

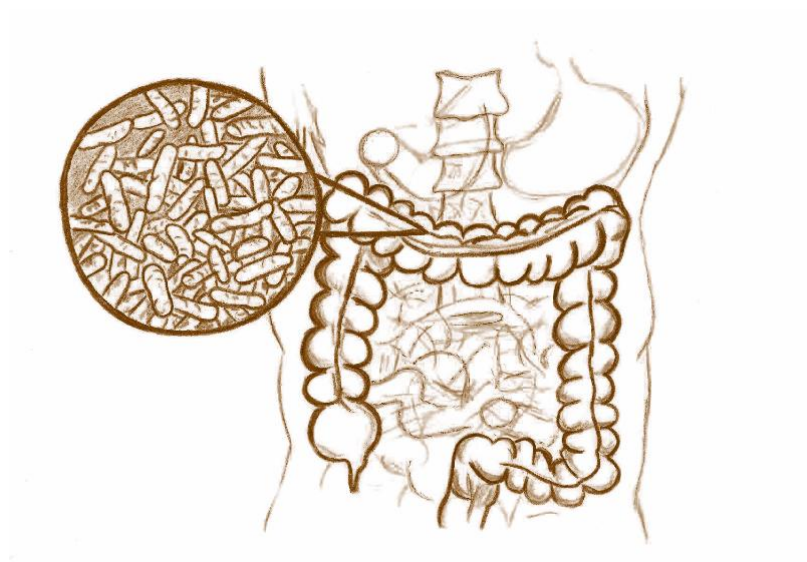
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Medicina



TESIS DOCTORAL

Análisis de la relación entre Microbiota Intestinal,
Permeabilidad Intestinal y Niveles de Glucemia en Niños
con Diabetes Mellitus tipo 1 comparados con Niños con
Diabetes tipo MODY 2 y Controles Sanos



Beatriz María Martín Tejedor

Málaga, Junio de 2017



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



Departamento de Farmacología y Pediatría, Facultad de Medicina.

Programa de Doctorado “Avances en Pediatría” 2011-2012

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL, PERMEABILIDAD INTESTINAL Y NIVELES DE GLUCEMIA, EN NIÑOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 COMPARADOS CON NIÑOS CON DIABETES TIPO MODY 2 Y CONTROLES SANOS

Memoria para optar al título de doctora por la Universidad de Málaga

Presentada por:

Beatriz María Martín Tejedor

Realizado bajo la dirección de:

Dra. M^a Isabel Queipo Ortuño


Dra. Isabel Leiva Gea

Tutor: **Dr. Juan Pedro López Sigüero**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Beatriz María Martín Tejedor

 <http://orcid.org/0000-0002-9576-6409>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Departamento de Farmacología y Pediatría

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

Dra. D^a M^a Isabel Queipo Ortuño (Investigadora Senior Miguel Servet) y **Dra. D^a Isabel Leiva Gea** (FEA Pediatra Endocrinóloga de HMI Hospital Regional Universitario) y **Dr. D. Juan Pedro López Sigüero** (FEA Pediatra Endocrinólogo de HMI Hospital Regional Universitario y Profesor Asociado de la Universidad de Málaga) certifican que el trabajo de tesis elaborado por **D^a Beatriz María Martín Tejedor**, titulado “Análisis de la relación entre microbiota intestinal, permeabilidad intestinal y niveles de glucemia, en niños con Diabetes Mellitus tipo 1 comparados con niños con Diabetes tipo MODY 2 y controles sanos”, ha sido realizado bajo su supervisión y dirección y, puesto que cumple todos los requisitos legales, autorizan su defensa pública y obtención del grado de doctora.

Málaga, Enero de 2017

Dra. D^a M^a I. Queipo Ortuño

(Directora)

Dra. D^a I. Leiva Gea

(Co-directora)

Dr. J.P. López Sigüero

(Tutor)

AGRADECIMIENTOS

*“Lámpara es Tu palabra para mis pasos,
luz en mi sendero”
Salmo 119*

A Isabel Leiva, por su entusiasmo y su fuente inagotable de ideas, en las que me ha invitado a embarcarme, y por su confianza y su apoyo en este proyecto.

A Maribel Queipo, por su comprensión y apoyo, por su labor incansable por la que he conseguido realizar esta tesis.

Al equipo de investigación de IBIMA, por su entrega en recursos humanos y técnicos.

A la unidad de Endocrinología Pediátrica del Hospital Materno Infantil de Málaga, por apasionarme con el mundo de las hormonas:

A Juan Pedro López Sigüero, por introducirme en la investigación y enseñarme su método, y mostrarme la necesidad de estar siempre actualizados

A María José Martínez-Aedo, por mostrarme su experiencia y transmitirme su saber

A José, por su gran dulzura y enseñarme a ser cercana a las familias de los pacientes

A Lola Bermejo, por sus ganas y su esfuerzo y por enseñarme a poner una sonrisa en todas las situaciones

A Ana Ortega, por apoyarme y creer en mí, por sonreírme cada mañana

Al servicio de pediatría (UGC de Pediatría, UGC Neonatología y UGC Cuidados Críticos y Urgencias Pediátricas) del Hospital Regional Universitario de Málaga, por haberme iniciado en el mundo de la pediatría y de la investigación. A mis compañeros de residencia por los buenos y los malos momentos, por haberme sostenido en tantas ocasiones, en especial a Silvia, Pili, Ana, Manu por su cercanía y compañerismo.

Al servicio de pediatría del Hospital Internacional Xanit Benalmádena, por dejarme más tiempo libre para este proyecto; a Cinta y Paco, por su disponibilidad y capacidad de cambio; a todos mis compañeros, por haberme apoyado y dado la tranquilidad necesaria para poderlo llevar a cabo.

A los pacientes con diabetes y a los niños sanos que se han prestado para participar en este estudio.

A mis padres, por haberme transmitido lo más importante, por haberme enseñado las prioridades de la vida y porque, gracias a ellos, soy quien soy.

A mis suegros, por el cariño y atención que dan a mis hijos y por su entera disponibilidad.

A mis hermanos, por haberme allanado el camino, por haberme transmitido su sabiduría

A tantos amigos que me han sostenido, que han aportado su granito de arena y han dejado su huella en mí.

A mis hijos que, a pesar de ser pequeños para comprender la importancia de este proyecto, han cedido muchas horas para su realización. Y porque en los momentos más oscuros, ellos iluminaban mis días.

Y por último y el más importante, a mi marido Fran, por su apoyo incondicional, por sus sacrificios y por haberme rescatado en las situaciones difíciles. Le debo gran parte de este trabajo pero especialmente le agradezco que comparta conmigo el proyecto más importante: la vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Diabetes Mellitus tipo 1	5
1.1. Epidemiología de la Diabetes Mellitus tipo 1	5
1.2. Factores de Riesgo y desencadenantes	11
1.2.1. Genética asociada a DM1	11
1.2.2. Factores ambientales asociados a DM1	13
1.2.3. Seroconversión	16
1.2.4. Relación de HLA, seroconversión y progresión de enfermedad	18
1.3. Patogenia de la Diabetes Mellitus tipo 1	19
1.4. Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 1	26
2. Diabetes tipo MODY2	27
2.1. Epidemiología de la Diabetes MODY	28
2.2. Patogenia de MODY2	29
2.3. Diagnóstico de MODY2	31
2.4. Tratamiento de MODY2	35
3. Microbiota intestinal	36
3.1. Establecimiento de la microbiota intestinal	36
3.2. Pérdida de biodiversidad de la microbiota intestinal	38
3.3. Composición de la microbiota intestinal	41
3.4. Inmunología de la mucosa intestinal	44
3.5. Función de barrera intestinal	48

3.6. Permeabilidad intestinal en DM1.....	52
3.7. Microbiota intestinal y DM1.....	55
3.8. Endotoxemia metabólica y DM1.....	63
3.9. Microbiota y MODY2.....	64
FUNDAMENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
FUNDAMENTO.....	67
HIPÓTESIS.....	68
OBJETIVOS.....	68
1. Objetivo principal.....	68
2. Objetivos secundarios.....	69
MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
1. Diseño.....	73
2. Sujetos de estudio.....	73
3. Cálculo del tamaño muestral.....	75
4. Recogida de muestras.....	75
5. Análisis de los datos.....	76
5.1. Análisis variables antropométricas.....	76
5.2. Análisis variables bioquímicas.....	76
5.3. Análisis de la permeabilidad intestinal.....	77
5.3.1. Zonulina.....	77
5.3.1.1. Materiales.....	77
5.3.1.2. Muestras.....	77
5.3.1.3. Procedimiento de análisis.....	77
5.4. Análisis de la microbiota.....	78
5.4.1. Extracción ADN bacteriano de las muestras de heces.....	78

5.4.2. Determinación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos.....	80
5.4.3. Pirosecuenciación del ADN bacteriano.....	82
5.4.4. Procesamiento y análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación.....	82
5.5. Análisis estadístico.....	84
RESULTADOS.....	85
1. Dieta.....	87
2. Análisis de variables antropométricas y bioquímicas.....	87
3. Caracterización de la microbiota fecal mediante pirosecuenciación.....	89
3.1. Comparaciones taxonómicas de la microbiota fecal en los tres grupos de estudio.....	93
4. Medida de los niveles séricos de zonulina.....	98
5. Relación entre la composición de microbiota intestinal, los niveles de zonulina sérica y HbA1c.....	99
DISCUSIÓN.....	103
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXO 1.....	153
RESUMEN.....	157

ABREVIATURAS

ADA: American Diabetes Association

BBDP: BioBreeding diabetes-prone rats

BBDR : BioBreeding diabetes-resistant rats

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

c/10⁵h-a: por cada/10⁵habitantes-año

DIPP: estudio finlandés de predicción y prevención de diabetes

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

EDTA: ácido-etilen-diamino tetracético

EGFR: receptor del factor del crecimiento epidérmico

FIG: figura

GADA: anticuerpos frente a la isoforma de 65 kDa del ácido glutámico decarboxilasa

GCK: glucokinasa

hBD2: b-defensina 2 humana

hbA1c: hemoglobina glicosilada

HLA: antígeno leucocitario humano (human leukocyte antigen)

IAA: anticuerpos frente a insulina

IA-2A: anticuerpos frente a la proteína 2 asociada a insulinoma

IC: intervalo de confianza

ICA: anticuerpos frente a los islotes

INS: ADN no metilado de la pre-proinsulina

ISCI: Sistema de infusión continua de insulina

LA/MA: test de Lactulosa-manitol

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MDI: Régimen de múltiples inyecciones diarias

MODY: Maturity-Onset Diabetes of Youth

MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88

NOD: ratones diabéticos no obesos

NOD1: dominio de oligomerización de unión de nucleótidos 1

NOD2: dominio de oligomerización de unión de nucleótidos 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTUs: identidad potencial

PTMs: modificaciones post-traduccionales

QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology

RE: retículo endoplásmico

ROS: especies reactivas de oxígeno

TCR: receptores de células T

TGF β : factor de crecimiento transformante β

Th1: células T helpers 1

Th2: células T helpers 2

TLAI: tejido linfoide asociado al intestino

TLR: receptores de tipo Toll

TTOG: test de tolerancia oral a la glucosa

ZnT8A: anticuerpos frente al transportador de zinc ZnT8

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es un trastorno proinflamatorio mediado por células T que produce la destrucción específica de las células β de los islotes pancreáticos, con la consiguiente pérdida progresiva de la producción de insulina (Srikanta S 1983). Esto lleva a múltiples alteraciones metabólicas con una elevada morbilidad como consecuencia de la hiperglucemia, por lo que precisa unas medidas higienico-dietéticas estrictas y un tratamiento con insulina exógena de por vida.

1.1. Epidemiología de la DM1

Este tipo de diabetes es el más prevalente (80%) en la edad pediátrica (ADA 2012), siendo una de las enfermedades pediátricas más frecuentes en las dos primeras décadas de la vida. Afecta aproximadamente a 430000 niños en todo el mundo.

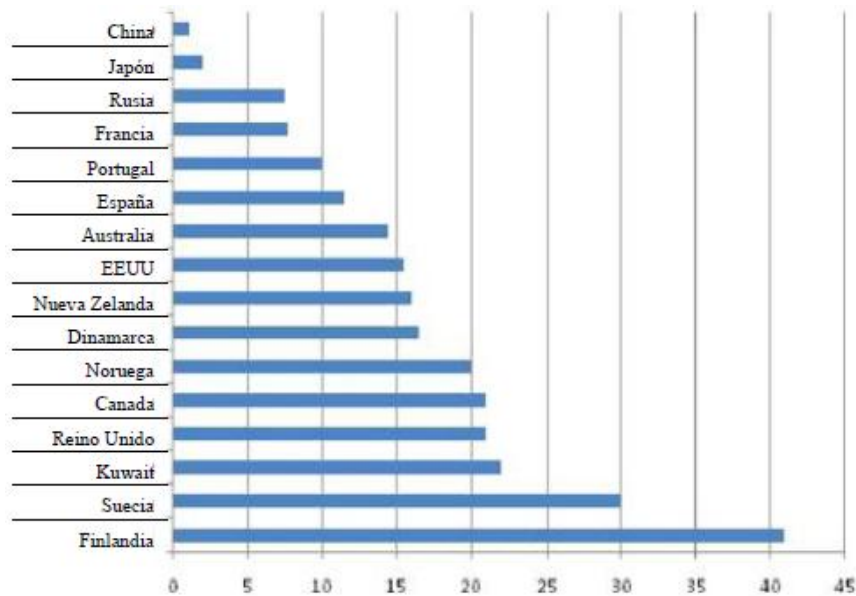
Los estudios epidemiológicos sirven para conocer la incidencia y prevalencia de la enfermedad y observar su evolución a lo largo tiempo. Del mismo modo, permiten el estudio de los posibles factores etiológicos, al analizar la influencia que éstos pueden tener en la incidencia de la enfermedad. Para conocer más sobre la epidemiología de la diabetes en población infanto-juvenil, se ha invertido un gran esfuerzo en la creación de registros estandarizados. El mantenimiento de registros estandarizados de DM1 a lo largo del tiempo permite obtener cifras de incidencia más fiables que los estudios de corta duración, así como conocer la evolución de la incidencia a lo largo del tiempo.

A partir de 1972 se comenzaron a desarrollar los primeros registros estandarizados de incidencia de DM1, que permitieron la comparación entre diferentes áreas, encontrando una gran variabilidad geográfica en la distribución mundial de la enfermedad (LaPorte RE 1985). A finales de la década de 1980 se pusieron en marcha estudios multicéntricos para conocer la distribución mundial de la DM1 como el Diabetes Mondiale (DiaMond) Project worldwide (DiaMond Project Group 2006) y The Epidemiology and Prevention of Diabetes (EURODIAB) study in Europe (EURODIAB ACE Study Group 2000).

El proyecto DIAMOND fue iniciado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1990, recogiendo datos de niños de hasta 14 años a través de registros de base poblacional en todo el mundo. En su publicación más reciente (2006) hay participación de 112 centros de 57 países durante el periodo de 1990-1999, con datos de 43.013 casos de DM1 de un estudio de población de 84 millones de niños menores de 14 años. Se propuso clasificar las áreas de estudio en 5 grupos en función de su incidencia (incidencia muy baja: $<1\text{c}/10^5\text{h-a}$ (por cada/10⁵habitantes-año); incidencia baja: $1-4,99\text{c}/10^5\text{h-a}$; incidencia intermedia: $5-9,99\text{c}/10^5\text{h-a}$; incidencia alta: $10-19,99\text{c}/10^5\text{h-a}$; incidencia muy alta: $\geq 20\text{c}/10^5\text{h-a}$). Los resultados mostraron una gran variabilidad geográfica en la incidencia de la enfermedad, desde los $0,1\text{ c}/10^5\text{h-a}$ en algunas regiones de China y Venezuela hasta los $40,9\text{ c}/10^5\text{h-a}$ en Finlandia. Las tasas de incidencia más altas se encontraron en Europa y EEUU. Se calculó un incremento global en las tasas de incidencia de un 2,8% anual (intervalo de confianza (IC) 95%: 2,4-3,2%), siendo este incremento especialmente marcado en Asia, Europa y EE. UU y especialmente en los grupos de menor edad. Este incremento fue mayor en el periodo de los últimos 5 años (3,4% anual; IC 95%: 2,7-4,3%) con respecto al periodo de los 5

primeros años (2,4% anual; IC 95%: 1,3-3,4%) (The DIAMOND Project Group 2006, FIG1).

FIG1. Incidencia estandarizada por edad de DM1 en niños menores de 14 años (por 100.000/año)
(adaptado de The DIAMOND Proyecto Group, 2006)



Por su parte, el proyecto EURODIAB se inició en 1988 como un estudio cooperativo a nivel europeo, con la participación de 17 países. Sus resultados han sido comunicados en sucesivas publicaciones, encontrando:

- Gran variabilidad de las tasas de incidencia de DM1 en los distintos países participantes, desde los 3,2 casos/100.000 habitantes-año ($c/10^5h-a$) de la República de Macedonia hasta los 40,2 $c/10^5h-a$ en Finlandia.
- Tasas de incidencia mayores en el norte y noroeste de Europa y más bajas en el centro, sur y este de Europa, con la excepción de Cerdeña (36,6 $c/10^5h-a$).
- Aumento de incidencia de un 3,2% anual (IC 95%: 2,7-3,7%) para el periodo 1989-1998 (Green A 2001) y un incremento anual del 3,9% (IC 95%: 3,6-4,2%) desde 1998-2003 (Patterson CC 2009). Este incremento ha sido mayor en los

países de baja incidencia (Europa oriental) y menor en los países de muy alta incidencia (Suecia, Finlandia, Noruega) y España. En cuanto al incremento por grupos de edad, fue del 5,4% anual (IC 95%: 4,8-6,1%) para niños de 0 a 4 años, 4,3% anual (IC 95%: 3,8-4,8%) para niños de 5 a 9 años y 2,9% anual (IC 95%: 2,5-3,3%) para niños de 10 a 14 años. En términos absolutos, el incremento fue similar en los distintos grupos de edad pero el incremento relativo más rápido fue observado en el grupo etario más joven. El incremento de las tasas de incidencia se ha observado en todos los centros participantes a excepción de Cataluña, donde se ha mantenido constante a lo largo de los 20 años de estudio (Green A 2001, Patterson CC 2009, Patterson CC 2012).

Ambos estudios, DiaMond y EURODIAB, usaron metodologías similares con la excepción de que DiaMond recogió los datos de forma retrospectiva en algunos países, lo cual podría dar lugar a una infraestimación de incidencias. Igualmente, la verificación de finalización fue más variada en el DiaMond (35-100%) con una tasa de finalización más baja en África, América Central y América del Sur; aun así muchos países europeos en DiaMond tuvieron una tasas de verificación similar al EURODIAB (en torno al 90%).

En la mayoría de registros se ha observado un aumento de incidencia de esta patología en las últimas décadas (DERI Study Group 1990, Nystrom L 1990, Rewers M 1987 y los ya comentados DiaMond y EURODIAB). En algunos registros, no se ha detecta un incremento estadísticamente significativo (Kostraba JN 1992, LaPorte RE 1981), probablemente por un inadecuado tamaño muestral. Es importante destacar que la mayoría de los datos epidemiológicos están basados en datos clínicos, pudiendo

aparecer sesgos, y además los estudios en edad pediátrica son pocos, por lo que los datos son limitados.

Otros autores argumentan que no se está produciendo un incremento en la prevalencia global de la enfermedad, sino una aceleración en el proceso de la enfermedad con debuts en edades más precoces y, por tanto, un aumento de la incidencia en jóvenes (Ehehalt S 2010).

EEUU se mantiene aparte de otras zonas del mundo reportando una incidencia estable desde 1970 a 1990 (Libman IM 2005). Si bien, el estudio multicéntrico para la investigación de la diabetes en jóvenes, Multicentre Search for Diabetes in Youth Study (SEARCH), publicó recientemente que la incidencia en el periodo 2002-2005 en jóvenes blancos no hispanos con edad ≤ 14 años fue de 27,5 c/10⁵h-a (Bell RA 2009), una tasa que supera la incidencia predicha para 2010 por datos previos del Allegheny County, Pennsylvania (Dokheel TM 1993). Además, en los datos del registro del estudio “Colorado Insulin-Dependent Diabetes Mellitus” y de SEARCH-Colorado, observamos que la incidencia de DM1 ha mostrado un incremento del 2,3% anual (IC 95%: 1,6-3,1%) en menores de 17 años a lo largo de las tres últimas décadas (Vehik K 2007).

Este patrón de incremento de incidencia en el grupo de menor edad se inició a mitad de 1990 (Cutfield WS 2008). Así lo podemos observar en un estudio austriaco, que no reportó cambios en incidencia en el periodo 1979-1994 pero sí un aumento del 9,2% anual entre 1995-2005 (Schober E 2008). Un patrón similar fue observado en Colorado, notificando una incidencia estable en 1978-1988 con un incremento del 60% en 2002-2004. Otro estudio en Francia mostró incidencias estables en 1988-1993, seguido de un rápido incremento en 1994-1997 (Charkaluk ML 2002).

En nuestro país el primer estudio epidemiológico de DM1 fue llevado a cabo por Serrano-Ríos en la Comunidad de Madrid, con los datos obtenidos a través de un registro estandarizado entre 1985 y 1988 (Serrano M 1990). Posteriormente Goday et al. iniciaron el Registro de Diabetes Mellitus de Cataluña entre 1987 y 1990 (Goday A 1992). En 1996 el Grupo de Trabajo de Epidemiología de la Sociedad Española de Diabetes publicó las recomendaciones metodológicas para la realización de estudios de incidencia de DM1 en España mediante registros estandarizados. Desde entonces se han realizado múltiples estudios epidemiológicos regionales de DM1 con amplia variabilidad geográfica con un rango que va desde los 11,5 c/10⁵h-a del Principado de Asturias hasta los 27,6 c/10⁵h-a de Castilla-La Mancha, sin cumplirse el gradiente “norte-sur” de incidencia de la enfermedad descrito previamente en Europa. De estos estudios se puede estimar una incidencia media anual para la población española de 17,69 c/10⁵h-a (Conde S 2014).

En nuestra región, se realizó un estudio en la provincia de Málaga publicando una incidencia media de 16,3 c/10⁵h-a (IC 95%: 15,1-17,4%) durante el periodo 1982-2000 (Lopez-Siguero JP 2002), con un incremento desde el periodo inicial (11,8 c/10⁵h-a) al periodo intermedio (16,85 c/10⁵h-a) y final del estudio (20,8 c/10⁵h-a). El incremento anual observado fue del 3,8% (IC 95%: 2,4-5,2%), similar a la media reportada por otros países europeos. El primer estudio realizado con datos de toda Andalucía, de tipo prospectivo basado en registros hospitalarios, comunicó para el periodo 2000-2009 una incidencia de DM1 en menores de 14 años de 20,76 c/10⁵h-a (0-4 años: 14,34 c/10⁵h-a; 5-9 años: 23,46 c/10⁵h-a; 10-14 años: 25,15 c/10⁵h-a) (Gómez-Gila AL 2011).

1.2. Factores de riesgo y desencadenantes

Hay muchas teorías sobre el aumento en las tasas de incidencia de DM1. En general, se asume que la etiología de la DM1 es un proceso multifactorial que ocurre en sujetos genéticamente predispuestos, con distintos desencadenantes ambientales (Knip M 2012). Pero a pesar de los múltiples estudios que se están realizando, no sabemos a qué se debe dicho aumento de incidencia.

1.2.1. Genética asociada a DM1

Se conocen factores de susceptibilidad genéticos relacionados con la región HLA (antígeno leucocitario humano), concretamente HLA de clase II (DR, DQ y DP) del complejo mayor de histocompatibilidad que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6. Los alelos que se asocian con mayor riesgo son: DQ β 1*0302 (ligado a DR4) y DQ β *0201 (ligado a DR3) (Winter W 2007, Winter W 2002). Aunque aproximadamente el 70% de los casos con DM1 presentan alelos de alto riesgo del HLA, sólo el 3-7% de los niños con dichos alelos desarrollan DM1 (Achenbach P 2005), lo que sugiere un componente no genético significativo. El riesgo de diabetes en familiares de casos afectos es mayor a la población general, como puede observarse en la tabla 1. En el caso de hermanos que comparten DR3-DQ2/DR4-DQ8 existe una susceptibilidad dependiente de la edad, con un riesgo 12 veces superior a la edad de 15 años si el caso índice lo desarrolla antes de los 10 años (Gillespie KM 2014).

Tabla 1. Riesgo de DM1 (adaptado de Winter W 2007)

Grupo de riesgo	Riesgo de DM1
Población general	1 /300-400
Familiar de primer grado con DM1	1/20
Hijo de madre afecta	1/50
Hijo de padre afecto	1/14
Tasas de concordancia:	
En gemelos monocigóticos	1/2-3 (30-50%)
En gemelos dicigóticos	1/10-16 (6-10%)
DR3/DR4 (+) en población general	1/40
Riesgo aleatorio en hermanos	1/20
HLA idéntico a un hermano afecto	1/7
Hermanos que comparten DR3/DR4 con hermano afecto	¼

Del mismo modo, hay alelos protectores frente a la DM1 (HLA-DR2, HLA-DR5, and HLA-DQB1*0602) (Maclaren N 1988). Sólo 1 de cada 15000 personas con HLA-DQB1*0602 desarrolla DM1 (Greenbaum CJ 2000). Sin embargo, en la pasada década el aumento ha sido demasiado rápido para ser atribuido exclusivamente a un aumento en la susceptibilidad genética (Pitkaniemi J 2004). Recientes estudios en Australia, Europa y EEUU han mostrado que la mayoría de individuos de reciente diagnóstico de DM1 tienen un HLA de riesgo moderado (DR3/3 y DR4/4), sin aumentar el número de individuos con HLA de alto riesgo (DR3/4) (Vehik K 2008, Fourlanos S 2008, Kontiainen S 1988, Vehik K 2011).

A través de Genoma Wide Association se han detectado 50 genes o loci no asociados a HLA con riesgo de DM1. Se destacan entre estos polimorfismos no HLA los siguientes: PTPN22, CTLA4, IL2RA, INS, ERBB3, ORMDL3, BACH2, IL27, GLIS3 y RNLS (Lempainen J 2015, Maziarz M 2015). La contribución genética no dependiente de HLA tiene un papel en la regulación inmune. Al ver su expresión en los

islotes pancreáticos se piensa que pueda tener un papel activo en la célula β . PTPN22, CTLA4 e IL2RA se asocian con una mayor susceptibilidad a otros trastornos autoinmunes.

Parece que la genética dependiente de HLA tiene un efecto limitado en la progresión desde la autoinmunidad al estadio sintomático, al contrario que la susceptibilidad genética no dependiente de HLA, que parece tener influencia en la progresión de la enfermedad.

1.2.2. Factores ambientales asociados a DM1

La influencia del medio ambiente es clara (Zipris D 2009) como podemos ver por la alta variabilidad geográfica, la discordancia entre gemelos (Akerblom HK 1998) o el cambio de incidencia en hijos de inmigrantes similar al del nuevo país de residencia (Delli AJ 2010). Los estudios epidemiológicos han sugerido múltiples factores de riesgo como:

- Factores dietéticos: corta duración de lactancia materna (Sadauskaite-Kuehne V 2004, Holmberg H 2007), introducción temprana de leche de vaca (Hamalainen AM 2000, Sadeharju K 2003, Knip M 2010, Lamb MM 2015) o gluten (Schmid S 2004, Beyerlein A 2014, Antvorskov JC 2014), introducción tardía de la alimentación complementaria, especialmente si ya se ha retirado la lactancia materna (Frederiksen B 2013)...
- Peso elevado y crecimiento acelerado (Hypponen E 2000, Dahlquist G 2006, Harder T 2009, Cardwell CR 2010, Magnus MC 2015).

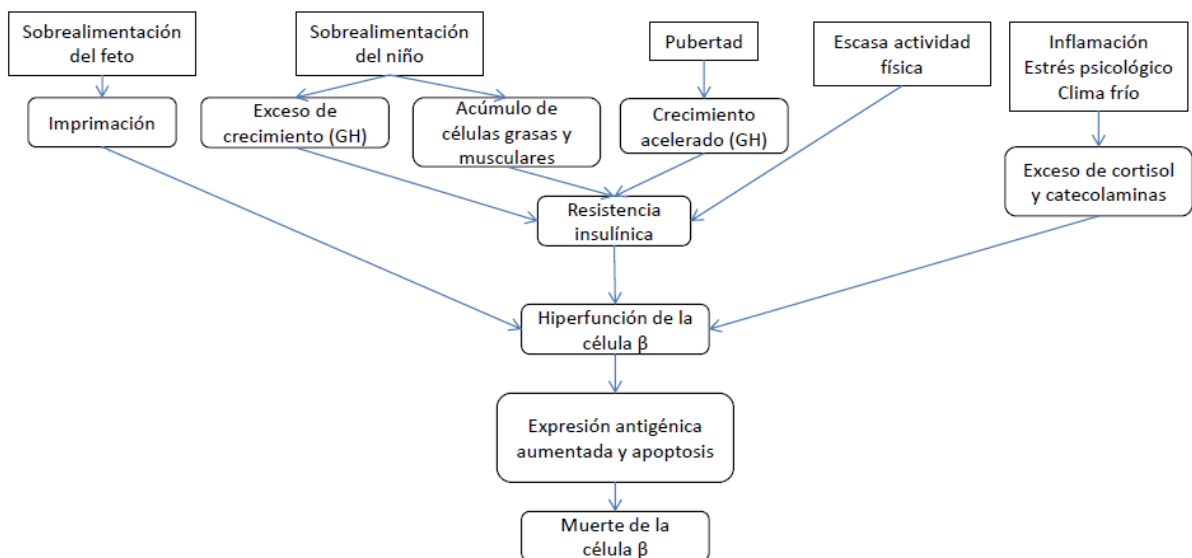
- Estación de nacimiento (Padaiga Z 1999). Puede estar relacionado con la exposición al sol y la producción de vitamina D (Weets I 2004, Sorensen IM 2012, Mathieu C 2015), la cual tiene una relación aún no confirmada con la patogenia de la DM1
- Distribución geográfica
- Toxinas: elevadas concentraciones de nitratos, nitritos y nitrosaminas tanto en alimentos como en el agua (Dahlquist GG 1990, Akerblom HK 1998, Benson VS 2010).
- Estrés (Thernlund GM 1995, Sepa A 2005, Nygren M 2015)
- Infecciones por virus: enterovirus (Stene LC 2012, Craig ME 2013), virus de Epstein-Barr (Bian X 2016), rotavirus (Blomquist M 2002), infecciones respiratorias en los primeros 6 meses de vida (Rasmussen T 2011, Beyerlein A 2014)

La mayoría de los estudios que se han realizado para identificar estos factores de riesgo han hallado conclusiones controvertidas. Uno de los posibles antígenos exógenos que podría desencadenar la autoinmunidad pancreática es la insulina bovina presente en las fórmulas de leche de vaca. Tras la introducción de estas fórmulas en la alimentación de los lactantes, se observa un aumento de IgG frente a insulina bovina, que disminuye a partir del primer año de vida por un mecanismo de tolerancia oral. Se ha observado que en los niños que desarrollan autoinmunidad temprana frente a la célula β , esta IgG frente a insulina bovina no desciende, como si presentasen una incapacidad para desarrollar tolerancia oral a dicha insulina (Vaarala O 1999). Por lo que la respuesta inmune inicial a la insulina bovina, puede desviarse posteriormente a una respuesta frente a la insulina humana en estos individuos. Un estudio en Finlandia administró

fórmula libre de insulina durante 6 meses a los niños genéticamente predispuestos a DM1 y los siguió hasta los 3 años, encontrando una reducción de incidencia del 60% de autoinmunidad pancreática en comparación con los niños alimentados con fórmula habitual (Vaarala O 2012).

La teoría de la Sobrecarga (FIG2) sostiene un mayor riesgo de DM1 debido al sobrepeso, el mayor crecimiento estatural, la inactividad física y el estrés (Dahlquist G 2006). El estrés de la célula β se debería a un aumento en la demanda de insulina, ya fuera por estos factores así como por la pubertad, traumatismos, infecciones, y excesiva ingesta de glucosa (Ludvigsson J 2006). Así el incremento en la incidencia en los últimos años estaría relacionado con las múltiples modificaciones en los hábitos de vida y factores ambientales (cambios en la dieta, sobrealimentación, patrones de actividad física, infecciones en etapas precoces, cambios climáticos, vacunación, uso de fármacos) que se están produciendo en el último siglo.

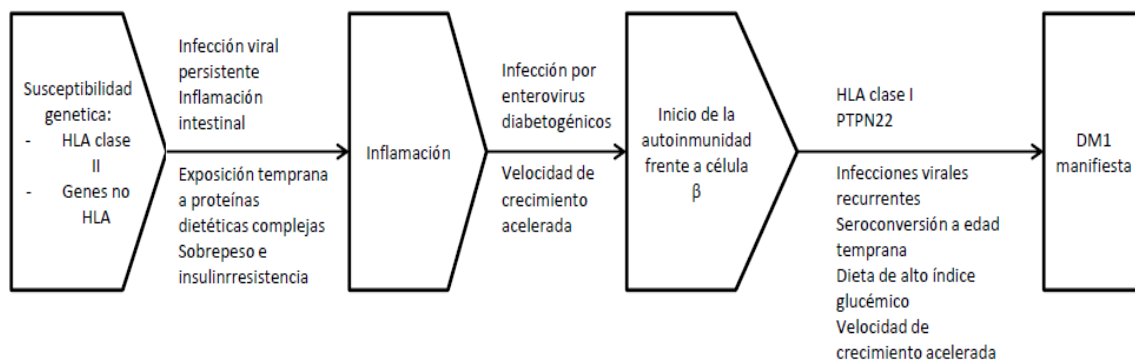
FIG2. Factores aceleradores de la destrucción de la célula β : La teoría de la Sobrecarga (adaptado de Dahlquist G 2006)



1.2.3. Seroconversión

Estudios metabolómicos recientes han mostrado que la seroconversión va precedida por inflamación (Oresic M 2008, FIG3). Los factores que inducen ese estado proinflamatorio no están bien definidos pudiendo ser una infección crónica viral en los islotes pancreáticos, factores dietéticos y la inflamación intestinal debida a cambios en la microbiota, de forma aislada o en combinación los que contribuyan a este proceso.

FIG3. Progresión desde la susceptibilidad genética hasta la DM1 manifiesta (adaptado de Pflueger M 2011)



La autoinmunidad pancreática puede aparecer en las primeras etapas de la vida y es predictor del desarrollo posterior de DM1, presentando un 90-95% de los pacientes con nuevo diagnóstico de DM1 al menos un autoanticuerpo positivo (Ziegler AG 1999, Hummel M 2004, Barker JM 2004, Jahromi MM 2007). Los autoanticuerpos asociados con la DM1 incluyen: anticuerpos frente a los islotes (ICA), anticuerpos frente a insulina (IAA), anticuerpos frente a la isoforma de 65 kDa del ácido glutámico decarboxilasa (GADA) y anticuerpos frente a la proteína 2 asociada a insulinoma (IA-2A) siendo su presencia altamente predictiva de riesgo de DM1 (Atkinson MA 1990, Decochez K 2000, Winter W 2011). Los anticuerpos frente al transportador de zinc ZnT8 (ZnT8A), una proteína transmembrana que concentra el zinc en los gránulos secretores de insulina, están presentes en un 60%-80% de los pacientes con DM1 al

debut, sin elevarse en controles sanos ni en Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Se hallaron ZnT8A en un 26% de los pacientes con DM1 con negatividad para el resto de anticuerpos comentados (Chimienti F 2004), de manera que la medición combinada de ZnT8A, GADA, IA2A, and IAA eleva la tasa de detección de autoinmunidad a un 98% en el debut (Wenzlau JM 2007). Igualmente, la presencia de varios autoanticuerpos en un paciente es más predictora de riesgo de DM1 que un título elevado de uno de ellos aislado o que una combinación específica de ellos (Orban T 2009).

Se ha observado que un 4% de los hijos de padres con DM1 en el estudio BABYDIAB y sobre el 6% de los niños con riesgo genético en la población general en el estudio finlandés de predicción y prevención de diabetes (DIPP) desarrollan autoanticuerpos frente a islotes antes de los dos años de vida (Hummel M 2004), presentando más riesgo de positivizar otros autoanticuerpos pancreáticos y de, finalmente, desarrollar DM1 (Kimpimaki T 2002). Los estudios DIPP, BABYDIAB y TEDDY (Giongo A 2010, Ziegler AG 2012, Uusitalo U 2016) detectan anticuerpos anti-islote después de los 6 meses con un pico a los 9-24 meses (media: 15 meses). En la mayoría de los casos se desarrollaron anticuerpos anti-insulina antes que anticuerpos anti-GAD65. Mientras que los anti-IA2 y ZnT8 raramente aparecieron como primer anticuerpo. La progresión de uno a dos o más anticuerpos ocurre más frecuentemente en niños menores de 5 años, generalmente a los 2 años de la seroconversión inicial. Esta seroconversión es menos frecuente a los 4 años de la seroconversión inicial.

El hecho que la autoinmunidad pueda aparecer en los 2 primeros años de vida, permaneciendo un tiempo variable hasta el debut clínico, provee una fuerte evidencia de que los factores que influyen en etapas precoces podrían jugar un importante papel en el inicio del trastorno.

Es importante diferenciar si los anticuerpos que aparecen en el lactante son endógenos o bien son transmitidos de la madre. Dependiendo de los títulos de anticuerpos en la madre, los anti-insulina pueden permanecer en la circulación del niño hasta el año de vida y los GADA maternos hasta los 18 meses (Naserke HE 2001, Hamalainen AM 2000). En modelos animales se ha observado un mayor riesgo de desarrollar DM1 en hijos de madres con DM1 que han pasado los autoanticuerpos a través de la placenta. Sin embargo, los hallazgos en humanos sugieren que la exposición fetal a GADA y/o IA-2A puede protegerlos de la autoinmunidad endógena futura y la DM1 (Koczwara K 2004). En concordancia con esto, observamos un riesgo global disminuido de autoinmunidad pancreática y DM1 en hijos de madres con DM1 en comparación con hijos de padres con DM1 y madres no diabéticas (Warram JH 1984, Pociot F 1993). Los datos del estudio Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY) fueron consistentes con los hallazgos del estudio BABYDIAB en que la presencia de autoinmunidad pancreática en la sangre del cordón, no era predictora del desarrollo posterior de autoinmunidad en niños con genotipos HLA de alto riesgo (Stanley HM 2004).

1.2.4. Relación de HLA, seroconversión y progresión de enfermedad

La seroconversión es más frecuente con HLA de alto riesgo DR3/4-DQ8 o DR4/4-DQ8/8. Los resultados del estudio TEDDY evidenciaron que la detección de dos o más anticuerpos incrementa la frecuencia de progresión a DM1 sintomática.

Los estudios de cohortes (DAISY, DIPP, BABYDIET y TEDDY) sugieren que el proceso de enfermedad empieza en épocas muy precoces de la vida. TRIALNET

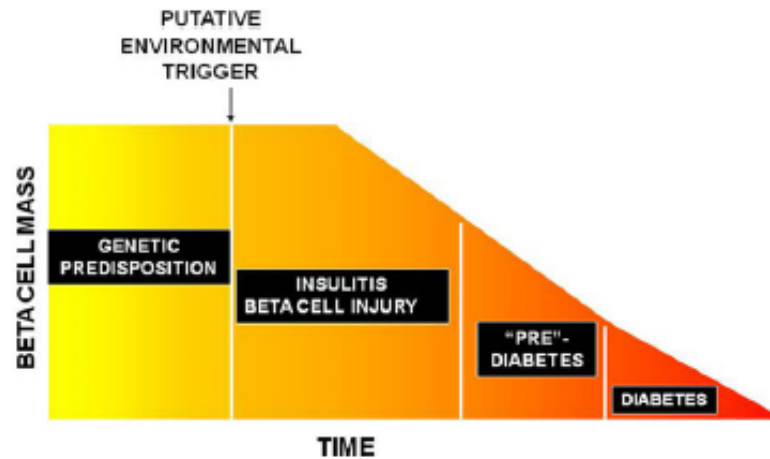
encontró que la edad de aparición de anticuerpos es el factor más importante asociado con la mayor tasa de progresión a enfermedad (Sosenko JM 2013).

1.3. Patogenia de la DM1

La patogenia de esta enfermedad es multifactorial y los mecanismos no son completamente conocidos. Las formas de presentación clínicas son variables, así como su pronóstico (Mayer-Davis EJ 2009). Durante muchos años se ha considerado una enfermedad autoinmune clásica en la que las células T autorreactivas escapaban de la selección negativa y destruían las células β pancreáticas. Actualmente sabemos que es una enfermedad compleja en la que intervienen muchos elementos inmunes y no inmunes, muchos de los cuales, aún desconocemos.

En 1986, George S. Eisenbarth (Eisenbarth GS 1986) propuso seis etapas en la patogenia de la DM1 acordes a la destrucción de células β : 1) susceptibilidad genética, 2) evento desencadenante, 3) autoinmunidad activa, 4) anomalías inmunes acompañadas por pérdida de secreción de insulina estimulada por glucosa, 5) diabetes manifiesta con pocas células β remanentes, 6) pérdida completa de células β . Este modelo de pérdida lineal de células β fue aceptado por muchos años (FIG4). Posteriormente, se han propuesto otros modelos para representar la pérdida de masa celular β . Entre ellos está la hipótesis de “recaída-remisión” que propone una fluctuación en la masa celular β como consecuencia de diferentes oleadas de destrucción de dichas células, en una compleja batalla entre elementos reguladores, células autorreactivas, células β supervivientes y sus sistemas de retroalimentación (von Herrath M 2007).

FIG4. Historia natural de la DM1 (tomado de Winter W 2007)



Un estudio reciente (Herold KC 2015) mostró la presencia de niveles elevados de ADN no metilado de la pre-proinsulina (*INS*) y su correlación con la muerte de células β en una cohorte de pacientes de riesgo. La muerte de células β comienza mucho antes del debut diabético, pero curiosamente el aumento de dicha muerte es sutil y esporádico antes del diagnóstico, con sólo una repercusión media en la secreción de insulina. Sin embargo, un marcado aumento de *INS* no metilado se observa cercano al momento del diagnóstico, disminuyendo después del desarrollo de hiperglucemia. Este hecho sugeriría que ambos, la hipótesis de recaída-remisión y el modelo lineal, pueden ser aplicados a los periodos de prediabetes y peri-diagnóstico, respectivamente, con pequeñas ondas cíclicas de destrucción de células β seguidas de una disminución brusca de la masa celular β en el diagnóstico. En concordancia, una publicación reciente (Fisher MM 2015) ha revelado un aumento en la muerte de células β al debut, que disminuye a las 8 semanas post-diagnóstico. Similar a las enfermedades crónicas, donde la exposición persistente al antígeno está asociada al agotamiento de las células T CD8+ y al fallo en la eliminación del virus (Wherry EJ 2011), en las enfermedades autoinmunes, y en la DM1 en particular, se observa un agotamiento de las células T CD8+. Tras un tiempo, el sistema inmune puede revertirlo, produciendo de nuevo

células T CD8+ autorreactivas capaces de continuar su ataque a las células β (McKinney EF 2015). Este mecanismo podría explicar en parte la dinámica de recaída-remisión de estas enfermedades.

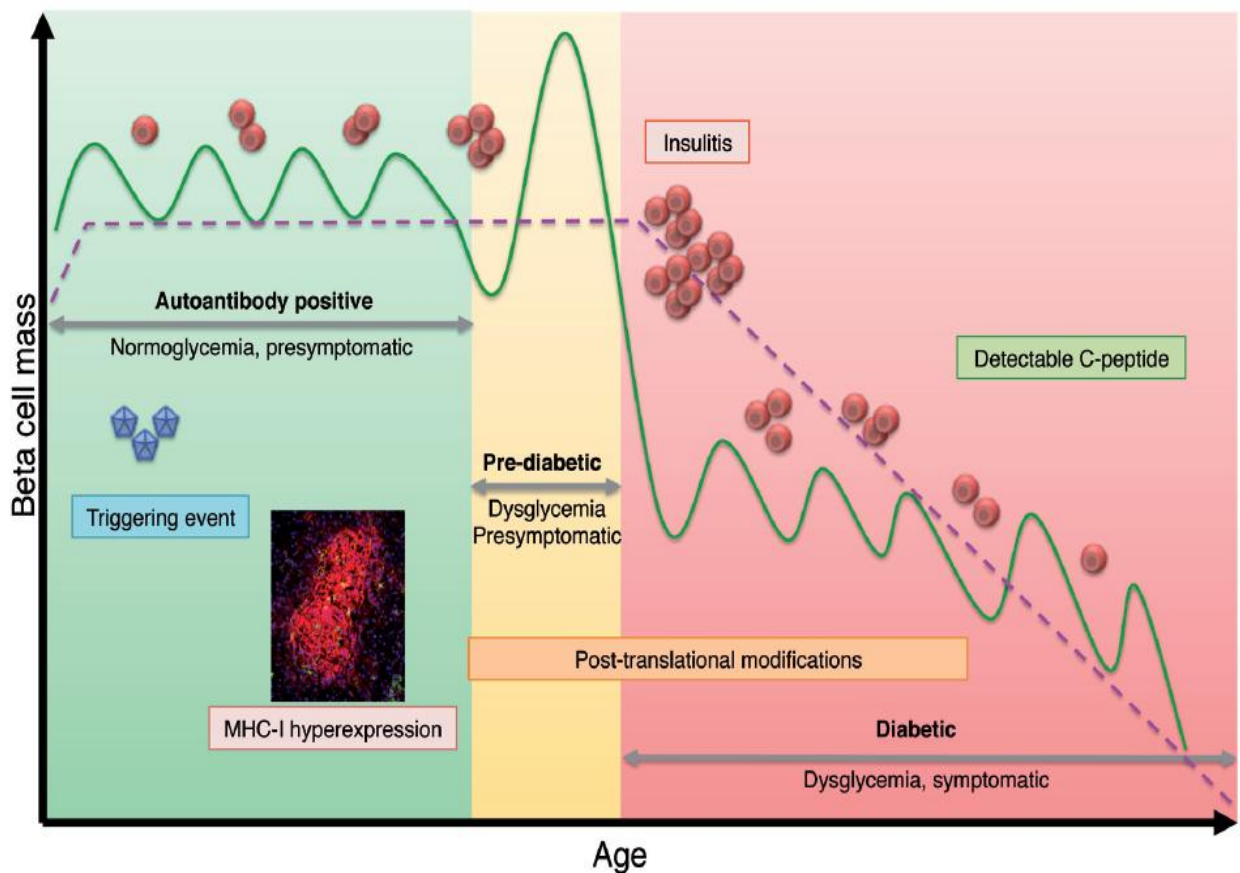
Recientemente, el Juvenile Diabetes Research Foundation, la Endocrine Society y la American Diabetes Association han sugerido la adopción de un nuevo sistema de clasificación de las etapas de la DM1 (Insel RA 2015), en la que se incluyen aspectos clínicos de la progresión de la enfermedad. Dividen la enfermedad en tres fases: 1) autoinmunidad y/o normoglicemia o DM1 presintomática; 2) autoinmunidad y/o disglucemia o DM1 presintomática; 3) autoinmunidad y/o disglucemia o DM1 sintomática. En estas etapas hay una progresión variable desde la autoinmunidad contra la célula β pancreática hacia la intolerancia a la glucosa y la etapa sintomática.

Oram et al mostró que el 80% de los pacientes con DM1 tienen péptido C detectable al menos 5 años tras el diagnóstico, lo que sustenta la idea de que permanezca un número desconocido de células β en el páncreas (Oram RA 2015). En concordancia, no se detectan cambios en el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) hasta 0.8 años antes del diagnóstico, seguido de un rápido descenso en la respuesta al TTOG tras el diagnóstico (Sosenko JM 2008).

Con todos estos avances, el escenario que nos encontramos es el representado en la FIG5 (Christoffersson G 2016): Individuos genéticamente predispuestos son expuestos a un evento desencadenante, que induce inflamación. Aparecen autoanticuerpos frente a los islotes, manteniéndose aún niveles de glucemia normales. Las células T autorreactivas infiltran islotes, causando ondas de muerte celular β , causando fluctuaciones en la masa celular β . Cuando el ritmo de destrucción es mayor que la compensación endógena, se inicia la fase de prediabetes, en la cual, aparece

alteración de la glucemia por incapacidad de las células β remanentes de producir suficiente insulina. Al diagnóstico, hay gran infiltración y la insulitis se hace más aparente. Al principio de la fase diabética, el péptido C puede ser aún detectable. Según va disminuyendo la masa celular β , disminuye también la inflamación y la infiltración. Por lo tanto, las fluctuaciones en la masa celular β a lo largo de los años, producen un continuo fenotipo de “recaída-remisión” con una caída más abrupta en torno al tiempo del diagnóstico, cuando se alcanza una masa celular β crítica. Hay gran variabilidad en la masa de células β remanente en páncreas de pacientes con DM1, siendo distinto el ritmo de destrucción en cada individuo.

FIG5. Escenario de la DM1 en la actualidad (tomado de Christoffersson G 2016).



El desarrollo de la enfermedad tiene un control poligénico complejo donde la mayor contribución corre a cargo del HLA y el CMH (complejo mayor de histocompatibilidad), aunque ya se conocen otras vías inmunológicas como la Il-2 (Lee KH 2001). La afectación de la insulinitis tiene una distribución heterogénea en muestras de páncreas de pacientes con DM1, al igual que la hiperexpresión de CMH-I.

Además de en muestras de páncreas, se ha estudiado el proceso en modelos animales para intentar comprender más la etiopatogenia de esta enfermedad. El modelo en ratones diabéticos no obesos (NOD) de líneas transgénicas de receptores de células T (TCR) (Verdaguer J 1996), desarrollados a finales de 1970, son el modelo animal más frecuentemente usado en DM1. En ellos se ha observado como las células T tienen un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad, no produciéndose DM1 en ratones NOD atímicos, con linfopenia T o timectomizados al nacimiento. Las células T CD4+ son las invasoras dominantes en los islotes con un papel importante en la progresión (Round JL 2010), mientras que los CD8+ son requeridos para iniciar la insulinitis y la destrucción de células β , y el interferón γ producido por las células T helpers 1 (Th1) es también un efector crucial. Las células CD8+ pueden destruir células β por la expresión de perforina. La presencia de citoquinas proinflamatorias induce daño a las células β y moléculas de la familia TNF inducen apoptosis (Thomas HE 2009).

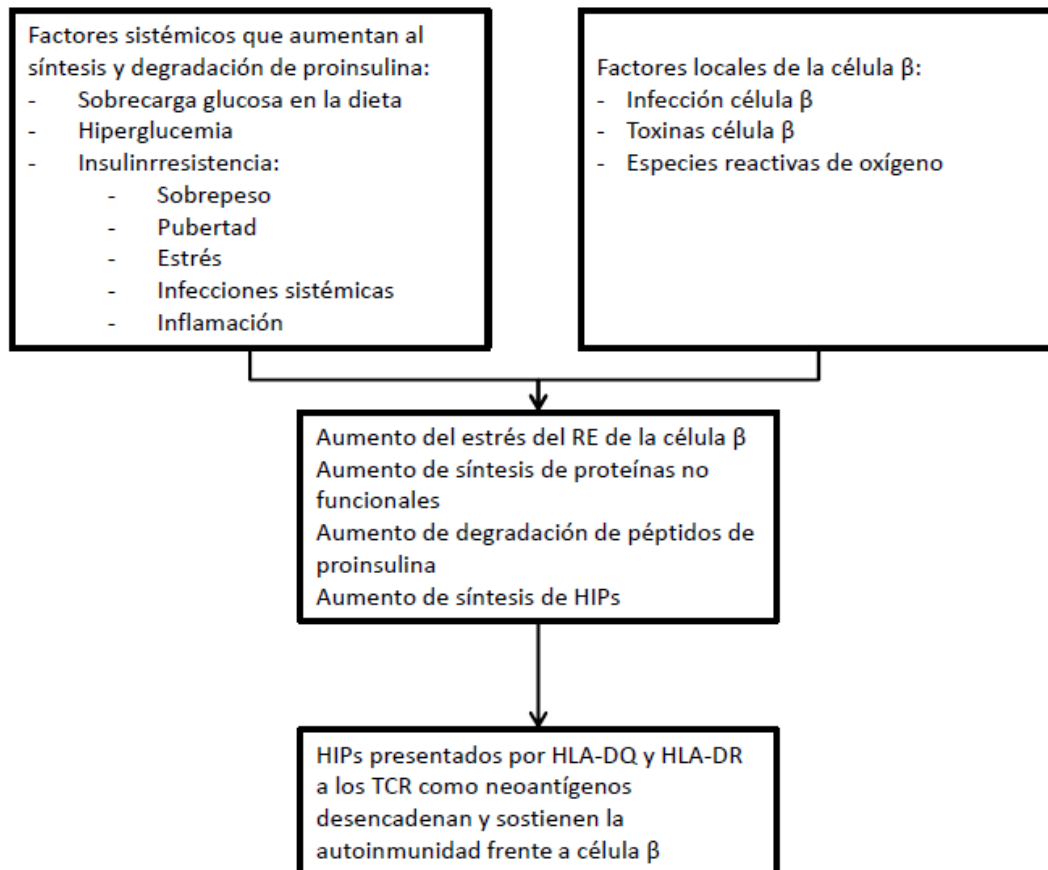
Estudios en humanos han mostrado también la implicación del sistema inmune en la destrucción de las células β pancreáticas. El interferón producido en las respuestas inflamatoria e infecciosa acelera la destrucción de las células β pancreáticas al inducir la expresión de moléculas de clase I del CMH (Seewaldt S 2000). Una mayor expresión de epítopos de clase I del CMH (Foulis AK 1987) y células T CD8+ (Itoh N 1993) se han observado en páncreas de individuos con DM1.

En los islotes analizados en las muestras de páncreas, hay células T CD8+ autorreactivas, pero la mayoría no son específicas frente a islotes, siendo la proporción de células específicas del 1% (Oldstone MB 2012). Esto puede deberse a que también participa el sistema inmune innato y la inflamación inespecífica, así como a que no conocemos todos los autoantígenos. La tolerancia central (en timo y médula ósea) no tiene en cuenta las modificaciones post-traduccionales (PTMs) que pueden ocurrir a lo largo de la vida y que pueden tener impacto en la afinidad CMH-péptido y/o CMH-péptido-TCR. Estas PTMs pueden causar modificaciones en la estructura proteica o en su función biológica o causar la degradación de la misma. Las PTMs pueden producirse por actuación de enzimas o bien ocurrir espontáneamente. La actividad de dichas enzimas puede verse aumentada por el estrés del retículo endoplásmico (RE) o por desencadenantes ambientales tales como infecciones. El papel de las PTMs ya ha sido descrito en otras enfermedades autoinmunes como celiaquía, esclerosis múltiple, artritis reumatoide... (Doyle HA 2014) pero hasta recientemente no se han estudiado en relación con DM1 (McGinty JW 2014, van Lummel M 2016, Jin N 2015, DeLong T 2016).

La alta tasa metabólica de las células β les hace más susceptibles a presentar estrés del RE. Esto junto a la inflamación de islotes en DM1 lleva a una alta probabilidad de PTMs, como los llamados péptidos híbridos de insulina. Por tanto, las PTMs de antígenos de los islotes pancreáticos pueden ser un factor principal en la progresión no lineal de la DM1, así como la propagación de la inflamación y el estrés celular pueden llevar a la génesis de neo-antígenos, que en último punto, aumentarían la tasa de destrucción de células β (Cnop M 2012), como se indica en la FIG6.

FIG6. Modelo de la relación entre los factores ambientales, el estrés del retículo endoplásmico, generación de nuevos autoantígenos y pérdida de la tolerancia que desencadena la autoinmunidad.

HIP = péptidos híbridos de insulina. (adaptado de Rewers M 2016)



Todo esto apunta también a la importancia de los factores ambientales en la etiopatogenia de esta enfermedad. Recientemente, se ha descrito un trío de factores asociados con su desarrollo como son: la alteración de la respuesta inmune, la función de la barrera mucosa intestinal, y la microbiota intestinal (Vaarala O 2008).

1.4. Tratamiento de la DM1

El tratamiento actual de estos pacientes se basa en el reemplazo con insulina exógena del déficit de producción por parte del páncreas (Nathan DM 2005, ADA 2016). El objetivo del tratamiento intensivo es imitar, en la medida de lo posible, la secreción fisiológica de insulina por el páncreas, con el fin de evitar o retrasar la aparición de complicaciones agudas y crónicas de la enfermedad, sin que ello suponga un aumento del riesgo de hipoglucemia. Para este fin se pueden iniciar dos pautas:

- Régimen de múltiples inyecciones diarias (MDI): se administra insulina rápida antes de cada comida, junto a una o más administraciones de insulina de acción larga o intermedia.
- Sistema de infusión continua de insulina (ISCI): con el apoyo de tecnología avanzada, mediante bombas de infusión programables, conectadas a un reservorio de insulina, se administra insulina de acción rápida de forma continua en el plano subcutáneo.

A este tratamiento farmacológico, se le asocian medidas higiénico-dietéticas (ADA 2016): dieta equilibrada con control de la cantidad de hidratos de carbono de absorción lenta y exenta de hidratos de carbono de acción rápida, y ejercicio aeróbico diario.

Hay una gran investigación en este campo, para mejorar la importante morbilidad asociada a esta enfermedad. Una rama de esta investigación está orientada a mejorar la calidad de vida de estos pacientes, con gran apoyo de la tecnología, avanzando en los dispositivos de infusión, así como en el uso de sensores continuos de glucemia y la integración de ambos, que pueda hacer posible la creación del páncreas

artificial (Taleb N 2016, Thabit H 2016). Otra rama está más dedicada al enlentecimiento de la progresión de la enfermedad o a la curación, basándose en la etiopatogenia (Rigby MR 2014), como puede ser la modificación de los factores de riesgo, el uso de probióticos, el uso de inmunosupresores, la búsqueda de dianas moleculares para frenar la autoinmunidad específica, o incluso el trasplante de islotes pancreáticos (Bellin MD 2015). Pero aún hay poca aplicabilidad clínica de toda esta investigación.

2. DIABETES TIPO MODY 2

Por otra parte, la diabetes tipo MODY (Maturity-Onset Diabetes of Youth) es, tras la DM1, el tipo de diabetes más frecuente en la infancia que no suele asociarse con obesidad o sobrepeso (Rubio Cabezas O 2008, Tinto N 2008, Lorini R 2009). Este tipo de diabetes es una enfermedad monogénica, es decir, una sola mutación en heterocigosis en un único gen es suficiente para que la enfermedad se exprese, sin depender de condicionantes ambientales.

MODY se define como una diabetes monogénica, con herencia autosómica dominante (Siddiqui K 2015), inicio juvenil (antes de los 25 años de edad), disfunción de la célula β pancreática, en ausencia de autoinmunidad frente a la célula β y sin signos de insulínresistencia (Oliveira CSV 2002, Fajans SS 2001, ADA 2016). Actualmente, hay una tendencia a cambiar el término MODY por “Diabetes monogénica” (Murphy R 2008).

2.1. Epidemiología de la Diabetes MODY

La prevalencia real de MODY es desconocida en la mayoría de las poblaciones, probablemente porque su fenotipo se superpone con las formas clásicas de diabetes. Se estima que es responsable de aproximadamente el 2-5% de todos los casos de DM (Ledermann HM 1995, Velho G 1998, Lindner T 1999, Eide SA 2008, Ellard S 2008, Incani M 2010, Galler A 2010), incluyendo alguna proporción de pacientes inicialmente clasificados como DM1 (Moller AM 1998, Lambert AP 2003).

Varios estudios indican que sólo una pequeña proporción de MODY es correctamente identificada. Por ejemplo, en Reino Unido sólo un 5-20% de los pacientes que teóricamente están afectados de MODY se prevé que estén correctamente diagnosticados (Shields BM 2012).

Las características clínicas de los distintos subtipos de MODY varían, y oscilan entre cuadros de hiperglucemias permanentes, pero leves o moderadas y con buen pronóstico clínico (MODY 2), y cuadros con hiperglucemias mantenidas que se acompañan, si existe un mal control glucémico, de complicaciones crónicas graves y precoces (Fajans SS 2001). En general, MODY 2 representa del 30 al 63% de los casos y MODY 3 del 21 al 64% de los casos (Moises RS 2001, Frayling TM 2001, Doria A 1999, Costa A 2000, Frayling TM 1997, Massa O 2001, Chevre JC 1998, Feigerlova E 2006, Lorini R 2009, Tinto N 2008, Shields BM 2010). Los otros tipos de MODY son formas más raras.

Los subtipos 1, 3, 4, 5 y 6 afectan a genes que codifican a factores nucleares de transcripción implicados en el desarrollo y la función del páncreas. En el caso de los tipos 1 y 3, se presentan hiperglucemias mantenidas que progresan desde formas leves a graves, requiriendo insulina un tercio de ellos y tienen más predisposición al desarrollo

de complicaciones vasculares (Fajans SS 2001). Las características específicas de cada tipo se pueden ver en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los tipos de MODY (adaptado de Giuffrida AB 2005)

Tipo	Gen	Edad diagnóstico	Otras alteraciones	Tratamiento	Complicac microvasc.
MODY1	HNF-4 α	Madurez temprana	↓ Triglicéridos	Dieta → →sulfonilureas → →insulina	Frecuentes
MODY2	GCK	Recién nacido/adolescente	↓ Triglicéridos	Dieta + ejercicio. Insulina en embarazo	Raras
MODY3	HNF-1 α	Adolescente	↓ Umbral renal glucosa ↑ HDL colesterol	Dieta → →sulfonilureas → →insulina	Frecuentes
MODY4	PDX1	- Recién nacidos (homocigotos) - Adultos jóvenes (heterocigotos)	Agenesia pancreática	Insulina 30% ADO → →insulina	Pocos datos
MODY5	HNF-1 β	Recién nacido/adolescente	- Enfermedad renal - Anomalías genitales - Atrofia pancreática y disfunción exocrina - Disfunción hepática - Disfunción biliar	ADO + insulina	Pocos datos
MODY6	NEUROD1	Adultos jóvenes		Insulina	Pocos datos
MODY7	KLF11	Adultos jóvenes		Pocos datos	Pocos datos
MODY8	CELL	Adultos jóvenes		Pocos datos	Pocos datos
MODY9	PAX4	Adultos jóvenes		Pocos datos	Pocos datos
MODY10	INS			Pocos datos	Pocos datos

2.2. Patogenia de MODY2

El gen que codifica la enzima Glucokinasa (GCK) está localizado en el brazo corto del cromosoma 7. Es una enzima del tipo hexoquinasa, que se expresa principalmente en las células β -pancreáticas y el hígado. Su función es catalizar la fosforilación de la glucosa en glucosa-6-fosfato (Ellard S 2008), el cual es el primer paso en el metabolismo de la glucosa. Así la GCK actúa como sensor de la célula β -pancreática, desencadenando la secreción de insulina ante las elevaciones de glucemia (Hattersley AT 1992, Froguel P 1993, Matschinsky FM 1996, Matschinsky FM 2002).

Por tanto, los pacientes con este tipo de diabetes tienen alterado el umbral para la liberación de insulina, por lo que no liberan insulina hasta niveles elevados de glucosa, generalmente por encima de 100 mg/dl (Nyunt O 2009).

Esta sensibilidad disminuida de la célula β -pancreática a la glucosa (Coperman JB 1995, Matschinsky FM 1996, Capuano M 2012) causa un cambio en la relación dosis-respuesta entre la glucemia y la secreción de insulina. Como consecuencia, la insulina secretada en respuesta a una cantidad determinada de glucosa es un 60% menos de media que en células β normalmente funcionantes (Vaxillaire M 1999). Estos pacientes suelen presentar respuesta insulínica normal ante la administración de glucosa intravenosa, siempre que la glucemia se mantenga por encima de 126 mg/dl. Hay mutaciones que deberían llevar a una disminución grave de la secreción de insulina, que en la práctica no es tan importante, lo que sugiere la presencia de mecanismos compensatorios que aumentan la respuesta insulínica (Byrne MM 1994, Sturis J 1994, Velho G 1996, Giuffrida AB 2005). La secreción de insulina permanece regulada y, generalmente, la primera fase de la secreción de insulina en respuesta a glucosa y arginina está preservada (Vaxillaire M 1999).

Las anomalías de esta enzima en las células hepáticas conllevan reducción de la síntesis hepática de glucógeno y aumento de la producción hepática de glucosa, lo que también favorece la hiperglucemia en pacientes con MODY2 (Velho G 1996).

MODY 2 tiene una penetrancia completa y escasa variación clínica (Giuffrida AB 2013), con hiperglucemia en ayunas estable desde el nacimiento (Ellard S 2008) y en la mayoría de pacientes, intolerancia leve a los hidratos de carbono. Varios estudios muestran que una proporción considerable de MODY2 presentan una glucemia normal 2 horas después de una sobrecarga oral de glucosa (Massa O 2001, Stride A 2002,

Pinelli M 2013). Por eso, las guías incluyen el HbA1c como marcador diagnóstico, aunque aún no hay consenso sobre el valor límite, siendo el valor de 6% el que se corresponde con prediabetes (The International Expert Committee 2009), y siendo discutido su uso en niños (ADA 2016).

Debido a la hiperglucemia relativamente baja, MODY2 raramente causa clínica y es un diagnóstico casual en la mayoría de los casos (Gloyn AL 2003, Stride A 2002). Generalmente, la tolerancia a la glucosa se mantiene estable a lo largo de la vida (Martin D 2008). Sin embargo, si se desarrolla insulinresistencia, el defecto de la célula β puede impedir una elevación compensatoria de la secreción de insulina, resultando en el empeoramiento de la tolerancia a la glucosa (Clement K 1996).

Hay una menor prevalencia de complicaciones microvasculares que en otros tipos de diabetes (Ryffel GU 2001, Stride A 2002, Velho G 1997), así como de enfermedad macrovascular ya que los factores de riesgo clásicos (incluyendo hipertensión, obesidad y dislipemia) son raros en MODY2 (Velho G 1997, Hattersley AT 2000, Schober E 2009), aunque deberían ser cuidadosamente monitorizados y tratados cuando sea necesario conforme a las guías ADA (Silverstein J 2005).

2.3. Diagnóstico de MODY 2

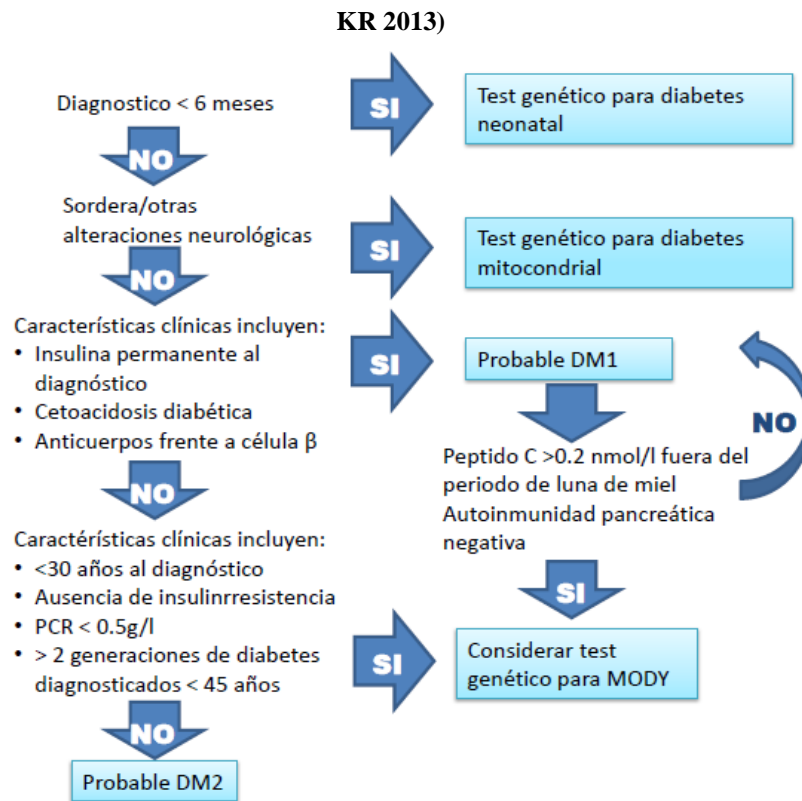
Para su diagnóstico se necesita un alto índice de sospecha, y resulta fundamental tener en cuenta la historia familiar, la edad de aparición, el grado de hiperglucemia y la ausencia de autoanticuerpos pancreáticos (Tapia Ceballos L 2008). Los criterios estrictos para el diagnóstico incluyen diabetes en al menos tres generaciones, con herencia AD y diagnóstico en al menos uno de los afectos antes de los 25 años. Las mutaciones de novo son raras, y por tanto, por definición, la ausencia de historia

familiar sugestiva de herencia AD hace el diagnóstico de MODY insostenible, si bien hay que tener en cuenta que los familiares pueden no haber sido diagnosticados aún.

Sin embargo, MODY debe también sospecharse en casos de diabetes inusual, siendo difícil en ocasiones diferenciar una diabetes monogénica de una clásica (Hattersley AT 2006, Murphy R 2008, Stride A 2002, Feigerlova E 2006, Nyunt O 2009), teniendo que investigar autoinmunidad e insulinresistencia para poder diferenciarlas. También se puede analizar la producción de insulina mediante la determinación de péptido C simultánea a la de glucemia para demostrar que ésta es lo suficientemente alta para provocar la secreción endógena de insulina. Los casos con péptido C positivo y negatividad de los autoanticuerpos son muy sugerentes de MODY en comparación con DM1 (Besser RE 2011, McDonald TJ 2011). También debe pensarse en este diagnóstico en mujeres diagnosticadas de diabetes gestacional que continúan presentando hiperglucemia tras el parto, en ausencia de factores de riesgo para diabetes tipo 2. La incidencia de mutaciones de GCK en esta población va del 0 al 80% dependiendo de lo estrictos que sean los criterios para realizar el screening (Stoffel M 1993, Ellard S 2000).

En un estudio en Oxford, en el que aumentaron los criterios para seleccionar los pacientes sometidos a análisis molecular, eligiendo también a aquellos diagnosticados de DM1 que tenían secreción de insulina residual tras 3 años del diagnóstico y aquellos diagnosticados de DM2 con inicio juvenil y ausencia de síndrome metabólico, se encontró que el 1% de los pacientes diagnosticados de DM1 y el 4% de los DM2 diagnosticados antes de 45 años, tenían MODY. Tras este cambio de diagnóstico, un cuarto de los pacientes tuvieron un cambio en el tratamiento (Thanabalasingham G 2012). Esto les llevó a la creación de un algoritmo para selección de pacientes para realización del test genético como el que aparece en la FIG7.

FIG7. Algoritmo para la selección de pacientes candidatos para el test genético (adaptado de Owen



Además de los algoritmos ya mencionados, ha sido sugerido el uso de un diagrama de 7 ítems (7-iF) (Tabla 3), que ha sido validado retrospectiva y prospectivamente (Pinelli M 2013) para identificar pacientes con una alta probabilidad de portar mutaciones en GCK (aquellos con todas las respuestas afirmativas), mejorando la tasa de detección y minimizando el número de test innecesarios. Consiste en siete preguntas de respuesta SI/NO sobre datos fácilmente obtenibles durante una exploración clínica estándar y por eso pueden ser aplicados en cualquier escenario clínico. Está principalmente indicado para médicos generales, que no trabajen en centros especializados, que son los que más pueden pasar por alto este diagnóstico. Este diagrama ha demostrado una precisión alta (76%), que mejora la precisión de la sospecha clínica (40%). Por otro lado, una puntuación menor (6/7) no se debe considerar criterio de exclusión, si no que debería derivarse a este paciente a un centro con experiencia en diabetes monogénica y valorar la realización de test genético.

Tabla 3: 7 Items Flowchart: indicaciones para test moleculares de GCK-MODY (adaptado de Pinelli M 2013)

Ausencia de autoinmunidad pancreática		Familiares afectos de diabetes o prediabetes	
Respuesta	Indicación test	Respuesta	Indicación test
Marcador negativo	Sí	Sí	Sí
Al menos un marcador positivo	No	No	No
Marcadores no analizados	No		
Terapia insulínica actual o en el pasados		Signos de diferentes tipos de diabetes	
Respuesta	Indicación test	Respuesta	Indicación test
Sí	No	Ninguno	Sí
No	Sí	Obesidad	No
		Acantosis nigricans	No
		Quistes renales	No
		Retinopatía o sordera	No
Valor de HbA1c		Otras enfermedades concurrentes	
Respuesta	Indicación test	Respuesta	Indicación test
HbA1c > 42 mmol/l (6%)	Sí	Otras enfermedades	No
HbA1c < 42 mmol/l (6%)	No	No otras	Sí
Debut (diabetes o hiperglucemia)			
Respuesta	Indicación test		
Entre los 6 meses y los 25 años	Sí		
Antes de 6 meses	No		
Después de 25 años	No		

Por último, se han fabricado modelos de decisión diagnóstica que proveen un modo de determinar la probabilidad de una persona de tener una determinada alteración en función de sus características clínicas (Shields BM 2012). Las probabilidades pre-test de MODY se estimaron en 0.7 y 4.6% para el DM1 vs MODY y DM2 vs MODY, respectivamente. Los modelos muestran una considerable mejora en la predicción de MODY en comparación con los criterios clínicos tradicionales. Estos modelos están validados y proveen probabilidades post-test para MODY que ayudarían en la práctica clínica, pudiendo llevarse a cabo como calculadoras online.

Tras realizar el diagnóstico molecular se podrá realizar screening familiar (Ellard S 2008), con una determinación de glucemia en ayunas; en aquellos que tengan hiperglucemia se podrá realizar el test genético para confirmar la presencia de la mutación (Stride A 2002). Los familiares de primer grado tienen un riesgo de 50% de portar la misma mutación y deberían realizarse screening para diabetes, con o sin test genético (Stride A 2002, Siddiqui K 2015). Aquellos que sean portadores, puede realizarse monitorización regulada de la glucemia con diagnósticos más precoces y tratamiento apropiado.

Una vez se lleva a cabo el análisis molecular, pueden encontrarse múltiples tipos de mutación: cortes, splicing, deleciones, inserciones, duplicaciones, contrasentido, sinsentido... En el caso del gen GCK, la identificación de estas mutaciones no siempre muestran si una variante es realmente patogénica o cómo de grave puede ser el fenotipo diabético. De las más de 200 mutaciones que inactivan GCK que se han descrito, sólo un 20% de ellas han sido caracterizadas funcionalmente (Estalella I 2008).

La variabilidad genética entre poblaciones distintas probablemente explica las diferencias de MODY2 en los diferentes países, pero las mutaciones en GCK parecen tener una prevalencia mundial (Osbak KK 2009). Aún es frecuente que se describan mutaciones desconocidas cuando se estudian nuevas familias.

2.4. Tratamiento de MODY2

Estos pacientes generalmente no precisan tratamiento, ya que la HbA1c está en el límite alto de la normalidad (Gloyn AL 2003, Thomson KL 2003, Hattersley AT 2000) y la presencia de alteraciones microvasculares es muy rara. La mayoría de los

casos son controlados exitosamente con dieta (Velho G 2004, Gloyn AL 2003, Stride A 2002, Hattersley AT 2000, Klupa T 2011).

Los agentes hipoglucemiantes orales son inefectivos porque la cantidad de insulina secretada depende de la glucosa sensada por las células β (Hattersley AT 2000). Por la misma razón, la insulina es sólo efectiva en dosis de reemplazo total. Este tratamiento, sin embargo, no se recomienda de rutina en pacientes MODY2, porque no son propensos a desarrollar complicaciones crónicas (Gloyn AL 2003, Stride A 2002, Hattersley AT 2000).

Por esto, el seguimiento de los pacientes MODY2 no tiene que ser tan intenso como otras formas de diabetes, pudiendo realizarse una revisión anual con HbA1c (Gloyn AL 2003, Hattersley AT 2000). Si bien, es recomendable instruir a los pacientes en hábitos de vida saludables, para evitar ganar excesivo peso y desarrollar insulínresistencia, lo que agravaría su pronóstico.

3. MICROBIOTA INTESTINAL

3.1. Establecimiento de la microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal humano contiene una media de 10^{14} microorganismos/ml de contenido luminal (Turnbaugh PJ y Hamady 2009, Qin J 2010), incluyendo unas 5000 especies de bacterias, siendo 150-200 especies bacterianas más frecuentes y las demás más inusuales (Turnbaugh PJ y Hamady 2009, Qin J 2010, Gomes AC 2014).

Las bacterias constituyen la gran mayoría de la microbiota intestinal humana, pero arqueobacterias, virus y protozoos también están presentes (Gomes AC 2014).

La microbiota intestinal humana es dinámica y va evolucionando a lo largo de la vida (tabla 4) (Turnbaugh PJ y Ridaura 2009, Hildebrandt MA 2009, Walker AW 2011). Previamente se pensaba que el feto se encontraba estéril en el útero y era rápidamente colonizado en el momento del nacimiento por las bacterias del ambiente, procediendo la mayoría de ellas de la microbiota vaginal y fecal (Dominguez-Bello MG 2010). Actualmente, sin embargo, hay autores que han propuesto que la placenta presenta una microbiota comensal no patógena, por lo que la colonización inicial del intestino humano comenzaría intraútero (Aagaard K 2014).

Tabla 4. Evolución de microbiota intestinal humana (adaptado de Bäckhed F 2011)

Edad	Características microbiota intestinal
Feto	Estéril
Nacimiento	Colonizado por bacterias ambientales. Microbiota materna vaginal y fecal
Neonato	Inicialmente, baja diversidad, bacterias anaerobias facultativas (Proteobacterias/Actinobacterias); progresando hacia una más diversa con predominio de <i>Firmicutes</i> y <i>Bacteroidetes</i>
Adulto	Diversa, con una variabilidad interindividuo mayor que intraindividuo a lo largo del tiempo, con mecanismos de selección. Selección positiva: factores del huésped como glicolípidos del epitelio o glicanos específicos del moco del huésped. Selección negativa: dieta y sistema inmune

La microbiota inicial está caracterizada por baja diversidad y principalmente bacterias anaerobias pertenecientes a las Proteobacterias y actinobacterias (Zoetendal EG 2008). Posteriormente aumenta la diversidad y dominan las bacterias de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Qin J 2010, Turnbaugh PJ y Hamady 2009, Eckburg PB 2005).

Se ha sugerido que el desarrollo de la microbiota adulta es el resultado tanto de selección positiva como negativa (Rawls JF 2006). Algunos de estos mecanismos de selección positiva pueden ser factores del huésped específicos para adhesión bacteriana, por ejemplo, glicolípidos del epitelio o glicanos específicos del moco intestinal, así como la dieta que es el factor más determinante de dicha microbiota intestinal (Turnbaugh PJ 2009, Walker AW 2011, Hildebrandt MA 2009). Datos recientes sugieren que la microbiota no sólo se afecta por la ingesta de macronutrientes sino también por el aporte calórico ingerido. A su vez, el sistema inmune del huésped puede hacer selección negativa al eliminar determinados grupos bacterianos. Estudios recientes han mostrado que niños con malnutrición aguda grave presentan inmadurez de la microbiota. (Subramanian S 2014). Así pues, se ha comprobado una variabilidad interindividuo mayor que intraindividuo a lo largo del tiempo.

3.2. Pérdida de biodiversidad de la microbiota intestinal

La hipótesis de la higiene mantiene que las mejoras en el saneamiento y las condiciones de vida pueden predisponer a enfermedades metabólicas, así como autoinmunes y alérgicas (Musso G 2010), siendo esta higiene la responsable del aumento de estas enfermedades en los últimos años en los países industrializados (Rook GA 2005). Esto podría explicarse por una disminución de la carga microbiana en los primeros meses de vida (Guarner F 2007). Este proceso de colonización puede evolucionar a lo largo de la vida, en función de la higiene, infecciones y tratamientos antibióticos (Fanaro S 2003).

El descubrimiento de tres subgrupos de linfocitos T reguladores ha revolucionado la base inmunológica original de la hipótesis de la higiene, el paradigma

Th1/Th2. Esto está sustentado por datos inmunológicos que demuestran que la respuesta a antígenos microbianos induce la expresión de citocinas Th1 que compensa la producción de citocinas Th2 polarizadas en recién nacidos. En situación de asepsia, el intestino puede propiciar una producción exagerada de IgE y enfermedades atópicas. Alternativamente, la ausencia de infecciones helmínticas elimina la regulación por incremento normal de Th2 en la infancia, culminando en un entorno más propenso a Th1, que es característico de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Korzenik JR 2006). Se considera que la inmunidad adaptativa y el desequilibrio entre las respuestas Th1, Th2, Th17 y linfocitos T reguladores son elementos clave en la patogénesis del proceso autoinmune.

Hay evidencia del cambio de microbiota intestinal en las últimas décadas, con incremento de algunas especies y disminución de otras, e incluso la pérdida de determinadas especies. Dentro de los factores que han influido en este cambio de la microbiota se encuentran:

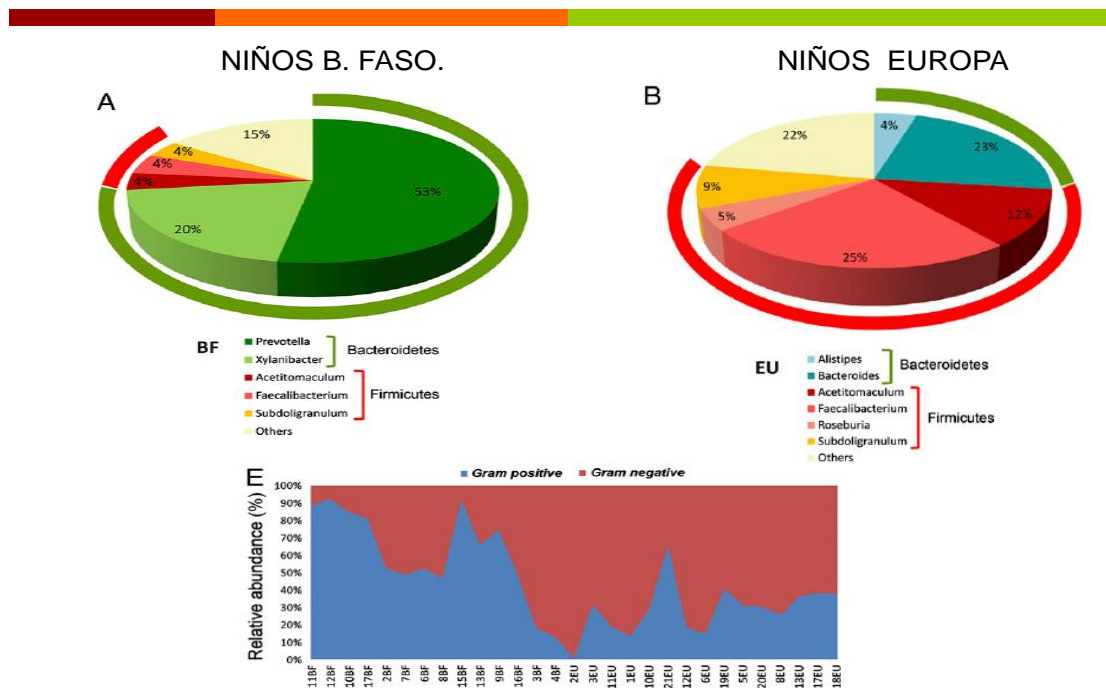
- Saneamiento del agua
- Incremento de las cesáreas
- Aumento de uso de antibióticos en pre-término
- Reducción de la lactancia
- Disminución del tamaño de las familias
- Aumento del uso de antibióticos
- Aumento de aseo y jabones antibacterianos.
- Vacunaciones
- Cambios en la dieta occidental

Estudios prospectivos en recién nacidos evidencian que la vía del parto es uno de los mayores determinantes de la flora intestinal. Estudios en modelos murinos han mostrado que los BioBreeding diabetes-prone (BBDP) nacidos por cesárea, presentan una aceleración del proceso respecto a aquellos nacidos por parto vaginal (Like AA 1991). Los nacidos por cesárea presentan menor número de *bifidobacterias* y *Bacteroides* y un mayor recuento de *C. difficile* (Penders J 2006, Palmer C 2007), es decir, una microbiota característica de la piel y predominada por taxones como *Staphylococcus* y *Propionibacterium spp.* (Dominguez-Bello M 2010).

Los antibióticos producen un importante efecto en la microbiota, y su uso excesivo está unido a un aumento de patógenos resistentes a los antibióticos (Dethlefsen L 2008, Jernberg C 2001). Aunque el particular taxón afectado varía entre individuos, algunos no se recuperan incluso después de meses de tratamiento y, en general, hay una disminución a largo plazo en la biodiversidad de las bacterias tras el uso de antibióticos. Un antibiótico puede afectar a un gran espectro de la microbiota, aunque no todas las especies sean sensibles a dicho antibiótico (Chopra I 2002). Por ejemplo, la eliminación de *lactobacillus* de la flora intestinal por el uso de antibióticos puede tener efecto en otras especies bacterianas, ya que los *lactobacillus* producen ácido láctico y acético, peróxido de hidrógeno y sustancias antimicrobianas, que contribuyen al mantenimiento normal de la flora intestinal (Lidbeck A 1993).

Cuando comparamos la microbiota de niños europeos y africanos encontramos una composición radicalmente diferente. Como demuestra la FIG8, los cambios se producen tanto en la proporción *Firmicutes/Bacteroidetes* como en la proporción de bacterias Gram-/Gram+. Los niños africanos presentan una mayor proporción de *Bacteroidetes* y de Gram positivos en su intestino, lo que sugiere que el estilo de vida occidental es favorecedor del incremento de *Firmicutes* y Gram negativos.

FIG8. Diferencias en la microbiota entre un niño europeo y un niño africano. En los gráficos A y B se presentan los filos y géneros bacterianos más prevalentes. Abajo aparece la relación Gram positivas (rojo) frente a las Gram negativas (azul) en diferentes niños de los dos continentes: los 14 primeros son niños africanos (BF) y 15 restantes son niños europeos (EU) (tomado de Filippo C 2010).



De Filippo et al.

PNAS | August 17, 2010 | vol. 107 | no. 33 | 14693

3.3. Composición de la microbiota intestinal

Los estudios metagenómicos han establecido que a pesar de la extensa variabilidad interpersonal de las distintas especies que componen la microbiota, se mantiene una cierta estabilidad en los patrones metabólicos y los metabolitos de dicha microbiota en todos los individuos (Burke C 2011, Turnbaugh PJ 2009, Kostic AD 2015). Las principales corresponden a 3 grandes filos: *Firmicutes* (Gram-positivos), *Bacteroidetes* (Gram-negativos) y *Actinobacterias* (Gram-positivos). Los *Firmicutes*

son las predominantes (60%), incluyendo más de 200 géneros (los más importantes son los *Micoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium*), y a la vez en cada género existen diferentes especies. Los *Bacteroidetes* y *Actinobacterias* suponen el 10% cada uno de la microbiota intestinal, estando el 20% restante constituido por más de 10 familias minoritarias. En total hay más 1000 especies diferentes de bacterias en nuestro intestino (Eckburg PB 2005). Los hongos y Archaea pueden ser también residentes, pero son menos del 1% de la población total.

El genoma bacteriano colectivo de la microbiota intestinal codifica una cifra estimada entre 2 y 4 millones de genes, superando al genoma humano en un factor de 140 veces (Hao WL 2004). Por lo tanto la adquisición de la microbiota intestinal a partir de la microbiota de la madre puede considerarse como la herencia de un genoma paralelo.

Han sido demostradas variaciones individuales en un nivel taxonómico más profundo, como las variaciones en las densidades de población y la diversidad de las especies bacterianas en todo el tubo digestivo. La cavidad oral presenta arquitecturas complejas al contrario que el resto del sistema gastrointestinal, que es principalmente tubular. La presencia de ácidos biliares en el duodeno o el pH ácido del estómago generan una presión de selección ambiental de los microorganismos locales. En la tabla 5 se resumen los géneros más abundantes en cada uno de los tramos del tracto gastrointestinal.

Tabla 5. Microorganismos predominantes en el tracto gastrointestinal humano

Localización	Cuantificación	Géneros
Estómago	10 ⁴ UFC/gr contenido intestinal	Helicobacter pylori (Filo: proteobacteria) Lactobacillus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Streptococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Duodeno	10 ³ -10 ⁴ UFC/gr contenido intestinal	Helicobacter pylori (Filo: proteobacteria) Lactobacillus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Streptococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Staphylococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Yeyuno	10 ⁵ -10 ⁷ UFC/gr contenido intestinal	Helicobacter pylori (Filo: proteobacteria) Lactobacillus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Streptococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Bacillus (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Ileon	10 ⁷ -10 ⁸ UFC/gr contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> (Filo: <i>Bacteroidetes</i>) Clostridium (Filo: <i>Firmicutes</i>) Enterobacteriaceae (Filo: Proteobacteria) Enterococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Lactobacillus (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Veillonella</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>)
Colon	10 ¹⁰ -10 ¹¹ UFC/gr contenido intestinal	<i>Bacteroides</i> (Filo: <i>Bacteroidetes</i>) Bacillus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Bifidobacterium (Filo: Actinobacteria) Clostridium (Filo: <i>Firmicutes</i>) Enterococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>) Eubacterium (Filo: <i>Firmicutes</i>) Fusobacterium (Filo: Fusobacteria) Peptostreptococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>) <i>Ruminococcus</i> (Filo: <i>Firmicutes</i>) Streptococcus (Filo: <i>Firmicutes</i>)

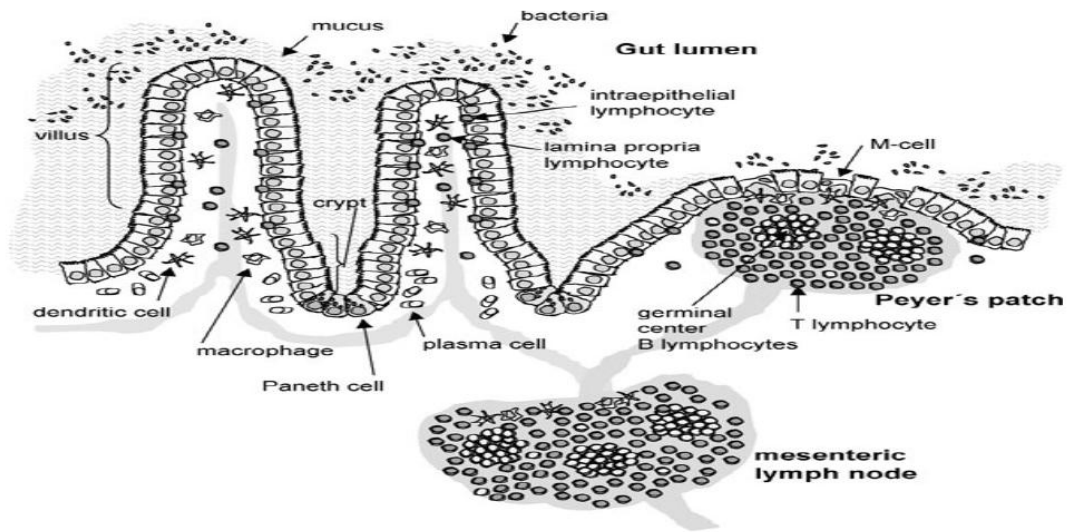
3.4. Inmunología de la mucosa intestinal

El epitelio intestinal es la superficie mucosa más extensa del cuerpo humano y proporciona una amplia superficie de interfase entre el medio externo y el hospedador. La pared del epitelio intestinal está constituida por cuatro capas: serosa, muscularis externa, submucosa y mucosa. La interacción de la capa de moco, células productoras de IgA, péptidos antimicrobianos y un complejo sistema de barrera epitelial formado por uniones estrechas y de adhesión (Ohland CL 2010) hace que sea la primera línea de defensa frente a antígenos y asegura interacciones específicas entre los antígenos lumbinales y el huésped, modificando constantemente los mecanismos locales y sistémicos de inmunidad (Fagarasan S 2002).

El tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) está formado por varias células especializadas que desempeñan funciones clave en la defensa del hospedador (Nagler-Anderson C 2001). Uno de los papeles fundamentales del TLAI es la distinción entre microorganismos comensales y patógenos (Lanning DK 2005). El tránsito paracelular de macromoléculas está controlado por TLAI, el cual actúa como un sistema de contención evitando que antígenos intestinales potencialmente nocivos accedan a la circulación sistémica, a través de un proceso mediado por IgA polimérica y linfocitos T reguladores. Los microorganismos comensales son cruciales para la maduración y el funcionamiento del sistema inmune de la mucosa.

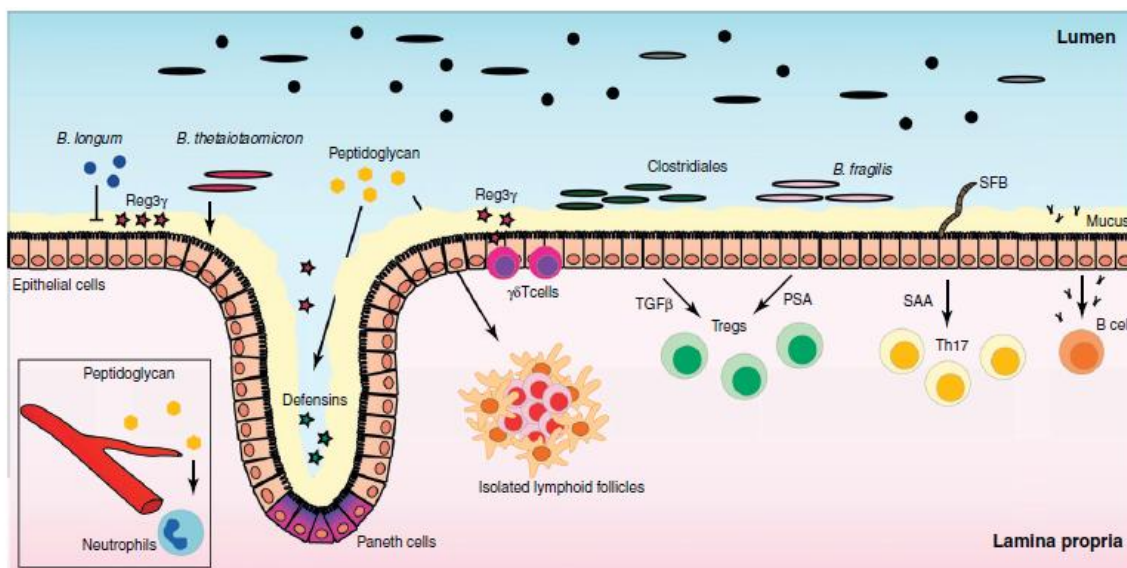
El TLAI se compone de zonas inductivas (placas de Peyer y folículos linfoides aislados) y zonas efectoras (células intraepiteliales y lámina propia) (Lorenz RG 2003) (FIG9). Las células epiteliales son participantes activos en la inmunidad de la mucosa a través de la expresión de receptores de tipo Toll (TLR), que inducen la transcripción de respuestas inmunitarias e inflamatorias (Cobrin GM 2005).

FIG9. Estructura de las componentes del TLAI (tomado de Lorenz RG I 2003).



Las células de Paneth, una población de células epiteliales intestinales especializadas que se sitúan en la base de las criptas intestinales, secretan péptidos antimicrobianos (FIG10). La microbiota puede estimular esta secreción, así como inducir la expresión Reg3 γ al activar los TLR en las células de Paneth (Brandl K 2007, Vaishnava S 2008).

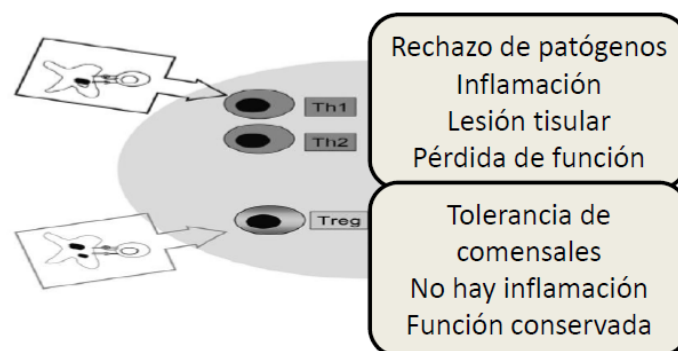
FIG10. Efectos de la microbiota en la inmunidad (tomado de Ubeda C 2012)



Además de TLR, las células de Paneth expresan NOD2 (dominio de oligomerización de unión de nucleótidos), una proteína citosólica que facilita la señalización inmune innata en respuesta a muramil dipéptido citosólico, un fragmento de peptidoglicano (Artis D 2008), producido por la microbiota (Kobayashi KS 2005). La activación del receptor NOD1 por fragmentos de peptidoglicano derivados de bacterias Gram-negativas contribuye al desarrollo de los folículos linfoides aislados, (Bouskra D 2008), así como aumenta la capacidad bactericida de los neutrófilos (Clarke TB 2010). Por su parte, los linfocitos T helper (Th) CD4+, incluyendo las células Th1, Th2 y Th17, también se ven influidos por la microbiota, que puede inducir la diferenciación Th17 mediante la producción de altos niveles de ATP (Atarashi K 2008).

Las células T reguladoras segregan citoquinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β), en respuesta a antígenos que se reconocen como comensales y no patógenos, siendo claves para la inmunotolerancia. En condiciones normales, en la mucosa intestinal hay un predominio de células T reguladoras, con escasas células Th1 activadas, creando una inmunotolerancia que permite la exposición continua a una elevada carga antigénica tanto de la microbiota como de la comida (FIG11) (Aderem A 2000)

FIG11. Esquema de inflamación e inmunomodulación (tomado de Aderem A 2000)



La alteración del equilibrio entre inmunidad y tolerancia puede dar lugar a enfermedades inflamatorias. Las células M presentadoras de antígenos captan y transportan eficientemente diversos microorganismos y antígenos (Jang MH 2004). Además, las células dendríticas captan antígenos presentes en la luz intestinal por transmisión de las dendritas a través de las uniones estrechas entre las células epiteliales, al tiempo que mantienen la integridad de la barrera (Bilsborough J 2004) y posteriormente migran a los ganglios linfáticos (Mellman I 2001) donde inducen linfocitos T naturales (Alpan O 2004). Cuando las células dendríticas presentan antígenos, se desencadena una serie de reconocimientos por receptores. Los TLR son los primeros que participan, ya que dirigen las respuestas inmunitarias activando los fenómenos de transmisión de señales que conducen a la expresión de factores como las citosinas y las quimiocinas. Éstas reclutan y regulan las células inmunitarias e inflamatorias que inician o intensifican las respuestas inmunitarias del hospedador (Akira S 2004).

Otras células como los mastocitos, parecen colaborar con las respuesta inmunitaria adaptativa, liberando mediadores preformados como histamina y serotonina, así como mediadores recién sintetizados como leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas, Il-4 y $TNF\alpha$, muchos de los cuales afectan a la permeabilidad intestinal (Xavier RJ 2007).

Algunas anomalías en el desarrollo del sistema inmune podrían deberse a defectos en la interacción de la microbiota con los compartimentos inmuno-competentes de la mucosa intestinal.

3.5. Función de barrera intestinal

El flujo pasivo de solutos a través de la barrera intestinal se produce principalmente a través de la ruta paracelular, dependiendo de la regulación de la unión estrecha intercelular. Ésta presenta resistencia eléctrica de los tejidos epiteliales, que depende del número y la complejidad de los filamentos de proteínas transmembranas dentro de la unión estrecha. En la actualidad se sabe que las uniones estrechas, consideradas hasta el momento como estructuras estáticas, son en realidad dinámicas y se adaptan fácilmente a diversas circunstancias de desarrollo, fisiológicas y patológicas.

Se ha propuesto que la alteración de la microbiota lleva a una permeabilidad intestinal aumentada debido a la disminución de expresión de proteínas de unión estrecha. Esto se acompaña de la absorción de antígenos de la dieta o de patógenos, que desencadenan inflamación y una hiperrespuesta inmune de la mucosa (Neu J 2010, Vaarala O 2008). Por ejemplo, puede favorecerse la traslocación de lipopolisacárido bacteriano (LPS), lo que puede culminar en endotoxemia metabólica e insulínresistencia.

Dietas ricas en grasas modifican la microbiota intestinal y por tanto la permeabilidad intestinal. Esta típica dieta aumenta la oxidación de ácidos grasos en el hígado y tejido adiposo, y la evidencia disponible sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas reducen la producción de moco en el epitelio intestinal. Uno de los efectos más precoces de estas ROS es la disrupción de las uniones estrechas de las células epiteliales del intestino (Schulzke JD 2009). Así, la integridad debilitada de la barrera intestinal permite la traslocación intestinal de bacterias (Brownlee M 2007). Además, la producción de malondialdehído, como resultado de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, induce daño a las membranas celulares epiteliales,

aumentando la permeabilidad de las uniones estrechas (Hall DM 2001, Muccioli GG 2010).

En modelos murinos, se ha estudiado como se modifica la pared intestinal al modificar la microbiota. Los ratones “libres de gérmenes” tienen vellosidades intestinales más largas y finas, lo que aumenta la superficie y puede facilitar la absorción de nutrientes desde el intestino. Además estos ratones tienen aumentada la expresión de genes que codifican transportadores en el intestino (Bäckhed F 2011). Sin embargo, estas estructuras son más vulnerables a las infecciones. Tras colonizarlos con microbiota intestinal normal, la composición celular cambia completamente y las vellosidades se acortan y ensanchan y aumenta la expresión de moléculas que son esenciales para mantener la función de barrera (Hooper LV 2001). Aún más, la colonización del intestino promueve el reclutamiento de células inmunes al intestino delgado y la formación del tejido linfoide asociado a intestino (Mazmanian SK 2005). Recientes estudios han demostrado que los sistemas inmune innato y adaptativo se complementan para mantener el mutualismo entre huésped y microbiota (Slack E 2009).

Estudios enfocados en linajes bacterianos específicos han revelado que *Bacteroides fragilis*, miembro del filo *Bacteroidetes* (Serreze DV 2000), presenta la habilidad de reducir la inflamación intestinal, mientras que las bacterias segmentadas filamentosas son capaces de activar la producción de IL-17 por las células T helper CD4+ (TH17), lo que estimula la respuesta autoinmune y la producción de citoquinas inflamatorias (Geuking MB 2011, Kriegel MA 2011, Mazmanian SK 2008). Es interesante que la inducción TH17 es dependiente de la predisposición genética individual (Geuking MB 2011).

Varias especies microbianas poseen la habilidad de modular el fenotipo TH17, especialmente las bacterias Gram + (Ivanov II 2008). Aunque TH17 induce inflamación pancreática, la progresión a DM1 ocurre sólo tras la diferenciación celular a TH1, así que aparentemente la formación de fenotipo TH17 diferenciado parece inhibir la manifestación del fenotipo diabetogénico (Martin-Orozco N 2009).

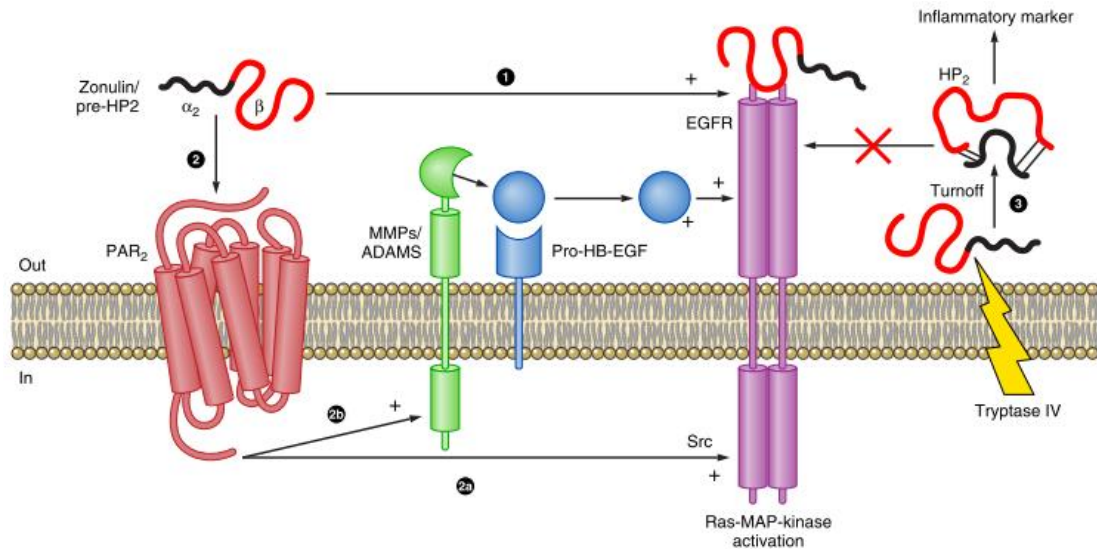
“The old friends hypothesis” propone que el mantenimiento de una microbiota normal es promovido por unos niveles altos de células T reguladoras, que secretan IL-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF β), lo que disminuye la inflamación (Rook GA 2005). Geuking MB et al (Geuking MB 2011) propone que esta respuesta simbiótica relaciona una variedad de células T reguladoras con una compleja flora intestinal (simbióticos, comensales potencialmente patógenos y microorganismos patógenos). Tomadas juntas, estas respuestas son las responsables de mantener la autotolerancia, y sugieren un importante papel de los probióticos en el mantenimiento de una flora intestinal saludable (Vaarala O 2008).

El descubrimiento de la zonulina, una molécula que modula reversiblemente la permeabilidad de las uniones estrechas, nos da información de cómo es regulada la función de la barrera intestinal en la salud y la enfermedad (Wang W 2000). La toxina zonulina ocludens (Zot) es una enterotoxina producida por el *Vibrio cholerae*, que en su extremo COOH-terminal se une a una proteasa específica activadora del receptor celular unido a una porción intracelular y la activa, por lo que se produce la apertura reversible de las uniones estrechas intercelulares. La activación de Zot está mediada, a su vez, por una cascada de eventos intracelulares que, mediante la polimerización de la proteína quinasa C separa la red de microfilamentos de actina (Singh R 2009). Parece que las zonas de unión a Zot están presentes en yeyuno e íleon pero no en colon y disminuye en las criptas de las vellosidades intestinales.

La investigación básica ayudó a identificar un homólogo en el intestino de humanos fallecidos, al que llamaron Zonulina (Fasano A 2011). Ésta es una proteína de 4kDa que aumenta la permeabilidad intestinal en primates, ya que disminuye la resistencia eléctrica transepitelial en yeyuno (35.3%) e íleon (25.6%), pero no en colon. Es similar al péptido activador de PAR2 (receptor de proteína G), activando el EGFR (receptor del factor del crecimiento epidérmico) y con ello, la apertura de las uniones estrechas. Esto es inhibido por la tirosin-quinasa AG1478. La secuencia de aminoácidos NH₂ terminal de la zonulina muestra grandes similitudes con las inmunoglobulinas. Se sabe que participa en el sistema inmune intestinal (FIG12) y está elevado en numerosas enfermedades autoinmunes, en las cuales la disfunción de las uniones estrechas parece ser el defecto inicial (Sapone A 2006). Por ejemplo, la gliadina reproduce el efecto de los EGF en el citoesquelético actínico a través de la inducción de zonulina en el tejido intestinal mediante el receptor CXCR3 (sobrexpresado en pacientes celíacos). Parece que el gluten y la exposición a determinadas bacterias son los mayores estimulantes para la producción de zonulina.

Otras moléculas implicadas son la β -catenina, cuya fosforilación inducida por probióticos pueden fortalecer el complejo E-cadherina/ β -catenina, sustentando el mantenimiento de las uniones de adhesión por el lugar de unión de la E-cadherina al citoesqueleto (Gooding JM 2004). Así también el butirato, metabolito de algunas bacterias presentes en la luz intestinal, reduce la traslocación bacteriana, mejorando la organización de las uniones estrechas (Lewis K 2010) y estimulando la síntesis de mucina, una glicoproteína que mantiene la integridad del epitelio intestinal (Paassen BN 2009).

FIG12. Mecanismos propuestos por los que la zonulina active EFGR: a través de la unión directa (1) o a través de la activación de PAR2 (2), mediado por señal Src (2a) o por liberación de MMPs y/o ADAMS (2b) que activarán Pro-HB-EGF. El procesamiento de la zonulina en su forma madura de dos cadenas produce cambios conformacionales que le impiden unirse a EGFR (3), con otras funciones (como unión a hemoglobina) y se convierte en un marcador de inflamación (tomado de Fasano A 2011)

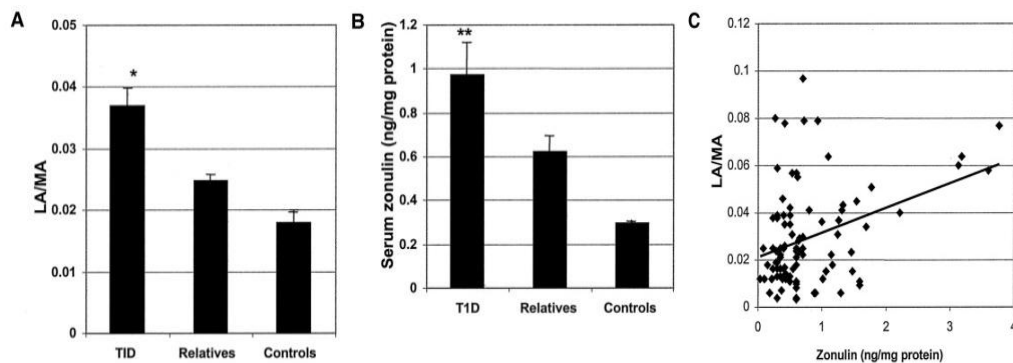


3.6. Permeabilidad intestinal en DM1

Sujetos susceptibles a enfermedades autoinmunes presentan una inadecuada función de la barrera intestinal (Neu J 2005), permitiendo mayor exposición de los antígenos al sistema inmune. En cuanto a la DM1, Bosi E et al (Bosi E 2006) habían demostrado la alteración en la permeabilidad intestinal de pacientes con DM1 con el test de Lactulosa-manitol (LA/MA), midiendo la excreción urinaria de ambos tras su administración oral (Bosi E 2006). Encontraron correlación con la excreción de la lactulosa pero no con el manitol. Además midieron el test en familiares de pacientes diabéticos que tenían autoanticuerpos positivos (como sujetos en fase preclínica ya que su riesgo de padecer DM1 en los próximos 5 años es más del 50%). También cogieron pacientes al debut y otros con larga evolución. Encontraron diferencias con la excreción de lactulosa en los 3 grupos con respecto a los controles pero no entre sí.

En cuanto a la zonulina, Sapone (Sapone A 2006) encontró que el 42% de los pacientes con DM1 y 29% de los familiares de primer grado tenía al menos 2DS por encima de la media normal para edad y sexo ($p < 0,001$). Solo el 4% de los controles tenían valor de zonulina superior a 2DS (FIG13). No encontraron correlación entre el valor de zonulina en DM1 y la edad de debut, duración de enfermedad, dosis diaria de insulina, HbA1c ni glucemia. En este estudio establecieron la relación de zonulina con la permeabilidad intestinal mediante el test manitol-lactulosa encontrando una relación directa entre el valor de zonulina y el ratio LA/MA.

FIG13.A. Ratio LA/MA en pacientes con DM1, familiares de primer grado y controles sanos. B. Zonulina sérica en pacientes con DM1, familiares de primer grado y controles sanos. C. Correlación entre LA/MA ratio y zonulina (tomado de Sapone A 2006)

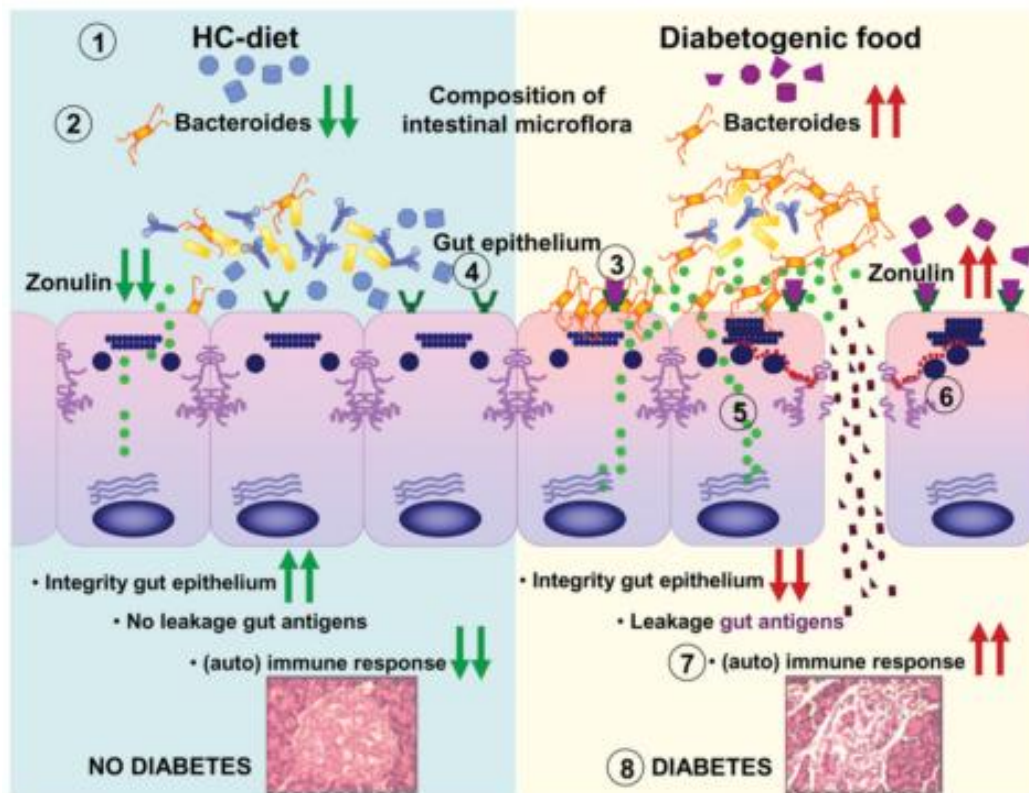


Parece que la alteración en la permeabilidad intestinal en pacientes con DM1 se produce antes que el debut (FIG14). Esto se basa en el modelo murino, en el cual se conoce que un aumento en la permeabilidad intestinal se sigue del debut de DM1 en un mes sin evidencia histológica de daño en los islotes pancreáticos inicialmente. También demostraron que el aumento de la zonulina precede al inicio de la DM1 en 2-3 semanas.

Parece que la administración oral de un inhibidor de zonulina reduce la incidencia de DM1 (Fasano A 2011). Por tanto, parece que la predisposición genética, la comunicación errónea entre la inmunidad congénita y adaptativa, la exposición a una

microbiota específica y la pérdida de función de la barrera intestinal, consecutiva a una disfunción de la unión estrecha intercelular, son en su totalidad componentes de la patogénesis de enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes.

FIG14. Mecanismo propuesto de acción del gluten en la patogénesis de la DM1. La dieta (1) afecta a la cantidad de *Bacteroides* intestinal. La microflora disbalanceada, con predominio de *Bacteroides* sobre otras como Bifidobacterias y Lactobacillus, activa la ruta de la zonulina (2). En paralelo, la gliadina (un componente del gluten) se une al receptor de CXCR3 (expresado en las células epiteliales intestinales) e induce una activación de la ruta de la zonulina dependiente de MyD88 (3). Una dieta con caseína hidrolizada previene la activación de CXCR3 (4). La activación de la ruta de la zonulina lleva a una liberación aumentada de zonulina (5) que se une a los receptores en la superficie epitelial intestinal y causa desensamblaje de las uniones estrechas por cambios dinámicos, incluyendo fosforilación de ocludina y ZO-1, cambios en ocludina-ZO-1 y ZO-1-miosina IB interacción proteína-proteína y polimerización de actina (6). Este desensamblaje lleva a incapacidad de la función de barrera, incrementando el paso de antígenos luminales en la lámina propia, donde son procesados por las células presentadoras de antígenos y presentados a las células T (7). La cascada de eventos inmunes finalmente lleva a la enfermedad autoinmune (8) (tomado de Visser J 2009)



3.7. Microbiota intestinal y DM1

Los pacientes con DM1 tienen alteración de la estructura de las uniones estrechas celulares como resultado de la disminución de la expresión de zonulina, así como del aumento del espacio paracelular entre las células epiteliales intestinales (Secondulfo M 2004). Esta permeabilidad intestinal aumentada es detectable incluso antes del inicio clínico de la enfermedad (Bosi E 2006, Sapone A 2006). Se ha sugerido que este aumento de la permeabilidad intestinal puede afectar la absorción de antígenos capaces de atacar y dañar las células β pancreáticas (Vehik K 2011). Igualmente, hay una inflamación intestinal en estos pacientes, como demuestra el estudio DIABIMMUNE (Kostic AD 2015) donde encontraron un alto nivel de b-defensina 2 humana (hBD2) en las muestras tempranas de niños que posteriormente desarrollaron DM1. hBD2 es un producto antimicrobiano producido por las células epiteliales colónicas en inflamación (Wehkamp J 2005), por lo que esto apoya la idea de una inflamación intestinal aumentada en los niños que desarrollaron DM1.

Este aumento de permeabilidad intestinal también se ha observado en modelos de rata BBDP o BioBreeding diabetes-resistant (BBDR) (Kuitunen M 2002, Watts T 2005, Bosi E 2006, Lee AS 2010) y de NOD. Por lo tanto, debido a que la microbiota puede afectar la permeabilidad intestinal, la ecología intestinal podría jugar un papel crucial en el desarrollo de DM1 (Mathis D 2012, Patterson E 2016).

De hecho, diversos modelos animales han demostrado la íntima relación entre microbiota intestinal y DM1, tanto en ratas BBDP (Lau K 2011) que desarrollan DM1, como en modelos de ratones NOD (Kriegel MA 2011, Wen L 2008). Adicionalmente, se ha comprobado que el uso de antibióticos puede prevenir la diabetes autoinmune en ratas BBDP (Brugman S 2006). Otro estudio experimental mostró que la administración

de antibióticos prevenía la insulinitis y destrucción de la célula β pancreática en ratones con DM1 inducida por virus, a través de mecanismos como la reducción de la respuesta inmune innata en ganglios linfáticos pancreáticos y placas de Peyer (Hara N 2012).

Por otra parte, en el estudio realizado por Roesch *et al.* se ha demostrado la presencia de niveles mayores de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en ratas BBDR, mientras que los *Bacteroides* y los *Clostridium* fueron más abundantes en las ratas BBDP (Roesch LFW 2009). Un estudio (Brugman S 2006) encontró que ratas BBDP que progresaron a DM1, presentaban menor variedad de bacterias del filo *Bacteroidetes*, en comparación con ratas control.

En consonancia, varios estudios han mostrado que la colonización de ratones genéticamente susceptibles con microbiota protectora puede disminuir el riesgo de desarrollar DM1 (Markle JG 2013). Valladares et al. han señalado que la administración de *Lactobacillus johnsonii* aislado de ratas BBDR puede retrasar o inhibir la aparición de DM1 en ratas BBDP (Valladares R 2010). Así como la administración de VSL#3 (una mezcla de *lactobacillus* y *bifidobacterium*) en ratones NOD modifica la inmunidad del tracto intestinal, aumentando la tolerancia (Dolpady J 2016), y disminuyendo la incidencia de DM1 por tres mecanismos: 1) suprimiendo la inflamación y muerte de las células β pancreáticas, 2) aumentando la producción de IL-10 por las placas de Peyer y 3) aumentando la expresión de IL-10 en páncreas (Calcinaro F 2005). IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que inhibe la presentación de antígenos y la producción de citoquinas proinflamatorias (Moore 2001), mientras que la depleción hepática de células natural killer se relaciona con el desarrollo de insulínresistencia hepática (Ohkawara S 2005).

La ablación génica de la proteína MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88, un adaptador para múltiples receptores de inmunidad innata que reconocen estímulos bacterianos) está relacionada con un efecto protector para el desarrollo de DM1, debido a una mayor tolerancia local a antígenos pancreáticos. Ratones MyD88 knockout estuvieron protegidos del desarrollo de DM1, y mostraron menor expresión de TNF- α en los ganglios linfáticos pancreáticos en comparación con ratones salvajes (Wen L 2008). También se encontró que la delección MyD88 estaba asociada con menor ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*, y mayores recuentos de *Lactobacillus*, *Rikenellaceae* y *Porphyromonadaceae*. Por el contrario, la destrucción de la microbiota intestinal en ratas MyD88 knockout con antibióticos de amplio espectro, fue asociada con aumento de incidencia de DM1, en comparación con ratones libres de gérmenes (Wen L 2008). Esto sugiere que componentes específicos de la microbiota intestinal pueden prevenir la activación de las células T autoinmunes independientemente de la presencia de MyD88 por mecanismos aún desconocidos (Wen L 2008).

En ratas BB se observó una diferencia en la composición de la microbiota antes del debut de DM1 en aquellos animales predispuestos a la enfermedad frente a aquellos protegidos (Roesch LF 2009), y una protección transferible se observó en ratones NOD MyD88 knockout como transductor esencial de la señal en TLR (Peng J 2014).

En un estudio reciente sobre la regulación metabólica durante la progresión de diabetes autoinmune en ratones NOD (Sysi-aho M 2011), se observó que las hembras, las cuales progresaban más tarde a diabetes autoinmune, mostraron las mismas rutas metabólicas que niños con DM1 preclínica (Oresic M 2008). Los cambios metabólicos fueron acompañados por una disminución en la diversidad de la microbiota, especialmente de los *Clostridium*. Estos han sido relacionados con la inducción de

células T reguladoras en la mucosa colónica (Atarashi K 2011), por lo que su disminución puede estar relacionada con la respuesta autoinmune.

Además de en estos modelos animales, la relación entre las bacterias intestinales y la DM1 en humanos ha sido demostrada (Atkinson MA 2012), sin embargo cómo influyen y por qué mecanismo continúa siendo motivo de multitud de estudios.

Los resultados del estudio DIPP indicó que los niños que progresaron a DM1 presentaron una reducción en la abundancia relativa de *Firmicutes* acompañado por un aumento en la abundancia relativa de *Bacteroidetes* con el tiempo, mientras que los niños sanos utilizados como controles (pareados por edad y HLA) tuvieron un aumento relativo de *Firmicutes* y una reducción de *Bacteroidetes* (Giongo A 2010). Curiosamente, todas las diferencias entre los niños con DM1 y los sujetos control ocurrieron dentro del filo *Bacteroidetes* y el género bacteriano *Bacteroides*, donde más del 20% del cambio observado se atribuyó a la especie de *Bacteroides ovatus*. Por el contrario, el aumento de la abundancia de *Firmicutes* detectado en los controles sanos fue resultado del aumento en la abundancia del orden *Clostridiales*, más concretamente de la cepa bacteriana CO19. Además, en este estudio los controles sanos tuvieron una microbiota intestinal más diversa y estable en comparación con los sujetos que desarrollaron autoinmunidad. Una de las limitaciones de este estudio fue que la muestra analizada fue relativamente pequeña para alcanzar conclusiones definitivas, aunque los autores concluyeron que la microbiota podría estar implicada en la predisposición a DM1 en individuos genéticamente susceptibles (Giongo A 2010).

En otro estudio, la composición de la microbiota intestinal de niños con DM1 muestra más factores de virulencia, genes de motilidad y mayor respuesta al estrés

(Brown CT 2011), así como menor recuento de bacterias productoras de butirato, un ácido graso de cadena corta con acción antiinflamatoria (Louis P 2009).

Otro estudio realizado por de Goffau et al (de Goffau M 2013) comparó la composición de la microbiota intestinal entre niños con autoinmunidad dirigida a células β y niños sanos pareados por edad, sexo, genotipo HLA de riesgo (HLA-DQB1) y tiempo y tipo de alimentación con fórmulas infantiles. El análisis de componentes principales puso de manifiesto una baja abundancia de bacterias productoras de lactato y de especies productoras de butirato en los niños con autoinmunidad presente. Además, en estos niños con autoinmunidad presente se encontró una escasez de las dos especies de *Bifidobacterium* más dominantes, *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, y un aumento de la abundancia de los géneros *Bacteroides*. Por otro lado, no se encontró un aumento en los niveles de calprotectina fecal o IgA (marcadores de inflamación) en los niños con autoinmunidad presente.

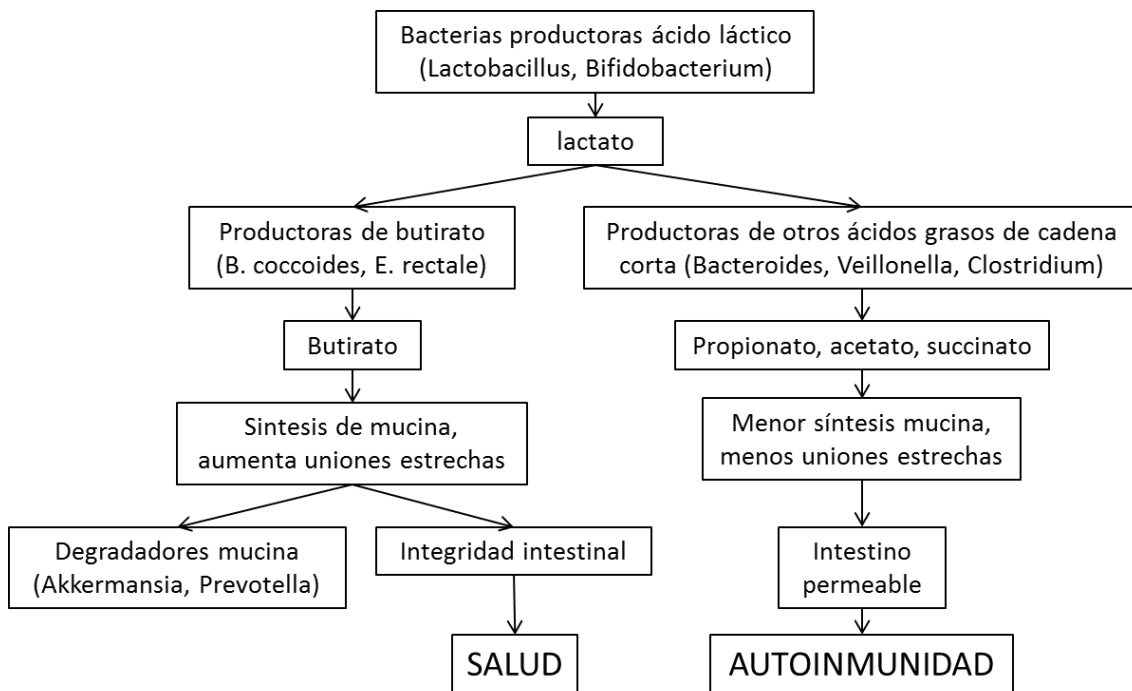
En el estudio de Murri (Murri M 2013) compararon la microbiota fecal de niños con DM1 frente a la de niños sanos pareados por sexo, edad, forma de nacimiento y tiempo y tipo de lactancia, hallando diferencias en la microbiota intestinal entre ambos grupos de estudio. En los niños con DM1, el número de *Actinobacterias* y *Firmicutes*, y el cociente *Firmicutes/Bacteroidetes* se encontraron significativamente reducidos, mientras que la cantidad de *Bacteroidetes* aumentó de forma significativa respecto a los niños sanos. A nivel de género en los niños con DM1 se encontró un aumento significativo en el número de *Clostridium*, *Bacteroides* y *Veillonella* y una disminución significativa en el número de bacterias esenciales para mantener la integridad del intestino como son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Blautia coccooides/Eubacterium rectale* grupo y *Prevotella*. Es decir, el número de bacterias productoras de ácido láctico, bacterias productoras de butirato y bacterias formadoras de mucina, esenciales

para mantener la integridad intestinal, fueron significativamente inferiores en los niños con DM1 respecto a los controles sanos (Brown CT 2011). Este estudio puso de manifiesto por primera vez que en el grupo de niños con DM1 el número de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y el cociente *Firmicutes/Bacteroidetes* correlacionaron negativamente con los niveles plasmáticos de glucosa y hemoglobina glicosilada mientras que la cantidad de *Clostridium* correlacionó de forma positiva con ellas. Sin embargo, el mecanismo causal que podría explicar la relación encontrada entre una determinada microbiota y el nivel de hiperglucemia observado en estos pacientes no está descrito aún, siendo uno de los objetivos principales del presente proyecto.

Algunos autores proponen que el cambio en la microbiota aparece tras la seroconversión, con una marcada disminución en la diversidad (Kostic AD 2015), lo que indicaría que la microbiota está implicada en la progresión de la autoinmunidad hacia las manifestaciones clínicas, más que en el inicio del proceso de la enfermedad (Knip M 2016).

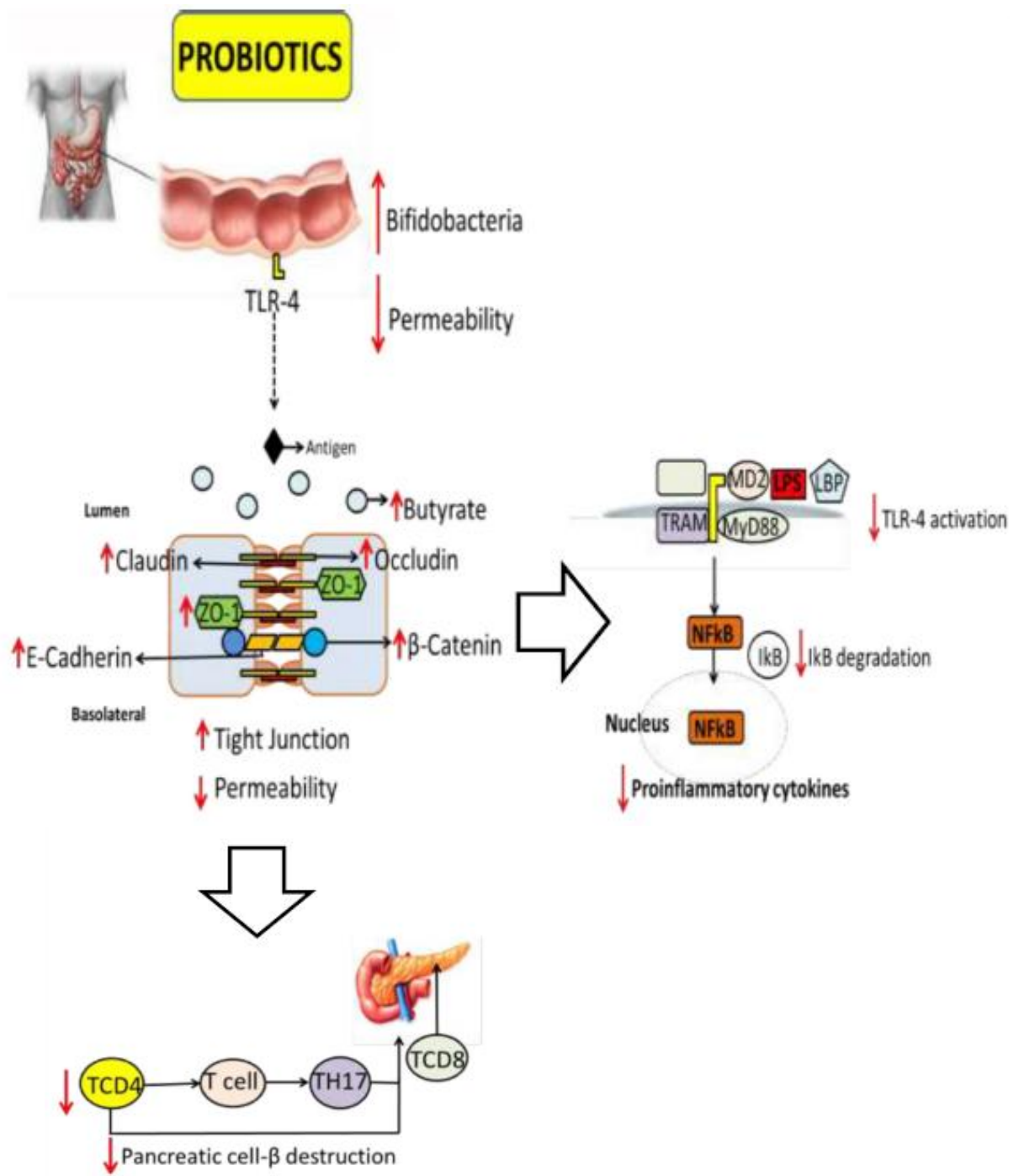
Así, en el estudio BABYDIET encontraron que la seroconversión es más frecuente en el subgrupo con aumento de *Bacteroidetes* y disminución de *Akkermansia*, sin encontrar relación entre la seroconversión y la lactancia materna. El inicio de la alimentación sólida sí se asoció con un aumento de *Bacteroides*. Los hallazgos principales en los pacientes con DM1 fueron un predominio de *Bacteroidetes* en el estadio preclínico, una biodiversidad reducida con un aumento de bacterias productoras de butirato y baja estabilidad de comunidades, produciéndose los cambios tras la seroconversión (Alkanani AK 2015). Este cambio de microbiota llevaría a un aumento de lactato y una disminución de butirato antes del debut (FIG15)

FIG15: La modificación de los metabolitos producidos por la microbiota pueden llevar a un estado de autoinmunidad o inmunotolerancia.



La modulación de la microbiota intestinal con probióticos podría facilitar el manejo de distintas enfermedades (FIG16). Los probióticos podrían estar implicados en el mantenimiento de una microbiota intestinal saludable, y han sido también identificados como adyuvantes efectivos en terapias contra la insulinresistencia (Moroti C 2012, Ejtahed HS 2012, Andreasen AS 2010). La evidencia disponible de estudios experimentales y ensayos clínicos apoyan la idea de que la modulación de la microbiota intestinal mediante la administración de probióticos puede ser efectiva como prevención y manejo de DM1 y DM2 (Gomes AC 2014). Aún más, se ha demostrado que los probióticos mejoran la absorción de antioxidantes y reducen la concentración postprandial de lípidos, acciones directamente relacionadas con el estrés oxidativo (Mikelsaar M 2009).

FIG16. Posibles efectos de tomar probióticos sobre DM1 y DM2. El consumo de probiótico aumenta el número de bifidobacterias y aumenta la expresión de las proteínas de adhesión que reducen la permeabilidad intestinal, dificultando la activación de TLR4 por LPS. Como resultado, las rutas de activación de NFkB están bloqueadas. La inducción de células Th17 también está inhibida, previniendo la infiltración pancreática por células T CD8+ (tomado de Floch MH 2005)



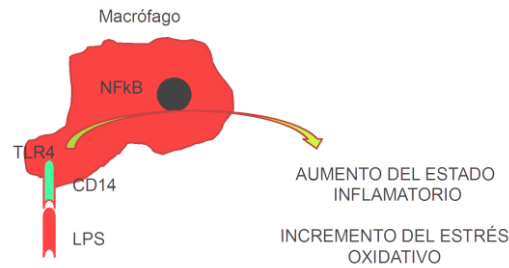
3.8. Endotoxemia metabólica y DM1

Los lipopolisacáridos (LPS) son un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas, que se absorben por el enterocito y son vehiculados en plasma fundamentalmente unidos a los quilomicrones (Clemente Postigo M 2012).

Se ha observado un incremento en los niveles plasmáticos de LPS en sujetos con una dieta alta en grasas (Neal MD 2006), tanto en humanos como en ratones (Amar J 2008, Cani PD 2007), así como en ratones deficientes de leptina con una dieta normal (Cani PD 2008). Esto sugiere que ante estas situaciones, o bien se produce un cambio en la proporción de bacterias Gram negativas en el intestino o bien, un cambio en la permeabilidad intestinal para que los LPS se incrementen en suero (Cani PD 2009). El papel causal de los LPS ha sido demostrado, ya que al infundir LPS en ratones alimentados con una dieta normal se induce resistencia a la insulina a nivel hepático, intolerancia a la glucosa y un incremento en el peso del tejido adiposo (Cani PD 2007)

El LPS se une al receptor CD14/TLR4 presente en los macrófagos y se produce un incremento en la producción de moléculas pro-inflamatorias (FIG17) (Spruss A 2009, Cani PD 2008). En ratones con ablación génica del receptor CD14/TLR4 se administraron inyecciones de LPS, sin inducirse estas características metabólicas y no presentaron diabetes tipo 2 ni obesidad, mostrando el importante papel del mecanismo del receptor CD14/TLR4 para LPS (Cani PD 2007, Poggi M 2007).

FIG17. Mecanismo por el que LPS incrementa el estrés oxidativo y la inflamación.



Este LPS también está implicado en la patogénesis de DM1, como poderoso trigger de la respuesta inmune que es (Davis-Richardson AG 2014). Pero un estudio reciente de Vatanen ha demostrado que más que la cantidad de LPS, la naturaleza y composición de los distintos subtipos de LPS parecen determinar el nivel de activación inmune desencadenada (Vatanen T 2016). Así el LPS procedente de *E. coli* (más prevalente en Rusia, donde hay baja incidencia de DM1), produce tolerancia a la endotoxemia y disminución de la incidencia de DM1 en ratones NOD. Sin embargo, el LPS de *B. dorei* (más prevalente en Finlandia y Estonia, zonas con alta prevalencia de DM1) es estructural y funcionalmente distinto y no tiene este efecto inmunomodulador.

3.9. Microbiota y MODY2

Hasta el momento no se ha realizado estudio alguno que analice las características de la microbiota intestinal presente en niños con diabetes tipo MODY 2, ni de la permeabilidad intestinal en estos pacientes. En ellos nos encontramos con una hiperglucemia leve mantenida (al igual que en pacientes con DM1 con buen control) pero sin presencia de autoinmunidad (al contrario que en el caso de DM1), los que los convierte en un grupo adecuado de comparación para estudiar la patogenia de sendas enfermedades.

FUNDAMENTO, HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS

FUNDAMENTO

- Las diferencias entre la microbiota intestinal entre sujetos sanos y afectados de DM1 ha sido ampliamente estudiada en modelos murinos, así como en modelos humanos en los últimos años.
- En estudios previos, hemos encontrado diferencias significativas en la microbiota intestinal entre pacientes con DM1 y controles sanos, así como una asociación de una determinada microbiota con los niveles de glucemia en los pacientes con DM1
- Hasta el momento no se ha realizado estudio alguno que analice las características de la microbiota intestinal presente en niños con diabetes tipo MODY 2, ni las posibles diferencias o semejanzas respecto a la microbiota presente en los niños con DM1, lo cual aportaría información relevante sobre las diferentes fisiopatologías de estas enfermedades.
- Si la microbiota fecal de los pacientes con DM1 fuera diferente a la de los pacientes con diabetes tipo MODY2 (de forma similar a los hallazgos previos respecto a diferencias entre DM1 y controles sanos) podríamos demostrar que la microbiota intestinal participa en el desarrollo de la patología autoinmune.
- Por el contrario si la microbiota fecal de los pacientes con DM1 y diabetes tipo MODY 2 fueran iguales y a su vez diferentes a la microbiota de los controles sanos, esto pondría de manifiesto que las diferencias en la microbiota intestinal podrían ser debidas a los elevados niveles de glucemia presente en ambos grupos de niños diabéticos.

HIPÓTESIS

- Los pacientes con DM1 presentan una microbiota intestinal diferente a la de los pacientes con diabetes tipo MODY 2 (pareados por nivel de HbA1c), pudiendo ser éste uno de los factores implicados en la aparición de DM1 en individuos genéticamente susceptibles
- La microbiota de los pacientes con diabetes tipo MODY 2 es diferente a la microbiota presente en controles sanos
- En pacientes con DM1 o tipo MODY 2 la permeabilidad intestinal está aumentada. Esto se debe a la pérdida de una determinada microbiota comensal que aumenta los niveles de proteínas de unión estrecha y contribuye a mantener la integridad del intestino.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar la composición de la microbiota intestinal de los niños afectados de DM1, de MODY 2 y controles sanos mediante pirosecuenciación masiva y comparar dicha microbiota entre los tres grupos de estudio.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Estudiar la relación entre la microbiota intestinal y los niveles de glucemia presentes en los pacientes con DM1 y con MODY 2.
- Medir marcadores de permeabilidad intestinal: zonulina en muestras de plasma de pacientes con DM1, diabetes tipo MODY2 y controles sanos.
- Estudiar las diferencias en los marcadores de permeabilidad intestinal entre los diferentes grupos y establecer su relación con la microbiota intestinal presente.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL y MÉTODOS**1. DISEÑO**

Estudio transversal de casos y controles donde compararemos la microbiota intestinal de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 respecto a la microbiota de pacientes con diabetes tipo MODY 2 y de controles sanos pareados por sexo, edad, raza, tipo de parto, tiempo de lactancia y, en el caso de los pacientes diabéticos, pareados también por los niveles de control metabólico (mediante hemoglobina glicosilada).

2. SUJETOS DE ESTUDIO

Se incluirán pacientes con edades comprendidas entre 5 y 14 años diagnosticados de diabetes mellitus tipo 1 y diabetes tipo MODY 2 atendidos en la Unidad de Diabetes Infantil del Hospital Regional Universitario de Málaga y, además, se incluirá un grupo de controles sanos atendidos en las consultas de anestesiología y en las consultas de pediatría de atención primaria.

La DM1 será diagnosticada siguiendo los criterios de la ADA y confirmada con la positividad de al menos dos autoanticuerpos anti-isletos (IAA, GAD65 o IA2) persistentes. La diabetes tipo MODY2 será diagnosticada mediante el análisis molecular del gen de la glucokinasa, que se solicitará ante la sospecha clínica con historia familiar y ausencia de autoinmunidad pancreática.

Los tres grupos de sujetos estarán emparejados por edad, sexo, IMC, modo de parto y duración de lactancia materna y, en el caso de los pacientes con DM1 y con diabetes MODY 2, estarán también emparejados entre ellos por el nivel de HbA1c.

Los niños con DM1 serán tratados y monitorizados acorde al protocolo médico habitual en la DM1. Todos los niños con DM1 estarán en tratamiento intensivo de insulinoterapia a través de MDI o ISCI. Los niños con diabetes tipo MODY 2 no recibirán tratamiento farmacológico según pauta habitual. Ambos grupos de diabéticos seguirán las recomendaciones higiénico-dietéticas del protocolo habitual en consulta, con dieta variada y equilibrada, libre de hidratos de carbono de absorción rápida, y práctica de ejercicio aeróbico a diario.

Los padres de los pacientes y controles realizarán una entrevista estructurada para obtener datos demográficos generales y del estilo de vida: edad, sexo, antecedentes familiares de diabetes, antecedentes personales, año de debut de la diabetes, duración de la diabetes, tipo de parto, peso al nacer, tiempo y tipo de lactancia, cohabitación con animales, uso de antibióticos en primeros 6 meses de vida y vivienda en zona rural o urbana, así como completarán un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario.

Criterios de exclusión: Se excluirán todos aquellos pacientes afectados de otras enfermedades infecciosas, inflamatorias o autoinmunes. Ningún sujeto del estudio deberá haber recibido tratamiento con antibiótico, probióticos, prebióticos o cualquier otro tratamiento médico que pudiera influir en la microbiota intestinal en los últimos 3 meses antes del inicio del estudio.

Todos los pacientes y controles serán informados extensivamente de las características del estudio (obteniendo consentimiento informado escrito). El protocolo ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación provincial de Málaga.

3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

El cálculo del tamaño de muestra se ha realizado considerando los resultados de un estudio previo realizado, sobre el cambio en el número de copias por gramo de heces de *Lactobacillus* al comparar pacientes con DM1 frente a controles sanos. Dichas bacterias se han seleccionado por ser unas de las más importantes formadoras de lactato. Tomando como dato una diferencia significativa en el número de copias por gramo de heces de *Lactobacillus* de 0.76 y asumiendo un error alfa de 0.05% y una potencia del 95% se necesitará incluir 10 pacientes en cada grupo. Sin embargo, para aumentar la potencia estadística del estudio, y poder compensar una posible menor diferencia en los resultados esperados, planteamos incluir 15 sujetos en el grupo de DM1.

Debido a que no hay bibliografía ni datos previos sobre microbiota en pacientes con MODY2, decidimos igualar el tamaño muestral de los 3 grupos, con 15 sujetos por grupo.

4. RECOGIDA DE MUESTRAS

A todos los pacientes y controles que participen en el estudio se le extraerán muestras de sangre por la mañana tras doce horas de ayunas. Estas muestras de sangre serán recogidas en dos tubos con ácido-etilen-diamino tetracético (EDTA) y serán centrifugadas a 2500 x g durante 10 minutos a 4°C, para aislar el plasma en el mismo día de la punción venosa. Estas muestras de suero y plasma serán alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Las muestras de heces se obtendrán por la mañana antes del desayuno. Muestras de heces del tamaño de una nuez serán recogidas en un frasco estéril de boca ancha, transportadas en nieve carbónica, previamente suministrada a los padres, hasta el

hospital y congeladas lo antes posible a -80°C hasta su posterior análisis. El tiempo transcurrido desde su recogida por parte de los padres hasta su entrega fue siempre inferior a 24 horas. Posteriormente, las muestras fueron enviadas en nieve carbónica al laboratorio de investigación de IBIMA del Hospital Clínico Virgen de la Victoria de Málaga, donde fueron procesadas y secuenciadas. La descongelación de las muestras se producirá de manera gradual durante 24 horas a 4°C para minimizar la posible pérdida de los grupos bacterianos más sensibles a los cambios de temperatura.

5. ANÁLISIS DE LOS DATOS

5.1. Análisis variables antropométricas

El peso y la talla de los niños fueron medidos acorde a procedimientos estandarizados. El peso se registró utilizando una báscula (Tanita 2001T-TB), con precisión de fracciones de 100 gr. La talla se midió con un estadímetro Holtain (Holtain Ltd, Dyfed, UK) con precisión de fracciones de 0,1 cm.

5.2. Análisis variables bioquímicas

Las mediciones de glucosa, triglicéridos y colesterol se realizaron con un autoanalizador Dimensión de Dade Behring Inc. (Deerfield, IL, EE.UU.) mediante métodos enzimáticos (Randox Laboratories Ltd., UK). Además, la insulina será cuantificada mediante RIA proporcionado por BioSource SA (Nivelles, Bélgica). El HOMA-IR se calculó a partir de insulina en ayunas y glucosa con la siguiente ecuación: $\text{HOMA-IR} = \text{insulina en ayunas (mIU / mL)} / \text{glucosa en ayunas (mol / L)} / 22.5$. La detección cuantitativa de autoanticuerpos a antígenos de células de islote se realizó utilizando el kit Elisa RSR GADAb, el kit Elisa RSR IA-2Ab y el kit RIA RSR IAA (RSR Limited, Cardiff, Reino Unido).

5.3. Análisis de la permeabilidad intestinal

Se determinará la concentración de zonulina en muestras de plasma mediante ELISAS comerciales (MyBioSource, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones de manufactura.

5.3.1. Zonulina

5.3.1.1. Materiales:

Todos los reactivos provistos son almacenados a 2-8°C.

	Materiales	Especificaciones	Cantidad
1	Placa	96 pocillos	Tira de pocillos
2	Conjugado Enzimático	6 ml	1 vial
3	Standard A	0 ng/ml	1 vial
4	Standard B	50 ng/ml	1 vial
5	Standard C	100 ng/ml	1 vial
6	Standard D	250 ng/ml	1 vial
7	Standard E	500 ng/ml	1 vial
8	Standard F	1000 ng/ml	1 vial
9	Sustrato A	6 ml	1 vial
10	Sustrato B	6 ml	1 vial
11	Solución de Parads	6 ml	1 vial
12	Solución de Lavado (100x)	10 ml	1 vial

5.3.1.2. Muestras:

Se utilizaron muestras de plasma recogida usando EDTA como anticoagulante.

5.3.1.3. Procedimiento de análisis:

1. Se añadieron 100 µl de Standards o Muestras en los pocillos de la placa y se añadieron 100 µl de PBS (pH 7.0-7.2) en el pocillo control

2. Se añadieron 50 µl de Conjugado Enzimático a cada pocillo excepto en el pocillo control, se mezcló y se cubrió la placa durante una hora a 37°C
3. Se lavó la placa mediante volcado del contenido de la placa en un contenedor apropiado de deshechos y añadiendo 400 µl de Solucion de Lavado. Se repitió este proceso 5 veces. Tras los lavados, se invirtió la placa, y se secó golpeando la placa con un papel absorbente hasta que no quedaran gotas.
4. Se añadieron 50 µl de Sustrato A y 50 µl de Sustrato B a cada pocillo, incluyendo el pocillo control, posteriormente se cubrió la placa y se incubó durante 10-15 minutos a 37°C.
5. Se añadieron 50 µl de Solucion de Parada a todos los pocillos y se determinó la Densidad Óptica a 450 nm usando un lector de ELISA

5.4. Análisis de la microbiota

5.4.1. Extracción del ADN bacteriano de las muestras de heces

La concentración de ADN se determinará mediante absorbancia a 260 nm y la pureza se estimará determinando la relación A260/A280 empleando un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

La descongelación de las alícuotas de las muestras de heces se realizó de manera gradual durante 24 horas a 4°C para minimizar la posible pérdida de los grupos bacterianos más sensibles a los cambios de temperatura. La extracción de ADN se realizó a partir de 200 mg de heces utilizando el QIAamp ADN Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones de manufactura.

El protocolo de aislamiento del ADN de muestra de heces para detección de patógenos ha seguido el siguiente procedimiento:

1. Se pusieron 200 mg de heces en un tubo de microcentrifuga de 2 ml y se mantuvo el tubo en hielo.
2. Se añadió 1.4 ml de Buffer ASL a cada muestra de heces. Se vorteo de forma continuada durante 1 minuto para homogeneizar las heces
3. Se calentó la suspensión a 70°C
4. Se vorteo durante 15 s. y se centrifugó la muestra a 12.000 x g durante 1 min
5. Se pipeteó 1,2 ml del sobrenadante en un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 ml y se desechó el pellet
6. Se añadió una pastilla inhibitEX a cada muestra y se vorteo inmediatamente y de forma continuada durante 1 min. o hasta que la pastilla estuviera completamente disuelta. Se incubó la suspensión durante 1 min. a temperatura ambiente
7. Se centrifugó la muestra a 12.000 x g durante 3 min. para eliminar inhibidores unidos a la matriz inhibitEX
8. Se pipeteó todo el sobrenadante en un nuevo tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5 ml y se centrifugó la muestra a 12.000 x g durante 3 min
9. Se pipeteó 15 µl de proteinase K en tubo nuevo de microcentrifuga de 1,5 ml
10. Se pipeteó 200 µl de sobrenadante anterior en el tubo de microcentrifuga que contenía proteinase K

11. Se añadió 200 µl de buffer AL y se vorteoó durante 15 s
12. Se incubó a 70°C durante 10 min
13. Se añadió 200 µl de etanol al lisado y se mezcló vorteoando
14. Se añadió el lisado a la columna y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min
15. Se abrió la columna y se añadió 500 µl de buffer AW1. Se puso la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min y se desechó el filtrado
16. Se abrió la columna y se añadió 500 µl de buffer AW2. Se puso la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min y se desechó el filtrado
17. Se abrió la columna y se añadió 40µl de agua Milliq. Se puso la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 12.000 x g durante 4 min y se recogió el filtrado conteniendo el ADN purificado

5.4.2. Determinación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó mediante la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Se puede determinar la concentración de los ácidos nucleicos, considerando que 1 unidad de absorción a 260 nm equivale a 50 µg de ADN de doble cadena por ml y a 40 µg de ARN por ml, mediante las siguientes fórmulas:

$$(\text{ADN}) = A_{260 \text{ nm}} \times ((50 \text{ µg ARN/ml}) / A_{260 \text{ nm}}) \times 1 \times D$$

$$(\text{ARN}) = A_{260 \text{ nm}} \times ((40 \text{ µg ARN/ml}) / A_{260 \text{ nm}}) \times 1 \times D$$

Siendo, l = paso de luz de la cuña en cm (normalmente 1 cm)

D = factor de dilución

$A_{260\text{ nm}}$ = absorancia a 260 nm

La relación entre $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ permite determinar la calidad (pureza) de los ácidos nucleicos. Se considera que el ADN puro tiene una relación de 1.8, aunque el rango de relaciones comprendidas entre 1.6 y 1.8 se consera un buen grado de pureza de las muestras. De la misma manera, el ARN puro tiene una relación de 2, y consideramos un buen grado de pureza el rango de relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.

Procedimiento utilizando un sistema NanoDrop ND-1000:

1. Limpiar la superficie del sistema de retención de muestra del microespectrofotómetro con 2 μl de agua deionizada RNasa-free en la superficie óptica inferior. Luego pasar un paño especial Kimwipe.
2. Abrir el software de NanoDrop y seleccionar el módulo de ácidos nucleicos.
3. Inicializar el espectrofotómetro añadiendo 2 μl de agua deionizada RNasa-free en el NanoDrop. Limpiar con Kimwipe.
4. Realizar una medida de blanco con 2 μl de agua deionizada RNasa-freeLimpiar con Kimwipe.
5. Medir la muestra de ácido nucleico añadiendo 2 μl .

5.4.3. Pirosecuenciación del ADN bacteriano

La estructura y diversidad de las poblaciones microbianas se determinará mediante el análisis genético masivo de la microbiota digestiva usando pirosecuenciación, a través de la amplificación de fragmentos de la región V2-V3 del ARNr de la región 16S utilizados para taxonomía de bacterias. Se utilizarán "Titanium Fusion Primers" (Roche. Technical Bulletin No. 013-2009), necesarios en el sistema GS Junior de Roche. A estos primers se les añadirán previamente los adaptadores A y B del sistema Titanium (Roche) los cuales permitirán la unión de los amplicones obtenidos a las microbolas de captura así como su secuenciación. Además, al primer forward se le añadirá una secuencia identificativa distinta de 10 pares de bases (MID) que posteriormente servirá de "código de barras" para separar las distintas muestras. Cada muestra será amplificada y posterior purificada utilizando el sistema de esferas magnéticas AMPure XP, Agencourt-Beckman Coulter, Inc. La concentración se estimará utilizando el kit Quant-iT PicoGreen dsADN Assay (Invitrogen). Se mezclarán cantidades equimolares de todas las librerías generadas, utilizándose finalmente para su amplificación mediante emPCR con la Librería Lib-L y su secuenciación utilizando los PicoTiter Plates para el sistema Junior de Roche de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.4.4. Procesamiento y análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación

Las secuencias obtenidas en la pirosecuenciación se procesarán mediante la plataforma de análisis QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Las secuencias obtenidas en la pirosecuenciación se procesarán mediante la plataforma de análisis QIIME. Para ello, las secuencias de baja calidad serán eliminadas, se eliminará automáticamente la porción Axxx o Bxxx del amplicón durante el alineamiento de la

secuencia. Se utilizará la interfaz QIIME para identificar lecturas repetidas en bases de datos de metagenómica. Este análisis incorpora varios programas que ofrecen la capacidad de agrupamiento rápido de secuencias similares y de realizar filtrados. Cada una de las secuencias será asignada a una identidad potencial (OTUs) utilizando el clasificador UCLUST de taxonomía por consenso. La asignación taxonómica de las secuencias se realizará mediante la búsqueda de homologías entre la secuencia problema y las secuencias ya conocidas y depositadas en las bases de datos (p.e. GreenGenes o Silva), realizando la clasificación taxonómica de las secuencias hasta nivel de género, siempre que estas no sean demasiado cortas. Las estimaciones de diversidad entre poblaciones de microorganismos se llevarán a cabo según se describe en Caporaso y col. (2010). Básicamente, las diferencias en composición globales de las comunidades de bacterias entre cada par de muestras se determinarán mediante análisis de cluster con el método 'neighborjoining' por el uso del algoritmo UPGMA del software UniFrac (Lozupone y Knight, 2005). También se aplicará un análisis de cluster jerárquico basado en la abundancia de OTUs utilizando la similitud de Bray-Curtis y el algoritmo UPGMA en el software PAST (v1.90, Hammer y col. Palaeontologia Electronica (<http://paleo-electronica.org>, 2001). Se realizará un análisis UniFrac PCoA (análisis de Componentes principales) con los datos de abundancia de OTUs utilizando la matriz de varianza-covarianza implementado en QIIME. Las variaciones en la abundancia de OTUs y análisis de divergencia de especies para determinar la diversidad de la microbiota intestinal se compararán mediante análisis estadístico de una vía ANOSIM con PAST, y las diferencias en la abundancia se considerarán a una $P < 0,05$. Además, se determinarán estimadores de diversidad α y β como Chao1, ACE y Jackknife de riqueza de OTUs (diversidad) para cada sujeto.

5.5. Análisis estadístico

La abundancia relativa de cada OTU (taxones) se comparó mediante una prueba de Wilcoxon con una corrección de continuidad utilizando el paquete de software *Explicitet* específicamente dirigido al análisis de datos de microbiomas. El estudio de la población dentro de la muestra y entre muestras fue evaluado mediante las α y β diversidades a través de *QIIME*, respectivamente. La α diversidad se determinó mediante dos tipos de diversidad: la riqueza, que se refiere a cuántos tipos diferentes de organismos están presentes en la muestra; Y la uniformidad, que se refiere a como de uniforme es una muestra. Ambos tipos de alfa-diversidades se estimaron mediante un *t*-test no paramétrico con un número predeterminado de permutaciones Monte Carlo de 999. La β -diversidad, se estimó por el método estadístico *ANOSIM* con 99 permutaciones y se resumió en un *PCoA*. La prueba *ANOSIM* compara la media de las disimilitudes clasificadas dentro de los grupos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software *SPSS v.18.0* (*SPSS inc*, Chicago, Illinois, USA), considerando un nivel de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Las diferencias en las características clínicas entre dos grupos se analizaron mediante la prueba *U* de Mann-Whitney. Las diferencias entre los tres grupos se analizaron utilizando *Kruskal-Wallis* seguido de un test *Post-hoc* de *Bonferroni*. El coeficiente de correlación de *Spearman* se calculó para estimar las correlaciones lineales entre variables. Se realizó un análisis de regresión lineal para identificar las bacterias individuales como predictores independientes de la zonulina sérica y los niveles de *HbA1c* en los tres grupos de estudio. Un valor de $p < 0,05$ se designó como alcanzando significación estadística.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. DIETA

Basándonos en los datos del cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (Anexo 1), los niños sanos y aquellos con DM1 y MODY 2 tuvieron una actividad física y un perfil dietético similares. El cuestionario incluyó cuatro posibles respuestas con respecto a la dieta prescrita: siempre, la mayor parte del tiempo, rara vez, o nunca. El análisis de los cuestionarios no mostró diferencias significativas en los patrones de consumo de trigo, arroz, verduras, pescado o carne entre los grupos de estudio, aunque los niños con ambos tipos de diabetes tuvieron una restricción en los hidratos de carbono de absorción rápida (alimentos hechos con harina blanca y azúcar refinado).

2. ANÁLISIS DE VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y BIOQUÍMICAS

Las principales características clínicas y bioquímicas de los tres grupos de estudio se muestran en la Tabla 1. Aparte de los niveles de glucosa y HbA1c, que fueron significativamente mayores en los niños con DM1 y MODY2 en comparación con los niños sanos, no se observaron otras diferencias significativas en el análisis de variables entre los grupos. No se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de HbA1c entre los niños DM1 y MODY2.

Además, debido a que todos los grupos de estudio fueron pareados por el tiempo de lactancia materna y el tipo de parto no se observaron diferencias significativas en estas variables.

Tabla 1. Variables antropométricas y bioquímicas en niños sanos, con DM1 y con MODY 2.

	Controles sanos	DM1	MODY2	P
N	13	15	15	
N varones/mujeres	7/6	7/8	7/8	
Parto vaginal/ Cesárea	8/5	10/5	10/5	
Edad al diagnóstico (años)		7.35±1.76 ^a	6.91±1.40 ^a	0.455
Tiempo desde el diagnóstico (años)		5.68±1.84 ^a	6.10±1.97 ^a	0.551
Tiempo de lactancia materna (meses)	6.58 ± 2.32 ^a	6.41 ± 2.81 ^a	6.54±3.2 ^a	0.911
Edad (años)	12.25 ± 2.92 ^a	12.56 ± 3.59 ^a	13.06± 3.20 ^a	0.654
IMC (kg/m²)	17.35 ± 1.82 ^a	17.89 ± 2.01 ^a	18.23±1.90 ^a	0.430
Peso (kg)	37.35 ± 9.0 ^a	38.32 ± 8.92 ^a	36.91±7.72 ^a	0.765
Peso al nacer (kg)	3.19 ± 0.45 ^a	3.28± 0.38 ^a	3.22±0.55 ^a	0.249
HbA1c (%)	4.47 ± 0.21 ^a	6.26 ± 0.38 ^b	6.11±0.33 ^b	0.001
Triglicéridos (mg/dL)	52.67 ± 9.43 ^a	53.50 ± 10.15 ^a	53.88±9.88 ^a	0.843
Colesterol (mg/dL)	153.88 ± 14.64 ^a	153.62 ± 16.87 ^a	154.5±17.9 ^a	0.920

Los valores se presentan como medias ± SD. El valor de P en la última columna se basó en la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para comparar los grupos entre sí. Los valores en una fila con diferentes letras son significativamente diferentes P <0,05 (Prueba post-hoc de Bonferroni)

3. CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN

Se obtuvieron un total de 366.359 lecturas de las 43 muestras fecales analizadas. Después del filtrado, el número medio de secuencias de alta calidad obtenidas por muestra fue de 8519.98 ± 5307.31 . El número total de OTUs identificados con una abundancia relativa superior al 1% en al menos cuatro muestras (97% de similitud de corte) fue de 3469.

Antes de evaluar las medidas de diversidad alfa y beta, las muestras se normalizaron a 3000 seq, lo que correspondía al número más bajo de lecturas de calidad obtenidas de cualquier muestra individual en el conjunto de datos. Con respecto al número de OTUs, los DM1 tuvieron menor número de OTUs que los MODY2 y controles sanos, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Los estimadores de riqueza de la comunidad (Chao) y de diversidad (índice de Shannon) entre los tres grupos de estudio se resumen en la FIG 1. El índice de Chao de cada grupo sugiere una riqueza bacteriana similar en las muestras fecales de los tres grupos de estudio. Con respecto al índice de Shannon hubo una disminución significativa en la diversidad de la microbiota de los niños DM1 con respecto a los controles sanos, pero no se encontraron diferencias en la alfa diversidad entre los niños sanos y MODY2 y los grupos DM1 y MODY2 (FIG 1).

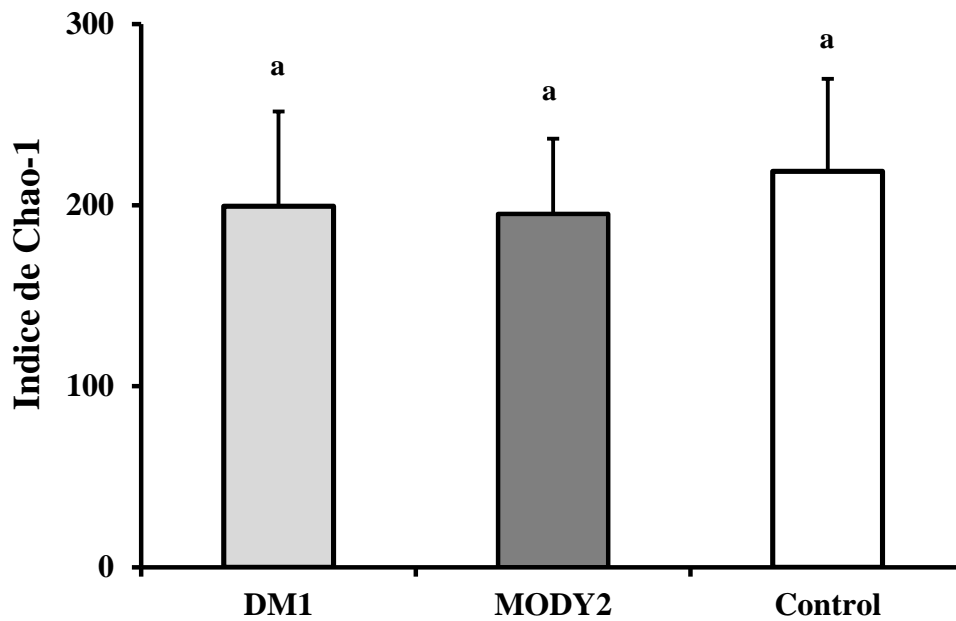
Las curvas de rarefacción de los OTUs observados calculadas a una distancia del 3% alcanzaron para todas las muestras una meseta a una profundidad de secuenciación de 100 secuencias por muestra (FIG 2), lo que indica que nuestro análisis habría

detectado la mayor parte de la diversidad microbiana y no se habrían encontrado más filotipos aumentando la profundidad de secuenciación.

Con respecto a la beta diversidad de la microbiota intestinal entre los tres grupos de estudio, se realizó un análisis de componentes principales de la matriz de *distancia* filogenética *Unifrac ponderada* (UniFrac (PCoA)) para comparar la estructura general de la microbiota intestinal de todas las muestras basándonos en la abundancia relativa de OTUs con un 97% de similitud. Los niños del grupo DM1 mostraron un patrón diferente de agrupamiento en comparación con los grupos sanos y MODY2 ($p= 0.02$ y $p= 0.03$ respectivamente), lo que indica que existen diferencias claras en sus perfiles de microbiota intestinal (FIG 3A y FIG 3B). No obstante, no todas las muestras del grupo control estuvieron totalmente separadas del grupo MODY2 en las combinaciones de coordenadas, como lo demuestran las coordenadas de los componentes principales, que representaron el 14.50% y el 26.34% de las variaciones totales. ANOSIM con permutaciones no reveló diferencias significativas entre los grupos ($p= 0.27$), lo que indica que no hay separación notable entre los dos grupos (FIG 3C).

FIG 1. Estimación de los índices de riqueza (Chao1) (A) y diversidad (Shannon) (B) entre las comunidades microbianas de las heces de los DM1, MODY2 y sanos. El estimador de riqueza Chao y el estimador de diversidad Shannon se calcularon a una distancia del 3%. Los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes, $p < 0.05$, ANOVA seguido de una Prueba de Comparación Múltiple de Bonferroni.

A



B

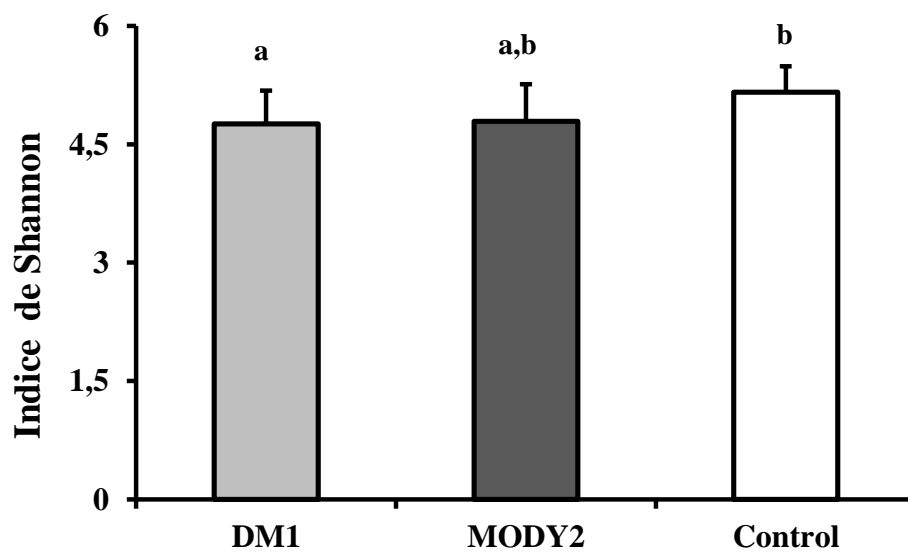


FIG 2. Curvas de rarefacción de cada muestra. Todas las curvas de rarefacción se calcularon al nivel de similitud del 97% con los datos de pirosecuenciación de la microbiota de los grupos DM1, MODY2 y controles sanos.

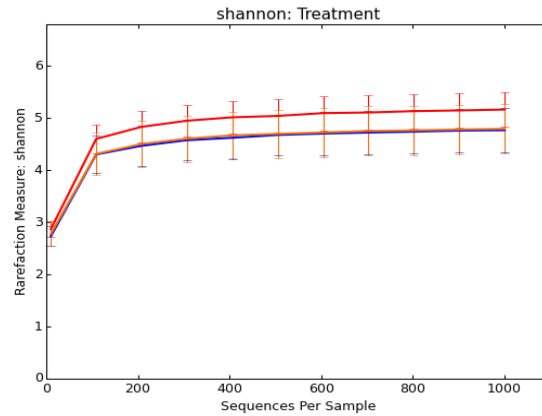
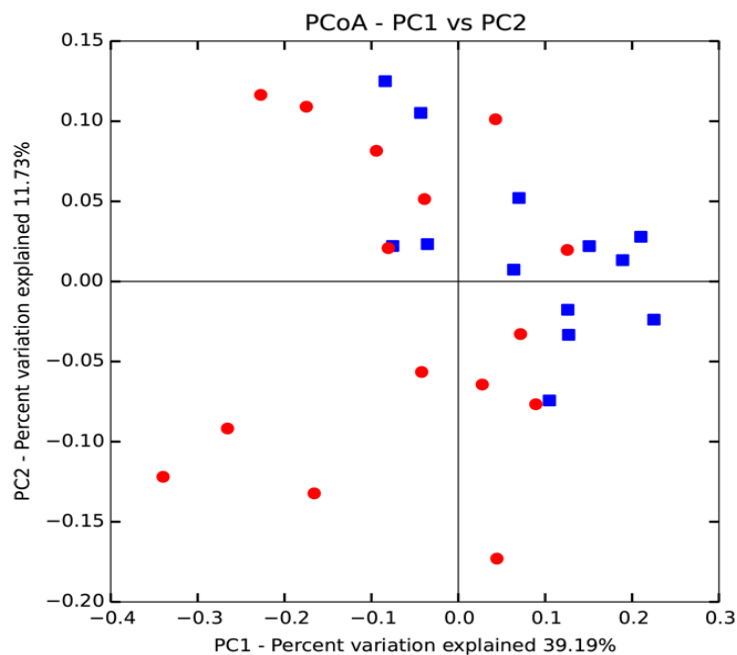
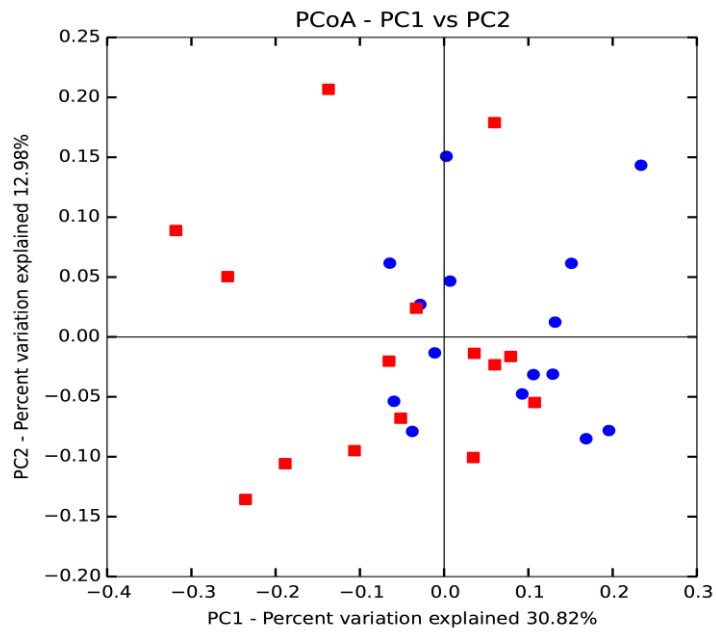
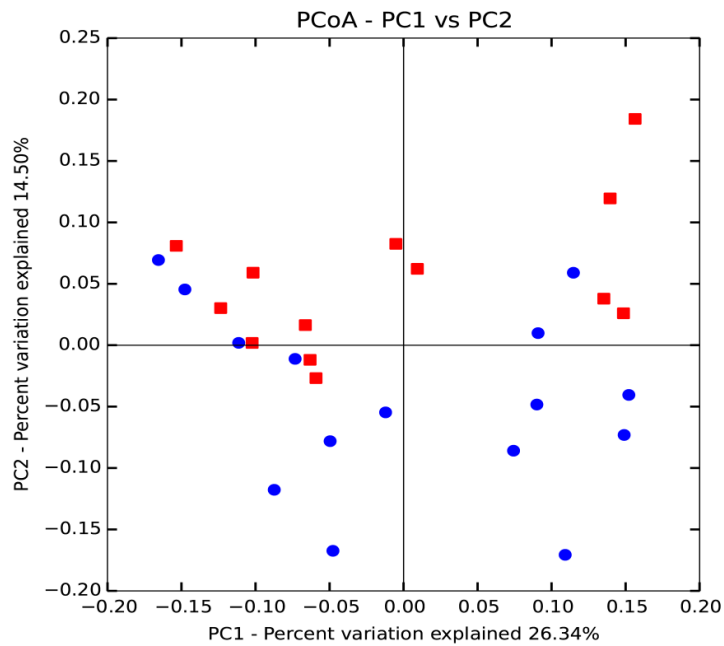


FIG 3. Agrupamiento de las comunidades bacterianas fecales de los diferentes grupos de estudio mediante *análisis de componentes principales (PCoA)* de la matriz de *distancia* filogenética *Unifrac ponderada*. Cada punto corresponde a una comunidad codificada según el grupo de niños. El porcentaje de variación explicado por las coordenadas principales se indica en los ejes. (A) DM1 (puntos rojos) vs Controles sanos (puntos azules); DM1 (puntos azules) vs MODY2 (puntos rojos) y (C) MODY2 (puntos azules) vs Controles sanos (puntos rojos).

A



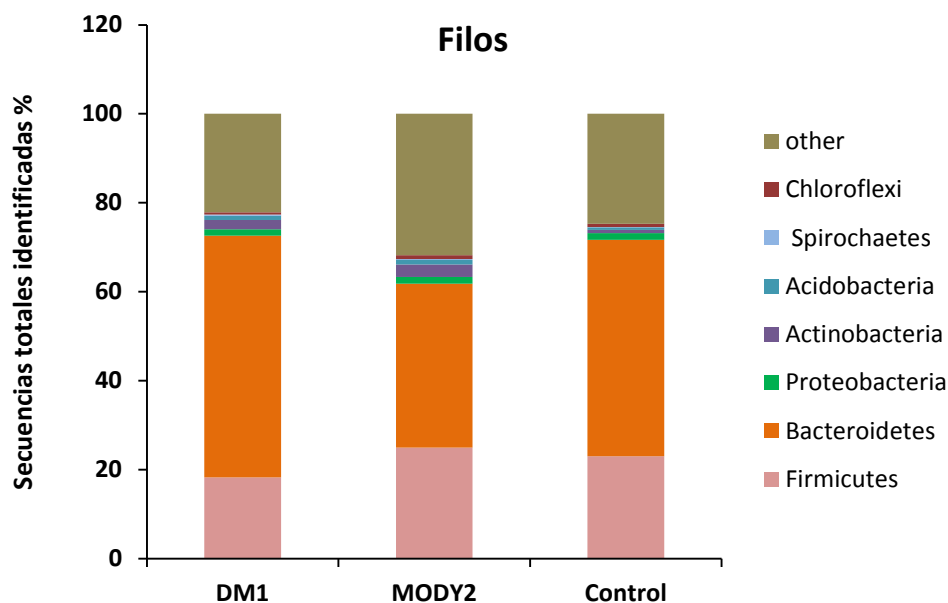
B**C**

3.1. Comparaciones taxonómicas de la microbiota fecal en los tres grupos de estudio.

Para comparar las comunidades de bacterias intestinales entre los tres grupos de estudio, se investigó la abundancia relativa de cada taxón de bacterias a nivel de filo,

familia y género en las muestras fecales recogidas. Los filos dominantes en todos los grupos fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes* seguidos por Proteobacteria y Actinobacteria. El grupo DM1 mostró un aumento significativo en la abundancia de *Bacteroidetes* (54.34% DM1 vs 36.87% MODY2 y 48.61% Sanos, $p<0.001$) y una disminución significativa en la abundancia de *Firmicutes* (18.25% DM1, 24.95% MODY2 y 23.04% Sanos, $p<0.001$) y Proteobacteria (1.47% DM1 frente a 1.51% MODY2 y 1.53% Sanos, $p<0.001$) en comparación con los grupos MODY2 y sanos. En el grupo MODY2, la frecuencia de *Bacteroidetes* fue significativamente menor que en el grupo control sano ($p<0.001$). El resto de la población bacteriana perteneció a otros 5 filos que tenían una abundancia relativa inferior al 1% (FIG 4). Además, la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* fue significativamente menor en DM1 con respecto a los grupos control y MODY2 (0.33% DM1, 0.67% MODY2 y 0.46% Sanos, $p<0.05$).

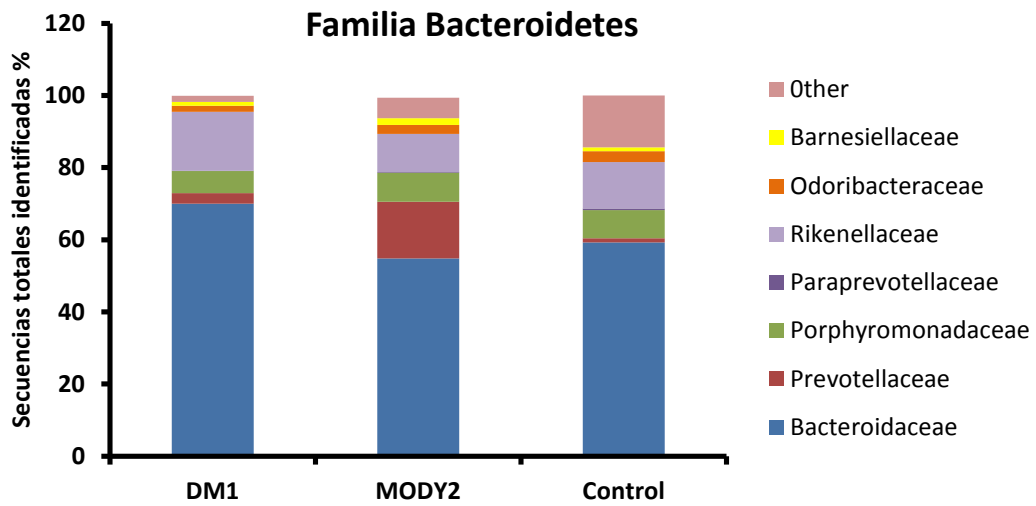
FIG 4. Distribución a nivel de filo de bacterias en muestras fecales de heces de DM1, MODY2 y controles sanos. Los datos se muestran como un porcentaje del total de secuencias identificadas por grupo.



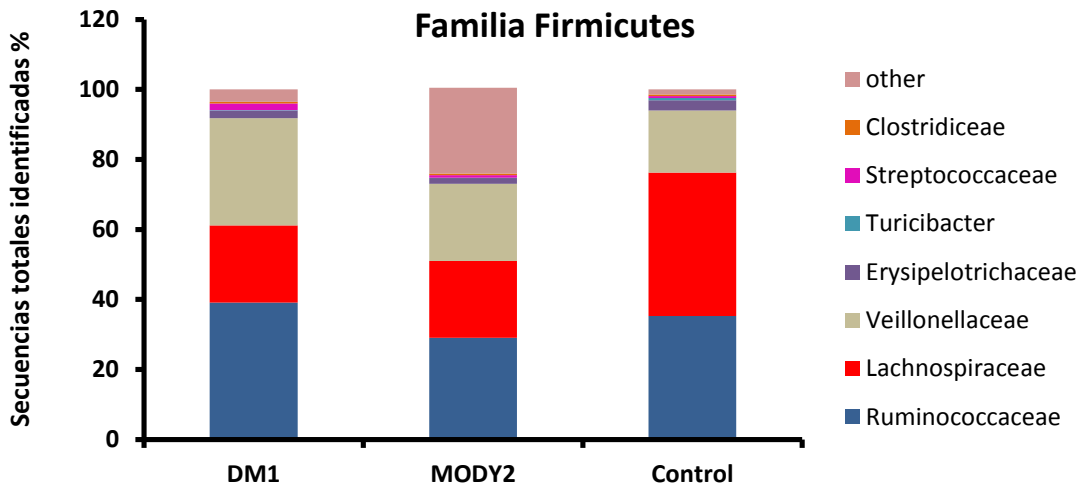
A nivel de familia y género, también hemos encontrado diferencias significativas en la composición microbiana entre los grupos de estudio. Un total de 16 familias fueron identificadas entre las 43 muestras fecales analizadas. Dentro de los *Bacteroidetes*, dos familias fueron significativamente más abundantes en DM1 en comparación con los grupos MODY2 y controles sanos: Bacteroidaceae (72.02% DM1, 54.82% MODY2 y 59.24% Sano, $p < 0.001$) y Rikenellaceae (16.33% DM1, 10.55% MODY2 y 12.85 % Sanos, $p = 0.001$). Por otro lado, *Prevotellaceae* (2.90% DM1, 15.68% MODY2 y 1.12% Sanos, $p < 0.001$) fue significativamente mayor en el grupo DM1 que en el grupo control y *Prevotellaceae* fue significativamente mayor en el grupo MODY2 que en el grupo DM1 ($p < 0.05$). Con relación a los *Firmicutes*, otras tres familias fueron significativamente más altas en DM1 en comparación con los grupos MODY2 y sanos: Ruminococcaceae (39.09% DM1, 29.01% MODY2 y 35.23% Sanos, $p < 0.001$), Veillonaceae (30.59% DM1, 22.08% MODY2 y 17.78 % Sanos, $p < 0.05$) y Streptococaceae (1.89% DM1, 0.73% MODY2 y 0.54% Sanos, $p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas a nivel de familia entre MODY2 y los controles sanos excepto en la abundancia de Ruminococcaceae ($p < 0.001$) (FIG 5).

FIG 5. Clasificación microbiana a nivel de familia en las muestras fecales de los grupos DM1, MODY2 y controles sanos. Los datos se muestran como un porcentaje del total de secuencias identificadas por grupo. A) géneros *Bacteroidetes*, b) géneros *Firmicutes* y c) géneros *Proteobacteria*.

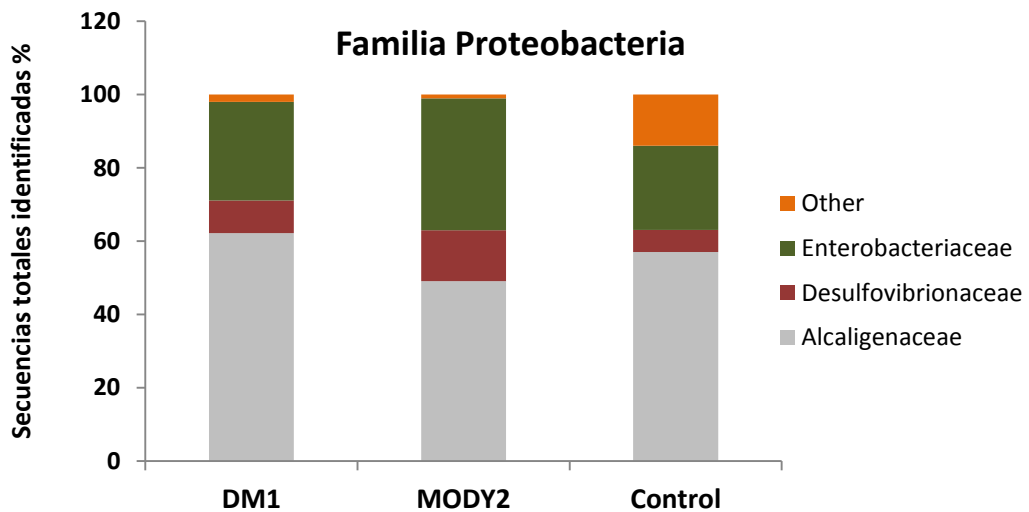
A



B



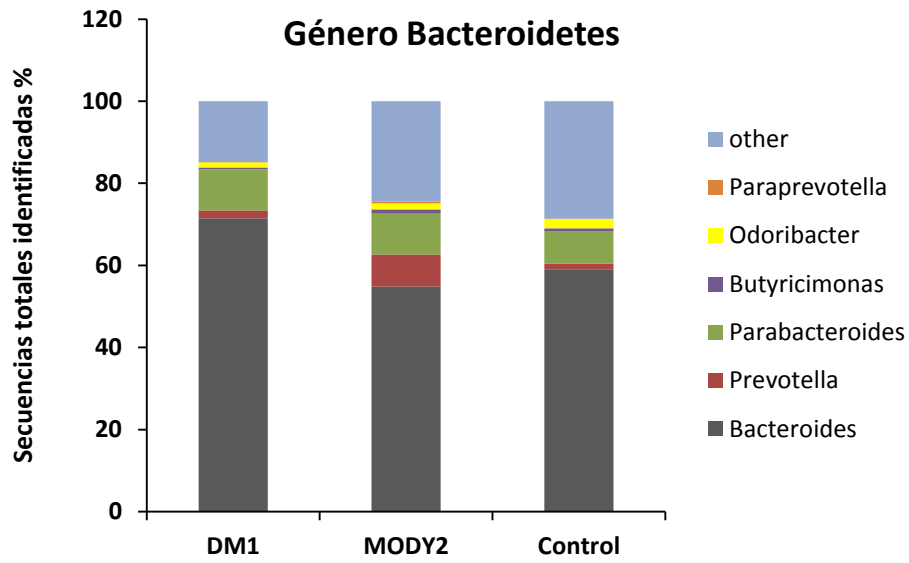
C



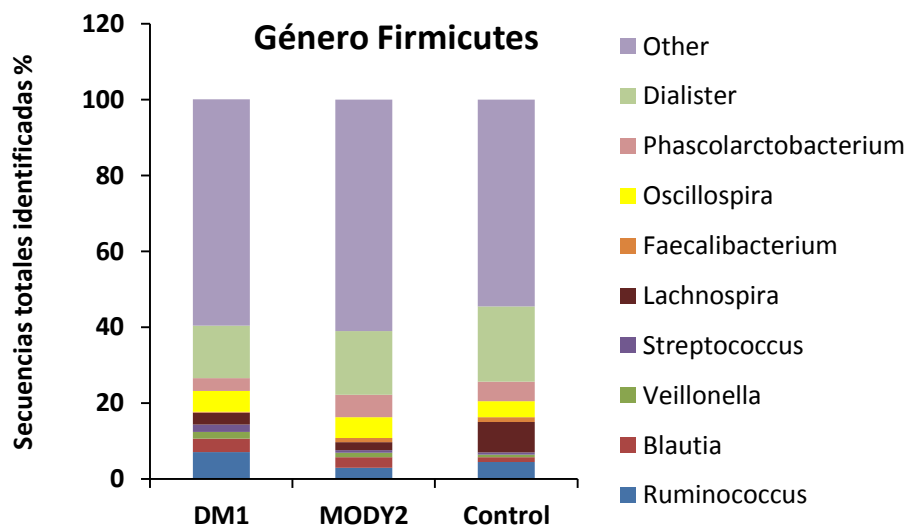
Con respecto a los géneros, siete fueron diferencialmente abundantes entre los grupos. Dentro de los *Bacteroidetes*, el grupo DM1 estuvo significativamente enriquecido con secuencias atribuidas al género *Bacteroides* (71.48% DM1, 54.81% MODY2 y 59.06% Sanos, $p < 0,001$), mientras *Prevotella* (1.96% DM1, 7.8% MODY2 y 1.37% Sanos) fue significativamente más abundante en los grupos DM1 y MODY2 con respecto a los controles sanos ($p = 0.030$ y $p < 0.001$, respectivamente). En cuanto a *Firmicutes*, la abundancia relativa de cuatro géneros fue significativamente mayor en el grupo DM1 que en los grupos MODY2 y control: *Ruminococcus* (7.10% DM1, 2.95% MODY2 y 4.43% Sanos, $p < 0.001$), *Blautia* (3.50% DM1, 2.73 % MODY2 y 1.30% Sanos, $p = 0.005$), *Veillonella* (1.78% DM1, 1.25% MODY2 y 0.70% Sanos, $p = 0.007$) y *Streptococcus* (1.93% DM1, 0.64% MODY2 y 0.57% Sanos, $p = 0.012$). Además, dos géneros fueron significativamente menos abundantes en los grupos DM1 y MODY2 con respecto al grupo control: *Lachnospira* (3.15% DM1, 2.16% MODY2 y 7.99% Sanos, $p < 0.001$) y *Faecalibacterium* (0.21% DM1, 1.08% MODY2 y 1.26% Sanos, $p = 0.05$). Finalmente, dentro del género Proteobacteria, *Sutterella* fue significativamente más abundante en los DM1 comparado con MODY2 y niños sanos (62.19% DM1, 49.04% MODY2 y 51.07% Sanos, $p = 0.024$) (FIG 6).

FIG 6. Abundancia relativa de géneros bacterianos en la microbiota de los niños DM1, MODY2 y sanos. Los datos se muestran como un porcentaje del total de secuencias identificadas por grupo. A) géneros *Bacteroidetes*, b) géneros *Firmicutes* y c) géneros Proteobacteria.

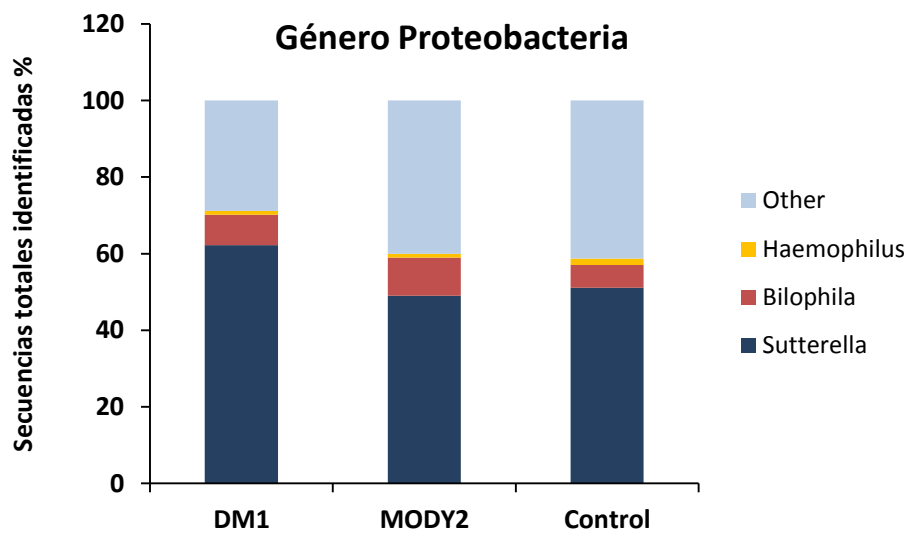
A



B



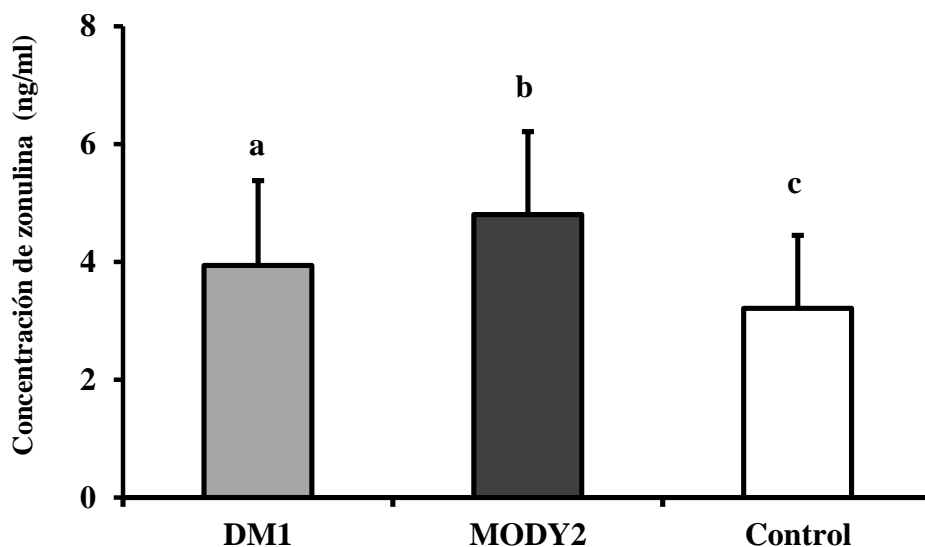
C



4. MEDIDA DE LOS NIVELES SÉRICOS DE ZONULINA

Se han medido los niveles séricos de zonulina tanto en niños con DM1 como en MODY2 y en controles sanos mediante ELISA. Los sujetos MODY2 mostraron niveles de zonulina sérica significativamente más altos (4.80 ± 1.41 ng/mg de proteína) que los DM1 (3.94 ± 1.44 ng / mg de proteína, $p= 0.02$) y los controles sanos (3.21 ± 1.24 ng/mg de proteína, $p<0.001$). Además, también se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de zonulina entre DM1 y sujetos controles ($p <0.05$) (FIG 7).

FIG 7. Diferencias en los niveles séricos de zonulina entre los grupos de estudio. Los grupos con diferentes de letras son estadísticamente diferentes, $p<0.05$.



5. RELACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN DE MICROBIOTA INTESTINAL, LOS NIVELES DE ZONULINA SÉRICA Y HbA1C.

Se encontró una correlación univariante significativa entre los cambios en la abundancia relativa de bacterias específicas a diferentes niveles de taxonómicos y los niveles séricos de zonulina y HbA1c en los grupos diabéticos (Tabla 2 y 3). No se encontraron correlaciones significativas en los controles sanos. El análisis de regresión

posterior, incluyendo todos los grupos bacterianos analizados, mostró que el aumento de *Bacteroides* ($p = 0.002$, $\beta = 0.995$, $r^2 = 0.94$) y la disminución de *Faecalibacterium* ($p = 0.041$, $\beta = -0.671$, $r^2 = 0.94$) y *Veillonella* ($P = 0.021$, $\beta = 0.636$, $r^2 = 0.93$) en el grupo DM1 y el aumento en *Prevotella* en el grupo MODY2 ($p = 0.002$, $\beta = 0.682$, $r^2 = 0.90$) estuvieron asociados con el aumento de los niveles séricos de zonulina. Por otro lado, el aumento de la abundancia de *Blautia* ($p = 0.043$, $\beta = 0.469$, $r^2 = 0.93$) y la disminución en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* ($P = 0.001$, $\beta = -0.947$, $r^2 = 0.91$) en los DM1 estuvieron asociados con los niveles de HbA1c presentes en dichos sujetos. Mientras, que en el grupo MODY2 sólo la disminución de *Ruminococcus* se asoció con los niveles de HbA1c ($p=0.003$, $\beta = -0.877$, $r^2=0.92$).

Tabla 2. Correlaciones entre la composición de la microbiota intestinal y los niveles séricos de zonulina en los grupos DM1 y MODY2.

Zonulina		
	DM1	MODY2
<i>Ruminococcus</i>	-0.162 (P=0.55)	-0,540 (P=0.036)
<i>Prevotella</i>	0.560 (P=0.37)	0.798 (P=0.037)
<i>Faecalibacterium</i>	-0.703 (P=0.027)	-0.540 (P=0.46)
<i>Bacteroides</i>	0.739 (P=0.0041)	0.350 (P=0.090)
<i>Veillonella</i>	0.570 (P=0.033)	0.704 (P=0.04)

Correlaciones realizadas mediante Rho (r) de Spearman. Los valores de P se indican entre paréntesis y la significación estadística se estableció a un valor de $P < 0.05$

Tabla 3. Correlaciones entre la composición microbiana intestinal y HbA1c en los grupos DM1 y MODY2.

HbA1c		
	DM1	MODY2
<i>Ruminococcus</i>	-0.362 (P=0.18)	-0.584 (P=0.025)
<i>Firmicutes to Bacteroidetes ratio</i>	-0.561 (P=0.029)	-0.332 (P=0.45)
<i>Blautia</i>	0.559 (P=0.038)	0.740 (P=0.79)
<i>Streptococcus</i>	0.068 (P=0.018)	0.441 (P=0.12)

Correlaciones realizadas mediante Rho (r) de Spearman. Los valores de P se indican entre paréntesis y la significación estadística se estableció a un valor de $P < 0.05$

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Este estudio describe y compara por primera vez la microbiota intestinal de pacientes con diabetes MODY2 con la flora bacteriana de individuos con DM1 y la de un grupo control de niños sanos. Tras la pirosecuenciación hemos encontrado diferencias significativas en el perfil bacteriano de las muestras de heces entre DM1, MODY2 y grupo control, pareados por edad, sexo, raza, IMC, vía del parto y duración de la lactancia materna, y HbA1c sólo en el caso de los grupos de diabéticos. Además hemos encontrado que la permeabilidad intestinal, determinada por los niveles séricos de zonulina, estaba significativamente aumentada en ambos grupos de diabéticos comparada con los controles sanos.

En este estudio, hemos observado una diversidad significativamente menor de la comunidad bacteriana dominante en el grupo de DM1 con respecto al grupo control. En cuanto a la diversidad en el grupo de MODY2 fue menor que en el grupo control y mayor que en el grupo de DM1, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos datos parecen sugerir que la hiperglucemia, tanto en DM1 como en MODY2, condiciona una pérdida de diversidad al compararlos con los sanos, pero que el componente de autoinmunidad en DM1 condiciona una mayor pérdida de diversidad. Por otra parte, en estudios anteriores, De Goffau et al, analizaron marcadores de DM1 en personas sanas encontrando que la diversidad microbiana era menor en muestras fecales de niños con dos o más autoanticuerpos asociados con esta enfermedad, que en niños con autoanticuerpos negativos, pareados por edad, sexo y genotipo de HLA (De Goffau M 2013). En otros dos estudios, niños en riesgo de DM1 fueron seguidos longitudinalmente desde el nacimiento y los autores describieron una disminución de la diversidad microbiana justo antes de la aparición de anticuerpos anti-islole y del debut de la enfermedad (Giongo A 2010, Kostic AD 2015).

Del mismo modo, el análisis de componentes principales de la matriz de distancia filogenética *Unifrac ponderada* indicó que el grupo de DM1 se agrupó separadamente cuando se comparó con los otros dos grupos de estudio, indicando que hay diferencias claras en sus perfiles de microbiota intestinal, probando la hipótesis de que la DM1 está asociada con cambios en la flora bacteriana colónica. Kostic et al encontraron que la disminución en la alfa diversidad en casos de DM1 podía ser causada por la relativa sobreabundancia de varios grupos tales como *Rikenellaceae* y los géneros *Ruminococcus*, *Blautia* y *Streptococcus* (Kostic AD 2015). Estos grupos de bacterias contienen especies que han sido caracterizadas como "patobiontes" (Chow J 2009), los cuales son miembros de la microbiota comensal que tienen la capacidad de llegar a ser patógenos. Por tanto, una disminución en la diversidad microbiana podría ser una señal distintiva de disbiosis.

Por otro lado, el análisis de pirosecuenciación de las secuencias génicas de 16S rARN mostró grandes diferencias significativas en la abundancia relativa de los filos, familias y géneros predominantes entre los grupos de estudio. En comparación con los controles sanos y los pacientes con MODY2, los niños con DM1 mostraron un aumento significativo en la abundancia relativa de los géneros *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, *Blautia* y *Streptococcus* y una disminución de la abundancia relativa de *Faecalibacterium* y *Lachnospira*, un género bacteriano que está a menudo disminuido en estados inflamatorios. Por otro lado los sujetos con MODY2 tienen un aumento significativo en la abundancia de *Prevotella* acompañado por una disminución significativa en *Ruminococcus* y *Bacteroides* en comparación con DM1 y grupo control.

A pesar de la gran variabilidad encontrada en la microbiota intestinal de sujetos con DM1, independientemente de la etnia, edad y geografía, todos los estudios han detectado *Bacteroides* como el principal género que lleva a la disbiosis relacionada con

DM1. El aumento significativo en la abundancia de *Bacteroides* encontrado por nosotros en las comunidades intestinales de DM1 comparado con los controles sanos, ha sido también observado en niños prediabéticos finlandeses y mejicanos (Mejía-León ME 2014; Brown CT 2011). Estudios previos han sugerido que la actividad de *Bacteroides* en la síntesis y degradación de la mucina podrían contribuir al desarrollo de DM1, mediante el adelgazamiento de la capa mucosa, lo que llevaría a un aumento de la permeabilidad intestinal y la inflamación (Tlaskalova-Hogenova H 2011). Esto se basa en que *Bacteroides* fermentaría la glucosa y el lactato en ácidos grasos de cadena corta como el propionato, acetato y succinato. Estos ácidos grasos de cadena corta, al contrario que el butirato, no inducen la síntesis de mucina (Paassen BN 2009), lo que resultaría en una disminución de los ensamblajes de las uniones estrechas, generando por tanto un aumento de la permeabilidad intestinal (Brown CT 2011).

Otro género cuya abundancia relativa fue significativamente más elevada en el grupo de DM1 fue *Veillonella*, la cual compite por el lactato como fuente de energía con las bacterias productoras de butirato, produciendo propionato de la fermentación láctica en vez de butirato. Esto disminuiría la síntesis de mucina y aumentaría la permeabilidad paracelular alterando las uniones estrechas (Brown CT 2011, Dietert RR 2014)

Por otro lado, *Faecalibacterium*, que estuvo significativamente disminuido en los sujetos con DM1, es una bacteria productora de butirato (Duncan SH 2002; Duncan SH 2004) con propiedades antiinflamatorias (Sokol H 2008). El butirato regula la integridad epitelial, por lo que una abundancia menor de bacterias productoras de butirato en la DM1 como *Faecalibacterium*, podría contribuir a una mayor permeabilidad intestinal (Peng L 2009; Li N 2010). Por tanto una menor producción de butirato puede estar asociada con la activación inmune intestinal en la DM1 (Li N 2010; Vaarala O 2012).

Hemos encontrado también un aumento significativo en la abundancia relativa de *Prevotella* en MODY2 comparado con DM1 y controles, sin disponer de datos sobre la microbiota de estos pacientes en la literatura para poder compararlos. *Prevotella* es una bacteria degradadora de mucina, lo que podría sugerir una disminución de mucina en la capa epitelial intestinal de los niños con diabetes monogénica. En este estudio, el aumento significativo en la abundancia de *Prevotella* sugiere una evolución hacia un nicho degradador de mucina en el grupo de MODY2. La degradación de mucina por las bacterias alteraría la protección de la superficie mucosa del huésped y potencialmente llevaría a la disrupción en la barrera epitelial, aumentando la permeabilidad intestinal y facilitando la traslocación bacteriana (Bischoff SC 2014).

De acuerdo con estos datos, este estudio ha mostrado una correlación positiva significativa entre los niveles de zonulina y la abundancia relativa de *Bacteroides* y *Veillonella* y una correlación negativa significativa con *Faecalibacterium* en niños con DM1. De igual modo, hemos encontrado una correlación positiva significativa entre zonulina y *Prevotella* en el grupo de MODY2. La zonulina regula la permeabilidad intestinal mediante la apertura de las uniones estrechas intercelulares, habiendo sido descritos unos niveles altos de la misma en diversas patologías autoinmunes como celiaquía o enfermedad inflamatoria intestinal, así como en sujetos obesos con intolerancia oral a la glucosa (Moreno-Navarrete J 2012). En un estudio reciente se han encontrado una zonulina sérica mayor en niños obesos que en sanos, sin correlación con la insulínresistencia (Kume T 2016).

Ésta es la primera vez que se describe un aumento de permeabilidad intestinal (medida por los niveles séricos de zonulina) en los niños con MODY2, coincidiendo con ello el predominio de *Prevotella* en su perfil bacteriano. Puesto que la diabetes MODY2 es una alteración genética que sólo produce hiperglucemias moderadas

mantenidas, nuestros hallazgos sugieren que la hiperglucemia por sí misma podría llevar a un perfil bacteriano degradador de mucina, con el consiguiente aumento de permeabilidad intestinal.

La alteración de la barrera intestinal está asociada con varios desórdenes intestinales como la enfermedad celiaca (Vogelsang H 1998, Fasano A 2012; Watts T 2005), síndrome de intestino irritable (Ghoshal UC 2012) y enfermedad inflamatoria intestinal (Vetrano S 2008; Zeissig S 2007). Además, tanto en modelos animales como en estudios humanos de DM1 ha sido descrita una disminuida integridad de la barrera intestinal con aumento de la permeabilidad (Fasano A 2012; Watts T 2005). El posible mecanismo sería que los antígenos bacterianos y toxinas de los microorganismos pueden ser detectados por moléculas relacionadas con las células epiteliales que forman las uniones estrechas, como la zonulina, alterando su actividad con el consiguiente aumento de la permeabilidad intestinal y traslocación bacteriana (Vaarala O 2013). Esta situación permite a los antígenos lumenales escapar del intestino y promover la respuesta autoinmune dirigida contra los islotes. Por tanto, pensamos que la permeabilidad intestinal puede jugar un papel importante en el desarrollo de DM1.

Por otro lado, este estudio mostró que la abundancia relativa de *Blautia* y el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* se correlacionaban positivamente con HbA1c en niños con DM1. Mientras que en MODY2, el nivel de HbA1c se correlacionó negativamente con la abundancia de *Ruminococcus*. *Blautia* tiene la función de transformar los carbohidratos y proteínas no digeridos en ácido acético, el cual puede producir energía para el cuerpo humano. Cui-Juan et al también describieron que *Blautia* estaba correlacionado positivamente con HbA1c (Qi CJ 2016) y Kostic et al indicaron que la abundancia de *Blautia* estaba asociada positivamente con la glucemia en niños con DM1 (Kostic AD 2015).

En particular, Cui-Juan et al sugirieron que la microbiota intestinal tiene la capacidad de regular la diferenciación de células T, deduciendo que *Blautia* podría influir en el desarrollo de DM1 por medio de la regulación de la autoinmunidad. Otros estudios han mostrado que la abundancia de *Blautia* estaba aumentada en enfermedades como síndrome de intestino irritable, hígado graso no alcohólico y enfermedad de Crohn (Qi CJ 2016).

En contraste con la situación en controles sanos y MODY2, observamos un aumento significativo en la abundancia relativa de *Bacteroidetes* y una disminución significativa de *Firmicutes* en niños con DM1. Nuestros datos muestran un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* significativamente menor en niños con DM1 y una correlación negativa entre este ratio y la HbA1c, lo que ayudaría a explicar el nivel glucémico de este grupo. Resultados similares han sido previamente publicados por nuestro grupo en un estudio preliminar donde comparamos niños con DM1 y controles sanos (Murri M 2013). De acuerdo con esto, Giongo et al observó que el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* en sujetos con DM1 cambiaba durante los primeros 6 meses tras el nacimiento, antes del desarrollo de la enfermedad autoinmune. Además, estos autores mostraron una disminución sucesiva de *Firmicutes* y un aumento de *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal a lo largo del tiempo hasta la aparición de diabetes (Giongo A 2011).

En el mismo sentido, Knip et al indicaron que estos cambios en los pacientes con DM1 parecen originarse antes de la aparición de autoanticuerpos predictores de DM1, sugiriendo que la microbiota intestinal en estos pacientes podría estar involucrada en la progresión desde la autoinmunidad frente a la célula β hasta la enfermedad manifiesta (Knip M 2016).

También se han descrito ratio *Bacteroidetes/Firmicutes* alterados en casos de obesidad con abundancia de *Firmicutes* (Armougom F 2009) y en enfermedad de Crohn con disminución de ambos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Willing B 2009).

Por último, la abundancia de *Ruminococcus* tiene diferente papel en DM1 y MODY2. En los niños con MODY2 hemos observado una disminución significativa en la abundancia de *Ruminococcus* comparada con controles y una fuerte asociación negativa con HbA1c. Las bacterias intestinales productoras de butirato pueden jugar un importante papel en la regulación de la glucemia y el metabolismo lipídico, como es mostrado por estudios de trasplante de microbiota fecal. Dichas bacterias juegan un papel clave en el aporte energético intestinal humano, por la producción de butirato, la principal fuente de energía del epitelio colónico. Además, ha sido descrito que el butirato mejora la sensibilidad a la insulina (Hague A 1996).

En niños con DM1 el aumento significativo en este género de bacterias puede contribuir a la patogénesis de la DM1 mediante la disminución de las células Treg, que protegen contra la diabetes. Esto es importante porque un alto nivel de células Treg esplénicas está asociado claramente con protección contra la diabetes en ratones NOD. Un estudio previo puso de manifiesto que los *Ruminococcus*, que fueron más abundantes en ratones NOD, se correlacionaron negativamente con una edad más retrasada del debut diabético, lo que sugiere un papel de estas bacterias en el desarrollo de diabetes (Krych Ł1 2015).

En conclusión, las diferencias en la microbiota intestinal entre pacientes con DM1 y MODY2 así como las diferencias encontradas en ambos grupos con respecto a los controles sanos, indican una diferente influencia de la microbiota intestinal en ambos tipos de diabetes.

Mientras que el perfil de microbiota que hemos encontrado asociado a DM1, caracterizado por una diversidad bacteriana reducida, un predominio de *Bacteroidetes* en cuanto a filos y un aumento en la proporción de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta distintos a butirato, apoyan la idea de la existencia de una microbioma “autoinmune” en estos pacientes, implicado en la alteración de la permeabilidad intestinal encontrada en los mismos. Sin embargo, aunque esta asociación no implica necesariamente causalidad, podría tener una implicación clínica significativa en el tratamiento futuro de pacientes diabéticos a través de la modulación de la microbiota intestinal. Estudios de intervención usando trasplante de microbiota fecal para normalizar la estructura de la microbiota intestinal en niños con alto riesgo de DM1, podría ser útil para demostrar el papel etiológico de la disbiosis en DM1.

Los niños con MODY2 tienen una microbiota intestinal marcada por un predominio de bacterias degradadoras de mucina y una pérdida de bacterias productoras de butirato, esenciales para mantener la integridad intestinal. Estos hallazgos en el perfil bacteriano de MODY2 abren una nueva línea de investigación. Esta enfermedad presenta alteraciones leves sin precisar tratamiento salvo en el embarazo, momento en que por empeoramiento del control metabólico precisan insulino terapia. Se han descrito cambios en la microbiota de embarazadas (Koren O 2012, Gohir W 2015) pudiendo estar relacionada con los cambios metabólicos del embarazo. Sería interesante estudiar la microbiota en embarazadas afectas de MODY2 y su relación con el empeoramiento del control metabólico, así como si existe aumento de la permeabilidad intestinal en las mismas.

La limitación de este estudio es el pequeño tamaño de cada uno de los grupos, si bien se ajustan al cálculo del tamaño muestral y la potencia estadística del estudio es suficiente para dar respuesta a la hipótesis planteada. Por otra parte, los grupos están

pareados en factores de confusión como el IMC, la edad, el tipo de parto, el tiempo de lactancia materna y la hemoglobina glicosilada en el caso de los diabéticos, lo que los hace homogéneos y da fortaleza a las diferencias encontradas.

Estos resultados han sido expuestos como comunicaciones y ponencias en congresos nacionales de endocrinología, tanto en pediatría como en adultos, y están en vías de publicación en revistas de alto impacto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1º) Los resultados muestran diferencias significativas entre la microbiota intestinal de DM1, MODY2 y sanos.

2º) La microbiota intestinal de DM1 tiene menor diversidad que el grupo control. La diversidad encontrada en MODY2 fue mayor que en DM1 pero inferior a en controles, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Estos datos parecen sugerir que la hiperglucemia, tanto en MODY2 como en DM1, condiciona una pérdida de diversidad al compararla con los sanos; si bien, el componente de autoinmunidad de DM1 determina una mayor pérdida de diversidad

3º) Los niños con MODY2 tienen una microbiota intestinal marcada por un predominio de bacterias degradadoras de mucina y una pérdida de bacterias productoras de butirato. El perfil de microbiota que hemos encontrado asociado a DM1, está caracterizado por un predominio de *Bacteroidetes* en cuanto a filos, y un aumento en la proporción de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta distintos a butirato.

5º) La abundancia relativa de *Blautia* y el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* se correlacionaron positivamente con HbA1c en niños con DM1. En MODY2, el nivel de HbA1c se correlacionó negativamente con la abundancia de *Ruminococcus*

6º) Además hemos encontrado que la permeabilidad intestinal, determinada por los niveles séricos de zonulina, estaba significativamente aumentada en ambos grupos de diabéticos comparado con los controles sanos

7º) Este estudio ha mostrado una correlación positiva significativa entre los niveles de zonulina y la abundancia relativa de *Bacteroides* y *Veillonella* y una

correlación negativa significativa con *Faecalibacterium* en niños con DM1, al igual que una correlación positiva significativa entre zonulina y *Prevotella* en el grupo de MODY2.

8º) Aunque estas asociaciones no implican necesariamente causalidad, podrían tener una implicación clínica significativa en el tratamiento futuro de pacientes diabéticos a través de la modulación de la microbiota intestinal. Estudios de intervención con trasplante de microbiota fecal podrían ser útiles para demostrar el papel etiológico de la disbiosis en DM1.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014; 6 (237): 237.
- Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005 Dec; 54 (Supl 2): S25-31.
- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-787
- Akerblom HK, Knip M: Putative environmental factors in Type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev*. 1998; 14(1): 31–67.
- Akira S, Takeda K. Toll like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511
- Alkanani AK, Hara N, Gottlieb PA, Ir D, Robertson CE, Wagner BD et al. Alterations in Intestinal Microbiota Correlate With Susceptibility to Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2015; 64 (10): 3510-20
- Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. Educated dendritic cells act as messengers from minor to naïve T helper cells. *Nat Immunology* 2004; 5: 615-622
- Amar J, Burcelin R, Ruidavets J, Cani P, Fauvel J, Alessi M, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1219–23
- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2012; 35 (Suppl 1): S64–71
- American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in Diabetes. *Diabetes Care* 2016; 39 (Suppl. 1)
- Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Møller K, Svendsen KD et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nut* 2010, 104: 1831–1838
- Antvorskov JC, Josefsen K, Engkilde K, Funda DP, Buschard K. Dietary gluten and the development of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2014; 57(9): 1770–80.
- Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D: Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 2009, 4: e7125

- Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 411–420
- Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M et al. ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 2008; 455: 808–812
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011; 331: 337–341.
- Atkinson MA, Maclaren NK, Holmes L, Scharp DW, Lacy PE, Riley WJ. The natural history and predictive value of Mr 64,000 autoantibodies for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1990; 3 (Suppl 1): 41-5.
- Atkinson MA, Chervonsky A. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease. *Diabetologia* 2012; 55: 2868–28677.
- Bäckhed F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2011; 58: 44-52
- Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3896-902.
- Bell RA, Mayer-Davis EJ, Beyer JW, D'Agostino RB, Lawrence JM, Linder B et al. Diabetes in non-Hispanic White youth: prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diab Care* 2009; 32 (Supp 2): S102-S111
- Bellin MD, Schwarzenberg SJ, Cook M, Sutherland DE, Chinnakotla S. Pediatric Autologous Islet Transplantation. *Current diabetes reports* 2015; 15 (10): 67
- Benson VS, Vanleeuwen JA, Taylor J, Somers GS, McKinney PA, Van Til L. Type 1 diabetes mellitus and components in drinking water and diet: a population-based, case-control study in Prince Edward Island, Canada. *J Am Coll Nutr* 2010; 29: 612–24.
- Besser RE, Shepherd MH, McDonald TJ, Shields BM, Knight BA, Ellard S et al. Urinary C-peptide creatinine ratio is a practical outpatient tool for identifying hepatocyte nuclear factor 1 α /hepatocyte nuclear factor 4- α maturity-onset diabetes of the young from long-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34: 286–291

- Beyerlein A, Chmiel R, Hummel S, Winkler C, Bonifacio E, Ziegler AG. Timing of gluten introduction and islet autoimmunity in young children: updated results from the BABYDIET study. *Diabetes Care* 2014; 37: e194–95
- Bian X, Wallstrom G, Davis A, Wang J, Park J, Throop A et al.: Immunoproteomic Profiling of Antiviral Antibodies in New-Onset Type 1 Diabetes Using Protein Arrays. *Diabetes* 2016; 65 (1): 285–96.
- Bilsborough J, Viney JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance and disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 300-309
- Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 189.
- Blomquist M, Juhela S, Erkkila S, Korhonen S, Simell T, Kupila A et al. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 511–515.
- Bosi E, Molteni L, Radaelli MG, Folini L, Fermo I, Bazzigaluppi E et al: Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2006, 49: 2824–2827.
- Bouskra D, Brezillon C, Berard M, Werts C, Varona R, Boneca IG et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 2008; 456: 507–510
- Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 1891–1900
- Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, et al. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *Plos One* 2011, 6: e25792.
- Brownlee M, Knight J, Dettmar PW, Pearson JP: Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. *Free Radic Biol Med* 2007, 43: 800–808.
- Brugman S, Klatter FA, Visser JT, Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Rozing J et al. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding

- diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* 2006; 49: 2105–2108
- Burke C, Steinberg P, Rusch D, Kjelleberg S, Thomas T. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 14288–14293
 - Byrne MM, Sturis J, Clement K, Vionnet N, Pueyo ME, Stoffel M et al. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycaemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest* 1994; 93: 1120–1130
 - Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V, Marzotti S et al. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 2005, 48: 1565–1575.
 - Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761–72
 - Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008, 57: 1470–1481
 - Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 2009; 15 (13): 1546-58.
 - Capuano M, Garcia-Herrero CM, Tinto N, Carluccio C, Capobianco V, Coto I et al. Glucokinase (GCK) mutations and their characterization in MODY2 children of southern Italy. *PloS one* 2012; 7 (6): e38906
 - Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Davis EA, Cinek O, Rosenbauer J et al. Birthweight and the risk of childhood-onset type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies using individual patient data. *Diabetologia* 2010; 53: 641–51.
 - Charkaluk ML, Czernichow P, Levy Marchal C. Incidence data of childhood onset type 1 diabetes in France during 1988-1997: the case for a shift toward younger age at onset. *Pediatr Res* 2002; 52 (6): 859-862
 - Chevre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanché H, Vionnet N, et al. Mutation screening in 18 Caucasian families suggests the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 1998; 41: 1017–1023

- Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of beta cell specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004; 53 (9): 2330-2337
- Chopra I, Hesse L, O'Neill AJ. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *J Appl Microbiol* 2002; 92, 4S-15S
- Chow J, Mazmanian SK. Getting the Bugs out of the Immune System: Do Bacterial Microbiota “Fix” Intestinal T Cell Responses? *Cell Host Microbe*. 2009; 5: 8–12
- Christoffersson G, Rodriguez-Calvo T and von Herrath M. Recent advances in understanding Type 1 Diabetes. *F1000Research* 2016; 27: 5
- Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by NOD1 enhances systemic innate immunity. *Nat. Med.* 2010; 16, 228–231
- Clement K, Pueyo ME, Vaxillaire M, Rakotoambinina B, Thuillier F, Passa P, Froguel P, Robert JJ, Velho G: Assessment of insulin sensitivity in glucokinase-deficient subjects. *Diabetologia* 1996; 39: 82–90
- Clemente Postigo M, Queipo Ortuno MI, Murri M, Boto Ordonez M, Perez Martinez P, Andres Lacueva C et al. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res* 2012; 53(5): 973-8
- Cnop M, Fougelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 2012; 18: 59–68.
- Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn’s disease. *Immunol Rev* 2005; 206: 277-295
- Conde Barreiro S, Rodríguez Rigual M, Bueno Lozano G, Lopez-Siguero JP, González Pelegrín B, Rodrigo Val MP et al. Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 1 en menores de 15 años en España. *An Pediatr (Barc)*. 2014; 81(3) :189.e1-189.e12
- Coperman JB, Cucca F, Hearne CM, Cornall RJ, Reed PW, Rønningen KS, et al. Linkage disequilibrium mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM7) to chromosome 2q31-q33. *Nat Genet* 1995; 9: 80–85

- Costa A, Besco´s M, Velho G, Chevre J, Vidal J, Sesmilo G et al. Genetic and clinical characterization of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 380–386
- Craig ME, Nair S, Stein H, Rawlinson WD. Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatr Diabetes*. 2013; 14(3): 149–58.
- Cutfield WS. Escher´s stairs and type 1 diabetes incidence in childhood. *Pediatr Diabetes* 2008; 9 (3 Pt 1): 175-177
- Dahlquist GG, Blom LG, Persson LA, Sandstrom AI, Wall SG. Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *BMJ* 1990; 300: 1302–06.
- Dahlquist G. Can we slow the rising incidence of childhood-onset autoimmune diabetes? The overload hypothesis. *Diabetologia*. 2006; 49 (1): 20–4.
- Davis-Richardson AG, Ardisson AN, Dias R, Simell V, Leonard MT, Kempainen KM et al. *Bacteroides dorei* dominates gut microbiome prior to autoimmunity in Finnish children at high risk for type 1 diabetes. *Front Microbiol* 2014; 5: 678
- de Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS* 2010; 33 (107): 14691–14696
- de Goffau M, Luopajarvi K, Knip M, Ilonen J, Ruohtula T, Härkönen T, et al. Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without. *Diabetes* 2013, 62: 1238–1244
- Decochez K, Keymeulen B, Somers G, Dorchy H, De Leeuw IH, Mathieu C et al. Use of an islet cell antibody assay to identify type 1 diabetic patients with rapid decrease in C-peptide levels after clinical onset. Belgian diabetes registry. *Diabetes Care* 2000; 23: 1072-8.
- Delli AJ, Lindblad B, Carlsson A, Forsander G, Ivarsson SA, Ludvigsson J et al. Type 1 diabetes patients born to immigrants to Sweden increase their native diabetes risk and differ from Swedish patients in HLA types and islet autoantibodies. *Pediatr Diabetes*. 2010; 11(8): 513–20.
- DeLong T, Wiles TA, Baker RL, Bradley B, Barbour G, Reisdorph R et al. Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science* 2016; 351: 711–14.

- DERI Study Group: Secular trends in incidence of childhood IDDM in 10 countries. Diabetes Epidemiology Research International Group. *Diabetes* 1990; 39: 858-864
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008; 18; 6(11): e280.
- DIAMOND Project Group, Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabet. Med.* 2006; 23: 857–866
- Dietert, RR. The microbiome in early life: Self-completion and microbiota protection as health priorities. *Birth Defects Res. Part B Dev Reprod Toxicol.* 2014; 101: 333–340)
- Dokheel TM. An epidemic of childhood diabetes in the United States? Evidence from Alleghen County, Pennsylvania, Pittsburgh Diabetes Epidemiology Research Group. *Diab Care* 1993; 16 (12): 1606-1611
- Dolpady J, Sorini C, Di Pietro C, Cosorich I, Ferrarese R, Saita D et al. Oral Probiotic VSL#3 Prevents Autoimmune Diabetes by Modulating Microbiota and Promoting Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Enriched Tolerogenic Intestinal Environment. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 7569431.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11971–11975
- Doria A, Yang Y, Malecki M, Scotti S, Dreyfus J, O’Keeffe C et al. Phenotypic characteristics of early-onset autosomal-dominant diabetes unlinked to known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes. *Diabetes Care* 1999; 22: 253–261.
- Doyle HA, Yang ML, Raycroft MT, Gee RJ, Mamula MJ. Autoantigens: novel forms and presentation to the immune system. *Autoimmunity* 2014; 47: 220–33.
- Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE, Flint HJ. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 5186–5190.

- Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 5810–5817
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent Met al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635–1638.
- Eehalt S, Dietz K, Willasch AM, Neu A. Epidemiological perspectives on type 1 diabetes in childhood and adolescence in Germany: 20 years of the Baden-wuerttemberg Diabetes Incidence Registry (DIARY). *Diabetes care* 2010;33(2):338–40
- Eide SA, Raeder H, Johansson S, Midthjell K, Søvik O, Njølstad PR et al. Prevalence of HNF1A (MODY3) mutations in a Norwegian population (the HUNT2 Study). *Diabet Med* 2008; 25:775–781
- Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986; 314 (21): 1360–8.
- Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 2012, 28: 539–543
- Ellard S, Beards F, Allen LI, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R et al. A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. *Diabetologia* 2000; 43, 250–253.
- Ellard S, Bellanne-Chantelot C, Hattersley AT. European Molecular Genetics Quality Network EMQN MODY group. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2008; 51: 546–53.
- Endesfelder D, zu Castell W, Ardisson A, Davis-Richardson AG, Achenbach P, Hagen M et al. Compromised gut microbiota networks in children with anti-islet cell autoimmunity. *Diabetes* 2014; 63: 2006–14.
- Estalella I, Garcia-Gimeno MA. Biochemical characterization of novel glucokinase mutations isolated from Spanish maturity-onset diabetes of the young (MODY2) patients. *J Hum Genet* 2008; 53:460–466
- EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 2000; 355 (9207): 873-876

- Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 2002; 298:1414-1427
- Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*. 2001; 12(13): 971–80.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 92, 48-55
- Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. 2011; 91(1): 151–75
- Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1258 (1): 25–3
- Feigerlova E, Pruhova S, Dittertova L, Lebl J, Pinterova D, Kolostova K et al. Aetiological heterogeneity of asymptomatic hyperglycaemia in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2006; 165: 446–452.
- Fisher MM, Watkins RA, Blum J, Evans-Molina C, Chalasani N, DiMeglio LA et al. Elevations in Circulating Methylated and Unmethylated Preproinsulin ADN in New-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2015; 64(11): 3867–72.
- Floch MH, Montrose DC. Use of probiotics in humans: an analysis of the literature. *Gastroenterol Clin North Am* 2005, 34: 547–570.
- Foulis AK, Farquharson MA, Hardman R. Aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules by B cells and hyperexpression of class I major histocompatibility complex molecules by insulin containing islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1987, 30: 333–343.
- Furlanos S, Varney MD, Tait BD, Morahan G, Honeyman MC, Colman PG et al. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases by lower risk human leukocyte antigen genotypes. *Diab Care* 2008; 31(8): 1546-1549.
- Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 1997; 46: 720–725.

- Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K et al. Beta-cell genes and diabetes. Molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 2001; 50 (Suppl. 1): S94–S100.
- Frederiksen B, Kroehl M, Lamb MM, Seifert J, Barriga K, Eisenbarth GS et al. Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA Pediatr* 2013; 167: 808–15.
- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F et al. Familial hyperglycemia due to mutation in the glucokinase: definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328: 697–702.
- Galler A, Stange T, Muller G, Näke A, Vogel C, Kapellen T, et al. Incidence of childhood diabetes in children aged less than 15 years and its clinical and metabolic characteristics at the time of diagnosis: data from the childhood diabetes registry of Saxony, Germany. *Horm Res Paediatr* 2010; 74: 285–291
- Geuking MB, Cahen zli J, Lawson MA. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 2011, 34: 794–806.
- Ghoshal UC, Shukla R, Ghoshal U, Gwee KA, Ng SC, Quigley EM. The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe? *Int J Inflamm* 2012: 151085
- Gillespie KM, Aitken RJ, Wilson I, Williams AJ, Bingley PJ. Early onset of diabetes in the proband is the major determinant of risk in HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 siblings. *Diabetes*. 2014; 63 (3): 1041-7
- Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes, *ISME J*. 2010; 5: 82–91.
- Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G et al: Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *Isme J* 2011, 5: 82–91
- Giuffrida AB, Fernando MA, Reis, F. Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7, 2005, 318–326
- Giuffrida FM, Calliari LE, Manna TD, Ferreira JG, Saddi-Rosa P, Kunii IS et al. A novel glucokinase deletion (p.Lys32del) and five previously described mutations cosegregate with the phenotype of mild familial hyperglycaemia (MODY2) in Brazilian families. *Diabetes research and clinical practice. Diabetes Res Clin Pract* 2013; 100 (2): e42-5

- Gloyn AL. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat* 2003; 22: 353–362. 47
- Goday A, Castell C, Tresserras R, Canela J, Taberner JL, Lloveras G. Incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Catalonia, Spain. The Catalan Epidemiology Diabetes Study Group. *Diabetologia* 1992; 35 (3): 267-71
- Gomes AC, Bueno AA, de Souza RGM, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition journal* 2014; 13: 60.
- Gómez-Gila AL, López-Siguero JP, Grupo Andaluz de Diabetes Infantil (GADI). Incidencia de diabetes mellitus tipo 1 en menores de 14 años en Andalucía (2000-2009). *Rev Esp Endocrinol Pediatr.* 2011; 2 (Supl): 104-5.
- Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *BioEssays* 2004, 26: 497–511.
- Green A, Patterson CC, The EURODIAB TIGER Study Group. Europe and Diabetes. Trends in the incidence of childhood onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia.* 2001; 44 (suppl 8): B9-B16
- Greenbaum CJ, Schatz DA, Cuthbertson D, Zeidler A, Eisenbarth GS, Krischer JP. Islet cell antibody-positive relatives with human leukocyte antigen DQA1*0102, DQB1*0602: Identification by the diabetes prevention trial-type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1255-60.
- Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutricion Hosp* 2007; 22 (supl 2): 14-7
- Gulden E, Wong FS, Wen L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* 2015; 159: 143–53.
- Hague A, Butt AJ, Paraskeva C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? *Proc Nutr Soc* 1996; 55: 937–943
- Hamalainen AM, Ronkainen MS, Akerblom HK, Knip M. Postnatal elimination of transplacentally acquired disease-associated antibodies in infants born to families with

- type 1 diabetes: The Finnish TRIGR Study Group: Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4249–4253
- Hao WL, Lee YK. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol* 2004; 268: 491-502
 - Hall DM, Buettner GR, Oberley LW, Xu L, Matthes RD, Gisolfi CV. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 280: H509–H521
 - Hara N, Alkanani AK, Ir D, Robertson CE, Wagner BD, Frank DN et al. Prevention of virus-induced type 1 diabetes with antibiotic therapy. *J Immunol* 2012, 15:3805–3814.
 - Harder T, Roepke K, Diller N, Stechling Y, Dudenhausen JW, Plagemann A. Birth weight, early weight gain, and subsequent risk of type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 1428–36.
 - Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC et al. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 1992; 339: 1307–1310.
 - Hattersley AT, Ellard S, Shepherd M et al. Phenotype – genotype relationships in maturity-onset diabetes of the young. In: Matschinsky FM, Magnuson MA, eds. *Molecular Pathogenesis of MODYs*. Front Diabetes, Vol. 15. Basel: Karger, 2000; 16–34.
 - Hattersley AT, Bruining J, Shield J, Njolstad P, Donaghue K, ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006–2007. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children. *Pediatr Diabetes* 2006; 7: 352–360.
 - Herold KC, Usmani-Brown S, Ghazi T, Lebastchi J, Beam CA, Bellin MD et al.: β cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals. *J Clin Invest*. 2015; 125(3): 1163–73.
 - Hildebrandt MA, Hoffman C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 2009; 137: 1716– 24.e1–24.e2.
 - Holmberg H, Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J, for the ABIS Study Group. Short duration of breast-feeding as a risk-factor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *Br J Nutr* 2007; 97: 111–16.

- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881–884.
- Hummel M, Bonifacio E, Schmid S, Walter M, Knopff A, Ziegler AG. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 2004; 140: 882–886
- Hyponen E, Virtanen SM, Kenward MG, Knip M, Akerblom HK. Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diab Care* 2000; 23 (12): 1755-1760
- Incani M, Cambuli VM, Cavalot F, Congiu T, Paderi M, Sentinelli F et al. Clinical application of best practice guidelines for the genetic diagnosis of MODY2 and MODY3. *Diabet Med* 2010; 27: 1331–1333.
- Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA et al.: Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2015;38(10):1964–74
- Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K et al: Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest* 1993, 92: 2313–2322.
- Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008, 4:337–349.
- Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 865-72.
- Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C et al. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6110-6115
- Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156: 3216–3223

- Jin N, Wang Y, Crawford F, White J, Marrack P, Dai S, et al. N-terminal additions to the WE14 peptide of chromogranin A create strong autoantigen agonists in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 13318–23.
- Kimpimaki T, Kulmala P, Savola K, Kupila A, Korhonen S, Simell T et al. Natural history of beta-cell autoimmunity in young children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4572– 4579
- Klupa T, Solecka I, Nowak N, Szopa M, Kiec-Wilk B, Skupien J et al. The Influence of Dietary Carbohydrate Content on Glycaemia in Patients with Glucokinase Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Journal of International Medical Research* 2011; 39 (6): 2296-2301
- Knip M, Virtanen SM, Seppa K, Ilonen J, Savilahti E, Vaarala O et al, and the Finnish TRIGR Study Group. Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. *N Engl J Med* 2010; 363: 1900–08.
- Knip M, Simell O. Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012; 2 (7): a007690.
- Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 2016; 12, 154–167
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731–734
- Koczwara K, Bonifacio E, Ziegler AG. Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1–4
- Kontiainen S, Scheinin T, Schlenzka A, Maenpaa J, Groop L, Koskimies S. Differences in HLA types in children with insulindependent diabetes diagnosed in 1960s, 1970s, and 1980s. *Lancet* 1988; 332: 219
- Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012; 150 (3): 470-80

- Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:197-209
- Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyötyläinen T, Hämäläinen AM et al, for the DIABIMMUNE Study Group. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 2015; 17: 260–73.
- Kostraba JN, Gay EC, Cai Y, Cruickshanks KJ, Rewers MJ, Klingensmith GJ et al. Incidence of insuline-dependent diabetes mellitus in Colorado. *Epidemiology* 1992; 3 (3): 232-238
- Kriegel MA, Sefik E, Hill JA, Wu HJ, Benoist C, Mathis D. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad* 2011, 108: 11548–11553.
- Krych Ł1, Nielsen DS, Hansen AK, Hansen CH. Gut microbial markers are associated with diabetes onset, regulatory imbalance, and IFN- γ level in NOD mice. *Gut Microbes*. 2015; 6 (2): 101-9
- Kuitunen M, Saukkonen T, Ilonen J, Akerblom HK, Savilahti E. Intestinal permeability to mannitol and lactulose in children with type 1 diabetes with the HLA-DQB1*02 allele. *Autoimmunity* 2002, 35: 365–368.
- Küme T, Acar S, Tuhan H, Çatlı G, Anık A, Gürsoy Çalan Ö et al. The Relationship of Serum Zonulin Level with Clinical and Laboratory Parameters in Childhood Obesity. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2017; 9 (1): 31-38
- Lamb MM, Miller M, Seifert JA, Frederiksen B, Kroehl M, Rewers M et al. The effect of childhood cow's milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatr Diabetes*. 2015; 16 (1): 31–8.
- Lambert AP, Ellard S, Allen LI, Gallen IW, Gillespie KM, Bingley PJ et al. Identifying hepatic nuclear factor 1 alpha mutations in children and young adults with a clinical diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26 (2): 333-7
- Lanning DK, Rhee KJ. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 2005; 26: 419-425

- LaPorte RE, Orchard TJ, Kuller LH, Wagener DK, Drash AL, Schneider BB et al. The Pittsburgh Insulin Dependent Diabetes Mellitus Registry: the relationship of insulin dependent diabetes mellitus incidence to social class. *Am J Epidemiol* 1981; 114 (3): 379 - 384
- LaPorte RE, Tajima N, Akerblom HK, Berlin N, Brosseau J, Christy M et al. Geographic differences in the risk of insulin-dependent diabetes mellitus: The importance of registries. *Diabetes Care* 1985; 8 (Suppl 1): 101-7
- Lau K, Benitez P, Ardisson A, Wilson TD, Collins EL, Lorca G et al. Inhibition of type 1 diabetes correlated to a *Lactobacillus johnsonii* N6.2-mediated Th17 bias. *J Immunol* 2011; 186: 3538–3546
- Ledermann HM. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet* 1995; 345: 648
- Lee AS, Gibson DL, Zhang Y, Sham HP, Vallance BA, Dutz JP. Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia* 2010, 53:741–748.
- Lee KH, Wucherpfenning KW, Wiley DC. Structure of a human insulin peptide-HLA DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2001; 2: 501-507
- Lempainen J, Laine AP, Hammais A, Toppari J, Simell O, Veijola R. Non-HLA gene effects on the disease process of type 1 diabetes: From HLA susceptibility to overt disease. *J Autoimmun.* 2015; 61: 45-53
- Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM. Enhanced Translocation of Bacteria Across Metabolically Stressed Epithelia is Reduced by Butyrate. *Inflammatory Bowel Diseases* 2010, 16: 1138–1148.
- Li N, Hatch M, Wasserfall CH, Douglas-Escobar M, Atkinson MA, Schatz DA et al. Butyrate and type 1 diabetes mellitus: can we fix the intestinal leak? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 51: 414–417.
- Libman IM, LaPorte RE. Changing trends in epidemiology of type 1 diabetes mellitus throughout the world: how far have we come and where do we go from here. *Pediatr Diabetes* 2005; 6 (3): 119-121
- Lidbeck A, Nord CE. Lactobacilli and the normal human anaerobic microflora. *Clin Infect Dis* 1993; 16 (Suppl 4): S181-7

- Like AA, Guberski DL, Butler L. Influence of environmental viral agents on frequency and tempo of diabetes mellitus in BB/Wor rats. *Diabetes* 1991; 40:259–262
- Lindner T, Cockburn BN, Bell GI. Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia* 1999; 42: 121–123.
- Lopez-Siguero JP, del Pino de la Fuente A, Martínez Aedo MJ, Moreno Molina JA. Increased incidence of type 1 diabetes in the South of Spain. *Diabetes Care*. 2002; 25: 1099.
- Lorenz RG, Chaplin DD, McDonald KG, McDonough JS, Newberry RD. Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. *J Immunol* 2003; 170 (11): 5475-82.
- Lorini R, Klersy C, D'Annunzio G, Massa O, Minuto N, Iafusco D et al. Maturity-Onset Diabetes of the Young in Children With Incidental Hyperglycemia: A multicenter Italian study of 172 families. *Diabetes Care* 2009; 32: 1864–1866.
- Louis P, Flint HJ: Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Fems Microbiology Letters* 2009, 294:1–8.
- Ludvigsson J. Why diabetes incidence increases--a unifying theory. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1079: 374–82.
- Maclaren N, Riley W, Skordis N, Atkinson M, Spillar R, Silverstein J, et al. Inherited susceptibility to insulin-dependent diabetes is associated with HLA-DR1, while DR5 is protective. *Autoimmunity* 1988; 1: 197-205
- Magnus MC, Olsen SF, Granström C, Joner G, Skriverhaug T, Svensson J, et al. Infant Growth and Risk of Childhood-Onset Type 1 Diabetes in Children From 2 Scandinavian Birth Cohorts. *JAMA Pediatr*. 2015; 169 (12): e153759
- Markle JG, Mortin-Toth S, Wong AS, Geng L, Hayday A, Danska JS. $\gamma\delta$ T cells are essential effectors of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *J Immunol*. 2013 Jun 1;190(11):5392-401
- Martin D, Bellanne-Chantelot C, Deschamps I, Froguel P, Robert JJ, Velho G. Long-Term Follow-Up of Oral Glucose Tolerance Test-Derived Glucose Tolerance and Insulin Secretion and Insulin Sensitivity Indexes in Subjects With Glucokinase Mutations (MODY2). *DIABETES CARE* 2008; 31(7):1321-3

- Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009, 39:216–224
- Massa O, Meschi F, Cuesta-Munoz A, Caumo A, Cerutti F, Toni S et al. High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI. *Diabetologia* 2001; 44: 898–905.
- Mathieu C. Vitamin D and diabetes: Where do we stand? *Diabetes Res Clin Pract.* 2015; 108 (2): 201-9
- Mathis D, Benoist C: The influence of the microbiota on type-1 diabetes: on the threshold of a leap forward in our understanding. *Immunol Rev* 2012; 245:239-249.
- Matschinsky FM. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996; 45: 223–241.
- Matschinsky FM. Regulation of pancreatic b-cell glucokinase. From basic to therapeutics. *Diabetes* 2002; 51 (Suppl. 3): S394–S404.
- Mayer-Davis EJ, Bell RA, Dabaelea D, D'Agostino R Jr, Imperatore G, Lawrence JM et al. The many faces of diabetes in American youth: type 1 and type 2 diabetes in five race and ethnic population: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diab Care* 2009; 32 (Suppl. 2): S99S101
- Maziarz M, Hagopian W, Palmer JP, Sanjeevi CB, Kockum I, Breslow N et al. Non-HLA type 1 diabetes genes modulate disease risk together with HLA-DQ and islet autoantibodies. *Genes Immun.* 2015 Dec;16(8):541-51
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL: An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005; 122: 107–118.
- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL: A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008, 453:620–625.
- McDonald TJ, Colclough K, Brown R, Shields B, Shepherd M, Bingley P et al. Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from type 1 diabetes. *Diabet Med* 2011; 28 (9): 1028–1033

- McGinty JW, Chow IT, Greenbaum C, Odegard J, Kwok WW, James EA. Recognition of posttranslationally modified GAD65 epitopes in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes* 2014; 63: 3033–40.
- McKinney EF, Lee JC, Jayne DR, Lyons PA, Smith KG. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*. 2015; 523 (7562): 612–6
- Mejía-León ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Domínguez-Bello MG, de la Barca AM. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep*. 2014;4: 3814
- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106: 255-258
- Mikelsaar M, Zilmer M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb Ecol Health Dis*. 2009; 21 (1): 1-27
- Moises RS, Reis AF, Morel V, Chacra AR, Dib SA, Bellanne-Chantelot C et al. Prevalence of maturity-onset diabetes of the young mutations in Brazilian families with autosomal-dominant early-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 786–787
- Moller AM, Dalgaard LT, Pociot F, Nerup J, Hansen T, Pedersen O. Mutation in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Caucasian families originally classified as having type I diabetes. *Diabetologia* 1998; 41: 1528–1531
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683-765
- Moreno-Navarrete J, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernandez-Real J. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS One* 2012; 7(5): e37160
- Moroti C, Souza Magri LF, Costa MR, Cavallini DC, Sivieri K. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis* 2012, 11: 29
- Muccioli GG, Naslain D, Bäckhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol* 2010, 6: 392–405.

- Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of molecular genetic classification of monogenic b-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4: 200–213.
- Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med.* 2013; 11:46.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota. The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* 2010; 33: 2277–2284
- Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 59-67
- Naserke HE, Bonifacio E, Ziegler AG: Prevalence, characteristics and diabetes risk associated with transient maternally acquired islet antibodies and persistent islet antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4826–4833
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al, Diabetes Control and Complications Trial / Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; 353: 2643-2653
- Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol* 2006, 176: 3070–3079
- Neu J, Reverte CM, Mackey AD, Liboni K, Tuhacek-Tenace LM, Hatch M et al. Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. *JPediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40 (5): 589-95
- Neu J, Lorca G, Kingma SDK, Triplett EW. The Intestinal Microbiome: Relationship to Type 1. *Diabetes* 2010, 39:563–571.
- Nygren M, Carstensen J, Koch F, Ludvigsson J, Frostell A. Experience of a serious life event increases the risk for childhood type 1 diabetes: the ABIS population-based prospective cohort study. *Diabetologia* 2015; 58: 1188–97.

- Nystrom L, Dahlquist G, Rewers M, Wall S. The Swedish childhood diabetes study. An analysis of the temporal variation in diabetes incidence 1978-1987. *Int J Epidemiol* 1990; 19: 141-146
- Nyunt O, Wu JY, McGown IN, Harris M, Huynh T, Leon GM et al. Investigating maturity onset diabetes of the young. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 67–74
- Ohkawara S, Furuya H, Nagashima K, Asanuma N, Hino T. Oral administration of butyrovibrio fibrisolvens, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. *J Nutr* 2005, 135:2878–2883.
- Ohland CL, MacnaughtonWK: Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 298:G807–G819.
- Oldstone MB, Edelmann KH, McGavern DB, Cruite JT, Welch MJ. Molecular anatomy and number of antigen specific CD8 T cells required to cause type 1 diabetes. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (11): e1003044
- Oliveira CSV, Furuzawa GK, Reis AF. The MODY type of diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46: 186–192.
- Oram RA, McDonald TJ, Shields BM, Hudson MM, Shepherd MH, Hammersley S et al.: Most people with long-duration type 1 diabetes in a large population-based study are insulin microsecretors. *Diabetes Care.* 2015; 38(2): 323–8.
- Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, Krischer JP, Skyler JS, Jackson R, et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the diabetes prevention trial-type 1. *Diabetes Care* 2009; 32: 2269-74.
- Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M, Nanto-Salonen K, Seppanen-Laakso T, Parikka V et al. Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med* 2008; 205: 2975–2984.
- Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanne Chantelot C, Ellard S, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat* 2009; 30: 1512–26
- Owen KR. Monogenic diabetes: old and new approaches to diagnosis. *Clinical Medicine* 2013; 13 (3): 278-81

- Paassen BN, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G et al. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J* 2009, 420: 211–219.
- Padaiga Z, Tuomilehto J, Karvonen M, Dahlquist G, Podar T, Adojaan B et al. Seasonal variation in the incidence of type 1 diabetes mellitus during 1983 to 1992 in the countries around the Baltic Sea. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 1999; 16 (9): 736-43
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5 (7): e177.
- Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009, 373 (9680): 2027–2033
- Patterson CC, Gyürüs E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia* 2012; 55 (8): 2142-7
- Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J.* 2016; 92 (1087): 286-300
- Penders J, Thijs C, Vink C. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118; 511-521
- Peng J, Narasimhan S, Marchesi JR, Benson A, Wong FS, Wen L. Long term effect of gut microbiota transfer on diabetes development. *J Autoimmun.* 2014; 53: 85–94.
- Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* 2009; 139: 1619–1625.
- Pflueger M, Seppanen-Laakso T, Suortti T, Hyotylainen T, Achenbach P, Bonifacio E et al. Age and islet autoimmunity-associated differences in amino acid and lipid metabolites in children at risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60: 2740–2747
- Pinelli M, Acquaviva F, Barbetti F, Caredda E, Coccozza S, Delvecchio M, et al. Identification of Candidate Children for Maturity-Onset Diabetes of the Young Type 2 (MODY2) Gene Testing: A Seven-Item Clinical Flowchart (7-iF). *PLoS ONE* 2013; 8(11): e79933.

- Pitkaniemi J, Onkamo P, Tuomilehto J, Arjas E. Increasing incidence of type 1 diabetes-role for genes? *BMC Genet* 2004, 5 (1): 5
- Pociot F, Norgaard K, Hobolth N, Andersen O, Nerup J: A nationwide population-based study of the familial aggregation of type 1 (insulindependent) diabetes mellitus in Denmark: Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Diabetologia* 1993; 36: 870–875
- Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high- fat diet. *Diabetologia* 2007; 50: 1267–76
- Qi CJ, Zhang Q, Yu M, Xu JP, Zheng J, Wang T et al. Imbalance of Fecal Microbiota at Newly Diagnosed Type 1 Diabetes in Chinese Children. *Chin Med J (Engl)*. 2016; 129 (11): 1298-304
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59–65.
- Rasmussen T, Witso E, Tapia G, Stene LC, Ronningen KS. Self-reported lower respiratory tract infections and development of islet autoimmunity in children with the type 1 diabetes high-risk HLA genotype: the MIDIA study. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27: 834–37
- Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI: Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 2006; 127: 423–433.
- Rewers M, LaPorte RE, Walczak M, Dmochowski K, Bogaczynska E. Apparent epidemic of insulin-dependent diabetes mellitus in Midwestern Poland. *Diabetes* 1987; 36 (1): 106-13.
- Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet* 2016; 387: 2340–48
- Rigby MR, Ehlers MR. Targeted immune interventions for type 1 diabetes: not as easy as it looks! *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 2014; 21 (4): 271-8

- Roesch LFW, Lorca GL, Casella G, Giongo A, Naranjo A, Pionzio AM et al. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *Isme J* 2009, 3: 536–548.
- Rook GA, Brunet LR: Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005, 54:317–320.
- Round JL, Mazmanian SK: Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci* 2010, 107: 12204–12209.
- Rubio Cabezas O. Diabetes mellitus monogénica. *An Pediatr (Barc)* 2008; 68: 73-77
- Ryffel GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol* 2001; 27: 11–29
- Sadauskaite-Kuehne V, Ludvigsson J, Padaiga Z, Jasinskiene E, Samuelsson U: Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Diabete Metab Res Rev* 2004; 20:150 –157
- Sadeharju K, Hamalainen AM, Knip M, Lonrot M, Koskela P, Virtanen SM et al. Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 271–277
- Sapone A. Zonulin Upregulation Is Associated With Increased Gut Permeability in Subjects With Type 1 Diabetes and Their Relatives. *Diabetes*. 2006; 55 (5): 1443–9
- Schmid S, Buuck D, Knopff A, Bonifacio E, Ziegler AG. BABYDIET, a feasibility study to prevent the appearance of islet autoantibodies in relatives of patients with type 1 diabetes by delaying exposure to gluten. *Diabetologia* 47: 1130 –1131, 2004
- Schober E, Rami B, Grabert M, Thon A, Kapellen T, Reinehr T et al. Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: experience from a large multicentre database. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 2009; 26: 466–473.
- Schober E, Rami B, Waldhoer T. Steep increase of incidence of childhood diabetes since 1999 in Austria. Time trend analysis 1979-2005. A nationwide study. *Eur J Pediatr* 2008; 167 (3): 293-297

- Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H et al. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 294-300.
- Seewaldt S, Thomas HE, Ejrnaes M, Christen U, Wolfe T, Rodrigo E et al. Virus-induced autoimmune diabetes: most beta-cells die through inflammatory cytokines and not perforin from autoreactive (anti-viral) cytotoxic T-lymphocytes. *Diabetes* 2000, 49: 1801–1809.
- Secondulfo M, Iafusco D, Carratù R, deMagistris L, Sapone A, Generoso M et al. Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. *Dig Liver Dis.* 2004; 36(1) :35-45.
- Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy. *Diabetes Care* 2005; 28: 290–95.
- Serrano Rios M, Moy CS, Martin Serrano R, Minuesa Asensio A, de Tomas Labat ME, Zarandieta Romero G et al. Incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in subjects 0-14 years of age in the Comunidad of Madrid, Spain. *Diabetologia* 1990; 33 (7): 422-4
- Serreze DV, Post CM, Chapman HD, Johnson EA, Lu B, Rothman PB: Interferon-gamma receptor signaling is dispensable in the development of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2000, 49:2007–2011
- Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* 2010; 53: 2504–2508
- Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia* 2012; 55(5): 1265–72
- Siddiqui K, Musambil M, Nazir N. Maturity onset diabetes of the young (MODY)-History, first case reports and recent advances. *Gene.* 2015; 15;555(1):66-71
- Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L et al. Care of children and adolescents with Type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005; 28: 186–212
- Singh R, Lei P, Andreadis ST: PKC- δ binds to E-cadherin and mediates EGF-induced cell scattering. *Exp Cell Res* 2009, 315: 2899–2913.

- Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MA et al. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 2009; 325: 617–620
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermidez-Humaran LG, Gratadoux JJ et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(43): 16731–16736
- Sorensen IM, Joner G, Jennum PA, Eskild A, Torjesen PA, Stene LC. Maternal serum levels of 25-hydroxy-vitamin D during pregnancy and risk of type 1 diabetes in the offspring. *Diabetes* 2012; 61: 175–78.
- Sosenko JM, Palmer JP, Rafkin-Mervis L, Krischer JP, Cuthbertson D, Mahon J et al.: Glucose and C-peptide changes in the perionset period of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care*. 2008; 31(11): 2188–92.
- Sosenko JM, Skyler JS, Palmer JP, Krischer JP, Yu L, the Type 1 Diabetes TrialNet and the Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study Groups. The Prediction of Type 1 Diabetes by Multiple Autoantibody Levels and Their Incorporation into an Autoantibody Risk Score in Relatives of Type 1 Diabetes Patients. *Diabetes Care* 2013; 36: 2615-2620
- Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I: Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009, 50: 1094–1104.
- Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA, Gleason RE, Kaldany A, Garovoy MR et al. Type 1 diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Ann. Intern. Med.* 1983; 99: 320–326
- Stanley HM, Norris JM, Barriga K, Hoffman M, Yu L, Miao D et al. Is presence of islet autoantibodies at birth associated with development of persistent islet autoimmunity? The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes Care* 2004; 27: 497–502
- Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol* 2012; 168: 12–23.

- Stoffel M, Bell KL, Blackburn CL, Powell KL, Seo TS, Takeda J et al. (1993) Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. *Diabetes*, 42, 937–940.
- Stride A, Vaxillaire M, Tuomi T, Barbetti F, Njølstad PR, Hansen T et al. The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load. *Diabetologia* 2002; 45: 427–435.
- Sturis J, Kurland IJ, Byrne MM, Mosekilde E, Froguel P, Pilkis SJ et al. Compensation in pancreatic b-cell function in subjects with glucokinase mutations. *Diabetes* 1994; 43: 719–723
- Subramanian S, Huq S, Yatsunenkov T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature* 2014; 510 (7505): 417-21
- Sysi-Aho M, Ermolov A, Tripathi A, Seppänen-Laakso T, Ruohonen ST, Toukola L et al. Metabolic regulation in progression to autoimmune diabetes. *PLoS Comput Biol* 2011; 7: e1002257.
- Taleb N, Emami A, Suppere C, Messier V, Legault L, Ladouceur M et al. Efficacy of single-hormone and dual-hormone artificial pancreas during continuous and interval exercise in adult patients with type 1 diabetes: randomized controlled crossover trial. *Diabetologia* 2016; 59 (12): 2561-2571.
- Tapia Ceballos L, Córdoba Borrás E, Picazo Angelín B, Ranchal Pérez P. Diabetes MODY. Una causa frecuente de hiperglucemia. *An Pediatr (Barc)*. 2008; 69(6):565-7
- Thabit H, Hovorka R. Coming of age: the artificial pancreas for type 1 diabetes. *Diabetologia* 2016; 59 (9): 1795-805
- Thanabalasingham G, Pal A, Selwood MP, Dudley C, Fisher K, Bingley PJ, et al. Systematic assessment of etiology in adults with a clinical diagnosis of young-onset type 2 diabetes is a successful strategy for identifying maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care* 2012; 35: 1206–12.
- The International Expert Committee (2009) International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes care* 32: 1327–1334.

- Thernlund GM, Dahlquist G, Hansson K, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Sjöblad S et al.: Psychological stress and the onset of IDDM in children. *Diabetes Care*. 1995; 18(10): 1323–9.
- Thomas HE, McKenzie MD, Angstetra E, Campbell PD, Kay TW: Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis* 2009, 14:1389–1404.
- Thomson KL, Glyon AL, Colclough K, Batten M, Allen LI, Beards F et al. Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in UK and European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat* 2003; 22: 417–421
- Tinto N, Zagari A, Capuano M, De Simone A, Capobianco V, Daniele G, et al. Glucokinase gene mutations: structural and genotype-phenotype analyses in MODY children from South Italy. *PloS one* 2008; 3: e1870.
- Tlaskalova-Hogenova H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell. Mol. Immunol* 2011; 8, 110–120
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480–484.
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI: The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009; 1: 6ra14–16ra14.
- Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in Immunology* 2012; 33(9): 459-66
- Uusitalo U, Liu X, Yang J, Aronsson CA, Hummel S, Butterworth M. Association of Early Exposure of Probiotics and Islet Autoimmunity in the TEDDY Study. *JAMA Pediatr*. 2016; 170 (1): 20-8
- Vaarala O, Atkinson MA, Neu J: The “perfect storm” for type 1 diabetes - the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 2008, 57: 2555–2562.

- Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hämäläinen A-M, Muona P, Väättäinen M et al. Cow milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1389–1394.
- Vaarala O. Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *RevDiabe Stud*, 2012, 9(4): 251-259
- Vaarala O. Human intestinal microbiota and tpe 1 diabetes. *CurrDiabRep* 2013;13,1–7
- Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105, 20858–20863
- Valladares R, Sankar D, Li N, Williams E, Lai KK, Abdelgeliel AS et al. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BBDR rats. *PLoS One* 2010, 5: e10507.
- Van Lummel M, van Veelen PA, de Ru AH, Pool J, Nikolic T, Laban S et al. Discovery of a selective islet peptidome presented by the highest-risk HLA-DQ8 trans molecule. *Diabetes* 2016; 65: 732–41.
- Vatanen T, Kostic AD, d’Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell* 2016; 165, 842–853
- Vaxillaire M, Pueyo ME, Clement K, Fiet J, Timsit J, Philippe J et al. Insulin secretion and insulin sensitivity in diabetic and non-diabetic subjects with hepatic nuclear factor-1a (maturity-onset diabetes of the young-3) mutations. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 609–618.
- Vehik K., Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith G, Bloch C et al. Increasing incidence of type 1 diabetes in 0-17 year old Colorado youth. *Diab Care* 2007; 30 (3): 503-509
- Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith GJ, Rewers M et al. Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. *Diab Care* 2008; 31 (7): 1392-1396
- Vehik K, Dabelea D: The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? *Diabetes Metab Res Rev* 2011, 27:3-13.

- Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME et al. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest* 1996; 98: 1755–1761
- Velho G, Blanche H, Vaxillaire M, Bellanné-Chantelot C, Pardini VC, Timsit J et al. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 1997; 40: 217–224.
- Velho G, Froguel P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 233–239.
- Velho G, Froguel P, Gloyn A, Hattersley AT: Maturity onset diabetes of the young type 2. In *Glucokinase and Glycemic Diseases: From the Basics to Novel Therapeutics*. Magnuson M, Matschinsky F, Eds. Basel, Karger, 2004, p. 42–64
- Verdaguer J, Yoon JW, Anderson B, Averill N, Utsugi T, Park BJ et al. Acceleration of spontaneous diabetes in TCR-beta-transgenic non obese diabetic mice by β cell cytotoxic CD8 T cells expressing identical endogenous TCR-alpha chains. *J Immunol* 1996; 157: 4726-4735
- Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A et al. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 2008; 135: 173–184.
- Visser J, Rozing J, Sapone A, Lammers K, Fasano A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann N Y Acad Sci [Internet]*. 2009; 1165: 195–205
- Vogelsang H, Schwarzenhofer M, Oberhuber G. Changes in gastrointestinal permeability in celiac disease. *Dig. Dis.* 1998; 16: 333–336
- Von Herrath M, Sanda S, Herold K: Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol.* 2007; 7 (12): 988–94
- Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 2011; 5: 220–230.
- Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci.* 2000; 113 Pt 24:4435-40.

- Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR: Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med* 1984; 311: 149–152
- Watts T, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Natl Acad Sci* 2005, 102: 2916–2921.
- Winter W. Autoimmune disorders that influence carbohydrate metabolism. In: *Clinical and Laboratory Evaluation of Human Autoimmune Diseases*. Chicago, IL: ASCP Press; 2002: 345-72.
- Winter W. Diabetes autoimmunity. In: Lifshitz, F, editor. *Pediatric Endocrinology*. Vol. 1. 5th Edition. New York, NY: Informa Healthcare USA, Inc; 2007:83-99.
- Weets I, Kaufman L, Van der Auwera B, Crenier L, Rooman RP, De Block C et al, and the Belgian Diabetes Registry. Seasonality in clinical onset of type 1 diabetes in Belgian patients above the age of 10 is restricted to HLA-DQ2/DQ8-negative males, which explains the male to female excess in incidence. *Diabetologia* 2004; 47: 614–21.
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005; 2 (9): 406-15.
- Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature* 2008, 455: 1109–1113.
- Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17040-5.
- Wherry EJ: T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011; 12(6): 492–9.
- Willing B, Halfvarson J, Dickson J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009, 15: 653- 660.
- Winter W. Diabetes autoimmunity. In: Lifshitz, F, editor. *Pediatric Endocrinology*. Vol. 1. 5th Edition. New York, NY: Informa Healthcare USA, Inc; 2007:83-99.

- Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem* 2011;57:168-75
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448:427-434
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease, *Gut* 2007; 56: 61–72.
- Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: The 2-year analysis of the German BABYDIAB study. *Diabetes* 1999; 48: 460-8.
- Ziegler AG, Bonifacio E; BABYDIAB-BABYDIET Study Group. Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55 (7): 1937-43
- Zipris D. Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms. *Clin. Immunol.* 2009; 131: 11–23.
- Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, Vos WM: High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 2008, 57:1605–1615

ANEXO

ANEXO 1. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

LISTADO DE ALIMENTOS	¿CUÁNTAS VECES COME?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche		
Yogur		
Chocolate: tableta, bombones, "Kit-Kat", "Mars" ...		
Cereales inflados de desayuno ("Korn Flakes" ...)		
Galletas tipo "María"		
Galletas con chocolate, crema...		
Magdalenas, bizcocho...		
Ensamada, donut, croissant...		
	A LA SEMANA	AL MES
Ensalada: lechuga, tomate, escarola...		
Judías verdes, acelgas o espinacas		
Verduras de guarnición: berenjena, champiñones		
Patatas al horno, fritas o hervidas		
Legumbres: lentejas, garbanzos, judías...		
Arroz blanco, paella		
Pasta: fideos, macarrones, espaguetis...		
Sopas y cremas		
	A LA SEMANA	AL MES
Huevos		
Pollo o pavo		
Ternera, cerdo, cordero (bistec, empanada...)		
Carne picada, longaniza, hamburguesa		
Pescado blanco: merluza, mero...		
Pescado azul: sardinas, atún, salmón...		
Marisco: mejillones, gambas, calamares...		
Croquetas, empanadillas, pizza		
Pan (en bocadillo, con las comidas...)		
	A LA SEMANA	AL MES
Jamón salado, dulce, embutidos		
Queso blanco o fresco (Burgos...) o bajo en calorías		
Otros quesos: curados o semicurados, cremosos		
	A LA SEMANA	AL MES
Frutas cítricas: naranja, mandarina...		
Otras frutas: manzana, pera, melocotón, plátano...		
Frutas en conserva (en almíbar...)		
Zumos de fruta natural		
Zumos de fruta comercial		
Frutos secos: cacahuetes, avellanas, almendras...		
Postres lácteos: natillas, flan, requesón		
Pasteles de crema o chocolate		
Golosinas: gominolas, caramelos...		
Bolsas de aperitivos ("chips", "chetos", "fritos" ...)		
Helados		
Bebidas azucaradas ("Coca-Cola", "Fanta" ...)		
Bebidas bajas en calorías ("Coca-Cola Light" ...)		

RESUMEN

RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad inmunomediada de origen multifactorial que está sufriendo un aumento de incidencia en las últimas décadas. Esta enfermedad presenta una elevada morbilidad, precisando un tratamiento farmacológico intensivo. Por otro lado, la diabetes MODY2 es de origen monogénico y produce una hiperglucemia moderada mantenida, que no precisa tratamiento. Previamente en estudios murinos y recientemente en humanos, la relación entre las bacterias intestinales y DM1 ha sido demostrada, sin embargo cómo influyen y por qué mecanismo continúa siendo motivo de estudio. También se han relacionado cambios en la microbiota con otras enfermedades autoinmunes y con alteraciones metabólicas como la DM2, pero hasta el momento la microbiota de los pacientes con MODY2 no ha sido estudiada. Por otra parte, se ha observado un aumento de la permeabilidad intestinal en relación con la flora intestinal hallada en DM1.

El objetivo de este estudio es analizar la composición de la microbiota intestinal de los niños afectados de DM1, MODY2 y controles sanos mediante pirosecuenciación masiva y compararla entre los tres grupos, así como analizar la permeabilidad intestinal mediante zonulina. Para ello se seleccionaron 15 pacientes con DM1, 15 con MODY2 y 13 controles sanos, pareados por sexo, edad, raza, vía de parto, tiempo de lactancia y, en el caso de los pacientes diabéticos, por niveles de hemoglobina glicosilada.

Tras la pirosecuenciación hemos encontrado diferencias significativas en el perfil bacteriano de las muestras de heces entre DM1, MODY2 y grupo control. En DM1 hay una menor diversidad ($p < 0.05$) que en el grupo de sanos, mientras que en MODY2 la diversidad es mayor que en DM1 pero menor a sanos ($p > 0.05$). Los niños con DM1 mostraron un aumento de los géneros *Bacteroides*, *Ruminococcus*,

Veillonella, *Blautia* y *Streptococcus* y una disminución de *Faecalibacterium* y *Lachnospira*, así como un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* disminuido. Los sujetos con MODY2 tienen un aumento de *Prevotella* con una disminución en *Ruminococcus* y *Bacteroides* en comparación con DM1 y grupo control. La abundancia relativa de *Blautia* y el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* se correlacionaron positivamente con HbA1c en niños con DM1. En MODY2, la HbA1c se correlacionó negativamente con la abundancia de *Ruminococcus*.

Además hemos encontrado que la permeabilidad intestinal estaba significativamente aumentada en ambos grupos de diabéticos comparada con los controles. Se encontró correlación positiva significativa entre la zonulina y la abundancia relativa de *Bacteroides* y *Veillonella* y una correlación negativa significativa con *Faecalibacterium* en niños con DM1, al igual que una correlación positiva significativa entre zonulina y *Prevotella* en el grupo de MODY2.

Este es el primer estudio que analiza la microbiota y la permeabilidad intestinal en niños con MODY2 y la compara con niños con DM1 y controles sanos. Aunque las asociaciones encontradas no implican necesariamente causalidad, sugieren la existencia de un microbioma autoinmune, así como de la modificación de la microbiota por la hiperglucemia. El aumento de permeabilidad intestinal en los MODY 2 pone esta enfermedad en el punto de mira.