

1. Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 por el laboratorio clínico

DIAGNOSIS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS BY CLINICAL LABORATORY

Raquel Galván Toribio

Graduada en Biotecnología por la Universidad de Salamanca.

Salomón Martín Pérez

Licenciado en Farmacia por la Universidad de Sevilla.

Ismael Almazo Guerrero

Licenciado en Medicina por la Universidad de Cádiz.

RESUMEN

La diabetes mellitus de tipo 1 es una enfermedad crónica autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células beta pancreáticas productoras de insulina. Los conocimientos sobre esta patología han aumentado rápidamente en los últimos años, lo que ha dado lugar a una mejora en la comprensión de muchos aspectos tales como la patogénesis, la genética, epidemiología, caracterización del perfil inmunitario y la carga de la enfermedad. Los biomarcadores séricos, que incluyen una combinación de pruebas de glucosa, moléculas glicosiladas, péptido C y autoanticuerpos, están bien establecidos para el diagnóstico de la enfermedad. Los datos epidemiológicos muestran que la incidencia de la diabetes tipo 1 ha aumentado entre un 3% y un 4% en las últimas décadas, lo que apoya el papel de los factores ambientales en la patogenia. Con el aumento de la prevalencia de la diabetes tipo 1 en todo el mundo y debido a la carga física y psicológica inducida por la enfermedad y a las graves complicaciones asociadas para los pacientes, el diagnóstico inequívoco y temprano es primordial, y en ello el laboratorio clínico juega un papel fundamental. Esto nos permitirá identificar a los individuos de alto riesgo para una prevención e intervención a tiempo.

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo 1, células beta, biomarcadores séricos, autoanticuerpos, péptido c, patogénesis, diagnóstico temprano, laboratorio clínico.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing pancreatic

beta cells. Knowledge about this pathology has increased rapidly in recent years, leading to an improved understanding of many aspects such as pathogenesis, genetics, epidemiology, characterization of the immune profile and disease burden. Serum biomarkers, which include a combination of glucose tests, glycosylated molecules, C peptide and autoantibodies, are well established for disease diagnosis. Epidemiological data show that the incidence of type 1 diabetes has increased by 3-4% in recent decades, supporting the role of environmental factors in pathogenicity. With the prevalence of Type 1 diabetes increasing worldwide, and due to the physical and psychological burden induced by the disease and the serious complications associated with it for patients, unambiguous and early diagnosis is paramount. and in this the clinical laboratory plays a fundamental role. This will allow us to identify high-risk individuals for early prevention and intervention.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus, beta cells, serum biomarkers, autoantibodies, c peptide, pathogenesis, early diagnosis, clinical laboratory.

INTRODUCCIÓN A LA DIABETES MELLITUS

La diabetes fue detectada por primera vez alrededor del año 1500 a.C. por los antiguos egipcios, que la consideraban una enfermedad rara en la que una persona orinaba en exceso y perdía peso. El término diabetes mellitus, que reflejaba el hecho de que la orina de los afectados tenía un sabor dulce, fue utilizado por primera vez por el físico griego Aretaeus. Sin embargo, no fue hasta 1776 cuando Matthew Dobson midió realmente la concentración de glucosa en la orina de dichos pacientes y comprobó que estaba aumentada. En 1812, la diabetes ya era una entidad clínica reconocida, aunque su prevalencia no estaba documentada y no se sabía prácticamente nada sobre los mecanismos responsables de la enfermedad. No se disponía de ningún tratamiento eficaz y era uniformemente mortal en las semanas o meses siguientes a su diagnóstico debido a la deficiencia de insulina (Polonsky, 2012).

Un hito importante en la historia de la diabetes fue el establecimiento del papel del hígado en la glucogénesis, y el planteamiento por Claude Bernard en 1857 de que la diabetes se debe a un exceso de producción de glucosa. La implicación del páncreas en la patogénesis de la enfermedad fue descrita por Mering y Minkowski en 1889 y este descubrimiento constituyó la base del aislamiento de la insulina por Banting y Best en 1921 y su posterior uso clínico (Ahmed, 2002).

Desde entonces, se han producido importantes avances en el conocimiento de las causas subyacentes de la diabetes y en el enfoque de su prevención y tratamiento.

Según la *Organización Mundial de la Salud* (OMS), la diabetes se puede definir como una enfermedad metabólica crónica que se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre y que, con el tiempo, puede provocar graves daños en muchos de los sistemas corporales, especialmente el corazón, vasos sanguíneos, riñones, ojos y nervios.



Figura 1. Frederick Banting (a la derecha) junto a Charles Best en su oficina en 1924, tras descubrir la insulina y su potencial terapéutico. Fuente: *El Aislamiento de la insulina; Banting y best. A hombros de gigantes. Ciencia y tecnología.* (2016, July 27).

Tanto el número de casos como la prevalencia de la diabetes han aumentado constantemente en las últimas décadas, y la OMS estima que más de 422 millones de personas en todo el mundo padecen esta enfermedad. En 2019, la diabetes fue la causa directa de 1,5 millones de muertes y el 48% de todas estas muertes se produjeron antes de los 70 años.

Muchos autores y expertos la consideran una pandemia mundial que puede ser fatal para el paciente y que acarrea un importante gasto sanitario. Es por ello que el diagnóstico temprano y el correcto manejo y control de la enfermedad para evitar complicaciones, es fundamental.

Existen diferentes tipos de diabetes y hoy en día, el término 'diabetes mellitus' engloba a todos los trastornos metabólicos cuyo principal hallazgo es la hiperglucemia crónica. En el desarrollo de la diabetes intervienen varios procesos patológicos que llevan a una alteración en la secreción de la insulina, a una alteración en su efecto o a ambos (Petermann et al., 2019). La insulina es ampliamente conocida como la principal hormona anabólica del cuerpo humano. Es segregada por las células beta de los islotes pancreáticos para regular, sobre todo, el metabolismo de los carbohidratos, promoviendo la absorción de la glucosa de la sangre a los tejidos.

En los individuos sanos, la secreción endógena de insulina se produce en 2 fases:

- Rápido aumento de la insulina sérica que alcanza su punto máximo entre los 30 y 45 minutos después del inicio de una comida, volviendo a los niveles basales al cabo de 1 a 3 horas.
- Secreción constante de insulina basal a un ritmo menor.

La insulina, junto con el glucagón, otra hormona también producida por el páncreas (en este caso por las células alfa) ajustan la producción hepática de glucosa al tiempo que modulan la utilización periférica de la glucosa. Así, se mantiene una concentración normal de glucosa en sangre en los individuos sin diabetes (en torno a 90 mg/dL). En los pacientes con diabetes mellitus, ambos aspectos de la liberación de la insulina endógena pueden estar notablemente disminuidos o ausentes, lo que imposibilita la nor-

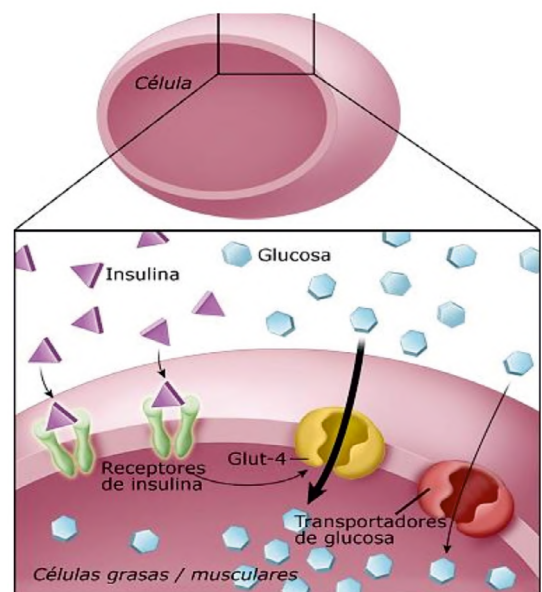
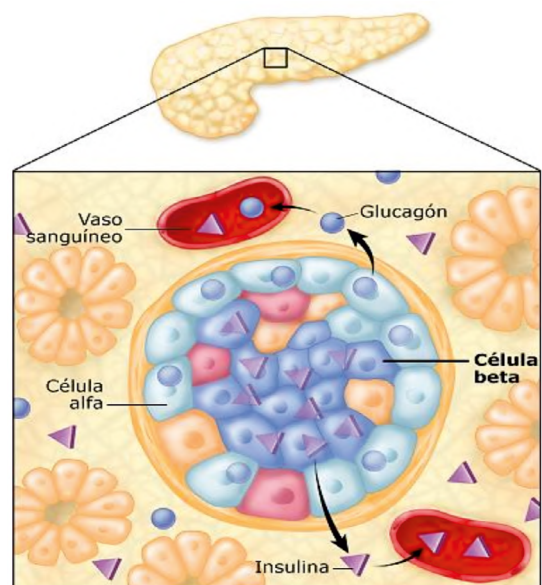


Figura 2. Representación de la fisiología del páncreas donde se produce la insulina y del efecto hipoglucemiante de ésta una vez se libera a la circulación sanguínea. Fuente: *¿Qué es la diabetes tipo 1? Diabetes Education Online.* (n.d.).

malización de los niveles de glucosa en sangre (Niswender, 2011). Esto puede deberse a una destrucción (normalmente autoinmune) de las células beta pancreáticas con la consiguiente deficiencia de insulina, o al desarrollo de ciertas alteraciones que dan lugar a una resistencia a la insulina. La base de las disfunciones en el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas que se observan en la diabetes es una consecuencia de la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana.

TIPOS DE DIABETES MELLITUS

La asignación de un tipo de diabetes a un individuo a menudo depende de las circunstancias presentes en el momento del diagnóstico, y muchos pacientes no encajan fácilmente en una sola clase. La gran mayoría de los casos de diabetes se engloban en los dos grandes grupos principales que son diabetes mellitus tipo 1 y diabetes mellitus tipo 2 pero, según la Asociación Americana de Diabetes, la enfermedad puede ser clasificada en las siguientes categorías generales:

Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)

Es debida a una destrucción, normalmente autoinmune, de las células beta pancreáticas donde se sintetiza y libera la insulina, por lo que suele conducir a una deficiencia total de insulina. Representa entre un 5 – 10% de todos los tipos de diabetes y su herencia es variable. Se sabe que existe cierta predisposición genética para su aparición, que normalmente se da en la infancia o adolescencia. Las manifestaciones clínicas típicas son la poliuria aguda, polidipsia, hiperglucemia grave y cetoacidosis. La tiroiditis autoinmune y la enfermedad celíaca son comorbilidades frecuentes de la DMT1. Los enfermos suelen ser normopesos y la terapia por excelencia es la administración exógena de insulina (Petersmann et al., 2019).

Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

Es debida a una resistencia periférica a la acción de la insulina y a la pérdida progresiva de su secreción por parte de las células beta pancreáticas. Aunque existe cierta predisposición genética para su aparición, está asociada a otras enfermedades tales como el síndrome metabólico y la obesidad. Es la forma más predominante de diabetes mellitus, representando entre un 90 – 95% del total. La DMT2 es de comienzo lento y normalmente se inicia en la etapa adulta. Los enfermos suelen tener sobrepeso e hipertensión y en los casos leves, puede controlarse con medidas que modifiquen el estilo de vida o con antidiabéticos orales (Petersmann et al., 2019).

Tipos específicos de diabetes debidos a otras causas

- **Síndromes de diabetes monogénica:** Diabetes neonatal, diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) ...
- **Enfermedades del páncreas exocrino:** Pancreatitis, fibrosis quística, hemocromatosis...
- **Endocrinopatías:** Síndrome de Cushing, acromegalia, feocromocitoma...
- **Diabetes inducida por fármacos o químicos:** Glucocorticoides, neurolepticos, interferón-alfa, pentamida...

Diabetes gestacional

Es un trastorno de tolerancia a la glucosa que se diagnostica por primera vez en el segundo o tercer trimestre del embarazo y que no era una diabetes manifiesta antes de la gestación. Suele ser una condición temporal y en la mayoría de las mujeres los niveles de glucosa se normalizan

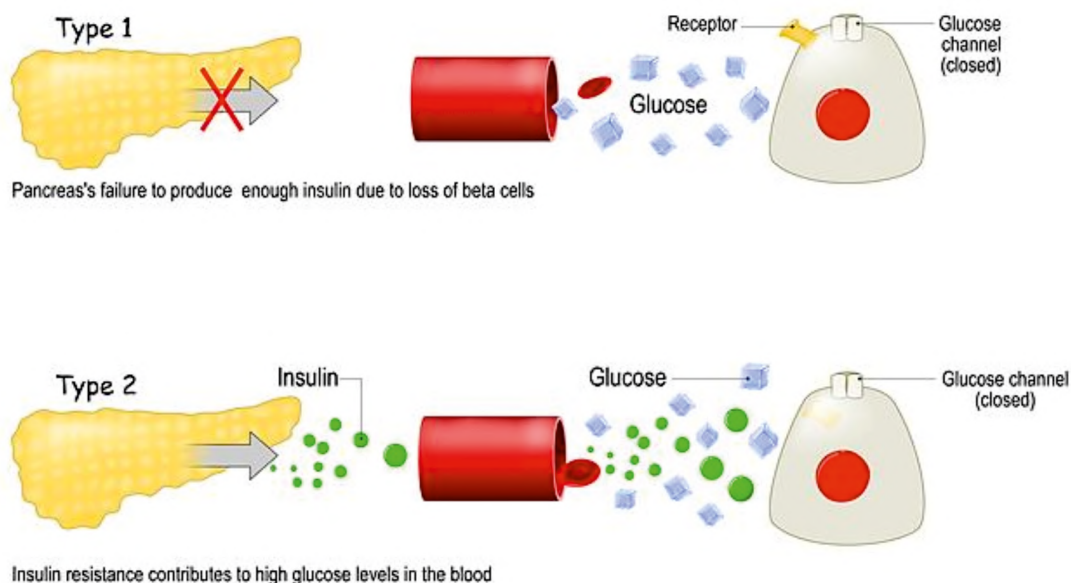


Figura 3. Esquema de la diabetes tipo 1, en la que hay una falta de insulina (arriba) vs diabetes tipo 2, en la que existe resistencia a la insulina. Fuente: Type 1 vs. type 2 diabetes. PainScale. (n.d.).

después del parto. No obstante, existe la posibilidad de que el trastorno vuelva a aparecer en embarazos posteriores y se estima que entre un 20 – 50% de los casos evolucionan a DMT2 con los años. Algunos de los factores de riesgo que predisponen a la aparición de diabetes gestacional son el sobrepeso y obesidad materna, la etnia, antecedentes familiares de diabetes mellitus y el síndrome de ovario poliquístico, entre otros. Esta alteración puede acarrear ciertas complicaciones maternas y fetales tales como la preeclampsia, parto por cesárea, parto prematuro, síndrome de dificultad respiratoria neonatal, etcétera. Hasta el 70 - 85% de las pacientes pueden controlarse con una actividad física adecuada y con modificaciones en la dieta y el estilo de vida, sin necesidad de recurrir a la insulina o a tratamiento con hipoglucemiantes orales (Lende & Rijhsinghani, 2020).

Prediabetes

Aunque no es un tipo de diabetes mellitus propiamente dicho, la prediabetes merece una mención en este contexto. Es el término utilizado para definir la condición de las personas cuyos niveles de glucosa no cumplen los criterios diagnósticos de diabetes, pero presentan un metabolismo alterado de los carbohidratos. La prediabetes no debe considerarse como una entidad clínica en sí misma si no como un factor de riesgo para la progresión a diabetes mellitus y a la aparición de enfermedad cardiovascular. Se asocia a la obesidad (especialmente obesidad abdominal o visceral), a la dislipidemia con triglicéridos altos y/o colesterol HDL bajo y a la hipertensión ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022," 2022).

La clasificación correcta de los pacientes es importante para determinar el manejo y la terapia más adecuada, pero algunos individuos no pueden ser claramente clasificados en el momento del diagnóstico.

Una vez que se produce la hiperglucemia, las personas con todas las formas de diabetes corren el riesgo de desarrollar las mismas complicaciones crónicas, aunque las tasas de progresión pueden ser diferentes.

En el futuro, con la mejora de la caracterización de las múltiples vías que llevan a la desaparición o disfunción de las células beta pancreáticas, será posible la adopción de terapias individualizadas que mejoren la calidad de vida de los pacientes. En todo el mundo, muchos grupos están trabajando mediante la combinación de las características clínicas, fisiopatológicas y genéticas para definir con mayor precisión subgrupos de diabetes que actualmente se agrupan bajo la nomenclatura de diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2, con el objetivo de optimizar los enfoques de tratamiento personalizado.

DIABETES MELLITUS TIPO 1: ETIOLOGÍA

En 1984, George Eisenbarth desarrolló un modelo conceptual para la patogénesis de la diabetes tipo 1 que todavía se utiliza hoy en día. El modelo traza una relación entre la masa de las células beta y la edad y describe una secuencia de eventos que comienza con un riesgo genético predisponente seguido de un desencadenante ambiental que causa autoinmunidad específica a los islotes pancreáticos con la consecuente pérdida de células beta, la alteración de la glucemia, la diabetes clínica y la rápida progresión de la enfermedad. Aunque es útil, este modelo no aborda la complejidad cada vez más evidente de la patogénesis de la diabetes de tipo 1.

A primera vista, la fisiopatología de la DMT1 podría parecer sencilla; sin embargo, cuanto más se aprende sobre la enfermedad, menos parece que se conozca realmente. Lo que antes parecía únicamente un trastorno autoinmu-

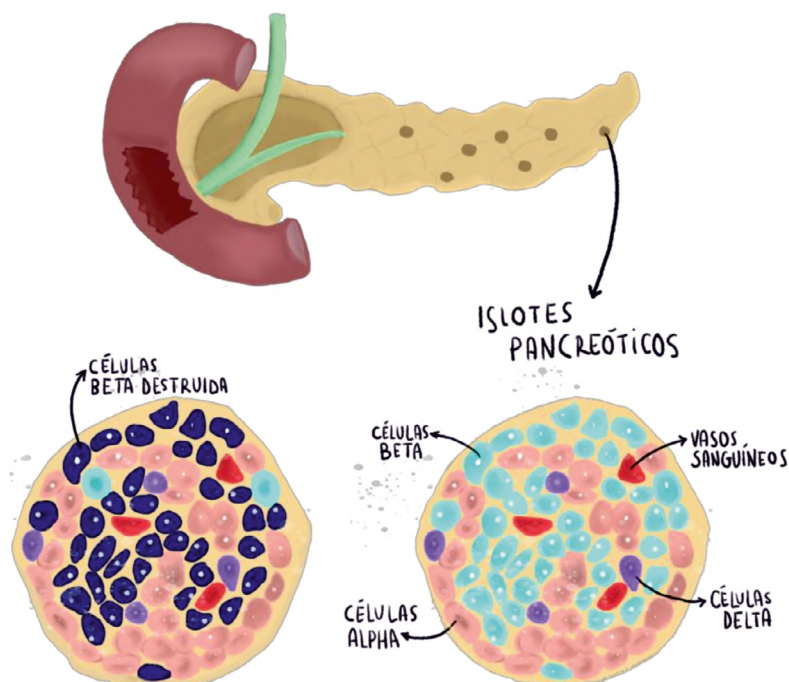


Figura 4. Representación de los islotes pancreáticos de un paciente con diabetes tipo 1 (izquierda), donde se observa la destrucción de las células beta productoras de insulina vs los islotes pancreáticos de una persona sana (derecha). Fuente: La Montañera Diabética que coronó el kilimanjaro. Content Factory. (2021, June 29).

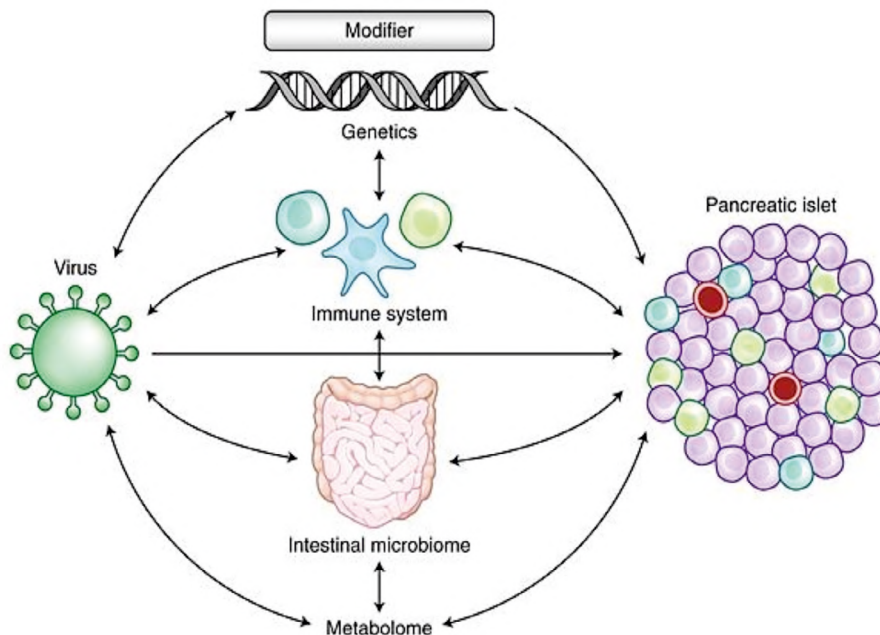


Figura 5. Representación y relación entre los principales factores que afectan a la integridad de los islotes pancreáticos mediante la destrucción de las células beta. Fuente: Roep, B. O. (2019). A viral link for type 1 diabetes. *Nature Medicine*, 25(12), 1816–1818.

ne propiciado por el ataque mediado por los linfocitos T a las células beta productoras de insulina, ahora se reconoce como el resultado de una compleja interacción entre factores ambientales, el microbioma, el genoma, el metabolismo y el sistema inmune, que varía entre los distintos individuos (DiMeglio et al., 2018).

A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios para identificar todos estos factores implicados en el desarrollo de la enfermedad, y aunque todavía no se ha obtenido una imagen completa, sí se han descrito y mapeado algunos genes que desempeñan un papel importante, así como otros posibles desencadenantes. Sobre la base de estos conocimientos, la diabetes mellitus de tipo 1 hoy en día se considera una enfermedad autoinmune en la que intervienen componentes genéticos, inmunológicos y ambientales.

Así, los desencadenantes principales de la diabetes mellitus tipo 1 se pueden clasificar en 3 tipos: Predisposición genética, infecciones virales y factores ambientales (Acharjee et al., 2013).

Debido a la naturaleza multifactorial de la enfermedad, estos factores no deberían considerarse de manera individual, sino de manera interactiva y de forma que, si se combinan, podrían aumentar considerablemente el riesgo de desarrollar la enfermedad. Por lo tanto, la caracterización completa de cada uno de estos componentes es relevante en el estudio de la DMT1 (Primavera et al., 2020).

Predisposición genética

La diabetes tipo 1 puede considerarse una enfermedad poligénica heredable. Los estudios epidemiológicos han demostrado una mayor incidencia entre los familiares de los pacientes con respecto a la población general, lo que refuerza el papel de los factores genéticos como causa de

la enfermedad. El riesgo entre hermanos es del 6 – 7% y el riesgo de los niños que tienen un padre con diabetes es del 1 – 9%.

El modelo inmunológico de la enfermedad se desarrolló a partir de una hipótesis simple basada en que la insulina se reconoce como una sustancia extraña en los pacientes. Por lo tanto, es lógico suponer que un defecto en la estructura de la insulina o una alteración en el proceso de reconocimiento puede ser responsable de la enfermedad.

En los mamíferos, todas las células nucleadas presentan moléculas marcadoras especiales que se expresan en la superficie celular y ayudan a identificarlas como constituyentes del propio organismo. Un grupo de genes conocido como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

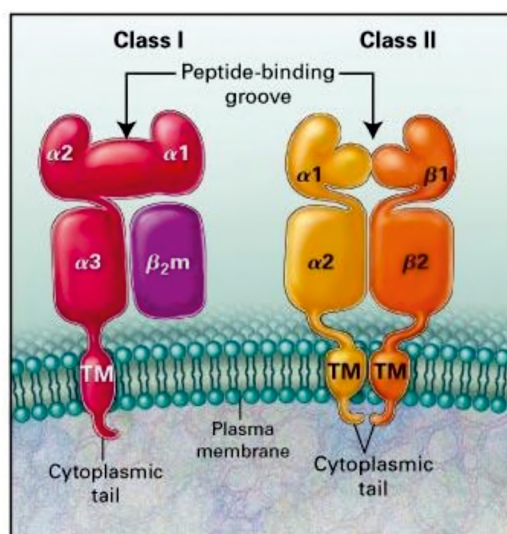


Figura 6. Estructura de las moléculas HLA de clase I y II. Fuente: Klein, J., & Sato, A. (2000). The HLA System. *New England Journal Of Medicine*, 343(10), 702-709.

es responsable de la producción de estas moléculas marcadoras. En los seres humanos, este sistema se conoce como complejo de antígenos leucocitarios (HLA).

Los genes HLA se agrupan en 3 clases que producen 3 tipos distintos de moléculas. Las moléculas de clase I se encuentran en la superficie de todos los tipos de células nucleadas ayudando a que estas células se identifiquen como propias. Las moléculas de clase II sólo aparecen en las células que participan activamente en los mecanismos de defensa del organismo, es decir, los macrófagos, las células dendríticas, linfocitos T y células epiteliales de los islotes de Langerhans.

En la DMT1, los genes HLA de clase II tienen una importancia primordial y pueden dividirse en 3 subclases: HLA-DQ, HLA-DP y HLA-DR. Numerosos estudios han demostrado que ciertas variantes de los genes HLA-DQ y DR (HLA-DQA1, DQB1 y DRB1) definen el riesgo de un individuo de desarrollar la enfermedad, hasta el punto de que se relacionan con aproximadamente el 50% de la heredabilidad (Ilonen et al., 2019). Los haplotipos de mayor riesgo son el DR3 y el DR4, y el 90 - 95% de los niños con diabetes tipo 1 son portadores de uno o de ambos. Sin embargo, menos del 5% de las personas con susceptibilidad genética conferida por el sistema HLA acaban desarrollando la enfermedad y existe una amplia gama de otros genes que también contribuyen al riesgo (Virtanen & Knip, 2003).

Fuera del sistema HLA, ciertos polimorfismos en el gen la insulina, localizado en el cromosoma 11, son el segundo factor genético más importante de susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo 1. La expresión ectópica de varias proteínas específicas en el timo es primordial para la generación de tolerancia sistémica hacia ellas. Los polimorfismos

identificados en el gen de la insulina en los pacientes con DMT1 se asocian con una pobre expresión de insulina en el timo, lo que lleva a que los linfocitos T autorreactivos específicos de la insulina no se destruyan durante su proceso de maduración y, por tanto, la insulina se identifique como un antígeno extraño y se genere inmunidad contra ella (Robertson & Rich, 2018).

También se ha demostrado que otras regiones del genoma humano parecen tener implicación en el desarrollo de la enfermedad, tales como, el receptor CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), la proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22 (PTPN22) y la cadena alfa del receptor de la interleucina-2 (IL-2RA) (Espino-Paisán et al., 2009).

Todas estas alteraciones modifican la vulnerabilidad de las células beta pancreáticas a los mediadores inflamatorios y llevan a su destrucción y a la consiguiente pérdida de la producción de insulina. Cuando las células beta dañadas sufren apoptosis, se liberan péptidos que, en los ganglios linfáticos pancreáticos, son presentados por las células dendríticas presentadoras de antígenos. Los linfocitos T nativos que entran en contacto con estos antígenos no los reconocen como proteínas propias, y se diferencian para actuar contra lo que creen que son antígenos extraños. Una fracción de las células T diferenciadas permanecen como células de memoria, mientras que la otra fracción, los linfocitos T citotóxicos, participa en la destrucción activa de las células beta. Además, la exposición de los linfocitos B a estos antígenos desencadena la producción de autoanticuerpos dirigidos contra los islotes pancreáticos. Estos procesos se ilustran en la Figura 7, que representa la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1 (Mahaffy & Edelstein-Keshet, 2007) (Katsarou et al., 2017).

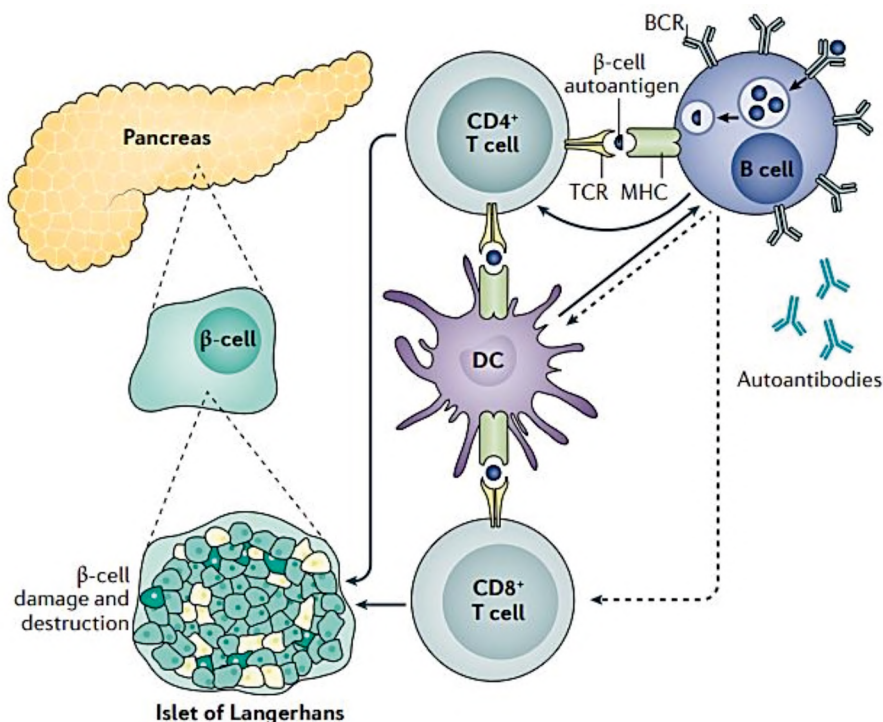


Figura 7. Patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1. La imagen ilustra la destrucción de las células beta por los linfocitos T y la generación de autoanticuerpos por los linfocitos B. Fuente: Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1).

Infecciones virales

El papel de las infecciones víricas en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1 está respaldado por estudios epidemiológicos, serológicos e histológicos. Las infecciones probablemente aceleran la aparición de la diabetes debido a la mayor demanda de insulina.

Existe una distribución estacional de los diagnósticos de DMT1 (más bajos durante el verano) que se correlaciona con el número de infecciones víricas, la mayoría de las cuales alcanzan su punto máximo durante los meses más fríos. También se han descrito asociaciones específicas de la aparición de la enfermedad con ciertos brotes virales, originalmente con las paperas y la rubéola. Pero, en los últimos años, el interés se ha centrado sobre todo en los Enterovirus humanos B, especialmente el virus Coxsackie B y el Echovirus.

Un informe de un caso clínico publicado a finales de la década de 1970 en el que se aisló el virus Coxsackie B4 del páncreas durante la autopsia de un niño que había fallecido al inicio de su diagnóstico de diabetes tipo 1, despertó el interés por el estudio de esta asociación.

Los factores que favorecen el desarrollo del proceso autoinmune deben buscarse en fases tempranas, como el inicio de la infancia e incluso el periodo fetal en el caso de la DMT1 infantil. El nacimiento en pleno invierno parece proteger contra la enfermedad, ya que el descenso de la protección de los anticuerpos maternos contra las múltiples infecciones víricas (que suele producirse en torno a los 6 meses de edad), tendría lugar en verano, cuando el número de brotes virales es bajo (Craig et al., 2013).

En el daño de las células beta pancreáticas inducido por el Enterovirus pueden intervenir múltiples mecanismos. Por un lado, puede darse una citolisis directa por la infección

activa, y, además, la inflamación asociada y otros procesos inmunológicos podrían causar daño celular. El virus Coxsackie B4 contiene una proteína (P2C) que es similar a la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), que está presente en los islotes de Langerhans del páncreas. Debido al mimetismo molecular, la P2C se toma erróneamente como una molécula propia y el virus no es atacado por los linfocitos T, lo que acaba potenciando la destrucción de las células beta (Varela-Calvino et al., 2000).

A pesar de todos los hallazgos que sugieren que la infección viral está asociada a un mayor riesgo de diabetes tipo 1, se ha sugerido que las infecciones perinatales por citomegalovirus están vinculadas a un menor riesgo de padecer la enfermedad, posiblemente debido al fuerte efecto inmunomodulador de este y otros Herpes virus (Ekman et al., 2019).

Factores ambientales

El gran aumento de la incidencia de la diabetes tipo 1 en niños en poblaciones genéticamente estables es la prueba más sólida del importante papel de los factores ambientales en la etiología de la enfermedad. El incremento del número de pacientes con un bajo nivel de riesgo genético definido por el sistema HLA también apoya la sugerencia de la gran implicación de la presión ambiental. Esto comenzó a cobrar importancia a mediados del siglo XX y sobre todo en los primeros años de este siglo (Patterson et al., 2019).

En la Figura 8 se observa la frecuencia de la distribución de los casos diagnosticados de DMT1 en el principio del siglo XX y en el principio del siglo XXI, respectivamente. Según múltiples estudios, el número relativo de casos con un fuerte componente genético ha descendido en el tiempo, ganando importancia los factores ambientales.

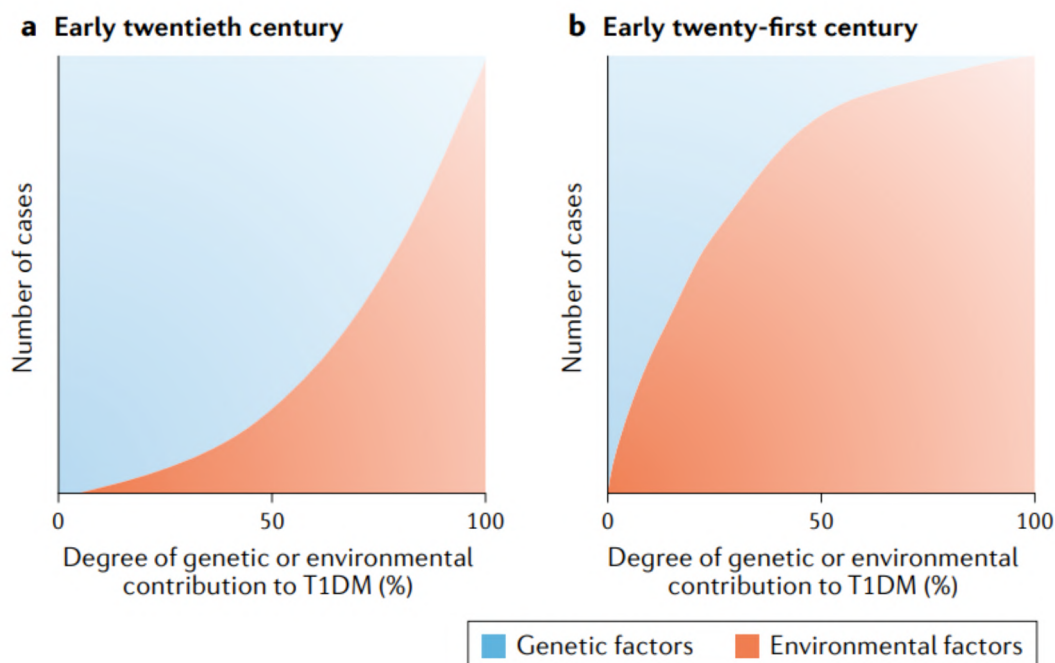


Figura 8. Proporción estimada de componentes genéticos (azul) y ambientales (rojo) en niños con diabetes mellitus tipo 1 a principios del siglo XX (a) y a principios del siglo XXI (b). Fuente: Ilonen, J., Lempainen, J., & Veijola, R. (2019). The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(11), 635–650.

Los estudios sobre personas del mismo grupo étnico pero situadas en diferentes zonas geográficas (por ejemplo, Finlandia frente a Estonia) han mostrado una distinta prevalencia de la DMT1. En las personas que emigran de países de baja incidencia a países de alta incidencia, la incidencia de la enfermedad tiende a aumentar, especialmente en los niños nacidos en el nuevo país o en los niños que se trasladaron a una edad temprana (≤ 10 años) (Ilonen et al., 2019).

Entre otros factores ambientales, la exposición a sustancias antigénicas en las primeras etapas de la vida, así como la nutrición, parecen contribuir a la aparición de la diabetes mellitus tipo 1.

Las interacciones entre los componentes bacterianos de la microbiota intestinal son cruciales para el desarrollo de un sistema inmunitario funcional, lo que hace que esta microbiota haya sido de gran interés por su posible papel en la autoinmunidad, incluida la DMT1. Las proporciones de los principales grupos bacterianos difieren entre los lactantes de poblaciones con diferente prevalencia de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, los lipopolisacáridos producidos por especies de *Bacteroides* son abundantes en poblaciones con una alta incidencia de diabetes y parecen ser menos capaces de activar la inmunidad innata y educar al sistema inmune en la tolerancia que los lipopolisacáridos producidos por *Escherichia coli*, que es común en los lactantes de poblaciones con baja incidencia de la enfermedad. La modificación de la microbiota en los primeros años de vida es una posibilidad interesante para prevenir la DMT1, como respaldan multitud de estudios, que muestran una disminución de la autoinmunidad hacia los islotes pancreáticos en los niños a los que se les administran probióticos en la infancia (Knip & Siljander, 2016), (Uusitalo et al., 2016). De igual manera, la disbiosis de la comunidad fúngica intestinal (el micobioma) también puede afectar al sistema inmunitario e influir en la salud (Iliev & Leonardi, 2017).

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo DMT2, pero no se descarta su influencia en el de-

sarrollo de DMT1. La ingesta de alimentos con un elevado índice glucémico aumenta la demanda de insulina y obliga a las células beta a producir más insulina, lo que puede acabar acelerando su destrucción por un aumento en el estrés (Corbin et al., 2018).

Existen múltiples estudios que buscan asociaciones entre componentes alimentarios específicos, su cantidad relativa en la dieta y la edad de inicio del consumo con la aparición de diabetes mellitus tipo 1. Algunos de ellos, por ejemplo, coinciden en señalar los efectos protectores de una dieta rica en aceites de pescado insaturados (que inhiben múltiples aspectos de la inflamación), así como un aumento del riesgo asociado al consumo abundante de leche de vaca, ya que la beta-caseína y la albúmina de la leche parecen favorecer la generación de linfocitos T que atacan específicamente al transportador de glucosa GLUT-2 de las células beta (Nucci et al., 2015).

El momento en que se introducen los alimentos con gluten también podría ser importante, ya que el gluten no disuelto provoca una inflamación subclínica de la mucosa intestinal, lo que aumenta la proporción de linfocitos T agresivos (Uusitalo et al., 2018). La vitamina D, también se ha estudiado por sus grandes efectos moduladores sobre el sistema inmunitario y se han encontrado niveles plasmáticos bajos en adultos jóvenes al ser diagnosticados de DMT1 (Littorin et al., 2006).

DIABETES MELLITUS TIPO 1: EPIDEMIOLOGÍA

Aunque la diabetes tipo 1 puede diagnosticarse a cualquier edad, es una de las enfermedades crónicas más comunes de la infancia. Los picos de presentación se producen entre los 5 y los 7 años y en la pubertad o cerca de ella. Mientras que la mayoría de los trastornos autoinmunes afectan en mayor medida a las mujeres, la DMT1 es ligeramente más común en niños y hombres (Atkinson et al., 2014).

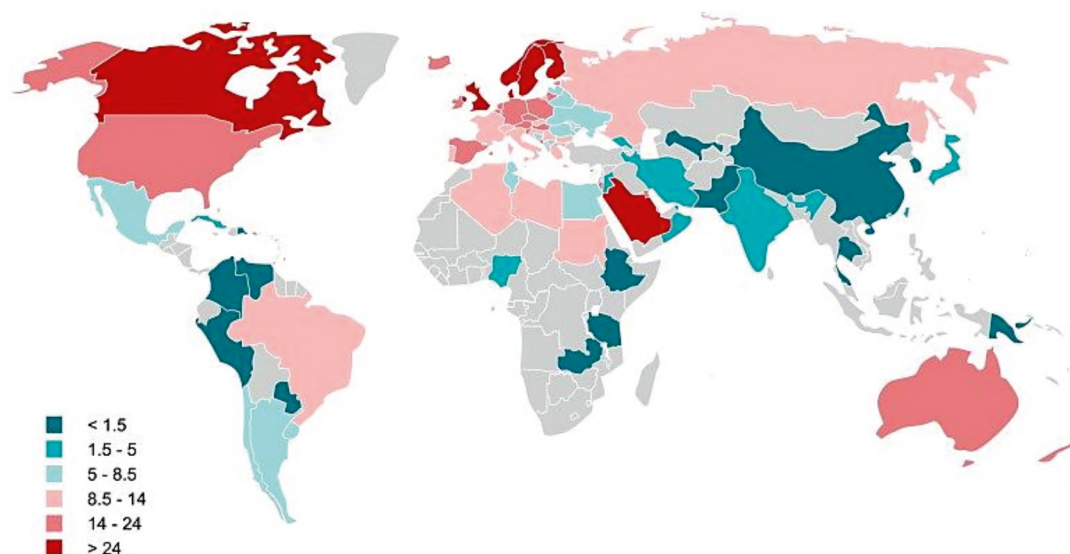


Figura 9. Mapa mundial donde se representan las tasas de incidencia de la diabetes de tipo 1 en niños menores de 15 años de 88 países diferentes. Fuente: Patterson, C., Guariguata, L., Dahlquist, G., Soltész, G., Ogle, G., & Silink, M. (2014). Diabetes in the young – A global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), 161–175.

Existen importantes variaciones globales en la incidencia y la prevalencia de la enfermedad. La mayoría de información recogida hace referencia a niños y adolescentes, ya que han sido estudiados con más detenimiento y frecuencia que los adultos. La *Federación Internacional de Diabetes* (FID) publica un Atlas epidemiológico mundial basado en los datos poblacionales más recientes de cada país y con estimaciones extrapolables a las regiones y países sin datos disponibles.

El último Atlas de la FID, correspondiente al año 2021, presenta los siguientes datos de incidencia de la enfermedad en niños menores de 15 años:

- Los 10 primeros países: Finlandia (52,2/100.000 al año), Suecia, Kuwait, Qatar, Canadá, Argelia, Noruega, Arabia Saudí, Reino Unido e Irlanda (27,5/100.000 al año).
- India y EE. UU. registraron el mayor número de casos totales con diferencia, debido a su gran población.

Estos patrones geográficos de incidencia también se observan en la diabetes de inicio en la edad adulta; las tasas de incidencia más elevadas se dan en los países nórdicos y las más bajas en los países asiáticos (Ogle et al., 2022).

La ocurrencia de la DMT1 ha aumentado en las últimas décadas en la mayoría de las poblaciones, especialmente en los países de renta baja y en los grupos de edad más jóvenes. Lo más común es que la incidencia de la enfermedad aumente con la edad, alcanzando un máximo a los 10 - 14 años, para luego disminuir. Sin embargo, existen regiones como el África subsahariana donde el pico de incidencia se produce al final de la adolescencia o incluso más tarde. Pero, aunque el pico se produzca en la infancia, más de la mitad de los casos se diagnostican en la etapa adulta.

Uno de los retos que afectan a la mayoría de los estudios epidemiológicos, es que el diagnóstico de diabetes, especialmente en las regiones menos favorecidas, se realiza de forma clínica, sin utilizar la medida de péptido C y autoanticuerpos, que son marcadores diagnósticos de la diabetes tipo 1. Esta asignación clínica puede conducir a una clasificación errónea de los pacientes, confundiendo la DMT1 de inicio en la edad adulta con DMT2 (Vanderniet et al., 2022).

En el año 2017 la OMS estimó que la prevalencia mundial de la DMT1 era de poco más de 9 millones, lo que representa solo el 2% de la prevalencia total de la diabetes. No obstante, aunque dicha prevalencia sea menor que la de la diabetes mellitus tipo 2, los costes de la atención a la diabetes tipo 1 suelen ser mayores. Esta discrepancia puede aumentar aún más con el incremento, en los pacientes diabéticos tipo 1, del uso de bombas de insulina y sensores de glucosa en tiempo real.

A nivel mundial, se estima que el 60% de todas las personas con esta patología tienen más de 40 años (Green et al., 2021). El aumento de la supervivencia de estos pacientes en las últimas décadas ha hecho que muchas personas convivan ahora con 50, 60, 70 o más años de diabetes tipo 1, por lo que también se necesitan conocimientos y recursos para apoyar a los enfermos de mediana edad, mayores y muy mayores.

DIABETES MELLITUS TIPO 1: DIAGNÓSTICO GENERAL

Durante décadas, la diabetes mellitus en todos sus tipos ha sido diagnosticada en base a criterios de glucosa sanguínea, ya sea con el valor en ayunas (prueba de glucemia en ayunas), el valor a las 2 horas durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa o incluso con el valor correspondiente a la prueba aleatoria de glucosa sanguínea.

En 1997, el primer *Comité de Expertos en Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus* revisó los criterios diagnósticos definidos hasta la fecha, utilizando estudios que asociaban los niveles de glucosa con la presencia de retinopatía, que se usó como factor clave para identificar el nivel umbral de normoglucemia. El punto de corte diagnóstico para la prueba de tolerancia a la glucosa se mantuvo, pero el punto diagnóstico para la prueba de glucemia en ayunas se redujo. Hoy en día, se siguen manteniendo esos valores establecidos como válidos para el diagnóstico.

En los últimos años, la hemoglobina glicosilada (HbA1c) ha cobrado gran importancia en este contexto y se ha incorporado como parámetro diagnóstico de diabetes mellitus. La HbA1c es un marcador de la glucemia crónica, que refleja los niveles medios de glucosa en sangre durante un período de 2 a 3 meses previos a la medición. En un primer momento, los *Comités de Expertos* no recomendaban el uso de este parámetro para el diagnóstico de diabetes, en parte debido a la falta de estandarización de la prueba. Sin embargo, los ensayos están ahora muy estandarizados para que sus resultados puedan aplicarse uniformemente tanto en el tiempo como en las distintas poblaciones. Así, el *Comité Internacional de Expertos*, tras una amplia revisión de la evidencia epidemiológica establecida y emergente, recomienda el uso de la HbA1c como criterio diagnóstico y la *Asociación Americana de Diabetes* reafirma esta decisión.

En general, tanto las pruebas de glucemia sanguínea como la hemoglobina glicosilada son igualmente apropiadas para el cribado diagnóstico de diabetes mellitus, aunque siempre hay que tener en cuenta que pueden existir variaciones intra y entre individuos.

La diabetes puede diagnosticarse en cualquiera de una amplia posibilidad de escenarios clínicos: En individuos aparentemente de bajo riesgo que casualmente se realizan una prueba de glucosa, en individuos examinados en base a su potencial riesgo de diabetes y en individuos con sintomatología típica.

Es necesario seguir investigando para caracterizar mejor a aquellos pacientes cuyo estado glucémico podría clasificarse de forma distinta según los resultados de dos pruebas diferentes (por ejemplo, glucosa en ayunas y HbA1C), obtenidos en estrecha aproximación temporal. Estas discordancias pueden deberse a la variabilidad de las mediciones, a los cambios en el tiempo o a que cada una de las pruebas mide procesos fisiológicos diferentes ("Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," 2014) ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022," 2022).

En el contexto de una hemoglobina glicosilada elevada pero un resultado de glucemia en ayunas normal, puede darse el caso de que los niveles de glucosa posprandial sí se reflejen alterados o de que exista una mayor tasa de glicación para un determinado grado de hiperglucemia. En el escenario opuesto, (glucemia en ayunas elevada pero HbA1C por debajo del punto de corte de la diabetes), puede darse el caso de que existan una mayor producción hepática de glucosa o que las tasas de glicación estén reducidas.

Al igual que con la mayoría de las pruebas diagnósticas, los resultados deben repetirse para descartar un error de laboratorio, a menos que el diagnóstico esté claro por motivos clínicos, como es el caso de un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica. Es preferible que para la confirmación se repita la misma prueba previamente utilizada. Sin embargo, hay situaciones en las que un mismo paciente dispone de dos resultados de dos pruebas diferentes. Si ambos están por encima de los umbrales de diagnóstico, el diagnóstico de diabetes se puede confirmar. Si los resultados son discordantes, la prueba cuyo resultado esté por encima del punto de corte diagnóstico, se debe repetir y usarla como diagnóstica. Si bien, es cierto que, en la mayoría de las circunstancias, la prueba con resultado "no diabético" probablemente se encuentre en un rango muy cercano al umbral que define la diabetes.

Dado que existe una variabilidad preanalítica y analítica de todas las pruebas de laboratorio, también es posible que cuando una prueba cuyo resultado esté por encima del umbral de diagnóstico se repita, el segundo valor salga por debajo del punto de corte diagnóstico. Esto es menos probable para la HbA1C, algo más probable para la glucosa en ayunas, y más probable para la prueba de tolerancia a la glucosa. Pero salvo errores del laboratorio, lo normal es que los resultados estén cerca de los límites del punto diagnóstico.

La decisión sobre qué prueba utilizar para diagnosticar la diabetes en un paciente concreto debe ser una decisión tomada por un profesional de la salud, teniendo en cuenta la disponibilidad y la viabilidad de las pruebas. Quizá, más importante que qué prueba elegir, es que la prueba se realice en el momento oportuno. Existe evidencia que indica que muchos pacientes en riesgo siguen sin realizarse pruebas diagnósticas y sin recibir asesoramiento para esta enfermedad cada vez más prevalente ("Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," 2014) ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022," 2022).

Prueba de la glucemia en ayunas

La glucosa es el hidrato de carbono más importante ya que constituye la fuente de energía principal para el organismo. Se obtiene de la dieta y según los requerimientos energéticos, se oxida en la célula o se metaboliza para su uso posterior a glucógeno o ácidos grasos que se almacenan en el hígado o en el tejido adiposo, respectivamente. Los niveles de glucosa en sangre están regulados por múltiples hormonas, principalmente la insulina y el glucagón producidos en los islotes pancreáticos. Las alteraciones en estos mecanismos de regulación pueden llevar a la hiperglucemia (exceso de

glucosa en sangre) y a la hipoglucemia (déficit de glucosa en sangre), típicas de la diabetes tipo 1. Aunque existen otras condiciones patológicas que alteran la glucemia, la medida de la glucosa en sangre es fundamental para el diagnóstico y manejo de la diabetes mellitus.

La técnica por excelencia para la determinación de glucosa en el laboratorio es el método enzimático que emplea la hexoquinasa. Esta enzima transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato consumiendo una molécula de ATP. A continuación, actúa otra enzima, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que en presencia de NADP⁺ (coenzima) oxida la glucosa-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, liberándose una molécula de NADH. Así, la cantidad de NADH producido, que se determina fotométricamente (luz ultravioleta) será directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Tietz, 2006).

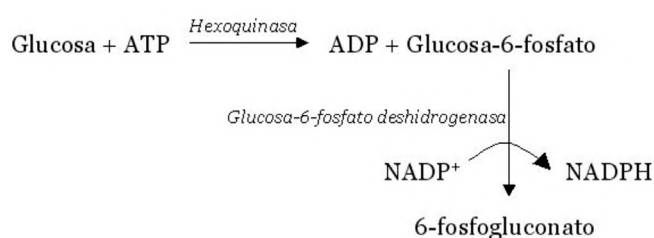


Figura 10. Reacción de la hexoquinasa utilizada para determinar la glucosa en el laboratorio clínico. Fuente: *Ensayo Enzimático*. *Wikipedia*. (n.d.)

Para la realización de la prueba de glucemia en ayunas el paciente no debe haber tomado ningún tipo de alimento o bebida (excepto agua) como mínimo en las 8 horas previas a la extracción sanguínea. Por ello, se suele realizar a primera hora de la mañana, antes del desayuno. El procedimiento consiste únicamente en extraer una muestra de sangre, y remitirla al laboratorio clínico para su análisis.

La etapa preanalítica es muy importante para asegurar la exactitud y fiabilidad de los resultados. Hay que asegurar que la glucólisis (consumo de la glucosa de la muestra por parte de las células sanguíneas) esté completamente inhibida. Para ello, los tubos de extracción incorporan inhibidores de la glucólisis tales como el citrato y el fluoruro. Además, para garantizar la inhibición se recomienda la centrifugación de la muestra antes de los 30 minutos desde la extracción. Después de la centrifugación, gracias al gel que incorporan los tubos, el plasma o suero queda separado de las células sanguíneas.

Además de la glucólisis, la estabilidad de la glucosa en la muestra también depende de la contaminación bacteriana y de la temperatura de almacenamiento. Para garantizar la estabilidad, si la medición no va a ser inmediata, la muestra debe almacenarse a 2 – 8 °C durante un máximo de 72 horas.

El análisis de la glucosa sanguínea es rápido y sencillo y no presenta limitaciones. No se han registrado interferencias con paneles de fármacos de uso común y el resultado tampoco se ve influido por la hemólisis o ictericia de la muestra.

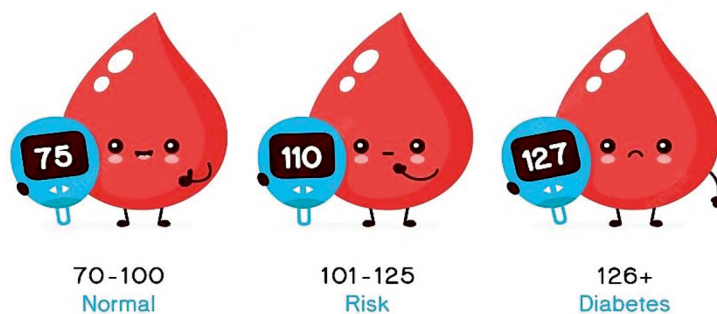


Figura 11. Resultados de la prueba de glucemia en ayunas. Fuente: Google Images.

Podemos encontrar 3 resultados tras realizar la prueba de glucemia en ayunas:

- Normal: Un nivel de glucosa sanguínea en ayunas menor que 100 mg/dL (5,6 mmol/L) es normal, correspondiente a una persona sana.
- Indicativo de prediabetes: Un nivel de glucosa sanguínea en ayunas entre 100 y 125 mg/dL (5,6 a 6,9 mmol/l) se considera prediabetes y el individuo está en riesgo de desarrollar diabetes mellitus.
- Diagnóstico de diabetes: Un nivel de glucosa sanguínea en ayunas igual o superior a 126 mg/dL (7 mmol/L) es indicativo de diabetes.

Así, la confirmación de un resultado igual a superior a 126 mg/dL en una prueba de glucemia en ayunas es diagnóstica de diabetes mellitus (Petersmann et al., 2019).

Prueba oral de tolerancia a la glucosa

La prueba oral de tolerancia a la glucosa es una medida de la respuesta del organismo a la glucosa e identifica las situaciones en las que el cuerpo no maneja correctamente este carbohidrato después de la ingesta. Se suele utilizar en pacientes cuyos resultados de glucemia en ayunas se encuentran en los límites diagnósticos y para apoyar o descartar el diagnóstico de diabetes mellitus. No obstante, la disponibilidad de la hemoglobina glicosilada ha hecho que esta prueba se solicite cada vez menos. Una variante de esta prueba se utiliza muy frecuentemente como método diagnóstico de la diabetes gestacional.

Al igual que para la prueba de glucemia en ayunas, el paciente no debe tomar alimentos ni bebidas (excepto agua) entre las 8 y 12 horas previas a la extracción de la muestra. Tampoco es recomendable fumar en este periodo de tiempo. Durante los tres días anteriores a la realización de la prueba el paciente debe hacer vida normal, mantenerse activo y llevar una dieta regular que incluya al menos 150 gramos de carbohidratos diarios, ya que el ayuno y la restricción de carbohidratos pueden elevar falsamente los niveles de glucosa durante la prueba. También es aconsejable que suspenda, siempre que sea posible, toda la medicación no esencial que pueda afectar al metabolismo de la glucosa al menos tres días antes de la prueba.

El procedimiento comienza con una primera extracción sanguínea a la llegada del paciente a la consulta. Esta mues-

tra, llamada muestra basal o a tiempo 0, es equivalente a la extraída en la prueba de glucemia en ayunas. A continuación, al paciente se le administra un preparado líquido que contiene 75 gramos de glucosa en aproximadamente 250 – 300 mL de agua y que debe tomarse en no más de 5 minutos. Cuando acabe de tomar el preparado, debe contar 120 minutos en los que debe permanecer en reposo, sentado o tumbado sin realizar ningún esfuerzo físico. Una vez transcurrido el tiempo, se realiza una segunda extracción sanguínea que en este caso será la muestra a tiempo 120.

Las condiciones preanalíticas y el método analítico son iguales a las de la prueba de la glucemia en ayunas.

Podemos encontrar 3 resultados tras realizar la prueba oral de tolerancia a la glucosa:

- Normal: Un nivel de glucosa sanguínea a los 120 minutos inferior a 140 mg/dL (7,8 mmol/L) se considera normal, correspondiente a una persona sana.
- Indicativo de prediabetes: Un nivel de glucosa sanguínea a los 120 minutos entre 140 y 199 mg/dL (7,8 y 11 mmol/L) se considera una alteración de la tolerancia a la glucosa, o prediabetes.
- Diagnóstico de diabetes: Un nivel de glucosa sanguínea a los 120 minutos igual o superior a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) es indicativo de diabetes mellitus.

Hay varios factores que pueden afectar a la precisión de la prueba de tolerancia a la glucosa, como algunas enfermedades, el nivel de actividad y ciertos medicamentos. Algunos pacientes no toleran la solución glucosada que se administra y responden con vómitos, lo que obliga a cancelar la prueba. Está contraindicada en presencia de enfermedades intercurrentes, de resección gastrointestinal o en caso de enfermedades gastrointestinales que alteren la absorción. No se recomienda su realización una vez diagnosticada la diabetes mellitus (Petersmann et al., 2019).

Prueba aleatoria de glucosa sanguínea

La prueba aleatoria de glucosa sanguínea es una medida de la glucemia en cualquier momento aleatorio o casual, sin ningún tipo de preparación previa. Sobre todo, es útil en los pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia o con una crisis hiperglucémica, ya que, en estos casos, si

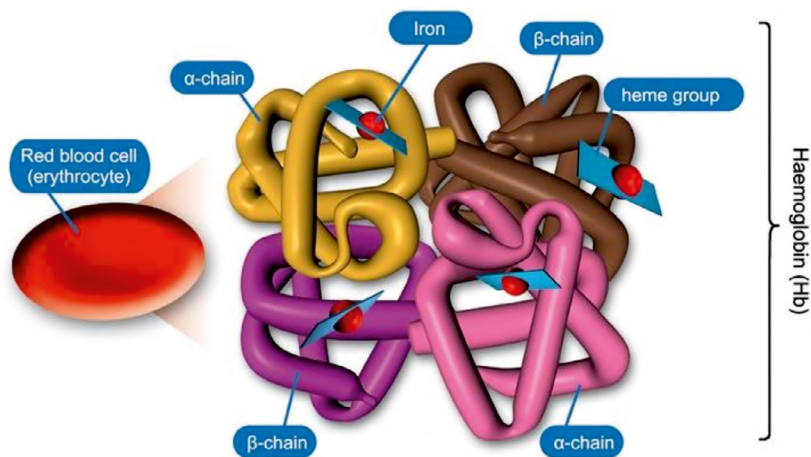


Figura 12. Estructura de la hemoglobina. Fuente: *Transition metals: Cisplatin, haemoglobin, EDTA. Savvy-Chemist. (2017, May 8).*

el resultado supera el punto de corte diagnóstico, esta única medición es suficiente para establecer el diagnóstico de diabetes y no se necesita una segunda prueba confirmatoria. Esta situación es frecuente en los pacientes con DMT1, que suelen debutar con síntomas clásicos como la poliuria, polidipsia, pérdida de peso y cetoacidosis diabética. La progresión de la alteración de la glucemia puede ser muy rápida en los diabéticos tipo 1 (diabetes de rápida evolución) y no verse reflejada en otras pruebas diagnósticas como la hemoglobina glicosilada en un primer momento, por lo que la prueba aleatoria de la glucosa es más sensible (DiMeglio et al., 2018).

Las condiciones preanalíticas y el método analítico son iguales a las de la prueba de la glucemia en ayunas.

Un resultado igual o superior a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) en la prueba aleatoria de la glucosa sanguínea es indicativo de diabetes mellitus.

Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

La hemoglobina (Hb) es una metaloproteína (contiene hierro) que se encuentra en los hematíes y se encarga del

transporte de oxígeno por la sangre hacia los distintos órganos y tejidos del cuerpo. Presenta una estructura cuaternaria característica constituida por cuatro subunidades con cuatro cadenas polipeptídicas que son iguales dos a dos. En el adulto, el 97% de la hemoglobina es de tipo HbA, formada por dos cadenas polipeptídicas alfa y dos cadenas polipeptídicas beta; un 2,5% es de tipo HbA2, formada por dos cadenas alfa y dos cadenas delta y el 0,5% restante es de tipo HbF (hemoglobina fetal) formada por dos cadenas alfa y dos cadenas gamma.

En 1958, Allen et al demostraron que la hemoglobina adulta podía separarse por cromatografía utilizando una resina de intercambio catiónico en un componente principal, que representaba más del 90% de la hemoglobina, al que llamaron HbA0, y en tres componentes menores con carga negativa, que designaron, según el orden de elución como HbAla, HbAlb y HbAlc, conocidos colectivamente como HbA1.

En los años posteriores surgieron varios estudios que arrojaron posibles asociaciones entre la HbA1 y la diabetes y a mediados de la década de 1970, ya parecía claro que tanto la HbA1 como la HbAlc estaban elevadas en los pacientes con diabetes mellitus, aunque aún no se comprendía el mecanismo de esta anomalía.

En 1966, se demostró que la HbAlc era idéntica a la HbA, salvo porque contenía un grupo no identificado unido al extremo N-terminal de la cadena beta. Los experimentos subsiguientes demostraron que ese grupo era una hexosa, en concreto, una molécula de glucosa. Así, se postuló que, en los hematíes, la glucosa reacciona con la valina N-terminal de la cadena beta para formar un enlace de aldimina que luego sufre un reordenamiento de Amadori (reacción irreversible) para formar un enlace de cetoamina más estable, tal y como se observa en la Figura 13.

El siguiente gran avance en la comprensión de la naturaleza de la HbAlc fue el descubrimiento de que ésta podía formarse incubando sangre entera o hemoglobina purificada en presencia de glucosa a 37°C, lo que sugirió que no intervenía ninguna enzima en el proceso.

Varios estudios midieron la actividad de la fracción de hemoglobina mayoritaria, designada como HbA0 (no glico-

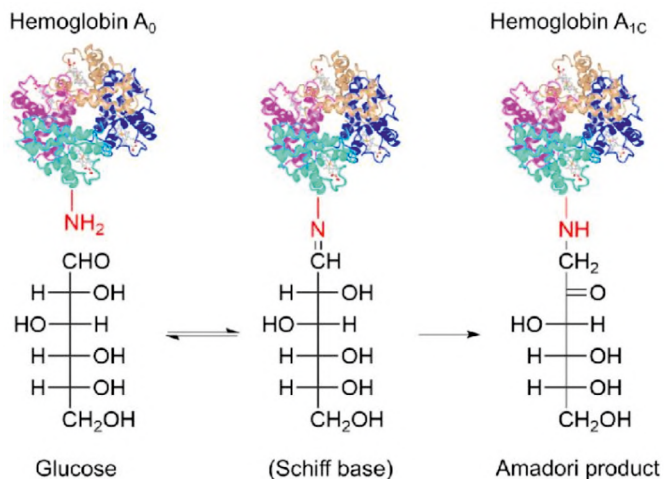


Figura 13. Reacción de glicosilación de la hemoglobina por la que se forma la HbA1c (Reacción de Amadori). Fuente: Hörber, S., Achenbach, P., Schleicher, E., & Peter, A. (2020). Harmonization of immunoassays for biomarkers in diabetes mellitus. *Biotechnology Advances*, 39, 107359.

silada), que alcanzó un pico a los 15 días y luego se mantuvo relativamente constante durante los siguientes 80 días, lo que concuerda con una eritropoyesis normal y una viabilidad celular de aproximadamente 100 días. Sin embargo, las actividades específicas de la HbA_{1a}, la HbA_{1b} y la HbA_{1c} aumentaron gradualmente y siguieron incrementándose a lo largo de los 100 días, superando la actividad de la HbA₀ a partir de los 60 días aproximadamente, lo que indica que el proceso de glicosilación se da mientras el hematíe sea viable (Nitin, 2010).

Todas las investigaciones llevadas a cabo en esos años permitieron concluir que la HbA_{1c} se forma a lo largo de la vida del hematíe como una modificación postsintética de la HbA y que su concentración es proporcional a la vida media del hematíe (aproximadamente 120 días) (Sacks, 2003).

Así, la HbA_{1c} constituye la fracción de hemoglobina glicosilada (GHb) resultante de la unión de una sola molécula de glucosa a la valina N-terminal de la cadena beta. No obstante, este extremo amino de la cadena beta no es el único lugar donde la glucosa puede unirse a la hemoglobina. El extremo amino de la cadena alfa se modifica de forma similar, aunque en una proporción de ocho a diez veces menor, por lo que no tiene un efecto suficiente sobre la carga de la proteína para permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico y su detección. También hay varios grupos amino en las lisinas a lo largo de las cadenas alfa y beta que pueden glicosilarse, pero debido a la estructura conformacional de la molécula de hemoglobina, estos grupos son menos accesibles a la glucosa libre y no ocurre de forma muy frecuente.

No obstante, la unión de la glucosa a estos otros posibles sitios de glicosilación forma el resto de GHb, pero la HbA_{1c} representa entre un 70 y 80% del total, por lo que es la más significativa. Todo ello, junto con la viabilidad de su medición y la demostración firme de su utilidad clínica han hecho que hoy en día la HbA_{1c} sea reconocida como el marcador más importante del control glucémico de los pacientes diabéticos, pero hasta llegar a esto ha sido necesario recorrer un largo camino (Goodall, 2005).

La relación entre la HbA_{1c} y el control de la diabetes mellitus fue demostrada por primera vez de forma convincente por Koenig et al, en el año 1976. Su investigación examinó esta asociación en cinco pacientes diabéticos mal con-

trolados y observó que la mejora del control glucémico provocaba una reducción de los niveles de HbA_{1c} al cabo de aproximadamente cuatro semanas. En otro estudio de pacientes diabéticos recién diagnosticados, del año 1978, se comprobó que los niveles inicialmente elevados de HbA_{1c} disminuían gradualmente en las semanas siguientes al inicio de la terapia dietética y de insulina, con una tendencia a nivelarse después de aproximadamente siete semanas (Koenig et al., 1976) (Ditzel & Kjaergaard, 1978).

Investigaciones adicionales, desde esa época hasta hace unos años, se han centrado en demostrar la existencia de la estrecha relación entre el valor de HbA_{1c} y la concentración de glucemia media. Dado que los hematíes son permeables a la glucosa sanguínea, la glicación de la hemoglobina se va a producir a lo largo de toda la vida del hematíe, que en condiciones normales es de 120 días. Por tanto, el nivel de HbA_{1c} es una medida integrada y un indicador fiable del estado glucémico del individuo en un periodo de aproximadamente 3 meses. Así, los resultados de HbA_{1c} se pueden tratar de traducir a valores de glucemia media estimada. Por ejemplo, un resultado de HbA_{1c} del 7% correspondería aproximadamente a un valor de 154 (123 – 185) mg/dL de glucemia media. No obstante, existe una gran variabilidad individual en esta relación, tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos, así como otros muchos factores que pueden afectar a la concentración de hemoglobina glicosilada (Makris & Spanou, 2011).

La gran cantidad de trabajos publicados desde su descubrimiento y la indudable evidencia hicieron que en el año 2009 la HbA_{1c} se añadiera y validara como prueba diagnóstica de la diabetes mellitus. Esta prueba presenta varias ventajas en comparación con el resto de las alternativas diagnósticas (prueba de glucemia en ayunas, prueba de tolerancia oral a la glucosa...) que incluyen la mayor comodidad (ya que no es necesario el ayuno), la mayor estabilidad preanalítica, y una menor influencia en el resultado del estrés agudo, cambios en la dieta o ciertas enfermedades. Sin embargo, estas ventajas pueden verse contrarrestadas por posibles factores interferentes en el proceso de glicación, por el mayor coste, la disponibilidad limitada de la técnica en ciertas regiones del mundo en desarrollo y la correlación imperfecta entre HbA_{1c} y glucosa media en ciertos individuos ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022," 2022).

Un resultado de HbA_{1c} igual o superior a 6,5% (48 mmol/mol) es indicativo de diabetes mellitus. Si el resultado se encuentra entre 5,7 – 6,4% (39 – 47 mmol/mol) se considera diagnóstico de prediabetes y el individuo se encuentra en alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus.

Métodos de determinación en el laboratorio

Los resultados del estudio de la *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) arrojaron la suficiente evidencia para que la HbA_{1c} se recomendara como medida analítica indispensable, al menos cada 6 meses, en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2. Esto hizo que se desarrollaran y comercializaran diversos métodos para su cuantificación.

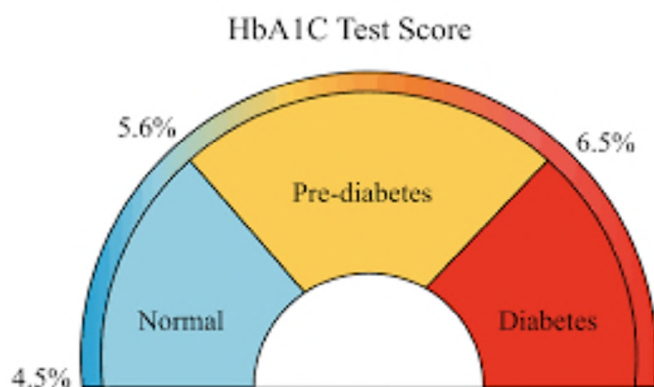


Figura 14. Resultados de la prueba de HbA_{1c}. Fuente: HbA_{1c}. Learn About Hba1C. (n.d.).

Al principio estas técnicas no detectaban la HbA1c de forma completamente aislada, si no una mezcla con otros tipos minoritarios de hemoglobina glicosilada. Además, cada una seguía un patrón distinto de separación, lo que hacía que los resultados no fueran intercomparables. Por ello, la *Asociación Americana de Química Clínica (AACC)* creó un comité que empezó el proceso de estandarización de la HbA1c, que tras varios años de trabajo se completó con el desarrollo de un método real, materiales primarios y calibradores y controles de referencia. Hoy en día la determinación de la HbA1c debe realizarse con un método que esté certificado por el *Programa de Estandarización de la Hemoglobina Glicosilada (Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP)* y estandarizado o trazable al ensayo de referencia del DCCT ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022," 2022).

Los métodos de determinación deben ser capaces de separar la HbA1c del resto de moléculas no glicosiladas de la sangre. Para ello pueden basarse bien en la diferencia de carga o bien en la diferencia de estructura de ambos grupos de moléculas. El análisis requiere una muestra de sangre total con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante.

Métodos basados en la diferencia de carga

Existe un rango de pH determinado en el que las proteínas suelen ser estables y adquieren carga neta positiva o negativa. La unión de la glucosa a la valina N-terminal de la cadena beta de la hemoglobina hace que la carga neta de la HbA1c sea diferente a la de la hemoglobina no glicosilada. Así, bajo diferentes condiciones la fracción glicosilada puede separarse fácilmente de la fracción no glicosilada.

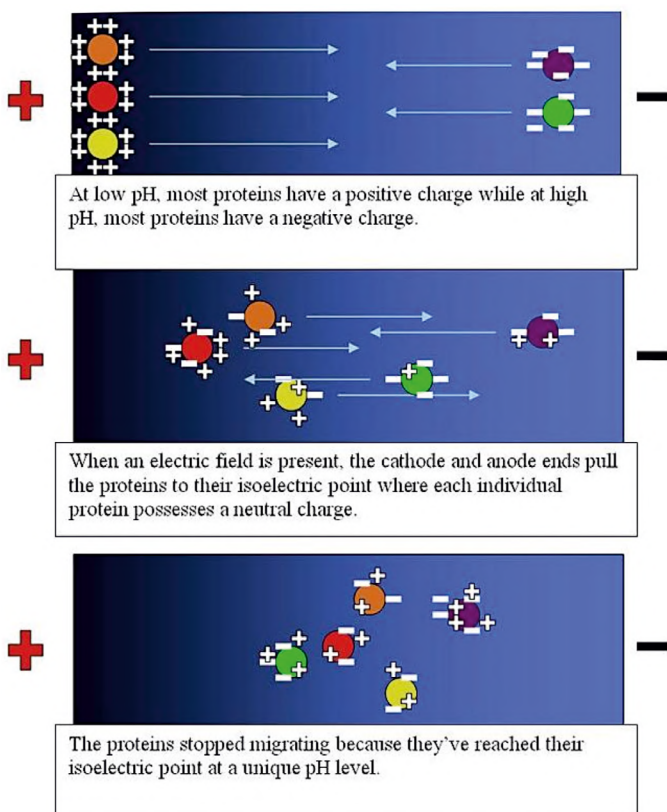


Figura 15. Esquema representativo de la técnica de Isoelectroenfoque.
Fuente: Google Images.

La electroforesis capilar en gel de agarosa es un método sencillo de determinación, aunque en la práctica clínica no se utiliza de forma rutinaria. Bajo acción de un campo eléctrico de alto voltaje las moléculas migran en función de su carga eléctrica (relación directa de proporcionalidad) y tamaño (relación inversa de proporcionalidad). Es necesario utilizar una solución hemolizante para que los hematíes se rompan y liberen la hemoglobina de su interior (Weykamp, 2013).

El isoelectroenfoque es una variante de la electroforesis en la que se emplea un gel de poliacrilamida que incorpora un gradiente de pH. Al aplicar el voltaje necesario, las distintas moléculas van migrando a lo largo del gel y se detienen en la región donde su punto isoeléctrico coincide con el pH. A pesar de que la diferencia entre los puntos isoeléctricos de la HbA1c y HbA0 (hemoglobina no glicosilada) es de solo 0,02 unidades de pH, se puede conseguir una separación precisa. Para la cuantificación se utiliza un microdensitómetro de alta resolución. Este método es útil para el estudio de las variantes de hemoglobina, ya que éstas (HbF, la HbC, HbS...) migran por separado (Jaisson et al., 2012).

La cromatografía de intercambio iónico se fundamenta en las interacciones electrostáticas (repulsivas o atrayentes) que tienen lugar entre los iones para la separación de moléculas. Utiliza una fase estacionaria, que generalmente es un polímero con grupos cargados unidos que actúa como intercambiador iónico, y una fase móvil, que es una disolución acuosa orgánica (tampón buffer) que también incorpora especies iónicas. Las moléculas cargadas a separar se unen al intercambiador de forma estable pero reversible, ya que al variar el ambiente iónico la interacción se rompe y van eluyendo de manera secuencial según la fuerza de la unión: Las moléculas con menor carga neta se desplazarán antes, pero las de mayor densidad de carga tendrán un tiempo de retención más elevado.

En el contexto de la cromatografía y hemoglobina glicosilada, al principio se utilizaban macrocolumnas de intercambio para la separación de las fracciones individuales HbA₀, HbA_{1b} y HbA_{1c}, que al tener más carga negativa que la HbA₀ eluían antes. Hoy en día, gracias a la variación de las condiciones de pH, presión, temperatura, fase estacionaria... se ha conseguido un método cromatográfico de alta resolución que utiliza microcolumnas más fáciles de manejar que disminuyen el tiempo de elución, pero no la especificidad. Se trata de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Como resultado se obtiene un cromatograma en el que se visualizan las distintas fracciones eluidas en forma de pico cuya área es proporcional a la concentración. Así, se pueden observar también las distintas variantes de hemoglobina, aunque a veces pueden interferir con la determinación de la HbA1c (Nitin, 2010).

Métodos basados en la diferencia de estructura

La cromatografía de afinidad se basa en las interacciones altamente específicas (tipo ligando – receptor o enzima – sustrato) que tienen lugar entre ciertas moléculas como fundamento para la separación. La unión de la glucosa a la hemoglobina genera un puente cis – diol por el que el

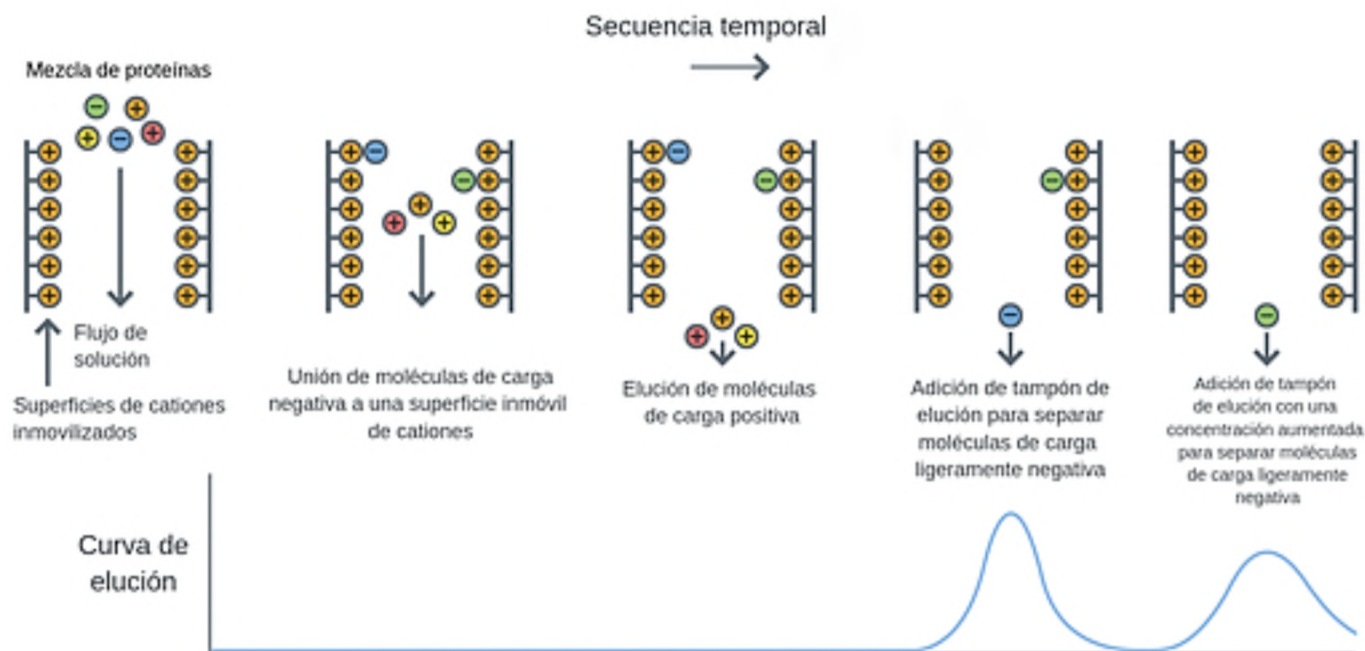


Figura 16. Esquema representativo de la técnica de Cromatografía de intercambio iónico. Fuente: Cromatografía de intercambio iónico. Labster theory. (n.d.)

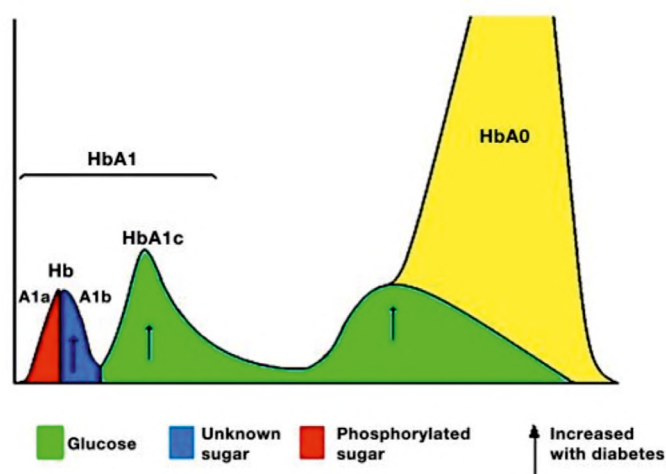


Figura 17. Separación de las especies de hemoglobina mediante cromatografía de intercambio iónico. La hemoglobina A1, que está cargada más negativamente que la HbA0, puede separarse además en sus partes constituyentes HbA1a, HbA1b y HbA1c, por orden de elución de la columna. Fuente: Makris, K., & Spanou, L. (2011). Is there a relationship between mean blood glucose and glycosylated hemoglobin? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5(6), 1572–1583.

boronato tiene gran afinidad. Así, mientras que la hemoglobina no glicosilada se desplaza libremente a través de una columna llena de partículas recubiertas de ácido borónico, las moléculas de hemoglobina glicosilada, al tener ese enlace cis – diol, quedan retenidas debido a la afinidad con el boronato. Para que esta fracción eluya se añade un ligando competidor a altas concentraciones que disocia el complejo. No obstante, además de a la valina N-terminal de la cadena beta (HbA1c), la glucosa se puede unir a otros residuos de la hemoglobina, por lo que este método mide la glicosilación total y no específicamente la HbA1c. La formación de estas otras hemoglobinas glicosiladas es proporcional a la formación de HbA1c, por lo que al final, con una calibración

eficaz los resultados se pueden expresar en términos de HbA1c (Weykamp, 2013).

Los inmunoensayos están basados en interacciones antígeno – anticuerpo. En este contexto se han desarrollado anticuerpos específicos contra distintas regiones de la HbA1c (por ejemplo, contra 6 aminoácidos de la región N – terminal) para la separación y cuantificación de esta. La turbidez de los inmunocomplejos formados se mide fotométricamente por turbidimetría o nefelometría y así se obtiene la concentración de hemoglobina. La ventaja es que, al ser tan específicos, los resultados no se ven afectados por la mayoría de las variantes de hemoglobina.

Por último, para la determinación de HbA1c se pueden utilizar ciertos ensayos enzimáticos de hidrólisis. Utilizan una proteasa que rompe la cadena beta y libera péptidos (normalmente dipéptidos) que reaccionan con otra enzima generando peróxido de hidrógeno, que sirve para cuantificar la HbA1c (Liu et al., 2008).

El análisis periódico de la HbA1c en las personas con diabetes es un requisito fundamental en el control de la enfermedad. Sin embargo, hay situaciones en las que no es posible analizar la HbA1c con la frecuencia recomendada. Las pruebas de laboratorio realizadas en el lugar de asistencia al paciente (POCT) tienen el potencial de ofrecer esta oportunidad. Se han publicado multitud de trabajos que evalúan el rendimiento de estos dispositivos POCT en comparación con los instrumentos de laboratorio habituales del laboratorio central. La mayoría de ellos concluyen que el rendimiento es aceptable en condiciones clínicas realistas (Lenters-Westra & English, 2019).

Sin embargo, la Asociación Americana de Diabetes y otros organismos importantes no recomiendan la utilización de estos dispositivos de medida de HbA1c para el diagnóstico de diabetes, si no que únicamente deberían aplicarse de forma más generalizada para evaluar el control glu-

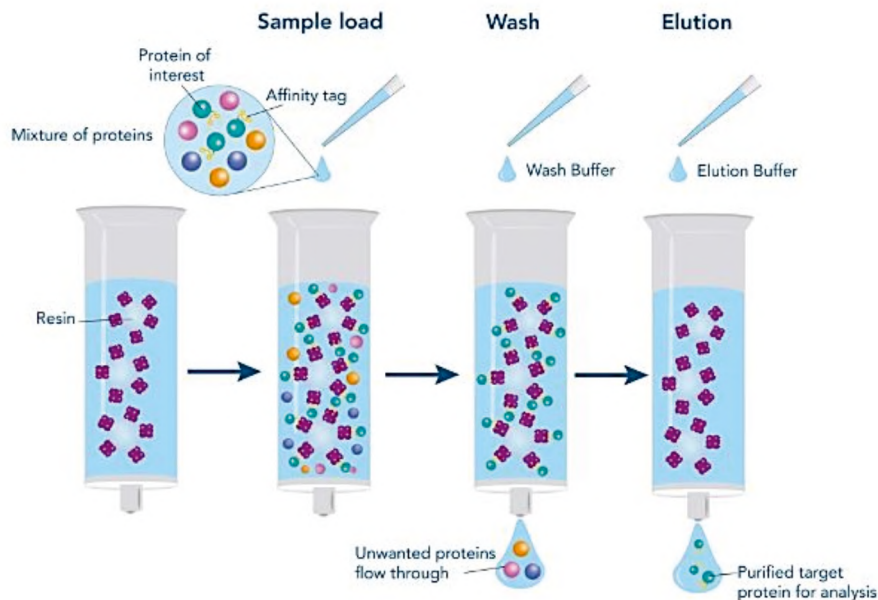


Figura 18. Esquema representativo de la técnica de Cromatografía de afinidad. Fuente: Protein affinity chromatography. IBA Lifesciences. (n.d.).

cémico en los casos necesarios. El resultado siempre debe confirmarse con una medida validada.

Factores que influyen en la determinación de HbA1c

Cuando se utiliza la HbA1c para diagnosticar la diabetes es importante recordar que se trata de una medida indirecta de los niveles de glucosa en sangre y hay que tener en cuenta ciertos factores que pueden influir y afectar a la glicosilación de la hemoglobina como son la glucemia, la hemodiálisis, el embarazo, el tratamiento del VIH, la edad, la raza/etnia, los antecedentes genéticos, y la anemia y hemoglobinopatías.

Las hemoglobinopatías son las alteraciones genéticas más frecuentes a nivel mundial y la principal causa de interferencia en la determinación de HbA1c. Los individuos con hemoglobinopatías estructurales presentan moléculas de

hemoglobina anormales debido a mutaciones puntuales que se producen en las cadenas polipeptídicas. Se han identificado más de 900 variantes estructurales, pero el 99% de ellas se pueden clasificar en cuatro categorías principales: Hb S (prevalente en África), Hb C (prevalente en Estados Unidos), Hb E (prevalente en Asia) y Hb D (prevalente en India). Los portadores heterocigotos suelen ser asintomáticos, lo que hace que la alteración pueda pasar desapercibida y afectar en los resultados. Se considera que los métodos de HPLC son los más vulnerables a este tipo de interferencia, aunque la mayoría de las variantes generan un pico extra en el cromatograma, lo que resalta la importancia de una correcta validación de los resultados por parte del laboratorio clínico. En los síndromes talasémicos existe una disminución total o parcial en la síntesis de una de las cadenas polipeptídicas. En la beta-talasemia, la producción de cadenas beta está inhibida. Cuando se ensamblan las moléculas de Hb, las cadenas beta se sustituyen por cadenas gamma o delta, elevando



Figura 19. Ejemplo de dispositivo POCT (pruebas de laboratorio realizadas en el lugar de asistencia al paciente) para la medición de HbA1c, de Roche Diagnostics. Fuente: Sistema Cobas B 101. Roche Diagnostics. (n.d.).

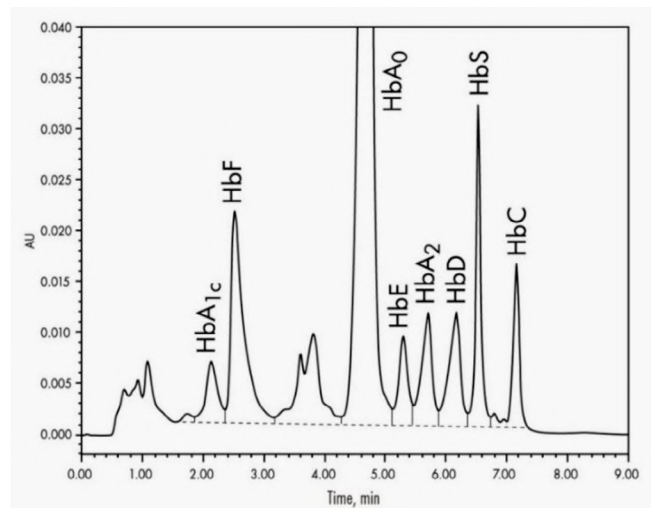


Figura 20. Cromatograma obtenido por HPLC en el que se observan las principales variantes estructurales de hemoglobina junto con la HbA1c. Fuente: Hemoglobin variants - HPLC. Chromsystems. (n.d.).

así los niveles de HbF y HbA₂, que normalmente son muy bajos.

Las hemoglobinas derivadas también pueden afectar al análisis de la HbA_{1c} y surgen como el resultado de ciertas modificaciones postraduccionales en la molécula de hemoglobina. La más común es la hemoglobina carbamida que se forma en pacientes urémicos por la reacción de la hemoglobina con la urea y tiene un punto isoeléctrico similar al de la HbA_{1c}, lo que puede producir una sobreestimación en algunos tipos de ensayos. La hemoglobina acetilada se forma por la reacción con el ácido acetilsalicílico, que comparte ciertas similitudes con la glucosa. También puede aparecer la llamada pre-HbA_{1c} (una base de Schiff).

Las distintas patologías y condiciones que acortan la vida media de los hematíes reducen el tiempo o tasa de glicosilación, lo que puede llevar a la infraestimación de la HbA_{1c} real. Esto puede ocurrir en anemias hemolíticas, en las transfusiones sanguíneas, en pacientes en hemodiálisis o en un sangrado masivo, entre otros. Por el contrario, la policitemia vera o la esplenectomía pueden llevar a la sobreestimación de la HbA_{1c}.

Adicionalmente, se han descrito interferencias por hipertrigliceridemia, hiperbilirrubinemia o ciertas adicciones tóxicas en algunos métodos analíticos. No obstante, aunque todos los métodos presentan alguna limitación, la mayoría de los instrumentos disponibles actualmente en el mercado son lo suficientemente potentes, precisos y robustos como para separar lo suficientemente bien las distintas fracciones de hemoglobina y evitar las interferencias analíticas casi en su totalidad.

En situaciones en las que se detecte una marcada discordancia entre el resultado de HbA_{1c} y los niveles de glucosa en plasma se debe plantear la posibilidad de que exista una interferencia en el ensayo. Cuando el resultado de HbA_{1c} sea superior a 15% o inferior al límite de referencia se recomienda analizar la causa y utilizar otra prueba para el diagnóstico de diabetes.

Con respecto a la etapa preanalítica, a diferencia de las muestras de glucosa, las muestras de HbA_{1c} se pueden recoger y almacenar fácilmente. La sangre puede extraerse en cualquier momento sin necesidad de tomar precauciones con el paciente y generalmente es estable hasta 1 semana a 2–8 °C y hasta un año a -70 °C (Weykamp, 2013) ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022," 2022).

DIABETES MELLITUS TIPO 1: BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad crónica que se caracteriza por la deficiencia de insulina como consecuencia de la destrucción (normalmente autoinmune) de las células beta pancreáticas productoras de insulina. Aunque la administración de por vida de insulina exógena puede ayudar a controlar la homeostasis de la glucosa en los pacientes, no existe una terapia efectiva que cure la enfermedad. Se estima que, en el momento del diagnóstico, el individuo con DMT1 ha perdido entre un 80–90% del total

de sus células beta, lo que dificulta en gran medida la posible reversión de la enfermedad. Además, se ha observado un constante aumento en el número de diagnósticos de DMT1, con un incremento anual medio del 2–5% a nivel mundial. Dada la naturaleza de la patología, los síntomas (a veces acompañados de complicaciones repentinas y agudas) suelen aparecer en la niñez o adolescencia, siendo la edad de incidencia máxima los 12–14 años, lo que normalmente acarrea problemas prácticos y emocionales para los pacientes y sus familiares. Todas estas cuestiones hacen necesaria la existencia de métodos eficientes de predicción y diagnóstico temprano (Katsarou et al., 2017).

Los biomarcadores son indicadores de procesos fisiológicos y patológicos normales y anormales y desempeñan un papel importante en el diagnóstico clínico, el pronóstico y el seguimiento de las respuestas terapéuticas. El desarrollo de biomarcadores sanguíneos es particularmente atractivo para la mayoría de las enfermedades debido al fácil acceso al espécimen en comparación con otros fluidos biológicos o tejidos. Sin embargo, en el caso de la diabetes tipo 1, la identificación de biomarcadores séricos específicos, especialmente de la destrucción o estrés de las células beta pancreáticas, ha sido un reto debido al hecho de que estas células sólo representan el 0,002% de la masa corporal.

Hasta ahora, los biomarcadores diagnósticos de DMT1 utilizados en la práctica clínica, se siguen basando en las consecuencias de la hiperglucemia, como son los ya comentados niveles altos de glucosa y de HbA_{1c}, en combinación con otros marcadores que permiten distinguir la diabetes tipo 1 de otros subtipos de diabetes, como son los niveles bajos de péptido C y la positividad de ciertos autoanticuerpos (Yi et al., 2018).

Insulina y péptido C

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos que se secreta por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. En primer lugar, se sintetiza como preproinsulina, que se convierte en proinsulina tras el desprendimiento del péptido señal en el retículo endoplasmático. Ahí, la proinsulina se almacena en vesículas y por acción de proteinasas específicas se separa en insulina monomérica (formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro), que es la molécula biológicamente activa, y en el péptido C, un polipéptido monocatenario de 31 aminoácidos. La insulina y el péptido C se producen y liberan en cantidades equimolares a la circulación sanguínea. La insulina circulante se retiene y metaboliza principalmente en el hígado y su vida media es muy corta, entre 3–5 minutos. Sin embargo, sólo una cantidad ínfima de péptido C es retenida en el hígado y su vida media es mayor, entre 20–30 minutos, por lo que circula en concentraciones superiores a la insulina por la circulación sistémica (Jones & Hattersley, 2013).

El péptido C se utiliza preferentemente a la insulina para evaluar la función de las células beta en la práctica clínica. En los pacientes en tratamiento con insulina, siempre se debe usar la medición del péptido C, ya que la insulina exógena es detectada por los ensayos analíticos y el re-

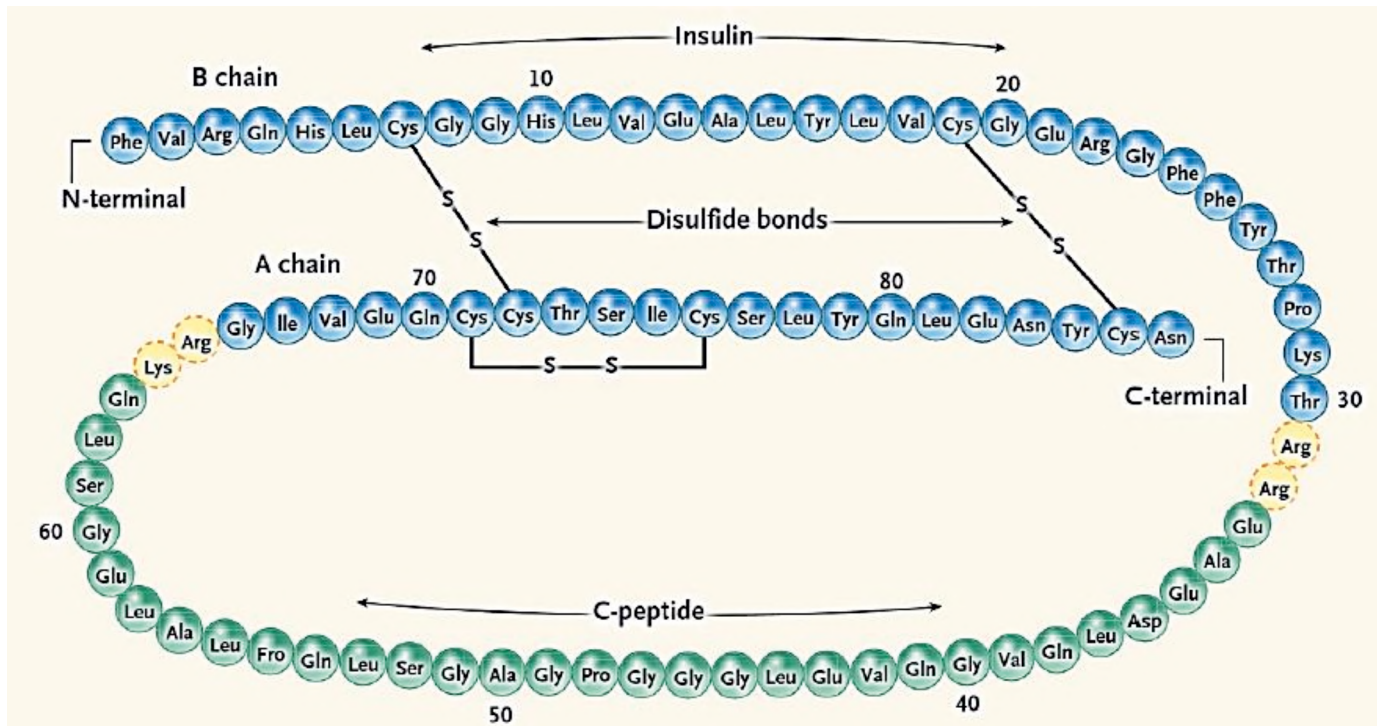


Figura 21. Estructura de la proinsulina humana. Las enzimas proteolíticas separan el péptido conector (péptido C, en verde) y la molécula de insulina (en azul). Fuente: Polonsky, K. S. (2012). *The past 200 years in Diabetes*. *New England Journal of Medicine*, 367(14), 1332–1340.

sultado no refleja el estado interno del paciente. No obstante, incluso en individuos que no están en tratamiento, los niveles de péptido C muestran con mayor precisión la secreción de insulina portal que los niveles de insulina periférica, debido a que el aclaramiento periférico de la insulina presenta una elevada variabilidad interindividual (Jones & Hattersley, 2013).

Para la determinación de insulina y péptido C en el laboratorio clínico, hoy en día se utilizan ensayos no isotópicos altamente sensibles y específicos que emplean anticuerpos monoclonales. Un ejemplo típico son los inmunoensayos de electroquimioluminiscencia que se basan en la técnica sándwich para cuantificar la insulina y el péptido C en suero (o plasma). En la primera incubación el anticuerpo monoclonal de captura y el anticuerpo monoclonal de detección (generalmente marcado con biotina) reaccionan con el analito formando un complejo sándwich con él. En una segunda incubación se añaden partículas de estreptavidina que, dado que tienen elevada afinidad por la biotina se van a unir a los complejos generando una señal quimioluminiscente que se utiliza para determinar la concentración del analito.

El péptido C puede medirse en una muestra en ayunas o en una muestra en cualquier momento sin preparación previa del paciente. Las condiciones preanalíticas son similares a las de la glucosa, se requiere una centrifugación rápida de la muestra, separación del suero o plasma y almacenamiento en frío si la muestra no puede ser procesada inmediatamente para garantizar la estabilidad de la molécula. Los principales ensayos de determinación no han reportado interferencias especialmente relevantes y frecuentes en la medida, a excepción de ciertos títulos extremadamente altos de anticuerpos dirigidos contra los anticuerpos del

inmunoensayo, aunque sí es recomendable evitar los tratamientos con biotina exógena días antes a la extracción de la muestra (Jones & Hattersley, 2013).

El principal papel clínico del péptido C es la distinción entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2 y el apoyo diagnóstico de DMT1. La utilidad es mayor en la diabetes de larga evolución, ya que en el momento del diagnóstico puede haber un solapamiento sustancial de los niveles de péptido C entre los individuos con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2, especialmente en los pacientes con sobrepeso u obesidad y edad avanzada.

En la DMT1 los niveles de insulina y péptido C descienden rápidamente, por lo que la utilidad de las pruebas aumenta de 3 a 5 años después del diagnóstico, cuando la gran mayoría de los pacientes tendrán concentraciones muy bajas de péptido C. En el momento del diagnóstico puede ser útil para confirmar la enfermedad si los resultados son bajos, reflejando la deficiencia de insulina. Sin embargo, los resultados más elevados deben interpretarse con precaución (especialmente en los pacientes obesos o aquellos con resistencia a la insulina) ya que pueden deberse simplemente a la secreción continua de insulina que puede observarse en el llamado 'periodo de remisión o periodo de luna de miel' típico de la DMT1, en el que el páncreas aún es capaz de producir una cantidad significativa de insulina endógena (Zhong et al., 2020).

Autoanticuerpos

La diabetes mellitus tipo 1 está causada por la destrucción de las células beta mediada por el sistema inmunitario, que conduce a la deficiencia de insulina y a la hiperglucemia. Los síntomas clásicos de la hiperglucemia suelen

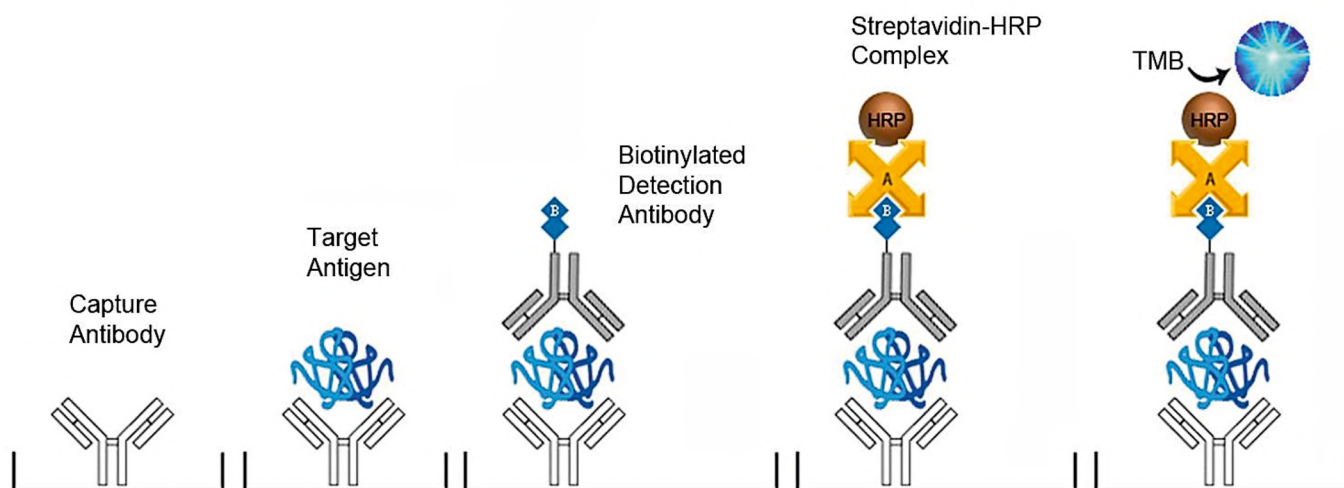


Figura 22. Esquema del ensayo tipo sándwich que se utiliza para la determinación de Insulina y Péptido C. Fuente: Mouse insulin c-peptide (Sandwich Elisa) Elisa Kit. LSBio. (n.d.).

aparecer rápidamente (en días o semanas), sobre todo en los niños pequeños, e incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, síntomas abdominales, cefaleas y cetoacidosis. La mayoría de los pacientes se diagnostica porque acuden al centro médico debido a la presencia de estos síntomas; una minoría se diagnostica mediante un análisis rutinario que incluye la medición de glucosa o mediante la detección de autoanticuerpos gracias a ciertos programas de cribado. Esto es posible porque la DMT1 está asociada a la aparición de autoanticuerpos meses o años antes del inicio de los síntomas. Se cree que estos autoanticuerpos no son patogénicos, pero sirven como biomarcadores del desarrollo de la autoinmunidad y, por tanto, como biomarcadores de apoyo al diagnóstico. Así, las bases del diagnóstico de la diabetes tipo 1 son la insulinopenia, los síntomas clásicos y la evidencia de autoinmunidad dirigida a las células beta pancreáticas (Katsarou et al., 2017).

Si hay positividad para los autoanticuerpos se puede establecer el diagnóstico de DMT1 autoinmune, también llamada tipo 1A, que es la mayoritaria. No obstante, existen pacientes con un cuadro clínico compatible con la diabetes tipo 1 (insulinopenia permanente y propensión a la cetoacidosis) pero en los que no se evidencia autoinmunidad contra las células beta (no presentan autoanticuerpos). Esta condición se conoce como diabetes tipo 1 idiopática o tipo 1B (Siller et al., 2020). Los pacientes con DMT1 idiopática tienden a ser mayores que los que padecen DMT1 autoinmune, suelen ser de ascendencia africana o asiática y tienen un índice de masa corporal más alto. No está claro si estos pacientes tienen una patología subyacente diferente, o si presentan autoanticuerpos que no se miden con los ensayos convencionales o autoanticuerpos dirigidos a autoantígenos aún por definir.

Aunque los autoanticuerpos pueden aparecer a cualquier edad, rara vez aparecen antes de los 6 meses y lo más común es que el primer anticuerpo se genere antes de los 3 años. Después de esta edad, el riesgo de desarrollar autoinmunidad contra los islotes pancreáticos disminuye. La aparición de autoinmunidad a una edad temprana y la positividad para múltiples autoanticuerpos se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de

la enfermedad. La titulación de los autoanticuerpos también influye en el riesgo de progresión, de forma que un título elevado de anticuerpos se asocia con un alto riesgo de progresión en los 5 años siguientes a la aparición del primer autoanticuerpo. No obstante, esto no siempre se cumple estrictamente, pues se ha encontrado una reversión a la seronegatividad de hasta el 60% de los individuos con un solo autoanticuerpo y la titulación puede cambiar relativamente (Primavera et al., 2020).

Hasta la fecha, los autoanticuerpos siguen siendo el patrón de oro para la estratificación del riesgo de desarrollar una diabetes tipo 1 clínicamente manifiesta, aunque ni siquiera la positividad de múltiples autoanticuerpos es específica de la enfermedad. A pesar de que a lo largo de los años se han descrito multitud de antígenos como posibles desencadenantes de la respuesta inmune asociada a la diabetes, sólo un pequeño número de éstos se ha considerado con el paso del tiempo y tras los procesos de estandarización. En la actualidad, existen cinco tipos principales de autoanticuerpos relacionados con la DMT1: Autoanticuerpos contra la insulina (IAA), Autoanticuerpos contra la proteína asociada al insulinoma 2 (IA-2), Autoanticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico de 65 kDa (GAD65), Autoanticuerpos contra el transportador de zinc 8 (ZnT8) y Anticuerpos contra las células de los islotes (ICA), aunque estos últimos no son específicos de la DMT1 y generalmente no se usan para el screening de la enfermedad (Peters, 2021). Un hilo común que une a los antígenos reconocidos por estos autoanticuerpos es su participación en la maquinaria secretora de las células beta, ya sea formando parte de los gránulos secretores de insulina o de microvesículas de tipo sináptico.

La descarboxilasa GAD65 es una enzima clave para la biosíntesis del ácido gamma aminobutírico (GABA), un importante neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central. Se encuentra generalmente formando parte de un complejo multiproteico en las microvesículas sinápticas, donde se almacena el GABA tras su síntesis. La expresión de GAD65 no es exclusiva de los islotes pancreáticos, donde se encuentra sobre todo en las células beta, sino que está presente en muchos otros tejidos. Además de en la

diabetes tipo 1, los anticuerpos contra GAD65 se han identificado en varias patologías autoinmunes graves del sistema nervioso central y son el sello distintivo de los pacientes con diabetes autoinmune latente del adulto (LADA), una forma de diabetes autoinmune de progresión lenta.

IA-2 es una proteína similar a la tirosina fosfatasa que se encuentra asociada a la membrana de los gránulos secretores de insulina. El papel biológico de IA-2 se conoce sólo parcialmente, aunque en las células beta pancreáticas puede establecer interacciones con una serie de proteínas interactuando indirectamente con los microfilamentos de actina del citoesqueleto celular. IA-2 influye en la secreción de insulina, en la biogénesis y homeostasis de los gránulos de secreción y en la expansión de las células beta. Su expresión no es exclusiva de las células beta pancreáticas, sino que está presente en varias células neuroendocrinas secretoras. Aunque la presencia de anticuerpos IA-2 se ha informado en ciertas enfermedades neurológicas, a diferencia de lo que ocurre con GAD65, la presencia de estos anticuerpos es, en la mayoría de los casos, un marcador de la presencia real o futura de DMT1 (Lampasona & Liberati, 2016).

El transportador de zinc 8 es una proteína multipaso con seis dominios transmembrana implicada en la regulación del contenido de zinc celular. ZnT8 forma homodímeros que se insertan en la membrana de los gránulos secretores de insulina. Existen otros transportadores ZnT que se expresan en las células beta, pero ZnT8 parece ser crítico para la acumulación de zinc en las vesículas y el mantenimiento de la insulina almacenada como hexámeros fuertemente empaquetados. La expresión de ZnT8 en humanos se limita en gran medida a los islotes pancreáticos, sobre todo en las células beta y es raro encontrar anticuerpos contra ZnT8 en ausencia de DMT1 (Lampasona & Liberati, 2016).

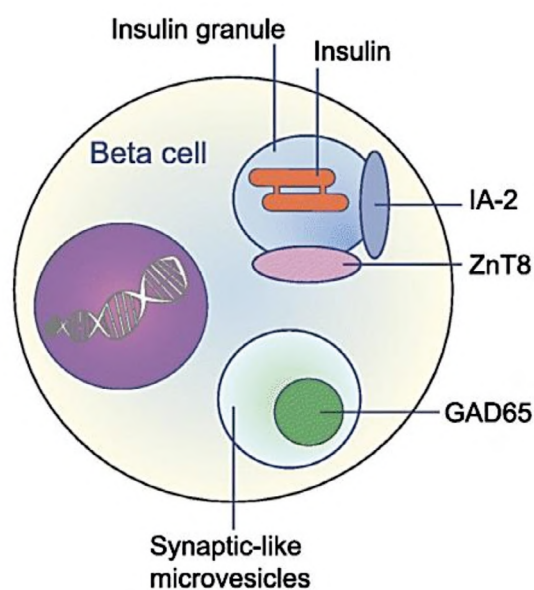


Figura 23. Diagrama esquemático de la célula beta pancreática que ilustra la localización de los principales antígenos que reconocen los autoanticuerpos: GAD65, IA-2, insulina y ZnT8. IA-2, la insulina y ZnT8 se encuentran en los gránulos de secreción de la insulina; GAD65 se encuentra en las microvesículas sinápticas. Fuente: Williams, C. L., & Long, A. E. (2019). What has zinc transporter 8 autoimmunity taught us about type 1 diabetes? *Diabetologia*, 62(11), 1969–1976.

La insulina en el cuerpo humano adulto se expresa casi exclusivamente en las células beta pancreáticas. Los anticuerpos anti-insulina se han descrito en otras enfermedades autoinmunes, aunque se suelen asociar con la coocurrencia o el futuro desarrollo de DMT1. A veces aparecen en pacientes después del tratamiento con insulina exógena y en el síndrome autoinmune por insulina (Cappellani et al., 2020).

Los individuos con genotipos HLA específicos (HLA DR - DQ) tienen un mayor riesgo de desarrollar dos o más autoanticuerpos y, por tanto, diabetes tipo 1. El primer autoanticuerpo que aparece en la infancia suele dirigirse a la insulina o al GAD65. Al menos uno de estos autoanticuerpos es positivo en el 95% de los pacientes con DMT1 al detectarse la hiperglucemia. En el momento del diagnóstico, se estima que entre el 50 – 90% de los pacientes son positivos para anticuerpos contra la insulina, 50 – 80% son positivos para anticuerpos contra GAD65, 50 – 70% son positivos para anticuerpos contra ZnT8 y entre el 30 – 70% son positivos para anticuerpos contra IA-2 (Peters, 2021). La *Asociación Americana de Diabetes* recomienda realizar un cribado de diabetes mellitus tipo 1 presintomática mediante la medición de anticuerpos contra la insulina, GAD65, IA-2 o ZnT8, sobre todo a individuos con familiares de primer grado con DMT1 y a individuos con genotipo HLA de riesgo.

En cuanto a los métodos de determinación en el laboratorio, tras el descubrimiento de los anticuerpos asociados a la diabetes, surgieron distintos equipos que utilizaban diferentes protocolos para el análisis, lo que hacía que se obtuvieran resultados discrepantes entre los distintos laboratorios. Esto hizo que diera comienzo el *Programa de Estandarización de Anticuerpos de los Islotes*, que hoy en día sigue trabajando para mejorar el rendimiento de los ensayos y la concordancia de los resultados entre laboratorios. En general, el programa ha permitido concluir que los ensayos en los que la unión de anticuerpos se produce en la interfaz de una superficie sólida recubierta de antígeno, como el ELISA directo, no permiten una detección sensible y específica de los autoanticuerpos. Es preferible utilizar ensayos como los de electroquimioluminiscencia, en los que la interacción de los anticuerpos con el antígeno se produce total o parcialmente en la fase fluida. Además, esta iniciativa ha permitido el uso global de un estándar común para la medición de estos autoanticuerpos (Lampasona et al., 2019).

La mayoría de los analizadores utilizados actualmente para la determinación de autoanticuerpos relacionados con la DMT1 se basan en inmunoensayos de quimioluminiscencia. El principio es el mismo que el utilizado para la medición de insulina y péptido C, una reacción tipo sándwich (Figura 22), con la diferencia de que en este caso el analito es un anticuerpo. Para el análisis se requiere una muestra de sangre y las condiciones preanalíticas son idénticas a las de la insulina o péptido C.

Posibles nuevos biomarcadores potenciales

Aunque el diagnóstico, o incluso el pronóstico, de la diabetes tipo 1 basado en el genotipo y la presencia de múl-

tipos autoanticuerpos está bien establecido, sigue siendo muy difícil identificar biomarcadores específicos capaces de predecir la progresión de la enfermedad. El desarrollo de las tecnologías "ómicas" de alto rendimiento ha proporcionado algunas plataformas excelentes para el descubrimiento de nuevos candidatos, permitiendo una visión global de los cambios moleculares que ocurren durante el transcurso de la enfermedad. Entre ellas se encuentran la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica, la secuenciación del ADN del microbioma intestinal y las proteínas y ácidos nucleicos derivados de las células beta (Regnell & Lernmark, 2017). A menudo estos estudios se llevan a cabo utilizando cultivos celulares, células inmortalizadas, islotes de ratón, tejidos de páncreas humano que incluyen pequeñas cantidades de islotes aislados por microdissección, secciones de islotes individuales o fuentes de células seleccionadas. Aunque muchas de estas investigaciones pueden no estar directamente relacionados con el suero, son igualmente útiles para identificar potenciales biomarcadores medibles en muestras sanguíneas, que es la opción ideal, al mismo tiempo que permiten dilucidar la patogénesis completa de la enfermedad.

Los avances más significativos hasta la fecha se han producido en el ámbito de los ácidos nucleicos. Algunos de los nuevos candidatos propuestos, como los patrones de metilación del ADN circulante, han demostrado ser prometedoros para la detección de la destrucción de las células beta. Los exosomas circulatorios y las modificaciones postraduccionales de las proteínas también parecen ser una fuente de interés como futuros marcadores biológicos. El objetivo último es construir un panel de múltiples biomarcadores de distinta naturaleza que proporcionen una predicción o medición más precisa de la DMT1 (Yi et al., 2018).

DIABETES MELLITUS TIPO 1: ESTADIOS DE LA ENFERMEDAD

Al analizar los factores de riesgo para la aparición de la diabetes tipo 1 a nivel poblacional e individual se ha descrito que el proceso de desarrollo de la enfermedad puede clasificarse en distintas etapas o estadios, y la probabilidad de que un individuo alcance un estado clínicamente sintomático puede verse con considerable precisión. Esta teoría propone que todos los casos comienzan con un periodo de "incubación" en el que la exposición a factores desencadenantes definidos y no definidos, como por ejemplo el riesgo genético, crea las condiciones para que surja la autoinmunidad hacia las células beta. Una vez iniciado el proceso de autoinmunidad, el progreso hacia la disglucemia y posterior diabetes manifiesta puede clasificarse en tres etapas principales, cuya duración es variable entre los distintos individuos (Al et al., 2021):

- Etapa 1: Existe una autoinmunidad asintomática hacia las células beta, definida por la presencia de 2 o más tipos de autoanticuerpos (GAD65, ZnT8, insulina, IA-2...). Es una etapa presintomática que puede durar desde unos pocos meses hasta décadas. La glucemia se mantiene aún controlada, por lo que no se detectarán resultados anormales en las pruebas de glucemia en ayunas o de tolerancia oral a la glucosa.

- Etapa 2: La autoinmunidad hacia las células beta sigue siendo asintomática, con la presencia de 2 o más tipos de autoanticuerpos (GAD65, ZnT8, insulina, IA-2...). Sin embargo, ya se ha perdido la suficiente cantidad de células beta para que las pruebas bioquímicas revelen una alteración en la tolerancia a la glucosa, obteniéndose normalmente resultados indicativos de prediabetes en la prueba de glucemia en ayunas (100 -125 mg/dL) y en la prueba de tolerancia oral a la glucosa (140 – 199 mg/dL). La disminución de la tolerancia a la glucosa también puede verse reflejada en un incremento gradual de la HbA1c mayor o igual al 10% o en un resultado indicativo de prediabetes (5,7 – 6,4%).
- Etapa 3: Con el incremento de la autoinmunidad, las células beta remanentes producen insuficiente insulina para prevenir la hiperglicemia persistente, que cursa con sus síntomas clásicos de poliuria, polidipsia y polifagia. La disglucemia también puede provocar la aparición de cetoacidosis diabética. En esta etapa todas las pruebas bioquímicas cumplen los criterios definidos para el diagnóstico de diabetes mellitus.

DIABETES MELLITUS TIPO 1: COMPLICACIONES ASOCIADAS

El descubrimiento de la insulina en 1922 hizo que la diabetes tipo 1 pasara de ser una enfermedad terminal a ser tratable, pero a pesar de los avances en la atención que se han conseguido, la enfermedad sigue estando asociada a una importante carga médica, psicológica y económica.

La hipoglucemia y la cetoacidosis son complicaciones típicas persistentes y potencialmente mortales. Las hipoglucemias recurrentes aumentan la probabilidad de sufrir nuevos episodios hipoglucémicos graves, ya que, a mayor número de eventos, la concentración de glucosa que desencadena las respuestas de contrarregulación para volver a la normoglucemia se va reduciendo. Los episodios de hipoglucemia se asocian a efectos adversos en la función cognitiva y están relacionados con el 4 - 10% de las muertes en la DMT1. Los sensores de monitorización de glucosa y otras tecnologías avanzadas posibilitan hoy en día la reducción de los niveles de HbA1c hasta el rango objetivo sin aumentar el riesgo de sufrir hipoglucemia grave. El tratamiento hospitalario por cetoacidosis diabética se produce a una tasa de 1 - 10 por cada 100 pacientes al año en población diabética, y representa el 3 - 19% de la mortalidad en la DMT1.

Las complicaciones microvasculares de la enfermedad se manifiestan principalmente como retinopatía, neuropatía y nefropatía, pero también pueden afectar a la función cognitiva, al corazón y a otros órganos. La hiperglicemia es el principal factor de riesgo de la enfermedad microvascular, y la disminución de la concentración de HbA1c mediante un tratamiento intensivo de la diabetes, sobre todo en las primeras fases de la enfermedad, se asocia a reducciones sorprendentes (en torno al 70%) de la incidencia y a una progresión más lenta de la enfermedad microvascular, aunque existe mucha variabilidad interindividual.

Las complicaciones macrovasculares de la DMT1 incluyen la aterosclerosis y la trombosis en el corazón, las arterias periféricas y el cerebro. En contraste con las complicaciones microvasculares, el riesgo de complicaciones cardiovasculares no parece atenuarse tanto con un control intensivo de la glucemia. La nefropatía diabética, tanto si se manifiesta como microalbuminuria, macroalbuminuria, o una tasa de filtración glomerular reducida, aumenta progresivamente el riesgo global de complicaciones macrovasculares.

Las personas con DMT1 también pueden presentar cambios neurocognitivos crónicos o agudos, que incluyen el declive de la función cognitiva con efectos perjudiciales en la velocidad psicomotriz, la flexibilidad cognitiva, la atención y la percepción visual.

No obstante, en los últimos 25 años, los riesgos de sufrir complicaciones microvasculares y macrovasculares han disminuido sustancialmente en la DMT1. Este progreso ha sido impulsado en gran medida por un mejor control de la glucemia y una mejor gestión de los factores de riesgo asociados, como la hipertensión y la hiperlipidemia. Los niveles bajos de educación y de ingresos se asocian a un riesgo de complicaciones microvasculares y macrovasculares más elevado. El sexo también parece modificar el riesgo, ya que se ha demostrado que las mujeres con DMT1 presentan tasas más altas de mortalidad prematura por todas las causas y de eventos vasculares que los hombres con DMT1. Una complicación adicional digna de mención es la 'carga de efectos adversos' sobre todo psicológicos y emocionales en los familiares, amigos y cuidadores de los pacientes, más aún en el inicio de la enfermedad a edades tempranas.

En este sentido, es necesario seguir trabajando para combinar los modelos de predicción con los biomarcadores específicos y las terapias reguladoras de la enfermedad, y así poder prevenir las secuelas y complicaciones asociadas (DiMeglio et al., 2018).

BIBLIOGRAFÍA

- Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. (2022). *Diabetes Care*, 45(1), 17–38.
- Acharjee, S., Ghosh, B., Al-Dhubiab, B. E., & Nair, A. B. (2013). Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. *Canadian Journal of Diabetes*, 37(4), 269–276.
- Ahmed, A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, 23(4), 373–378.
- Al, A., Akil, S., Yassin, E., Maraghi, A. Al, Aliyev, E., Malki, K. Al, & Fakhro, K. A. (2021). Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era. *Journal of Translational Medicine*, 1–19.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69–82.
- Cappellani, D., Macchia, E., Falorni, A., & Marchetti, P. (2020). Insulin Autoimmune Syndrome (Hirata Disease): A Comprehensive Review Fifty Years After Its First Description. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, Volume 13, 963–978.
- Corbin, K. D., Driscoll, K. A., Pratley, R. E., Smith, S. R., Maahs, D. M., & Mayer-Davis, E. J. (2018). Obesity in Type 1 Diabetes: Pathophysiology, Clinical Impact, and Mechanisms. *Endocrine Reviews*, 39(5), 629–663.
- Craig, M. E., Nair, S., Stein, H., & Rawlinson, W. D. (2013). Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatric Diabetes*, n/a-n/a.
- Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2014). *Diabetes Care*, 37(1), 81–90.
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449–2462.
- Ditzel, J., & Kjaergaard, J. J. (1978). Haemoglobin Alc concentrations after initial insulin treatment for newly discovered diabetes. *BMJ*, 1(6115), 741–742.
- Ekman, I., Vuorinen, T., Knip, M., Veijola, R., Toppari, J., Hyöty, H., Kinnunen, T., Ilonen, J., & Lempainen, J. (2019). Early childhood CMV infection may decelerate the progression to clinical type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*, 20(1), 73–77.
- Espino-Paisán, L., Urcelay, E., & Santiago, J. L. (2009). An insight into the genetics of type 1 Diabetes. *Inmunología*, 28(4), 173–181.
- Goodall, I. (2005). HbA1c standardisation destination--global IFCC Standardisation. How, why, where and when--a tortuous pathway from kit manufacturers, via inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 26(1), 5–19.
- Green, A., Hede, S. M., Patterson, C. C., Wild, S. H., Imperatore, G., Roglic, G., & Beran, D. (2021). Type 1 diabetes in 2017: global estimates of incident and prevalent cases in children and adults. *Diabetologia*, 64(12), 2741–2750.
- Hörber, S., Achenbach, P., Schleicher, E., & Peter, A. (2020). Harmonization of immunoassays for biomarkers in diabetes mellitus. *Biotechnology Advances*, 39, 107359.
- Iliev, I. D., & Leonardi, I. (2017). Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. *Nature Reviews Immunology*, 17(10), 635–646.
- Ilonen, J., Lempainen, J., & Veijola, R. (2019). The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(11), 635–650.
- Jaisson, S., Leroy, N., Meurice, J., Guillard, E., & Gillery, P. (2012). First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing® (Sebia) as a new analyzer for HbA1c assay by capillary electrophoresis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50(10).
- Jones, A. G., & Hattersley, A. T. (2013). The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetic Medicine*, 30(7), 803–817.

21. Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17016.
22. Klein, J., & Sato, A. (2000). The HLA System. *New England Journal Of Medicine*, 343(10), 702-709.
23. Knip, M., & Siljander, H. (2016). The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(3), 154–167.
24. Koenig, R. J., Peterson, C. M., Jones, R. L., Saudek, C., Lehrman, M., & Cerami, A. (1976). Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin A 1c in Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 295(8), 417–420.
25. Lampasona, V., & Liberati, D. (2016). Islet Autoantibodies. *Current Diabetes Reports*, 16(6), 53.
26. Lampasona, V., Pittman, D. L., Williams, A. J., Achenbach, P., Schlosser, M., Akolkar, B., Winter, W. E., Watson, K., Weets, I., Tao, Y., Chen, V., Yang, Y., Uibo, R., Reimand, K., Knip, M., Härkönen, T., Chatenoud, L., Achenbach, P., Neidhoefer, S., ... Hagopian, W. A. (2019). Islet Autoantibody Standardization Program 2018 Workshop: Interlaboratory Comparison of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody Assay Performance. *Clinical Chemistry*, 65(9), 1141–1152.
27. Lende, M., & Rijhsinghani, A. (2020). Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24), 9573.
28. Lenters-Westra, E., & English, E. (2019). Analysis: Investigating the quality of POCT devices for HbA1c, what are our next steps? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 13(6), 1154–1157.
29. Littorin, B., Blom, P., Schölin, A., Arnqvist, H. J., Blohmé, G., Bolinder, J., Ekblom-Schnell, A., Eriksson, J. W., Gudbjörnsdóttir, S., Nyström, L., Östman, J., & Sundkvist, G. (2006). Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia*, 49(12), 2847–2852.
30. Liu, L., Hood, S., Wang, Y., Bezverkov, R., Dou, C., Datta, A., & Yuan, C. (2008). Direct enzymatic assay for %HbA1c in human whole blood samples. *Clinical Biochemistry*, 41(7–8), 576–583.
31. Mahaffy, J. M., & Edelstein-Keshet, L. (2007). Modeling Cyclic Waves of Circulating T Cells in Autoimmune Diabetes. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 67(4), 915–937.
32. Makris, K., & Spanou, L. (2011). Is There a Relationship between Mean Blood Glucose and Glycated Hemoglobin? *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5(6), 1572–1583.
33. Niswender, K. D. (2011). Basal insulin: Physiology, pharmacology, and clinical implications. *Postgraduate Medicine*, 123(4), 17–26.
34. Nitin, S. (2010). HbA1c and factors other than diabetes mellitus affecting it. *Singapore Medical Journal*, 51(8), 616–622.
35. Nucci, A. M., Virtanen, S. M., & Becker, D. J. (2015). Infant Feeding and Timing of Complementary Foods in the Development of Type 1 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 15(9), 62.
36. Ogle, G. D., James, S., Dabelea, D., Pihoker, C., Svensson, J., Maniam, J., Klatman, E. L., & Patterson, C. C. (2022). Global estimates of incidence of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Atlas, 10th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109083.
37. Patterson, C., Guariguata, L., Dahlquist, G., Soltész, G., Ogle, G., & Silink, M. (2014). Diabetes in the young – A global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), 161–175.
38. Patterson, C. C., Harjutsalo, V., Rosenbauer, J., Neu, A., Cinek, O., Skrivarhaug, T., Rami-Merhar, B., Soltesz, G., Svensson, J., Parslow, R. C., Castell, C., Schoenle, E. J., Bingley, P. J., Dahlquist, G., Jarosz-Chobot, P. K., Marčulionytė, D., Roche, E. F., Rothe, U., Bratina, N., ... Green, A. (2019). Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989–2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia*, 62(3), 408–417.
39. Peters. (2021). Screening for Autoantibodies in Type 1 Diabetes: A Call to Action. *The Journal of Family Practice*, 70(6).
40. Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127(1), 1–7.
41. Polonsky, K. S. (2012). The Past 200 Years in Diabetes. In *New England Journal of Medicine* 367 (14) 1332–1340.
42. Primavera, M., Giannini, C., & Chiarelli, F. (2020). Prediction and Prevention of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 11.
43. Regnell, S. E., & Lernmark, Å. (2017). Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. In *Diabetologia* 60 (8) 1370–1381.
44. Robertson, C. C., & Rich, S. S. (2018). Genetics of type 1 diabetes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 50, 7–16.
45. Roep, B. O. (2019). A viral link for type 1 diabetes. *Nature Medicine*, 25(12), 1816–1818.
46. Sacks, D. B. (2003). Hemoglobin Variants and Hemoglobin A1c Analysis: Problem Solved? *Clinical Chemistry*, 49(8), 1245–1247.
47. Siller, A. F., Tosur, M., Relan, S., Astudillo, M., McKay, S., Dabelea, D., & Redondo, M. J. (2020). Challenges in the

- diagnosis of diabetes type in pediatrics. *Pediatric Diabetes*, 21(7), 1064–1073.
48. Tietz, N. (2006). *Clinical Guide to Laboratory Tests* (W. S. CO (Ed.); 4th Ed).
 49. Uusitalo, U., Lee, H.-S., Andrén Aronsson, C., Vehik, K., Yang, J., Hummel, S., Silvis, K., Lernmark, Å., Rewers, M., Hagopian, W., She, J.-X., Simell, O., Toppari, J., Ziegler, A.-G., Akolkar, B., Krischer, J., Virtanen, S. M., Norris, J. M., Rewers, M., ... Triplett, E. (2018). Early Infant Diet and Islet Autoimmunity in the TEDDY Study. *Diabetes Care*, 41(3), 522–530.
 50. Uusitalo, U., Liu, X., Yang, J., Aronsson, C. A., Hummel, S., Butterworth, M., Lernmark, Å., Rewers, M., Hagopian, W., She, J.-X., Simell, O., Toppari, J., Ziegler, A. G., Akolkar, B., Krischer, J., Norris, J. M., & Virtanen, S. M. (2016). Association of Early Exposure of Probiotics and Islet Autoimmunity in the TEDDY Study. *JAMA Pediatrics*, 170(1), 20.
 51. Vanderniet, J. A., Jenkins, A. J., & Donaghue, K. C. (2022). Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Current Cardiology Reports*, 24(10), 1455–1465.
 52. Varela-Calvino, R., Sgarbi, G., Arif, S., & Peakman, M. (2000). T-Cell Reactivity to the P2C Nonstructural Protein of a Diabetogenic Strain of Coxsackievirus B4. *Virology*, 274(1), 56–64.
 53. Virtanen, S. M., & Knip, M. (2003). Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(6), 1053–1067.
 54. Weykamp, C. (2013). HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects. *Annals of Laboratory Medicine*, 33(6), 393–400.
 55. Williams, C. L., & Long, A. E. (2019). What has zinc transporter 8 autoimmunity taught us about type 1 diabetes? *Diabetologia*, 62(11), 1969–1976.
 56. Yi, L., Swensen, A. C., & Qian, W. J. (2018). Serum biomarkers for diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Translational Research*, 201, 13–25.
 57. Zhong, T., Tang, R., Gong, S., Li, J., Li, X., & Zhou, Z. (2020). The remission phase in type 1 diabetes: Changing epidemiology, definitions, and emerging immuno-metabolic mechanisms. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 36(2).