

Regarding the p.His336Asp variant in the *HNF1B* gene, it is unclear if it is pathogenic. Published data do not show clear evidence of pathogenicity [20,21] and it has been classified as a variant of uncertain significance in a recent report [22]. The other two rare variants, p.Gly31Asp in the *HNF1A* gene and p.Gly76Cys in the *HNF1B* gene, have been recently re-classified as likely benign polymorphisms [27]. Although the p.Gly31Asp variant has been previously described in the literature associated with monogenic diabetes [23], the pathogenicity of this variant is currently questioned based on allele frequency data in the general European population [24,25] and on functional studies that do not demonstrate a clear impairment of protein functionality [26]. In addition, the family study shows the variant is inherited from an unaffected mother. Therefore, based on this information, we interpret p.Gly31Asp as a likely benign variant. The situation is similar concerning the p.Gly76Cys variant in the *HNF1B* gene which, although previously described in the literature associated with monogenic diabetes [28], has been recently found at a frequency of 0.5% in a healthy Spanish population [29] and greater than 8% in the North African population [30,31]. This allele frequency is higher than that expected based on the estimated prevalence of monogenic diabetes in the population. Moreover, the family study shows that unaffected relatives carry the variant, so based on this information we interpret p.Gly76Cys as a likely benign variant.

The clinical and analytical data of the patients with non-autoimmune diabetes in our cohort support the diagnosis of T1D and, except for the absence of autoantibodies, do not specifically suggest monogenic diabetes. Low fasting serum C-peptide values at the onset of the disease (less than 0.2 nmol/l) denote low endogenous insulin production and correlate with T1D [38]. In our cohort, 55% (11/20) of the children with negative autoimmunity had low C-peptide levels in conjunction with hyperglycemia at diagnosis. The presence of slightly higher levels in the rest of the patients might be related to a greater pancreatic reserve at the onset of the disease. On the other hand, there are only two patients with obesity (patient 2 and 8) who might be suspected of having T2D. However the likelihood of T2D has been discarded as it is a rare disease in pediatrics in Europe [39,40]. In addition, both cases are Caucasian, with healthy parents, clear symptoms of diabetes at diagnosis, not too high C-peptide levels and no clinical or analytical evidence of insulin resistance. Furthermore, one of them has autoimmune thyroiditis. Therefore, although the absence of positive pancreatic-autoantibodies suggests monogenic diabetes, a diagnosis of T1D in our cohort should not be definitively ruled out. There could be other autoantibodies, still not identified, that could have contributed to the development of the autoimmune process in these patients and that could be signaled by positivity to islet cell antibodies (ICA) [32,41]. Additionally, some mildly positive cases could not be identified by the assays. This error is minimized in our study by the combined measurement of four pancreatic-antibodies for the diagnosis, achieving a 94.3% autoimmunity detection rate at the onset of the disease.

In our cohort, the addition of the ZnT8A test to the traditional set of diabetes associated autoantibodies has made it possible to identify autoimmunity in four patients who were ZnT8A positive and otherwise antibody-negative. This represents a non-negligible percentage, close to 15% of patients (4/27), who were diagnosed properly as T1D. The absence of pathogenic variants in the four patients with only ZnT8A positive, supports recently published data confirming ZnT8A as a marker for excluding patients from genetic testing for monogenic diabetes [42,43].

Although autoantibodies are so far considered as the best biomarker to discriminate MODY from T1D, we cannot ensure that there is no monogenic diabetes among pediatric patients with positive autoimmunity at diagnosis. Nevertheless, both in our experience [11] and in previously published studies [44,45], the proportion of patients with positive autoimmunity and molecular diagnosis of MODY is the same as expected in the control population, suggesting that autoantibodies are rare in MODY. However, other studies with different approaches show higher prevalence of positive autoantibodies among MODY cases. GADA and IA2A were found in Czech patients with MODY and delayed diabetes onset with insufficient disease control [46]. Pancreatic autoantibodies were also found in a high proportion (17%) in German and Austrian patients with MODY, but this might be an overestimation due to the fact that the diagnosis of MODY was not confirmed by genetic testing in 20% of studied patients. Surprisingly, using the same testing protocol, the positive rate in patients with type 2 diabetes was even greater than in MODY patients [47].

A significantly lower presence of ketoacidosis at diagnosis in autoimmune negative patients was found in our cohort, reflecting a less aggressive onset of diabetes in this subset of patients. Nevertheless, factors involved in DKA development are not yet clear. A recent report has found a correlation between the number of positive antibodies and the severity of ketoacidosis [48], which supports the relation of DKA to the intensity of destruction of pancreatic  $\beta$ -cells. Other reports have found a greater risk of DKA associated with different specific antibodies [48,49]. However, most of the published data find no difference in rates of DKA and presence or absence of autoimmunity [50,51] which substantiates the relationship of DKA to delayed diagnosis rather than to the expression of antigenicity. Our study did not have the capacity to find any other clinical differences among patients with positive and negative autoimmunity and carriers and non-carriers of pathogenic variants, probably due to the small number of patients. The two probands carrying pathogenic variants in this study had been previously diagnosed with T1D, despite the absence of autoimmunity. In these particular cases, neither clinical data nor HLA-DRB1 helped to differentiate MODY. In fact, both patients with MODY had HLA-DRB1 risk alleles for T1D (1 and 2 risk alleles). Furthermore, as the presence of two HLA-DRB1 risk alleles for T1D increases the probability of developing autoimmune diabetes [11] we cannot dismiss the possibility that the proband carrying two HLA-DRB1 risk alleles may also develop autoimmune diabetes in the future.

The main strength of the current study is the well-characterized cohort of T1D patients based on the combination of four autoantibody assays. This enabled us to accurately define the antibody-negative patients who were the target of the molecular testing. Another advantage is the screening approach by NGS that extends the search for genetic variants to twelve genes related to MD as well as the MLPA analysis. The possibility of misdiagnosing patients with rarer forms of monogenic diabetes cannot be completely excluded, as patients may carry variants in other known MD genes not tested in this study or in a gene not yet identified as a monogenic cause of diabetes.

In summary, our study shows that ZnT8A is an autoantibody to be considered for improving the diagnosis of T1D in pediatrics. In addition, at least 8% of pediatric patients suspected of T1D but with undetectable autoimmunity have monogenic diabetes and can benefit from the correct diagnosis of the disease by genetic study.

## Supporting information

**S1 Table. Characteristics of the population included in the study.**  
(PDF)

## Acknowledgments

The authors thank Rubén Coscojuela (RAFER, S.L) for HLA-DRB1 technical support. We are also grateful to patients who agreed to take part in this work as well as physicians and nurses in the participant hospitals. We also thank Ana Sanz, Ana B. de la Hoz and Gustavo Pérez-Nanclares for technical assistance.

## Spanish Pediatric Diabetes Collaborative Group

H. U. Basurto, Bizkaia (Concepción Fernández-Ramos, Javier Núñez), H. U. Cruces, Bizkaia (J Oriol Casanovas-Marsal, Gema Grau, Amaia Rodríguez-Estévez, Amaia Vela, Olaia Velasco-Vielba), H. U. Miguel Servet, Zaragoza (Marta Ferrer, Gracia M Lou), H. U. Ramón y Cajal, Madrid (Raquel Barrio, Beatriz García-Cuartero, María Martín-Frías), H. U. Severo Ochoa, Madrid (Amparo González), H. U. Son Espases, Palma de Mallorca (María Caimari, Diego de Sotto), H. U. Vall d'Hebron, Barcelona (Ariadna Campos, Maria Clemente), H. U. Virgen del Rocío, Sevilla (Ana L Gómez-Gila).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Inés Urrutia, Rosa Martínez, Itxaso Rica, Anibal Aguayo, Luis Castaño.

**Formal analysis:** Inés Urrutia, Rosa Martínez, Idoia Martínez de LaPiscina, Alejandro García-Castaño.

**Funding acquisition:** Rosa Martínez, Luis Castaño.

**Methodology:** Inés Urrutia, Rosa Martínez, Idoia Martínez de LaPiscina, Alejandro García-Castaño, Begoña Calvo.

**Supervision:** Itxaso Rica, Luis Castaño.

**Writing – original draft:** Inés Urrutia.

**Writing – review & editing:** Inés Urrutia, Rosa Martínez, Itxaso Rica, Idoia Martínez de LaPiscina, Alejandro García-Castaño, Anibal Aguayo, Begoña Calvo, Luis Castaño.

## References

1. Atkinson M, Eisenbarth G, Michels A. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014; 383(9911):69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7) PMID: 23890997
2. Winter W, Schatz D. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem*. 2011; 57(2):168–175. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.148205> PMID: 21127152
3. Wenzlau J, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar S, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(43):17040–17045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705894104> PMID: 17942684
4. Wang J, Miao D, Babu S, Yu J, Barker J, Klingensmith G, et al. Prevalence of autoantibody-negative diabetes is not rare at all ages and increases with older age and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(1):88–92. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1494> PMID: 17062766
5. Erlich H, Valdes A, Noble J, Carlson J, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk. *Diabetes*. 2008; 57(4):1084–1092. <https://doi.org/10.2337/db07-1331> PMID: 18252895
6. Vaxillaire M, Froguel P. Monogenic diabetes: Implementation of translational genomic research towards precision medicine. *J Diabetes*. 2016; 8(6):782–795. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12446> PMID: 27390143
7. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): How many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010; 53(12):2504–2508. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1799-4> PMID: 20499044

8. Amed S, Oram R. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): Making the Right Diagnosis to Optimize Treatment. *Can J Diabetes*. 2016; 40(5):449–454. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2016.03.002> PMID: 27130141
9. Mayer-Davis EJ, Kahkoska AR, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Gong CX, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2018; 19(S27):7–19. <https://doi.org/10.1111/pedi.12773> PMID: 30226024
10. Wolfsdorf JI, Glaser N, Agus M, Fritsch M, Hanas R, Rewers A, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *Pediatr Diabetes*. 2018; 19(S27):155–177. <https://doi.org/10.1111/pedi.12701> PMID: 29900641
11. Urrutia I, Martínez R, López-Euba T, Velayos T, De La Piscina IM, Bilbao JR, et al. Lower frequency of HLA-DRB1 type 1 diabetes risk alleles in pediatric patients with MODY. *PLoS One*. 2017; 12(1): e0169389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169389> PMID: 28052112
12. Sánchez González E, Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Ferrández Longás A, López De Lara D, López-Siguero JP. Spanish growth studies: the current situation, their effectiveness and recommendations for their use. *An Pediatr*. 2011; 74(3):193.e1–e16. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2010.10.005> PMID: 21237733
13. Bilbao JR, Rica I, Vazquez JA, Busturia MA, Castano L. Influence of sex and age at onset on autoantibodies against insulin, GAD65 and IA2 in recent onset type 1 diabetic patients. *Horm Res*. 2000; 54(4):181–185. <https://doi.org/10.1159/000053256> PMID: 11416235
14. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5):405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30> PMID: 25741868
15. Rajan S, Eames SC, Park S-Y, Labno C, Bell GI, Prince VE, et al. In vitro processing and secretion of mutant insulin proteins that cause permanent neonatal diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298(3):E403–E410. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00592.2009> PMID: 19952343
16. Støy J, Edghill EL, Flanagan SE, Ye H, Paz VP, Pluzhnikov A, et al. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(38):15040–15044. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707291104> PMID: 17855560
17. Brahm AJ, Wang G, Wang J, McIntyre AD, Cao H, Ban MR, et al. Genetic Confirmation Rate in Clinically Suspected Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Can J Diabetes*. 2016; 40(6):555–560. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2016.05.010> PMID: 27634015
18. Wasserman H, Hufnagel RB, Miraldi Utz V, Zhang K, Valencia CA, Leslie ND, et al. Bilateral cataracts in a 6-yr-old with new onset diabetes: a novel presentation of a known INS gene mutation. *Pediatr Diabetes*. 2016; 17(7):535–539. <https://doi.org/10.1111/pedi.12335> PMID: 26530398
19. Bonfanti R, Colombo C, Nocerino V, Massa O, Lampasona V, Iafusco D, et al. Insulin gene mutations as cause of diabetes in children negative for five type 1 diabetes autoantibodies. *Diabetes Care*. 2009; 32(1):123–125. <https://doi.org/10.2337/dc08-0783> PMID: 18840770
20. Weber S, Morinlere V, Knüppel T, Charbit M, Dusek J, Ghiggeri GM, et al. Prevalence of Mutations in Renal Developmental Genes in Children with Renal Hypodysplasia: Results of the ESCAPE Study. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(10):2864–2870. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006030277> PMID: 16971658
21. Karges B, Bergmann C, Scholl K, Heinze E, Rasche FM, Zerres K, et al. Digenic inheritance of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  with maturity-onset diabetes of the young, polycystic thyroid, and urogenital malformations. *Diabetes Care*. 2007; 30(6):1613–1614. <https://doi.org/10.2337/dc06-2618> PMID: 17337496
22. Nicolaou N, Pulit SL, Nijman IJ, Monroe GR, Feitz WFJ, Schreuder MF, et al. Prioritization and burden analysis of rare variants in 208 candidate genes suggest they do not play a major role in CAKUT. *Kidney Int*. 2016; 89(2):476–486. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.319> PMID: 26489027
23. Chèvre J, Hani E, Boutin P, Vaxillaire M, Blanché H, Vionnet N, et al. Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia*. 1998; 41(9):1017–1023. <https://doi.org/10.1007/s001250051025> PMID: 9754819
24. Flannick J, Beer NL, Bick AG, Agarwala V, Molnes J, Gupta N, et al. Assessing the phenotypic effects in the general population of rare variants in genes for a dominant Mendelian form of diabetes. *Nat Genet*. 2013; 45(11):1380–1387. <https://doi.org/10.1038/ng.2794> PMID: 24097065
25. Colclough K, Bellanné-Chantelot C, Saint-Martin C, Flanagan S, Eillard S. Mutations in the Genes Encoding the Transcription Factors Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha and 4 Alpha in Maturity-Onset Diabetes of the Young and Hyperinsulinemic Hypoglycemia. *Hum Mutat*. 2013; 34(5):669–685. <https://doi.org/10.1002/humu.22279> PMID: 23348805

26. Najmi LA, Aukrust I, Flannick J, Molnes J, Burtt N, Molven A, et al. Functional investigations of HNF1A identify rare variants as risk factors for type 2 diabetes in the general population. *Diabetes*. 2017; 66(2):335–346. <https://doi.org/10.2337/db16-0460> PMID: 27899486
27. Chambers C, Fouts A, Dong F, Colclough K, Wang Z, Batish SD, et al. Characteristics of maturity onset diabetes of the young in a large diabetes center. *Pediatr Diabetes*. 2016; 17(5):360–367. <https://doi.org/10.1111/pedi.12289> PMID: 26059258
28. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, Collin P, Daumont M, Douillard C, et al. Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes*. 2005; 54(11):3126–3132. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3126> PMID: 16249435
29. Dopazo J, Amadoz A, Bleda M, Garcia-Alonso L, Alemán A, García-García F, et al. 267 Spanish Exomes Reveal Population-Specific Differences in Disease-Related Genetic Variation. *Mol Biol Evol*. 2016; 33(5):1205–1218. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw005> PMID: 26764160
30. Madariaga L, Morinière V, Jeanpierre C, Bouvier R, Loget P, Martinovic J, et al. Severe prenatal renal anomalies associated with mutations in HNF1B or PAX2 genes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013; 8(7):1179–1187. <https://doi.org/10.2215/CJN.10221012> PMID: 23539225
31. Faguer S, Decramer S, Chassaing N, Bellanné-Chantelot C, Calvas P, Beauflis S, et al. Diagnosis, management, and prognosis of HNF1B nephropathy in adulthood. *Kidney Int*. 2011; 80(7):768–776. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.225> PMID: 21775974
32. Andersson C, Kolmodin M, Ivarsson S, Carlsson A, Forsander G, Lindblad B, et al. Islet cell antibodies (ICA) identify autoimmunity in children with new onset diabetes mellitus negative for other islet cell antibodies. *Pediatr Diabetes*. 2014; 15(5):336–344. <https://doi.org/10.1111/pedi.12093> PMID: 24206368
33. Verkauskienė R, Danyte E, Dobrovolskiene R, Stankute I, Simonienė D, Razanskaite-Virbickienė D, et al. The course of diabetes in children, adolescents and young adults: Does the autoimmunity status matter? *BMC Endocr Disord*. 2016; 16(1):61. <https://doi.org/10.1186/s12902-016-0145-3> PMID: 27842589
34. Johansson BB, Irgens HU, Molnes J, Sztromwasser P, Aukrust I, Juliusson PB, et al. Targeted next-generation sequencing reveals MODY in up to 6.5% of antibody-negative diabetes cases listed in the Norwegian Childhood Diabetes Registry. *Diabetologia*. 2017; 60(4):625–635. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4167-1> PMID: 27913849
35. Gandica RG, Chung WK, Deng L, Goland R, Gallagher MP. Identifying monogenic diabetes in a pediatric cohort with presumed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2015; 16(3):227–233. <https://doi.org/10.1111/pedi.12150> PMID: 25082184
36. Rubio-Cabezas O, Edghill EL, Argente J, Hattersley AT. Testing for monogenic diabetes among children and adolescents with antibody-negative clinically defined Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2009; 26(10):1070–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02812.x> PMID: 19900242
37. Ushijima K, Fukami M, Ayabe T, Narumi S, Okuno M, Nakamura A, et al. Comprehensive screening for monogenic diabetes in 89 Japanese children with insulin-requiring antibody-negative type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018; 19(2):243–250. <https://doi.org/10.1111/pedi.12544> PMID: 28597946
38. Leighton E, Sainsbury CA, Jones GC. A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes Ther*. 2017; 8(3):475–487. <https://doi.org/10.1007/s13300-017-0265-4> PMID: 28484968
39. Reinehr T. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World J Diabetes*. 2013; 4(6):270–281. <https://doi.org/10.4239/wjcd.v4.i6.270> PMID: 24379917
40. Aguayo A, Vela A, Aniel-Quiroga A, Blarduni E, Fernández C, Grau G, et al. Absence of diabetes mellitus type 2 in obese children and adolescents in the north of Spain. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2013; 26(1–2):25–29. <https://doi.org/10.1515/jpem-2012-0200> PMID: 23329743
41. Massa O, Alessio M, Russo L, Nardo G, Bonetto V, Bertuzzi F, et al. Serological Proteome Analysis (SERPA) as a tool for the identification of new candidate autoantigens in type 1 diabetes. *J Proteomics*. 2013; 82:263–273. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.030> PMID: 23500132
42. Patel KA, Weedon MN, Shields BM, Pearson ER, Hattersley AT, McDonald TJ. Zinc Transporter 8 Autoantibodies (ZnT8A) and a Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Can Exclude Individuals With Type 1 Diabetes From Inappropriate Genetic Testing for Monogenic Diabetes. *Diabetes Care*. 2018; 42(2):e16–e17. <https://doi.org/10.2337/dc18-0373> PMID: 30409810
43. Heneberg P, Šimčíková D, Čecháková M, Rypáčková B, Kučera P, Anděl M. Autoantibodies against ZnT8 are rare in Central-European LADA patients and absent in MODY patients, including those positive for other autoantibodies. *J Diabetes Complications*. 2019; 33(1):46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.10.004> PMID: 30377089
44. McDonald T, Colclough K, Brown R, Shields B, Shepherd M, Bingley P, et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type1 diabetes. *Diabet Med*. 2011; 28(9):1028–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03287.x> PMID: 21395678

45. Johnson SR, Ellis JJ, Leo PJ, Anderson LK, Ganti U, Harris JE, et al. Comprehensive genetic screening: The prevalence of maturity-onset diabetes of the young gene variants in a population-based childhood diabetes cohort. *Pediatr Diabetes*. 2019; 20(1):57–64. <https://doi.org/10.1111/medi.12766> PMID: 30191644
46. Urbanová J, Rypáčková B, Procházková Z, Kučera P, Černá M, Anděl M, et al. Positivity for islet cell autoantibodies in patients with monogenic diabetes is associated with later diabetes onset and higher HbA1c level. *Diabet Med*. 2014; 31(4):466–471. <https://doi.org/10.1111/dme.12314> PMID: 24102923
47. Schober E, Rami B, Grabert M, Thon A, Kapellen T, Reinehr T, et al. Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: Experience from a large multicentre database. *Diabet Med*. 2009; 26(5):466–473. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02720.x> PMID: 19646184
48. Niechcial E, Rogowicz-Frontozak A, Pilaciński S, Fichna M, Skowrońska B, Fichna P, et al. Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age and metabolic state in patients with newly diagnosed autoimmune diabetes. *Acta Diabetol*. 2018; 55(3):287–294. <https://doi.org/10.1007/s00592-017-1091-x> PMID: 29327148
49. Vicinanza A, Messaoui A, Tenoutasse S, Dorchy H. Diabetic ketoacidosis in children newly diagnosed with type 1 diabetes mellitus: role of demographic, clinical and biochemical features along with genetic and immunological markers as risk factors. A twenty-year experience in a tertiary Belgian centre. *Pediatr Diabetes*. Forthcoming 2019. <https://doi.org/10.1111/medi.12864> PMID: 31038262
50. Bravis V, Kaur A, Walkey HC, Godsiand IF, Misra S, Bingley PJ, et al. Relationship between islet auto-antibody status and the clinical characteristics of children and adults with incident type 1 diabetes in a UK cohort. *BMJ Open*. 2018; 8(4):e020904. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020904> PMID: 29622578
51. Östman J, Landin-Olsson M, Törn C, Palmer J, Lernmark A, Arnqvist H, et al. Ketoacidosis in young adults is not related to the islet antibodies at the diagnosis of Type 1 diabetes mellitus—a nationwide study. *Diabet Med*. 2000; 17(4):269–274. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-5491.2000.00265.x> PMID: 10821292