

Determinación de marcadores genéticos en pacientes con diabetes tipo I y población sana

Fabiola Montoya, Claudia Isabel Bedoya, Martha Cecilia Restrepo, Alberto Villegas, Sonia C. Posada, Héctor Iván García, José Luis Vicario

Se estudiaron 26 pacientes diabéticos insulino-dependientes y 56 individuos sanos de la ciudad de Medellín. Se utilizaron 240 antisueros para las clases I y II del complejo mayor de histocompatibilidad, utilizando la técnica de microlinfocitotoxicidad de Terasaki. Los antígenos HLA de la clase II también se analizaron siguiendo los protocolos del XI Taller

Internacional de Histompatibilidad, amplificando el DNA por medio de la técnica de PCR y las hibridaciones se hicieron con sondas de oligonucleótidos seleccionados para HLA-DRB1, DQA1 y DQB1. En los antígenos de la clase I, el HLA B18 se identificó en 46 % de los pacientes comparado con 12,5% de los controles; el riesgo relativo (RR) fue de 3.7. Lo contrario ocurrió con el B44, que se determinó en 7,6% de los enfermos y en 25% de los sanos. En cuanto a los antígenos de clase II, los alelos DRB1*0405 y *0301 se encontraron asociados a susceptibilidad, con un RR de 61.3 y 6.6, respectivamente.

Se ha calculado que la diabetes mellitus afecta entre 2 y 4% de la población general (1). De este porcentaje, 10 a 15% corresponde a la diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) o tipo I (2, 3). Hay evidencias que relacionan la diabetes insulino-dependiente con fenómenos autoinmunes, factores hereditarios, sustancias tóxicas o infecciones virales (4-7). La asociación de DMID y antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ha sido demostrada en diferentes estudios (8-10). La primera información publicada de esta asociación apareció entre 1973 y 1975, estableciendo una relación con los antígenos de la clase I, HLA-B8 y B15 (10-11). Posteriormente se informó que existía una fuerte asociación con los antígenos de clase II, HLA-DR3 y DR4. Por el contrario, el antígeno DR2 parece otorgar pro-

Fabiola Montoya R., Claudia Isabel Bedoya, Martha Cecilia Restrepo: Investigadores Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín; Sonia C. Posada S.: Jefe Sección Inmunología, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín; Alberto Villegas: Corporación Antioqueña de Diabetes, Medellín; Héctor Iván García: Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Medellín; José Luis Vicario: Instituto de Transfusión, Madrid, España.

tección contra el desarrollo de la enfermedad (12-15).

Con las nuevas técnicas de biología molecular es posible amplificar el ADN por medio de la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y así se ha podido demostrar qué moléculas de la clase II del HLA están relacionadas con la DMID. Algunos antígenos HLA-DQ que no tienen el ácido aspártico en la posición 57 de su cadena beta están asociados con una susceptibilidad para la DMID (16-21). Estudios realizados en varios países con distintos grupos étnicos han demostrado diferencias en los antígenos HLA de los individuos afectados por la enfermedad; es así como el HLA-DR7 y el DQA1 se observan más frecuentemente en los diabéticos negros de origen americano (22-23). En las poblaciones japonesa y china se ha encontrado un aumento de los HLA-DR3, DR4 y DR9, relacionado con una mayor susceptibilidad para la diabetes (24); en la población japonesa también se ha informado como marcador de susceptibilidad el B61 (25-28).

En Colombia la asociación de HLA y DMID no ha sido descrita hasta el momento. En el presente estudio se determinan las frecuencias antigénicas y génicas de los antígenos HLA en dos poblaciones diferentes: una con DMID y otra sin la enfermedad, buscando asociaciones de susceptibilidad o protección entre los marcadores genéticos y la diabetes.

Material y métodos

Población

Todas las personas estudiadas pertenecían al grupo étnico de-

nominado mixto (mezcla de negros, indios y blancos). El grupo de pacientes estuvo conformado por 26 personas que tenían el diagnóstico de diabetes mellitus insulino-dependiente de acuerdo con los criterios establecidos por la OMS y que asistían a la consulta de la Corporación Antioqueña de Diabetes en Medellín (3). Como grupo control se estudiaron 56 individuos no relacionados, trabajadores del área de la salud, que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: ser residentes de la ciudad de Medellín, no tener antecedentes familiares de diabetes, no tener en el momento del examen características clínicas de diabetes y tener las cifras de glicemia por debajo de 120 mg/dL. Cada una de las personas estudiadas firmaba su consentimiento escrito para ingresar al estudio.

Determinación de la glicemia

Para medir los niveles de glucosa en sangre se empleó la técnica del Haemo-Glucotest®. La muestra de sangre se tomó en ayunas por punción de la yema del dedo. La gota de sangre se depositó en la tirilla reactiva (29) y la lectura se hizo en el aparato Reflolux S, considerando el límite superior en 120 mg/dL.

Determinación de los antígenos de histocompatibilidad

Por punción venosa se obtuvieron 30 ml de sangre, 15 ml con heparina y 15 ml con EDTA. De la sangre heparinizada se obtenía el total de los linfocitos, separando las células por gradientes de densidad según el método de Boyun (30). Por medio de una columna de nylon se separaron las poblaciones de linfocitos T y B. En los linfocitos

T se identificaron los antígenos de la clase I: HLA-A, B y CW por la técnica de microlinfocitotoxicidad de Terasaki (31); con la misma técnica se procesaron los linfocitos B para los antígenos HLA de la clase II: DR y DQ. Se incluyeron 240 antisueros preparados por One Lambda Inc. que identificaron los antígenos siguientes:

HLA-A: A1, A2, A3, A4, A10, A11, A23, A24, A25, A26, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A36, A68, A69.

HLA-B: B5, B7, B8, B13, B15, B16, B17, B18, B21, B27, B35, B37, B38, B40, B41, B42, B44, B45, B47, B48, B49, B50, B51, B53, B55, B57, B60, B61, B62, B63, B65, B67, B73.

HLA-CW: CW1, CW2, CW3, CW4, CW5, CW6, CW7, CW8, CW9.

Los antígenos HLA-DR y DQ fueron determinados en los linfocitos B y se identificaron los siguientes:

HLA-DR: DR1, DR2, DR3, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR18.

HLA-DQ: DQ1, DQ2, DQ3, DQ4, DQ5 y DQ6.

Para completar la reacción se usó complemento de conejo de la misma marca y como colorante vital se empleó azul de tripano. La lectura se hizo en un microscopio invertido.

Preparación del ADN

El ADN genómico tanto de los individuos diabéticos como de los sanos se obtuvo de los leucocitos de la sangre periférica con EDTA como anticoagulante. Se empleó el método de extracción de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (32). Se amplificaron los exones 2 de los ADN

correspondientes a los DRB1, DQA1 y DQB1 por la técnica de la PCR (33-35) usando Taq polimerasa (Boehringer Mannheim Germany R). Para la amplificación se emplearon 35 ciclos. Los precursores específicos fueron preparados en el laboratorio de J.L. Vicario en Madrid.

La amplificación fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa usando 5µl del producto de ADN amplificado por la técnica de la PCR, luego se coloreó con bromuro de etidio.

El ADN amplificado se desnaturizó y luego fue transferido a membranas de nitrocelulosa (Boehringer Mannheim), las cuales fueron hibridizadas con sondas de oligonucleótidos seleccionados siguiendo los protocolos del XI International Histocompatibility Workshop (36-38). El revelado se hizo por la técnica de quimioluminiscencia empleando una película Kodak X-OMATXAR-5 y después se reveló con una máquina de rayos X.

Análisis estadístico

En los grupos de pacientes y controles se determinaron las frecuencias antigénicas y génicas, estas últimas a través de la fórmula de Haldane (39). Para la comparación entre enfermos y controles sanos se utilizaron las tablas de 2 x 2 para cada uno de los antígenos. La fuerza de la asociación existente entre cada marcador y la DMID se estableció a través del riesgo relativo (RR) tanto de manera puntual como en forma de intervalos de confianza exactos, mediante la fórmula de Mehta y cols (40). Como prueba de significancia estadística de la asociación se empleó la prueba de Chi cuadra-

do con la corrección de Yates o la prueba de exactitud de Fisher cuando el valor esperado de una de las celdas de la tabla de 2 x 2 fuera menor de 5.

El nivel del valor de P se estableció en 1% y este valor fue corregido (Pc) multiplicándolo por el número de observaciones realizadas, tal como lo sugiere Svejgaard (41).

Para los marcadores genéticos asociados estadísticamente con la enfermedad se calculó la fracción etiológica cuando el RR fuera mayor que 1 y la fracción prevenible cuando el RR fuera menor de 1.

Resultados

El grupo de DMID estuvo conformado por 26 individuos de los cuales 54% fueron mujeres. En el grupo control de 56 personas, 63% correspondió al sexo femenino. La edad de los enfermos y de los controles osciló entre 6 y 70 años. La clasificación étnica tanto para los enfermos como para los sanos correspondió al grupo mixto.

Los antígenos de la clase I (HLA-A, B y CW) más frecuentemente encontrados en las dos poblaciones estudiadas fueron: HLA-A2, A24, A1 y A69 (Tabla 1).

El HLA-A1 se encontró en 34.6% de los enfermos y en la población sana en 16%. El HLA A69 se identificó en 26.9% de los pacientes y en 16% de los sanos.

Se encontraron las siguientes frecuencias génicas en los pacientes: 0.24 para el A2; 0.22 para el A24; 0.14 para el A69 y 0.19 para el A1.

Los alelos HLA-A31, A32 y A34 no se detectaron ni en los enfermos ni en los sanos.

Antígeno	DMID (n= 26)			Controles (n=56)		
	No.	F.A	F.G	No.	F.A	F.G
A1	9	34.6	0.19	9	16.1	0.08
A2	11	42.3	0.24	20	35.7	0.2
A3	4	15.4	0.08	13	23.2	0.12
A10	0	0.0	0.00	2	3.6	0.02
A11	1	3.9	0.02	7	12.5	0.06
A23	0	0.0	0.00	5	8.9	0.05
A24	10	38.5	0.22	13	23.2	0.12
A25	1	3.9	0.02	4	7.1	0.04
A26	0	0.0	0.00	6	10.7	0.05
A28	0	0.0	0.00	3	5.4	0.03
A29	1	3.9	0.02	3	5.4	0.03
A30	4	15.4	0.08	2	3.6	0.02
A31	0	0.0	0.00	0	0.00	0.00
A32	0	0.0	0.00	0	0.00	0.00
A33	2	7.7	0.04	8	14.3	0.07
A34	0	0.0	0.00	0	0.00	0.00
A36	0	0.0	0.00	1	1.8	0.01
A68	0	0.0	0.00	5	8.9	0.05
A69	7	26.9	0.14	9	16.1	0.08
Blanco	2	7.6	0.04	2	3.6	0.02
CW1	1	3.9	0.02	8	14.3	0.07
CW2	1	3.9	0.02	3	5.4	0.03
CW3	7	26.9	0.14	11	19.6	0.10
CW4	1	3.9	0.02	12	21.4	0.11
CW5	11	42.3	0.24	10	17.9	0.09
CW6	0	0.0	0.00	5	8.9	0.05
CW7	11	42.3	0.24	23	41.1	0.23
CW8	5	19.2	0.10	8	14.3	0.07
CW9	0	0.0	0.00	1	1.8	0.01
Blanco	15	57.7	0.35	31	55.3	0.33

F.A = Frecuencia antigénica
F.G = Frecuencia génica

Tabla 1. Frecuencias y asociaciones para antígenos HLA-A y HLA-CW en diabetes. Medellín.

Marcadores genéticos en diabetes tipo I

Antígeno	DMID (n=26)			Controles (n=56)			RR	Pc
	No.	F.A	F.G	No.	F.A	F.G		
B7	5	19.2	0.10	6	10.7	0.06		
B8	5	19.2	0.10	5	8.9	0.05		
B13	1	3.8	0.02	4	7.1	0.04		
B15	0	0.0	0.00	2	3.6	0.02		
B17	1	3.8	0.02	1	1.8	0.01		
B18	12	46.1	0.26	7	12.5	0.07	3.7	0.001
B27	0	0.0	0.00	1	1.8	0.01		
B35	3	11.5	0.06	19	33.9	0.19	0.3	0.03
B37	0	0.0	0.00	1	1.8	0.01		
B38	0	0.0	0.00	2	3.6	0.02		
B40	5	19.2	0.10	3	5.4	0.03		
B41	0	0.0	0.00	3	5.4	0.03		
B42	1	3.8	0.02	1	1.8	0.01		
B44	2	7.7	0.04	14	25.0	0.13	0.3	0.07
B48	1	3.8	0.02	2	3.6	0.02		
B49	2	7.7	0.04	11	19.5	0.10		
B50	1	3.8	0.02	0	0.0	0.00		
B51	1	3.8	0.02	11	19.5	0.10		
B53	2	7.7	0.04	1	1.8	0.01		
B55	0	0.0	0.00	5	8.9	0.05		
B60	2	7.7	0.04	1	1.8	0.01		
B61	0	0.0	0.00	1	1.8	0.01		
B62	0	0.0	0.00	1	1.8	0.01		
B63	0	0.0	0.00	2	3.6	0.02		
B65	5	19.2	0.10	6	10.7	0.06		
El B5, B16, B45, B47, B73 no se detectaron ni en los diabéticos ni en los controles.								
RR = Riesgo relativo Pc = Valor P corregido								

Tabla 2. Frecuencias y asociaciones para antígenos HLA-B en diabetes. Medellín.

En el locus HLA-CW, los alelos CW5 y CW7 fueron los más frecuentes en los dos grupos estudiados: el CW7 se encontró en más de 40% de los enfermos y de los sanos y el CW5 en 42.3% y 17.9% respectivamente (Tabla 1). La frecuencia génica de estos dos alelos fue de 0.24 en los pacientes. Se puede observar que el CW6 y el CW9 no se encontraron en los pacientes diabéticos y en los individuos sanos su frecuencia fue muy baja.

La distribución de los antígenos HLA-B se muestra en la Tabla 2. Se observa que el HLA-B 18 fue más común en los pacientes, 46% versus 12.5% de los sanos. El HLA B44 sólo estuvo presente en 7.7% de los diabéticos, en contraste con el grupo de sanos en el que fue positivo en 25%. Algo similar se observó con el B35 que tuvo una frecuencia de 11.5% en los enfermos y de 33.9% en la población control. Los antígenos HLA-B16, B45, B47, B57, B63 y B73 no se encontraron en los dos grupos estudiados; otros alelos como el B15, B27, B37, B38, B41, B55, B61, B62 y B63 sólo se observaron en el grupo control y con una frecuencia muy baja. La frecuencia génica en los diabéticos fue de 0.26 para el B18, 0.06 para el B35 y 0.04 para el B44.

Ninguno de los antígenos de clase I se encontró asociado de manera estadísticamente significativa ($P < 0,01$ y $P_c < 0,01$) como marcador genético de susceptibilidad o de protección para la DMID. Sin embargo, el RR para el HLA-B 18 fue de 3.7 y para el B44 de 0.29; esto sugiere que el primero es un marcador de susceptibilidad y el segundo de resistencia.

En la clase II observamos que los antígenos DR4 y DR3 estuvieron aumentados en los sujetos con DMID: 53% y 50% frente a 30.3% y 12.5% de los sanos. El HLA DR1 se presentó en 35.7% de los controles versus 3.8% de los enfermos (Tabla 3). Al analizar los subtipos del DRB 1*04 se observa que el *0405 se identificó en 34.6% de los diabéticos, pero no se presentó en la población control; el RR fue de 61.3. Los otros subtipos del DR4 se determinaron con una frecuencia más o menos similar en los dos grupos. Las frecuencias génicas de estos alelos en los diabéticos fueron: 0.29 para el DRB 1*0301 y 0.19 para el DRB 1*0405.

Los alelos DRB 1*0405 y *0301 se encontraron asociados con susceptibilidad a la enfermedad con un RR de 61.3 y 6.0 respectivamente ($P_c = 0.0013$; $P_c = 0.072$). El *1301 se definió como un alelo de protección con un RR de 0.01 ($P = 0.002$).

Los HLA-DQA1*0101, *03 y *0501 fueron los marcadores más frecuentes en estas poblaciones; el *0103 no se observó en los pacientes con DMID, pero en las personas sanas estuvo en 19.6%. El RR para este alelo fue de 0.07 ($P < 0.01$) (Tabla 3).

En el DQB1 se observa que el *0201, *0301 y *0302 fueron los más frecuentes. El *0101 no se observó en estas poblaciones. El DQB 1*0402 y *0603 no se encontraron en los pacientes, pero sí en la población sana. El DQB 1*0501 que se presentó en 42.8% de los sanos, sólo se encontró en 3.8% de los diabéticos y el RR fue 0.09 por lo cual se considera como un marcador de resistencia a la enfermedad.

El haplotipo DRB1*0405-DQA1*03-DQB1*0302 se observó en 53.8% de los diabéticos, pero no en la población control. El RR fue de 61.3 ($P < 0.001$). El DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 estuvo en 38.46% de los enfermos versus 8.9% de los sanos, con un RR de 6.0 (Tabla 4). El haplotipo DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603 estuvo presente en 3.8% de los enfermos y en 19.6% de los sanos.

Discusión

Los estudios de diferentes autores (7-14) han llevado a la conclusión que genes de varios loci pueden estar comprometidos en la predisposición genética a la diabetes mellitus.

Nerup y cols (10) en Dinamarca y Cudworth y Woodrow (11) en Gran Bretaña evaluaron los antígenos HLA y mostraron una alta frecuencia de los genes B8 y B15 en diabéticos. Posteriormente se encontró en la diabetes una mayor asociación con los antígenos de la clase II, especialmente el DR3/DR4. En este grupo los genes del HLA-B están en un desequilibrio de unión con los DR.

En caucásicos se ha podido demostrar la asociación entre la diabetes y los antígenos HLA-B8, B15, B18 y CW3 (9,15,16) y se ha encontrado que las combinaciones de B8 y B15 o B8 y B18 están relacionadas con la susceptibilidad a la enfermedad. También la DMID se halla estrechamente asociada con los antígenos de la clase II DR3 y DR4 (10-16); en contraste, la frecuencia de DR2 está disminuida o ausente en los casos de DMID. Estudios en la población de mexicanos-americanos informan

Antígeno	DMID (n = 26)			Controles (n = 56)			RR	Pc
	No.	F.A	F.G	No.	F.A	F.G		
DRB1*0101	1	3.9	0.02	20	35.7	0.2	0.1	
DRB1*0301	13	50.0	0.29	7	12.5	0.06	4	0.0006
DRB1*0401	2	7.6	0.04	6	10.7	0.05	0.69	
DRB1*0402	3	11.5	0.06	11	19.6	0.10	0.53	
DRB1*0405	9	34.6	0.19	0	0.0	0.00	61.3	
DRB1*07	1	3.9	0.02	16	28.5	0.1		0.004
DRB1*1201	7	26.9	0.15	4	7.1	0.04	3.7	0.03
DRB1*1402	10	38.5	0.20	14	25.0	0.13	1.5	0.3
DRB1*1501	2	7.6	0.04	8	14.3	0.07	0.5	0.5
DQA1*0101	12	46.1	0.26	25	44.6	0.26	1.0	1.0
DQA1*0102	5	19.2	0.10	12	21.4	0.11	0.9	
DQA1*0103	0	0.0	0.00	11	19.6	0.10	0.07	0.01
DQA1*0201	4	5.3	0.08	18	32.1	0.18	0.5	0.5
DQA1*03	14	53.8	0.29	22	39.2	0.22	1.8	0.01
DQA1*0501	16	65.3	0.41	17	30.4	0.17	2.0	0.01
DQB1*0201	14	53.8	0.32	23	41.1	0.23	0.3	
DQB1*0301	8	30.7	0.18	12	21.4	0.11	1.4	0.4
DQB1*0302	13	50.0	0.29	18	32.1	0.18	1.6	0.08
DQB1*0303	1	3.8	0.03	4	7.1	0.04		
DQB1*0501	1	3.8	0.02	24	42.8	0.35	0.08	0.0002
DQB1*05031	6	23.1	0.12	4	7.1	0.04	3.0	0.06
DQB1*0602	3	11.5	0.03	11	19.6	0.11		
DQB1*0603	0	0.0	0.00	11	19.6	0.10	0.0	0.01

Tabla 3. Frecuencias y asociaciones para antígenos HLA-B, DRB1, DQA1 y DQB1 en diabetes. Medellín.

Haplotipo			DMID		Controles	
DRB1	DQA1	DQB1	No.	%	No.	%
0101	0101	0501	1	3.8	19	33.9
0301	0501	0201	13	50.0	7	12.5
04	03	0302	14	53.8	16	28.6
07	0201	0201	1	3.8	18	32.1
0801	0401	0402	0	0.0	3*	5.4
09	03	0303	0	0.0	4	7.1
10	0101	0501	0	0.0	2	3.6
1101	0501	0301	0	0.00	8	14.3
1201	0501	0301	7	26.9	4	7.1
1301	0103	0603	1	3.8	11	19.6
1401	0101	05031	6	23.1	4	7.1
1501	0102	0602	3	11.5	10	17.9
1601	0102	0502	2	7.7	0	0.0
Bianco			4	7.1	6	10.7

Tabla 4. Frecuencias y asociaciones para antígenos HLA-DRB1, DQA1 y DQB1 en diabetes. Medellín.

una mayor frecuencia del DR3 y DR4 en diabéticos. Aproximadamente 50% de los haplotipos incluían el DR4, por ejemplo: B35/DR4, B44/DR4. Además se observó una asociación significativa entre HLA-B18 y DR3 (7, 42).

Se estudiaron los antígenos HLA en dos grupos de población de la ciudad de Medellín. Los datos presentados en este estudio confirman las observaciones previas de una asociación con la clase I en relación con el HLA B18, que se encontró en 46.1% de los enfermos; esto es similar a lo informado en la población caucásica. En la clase II los antígenos HLA DR4 y DR3 estuvieron aumentados en el grupo de enfermos, con 53% y 50% respectivamente como ocurre con otros grupos de población que padecen esta enfermedad.

Los HLA-DQA1*0301 y *0501 se encontraron frecuentemente, tanto en los diabéticos como en la población control. El DQA *0501 se demostró en 61.5% de los enfermos y en la población sana en 30.4%. El DQB1*0302 se ha encontrado asociado con susceptibilidad a la diabetes en las poblaciones negra, oriental y caucásica (28). Por el contrario, el HLA-DQB1 *0501 (con un RR < 0.08) se considera como un marcador que determina resistencia a la DMID en la población colombiana estudiada.

Nuestros hallazgos son similares a los realizados en otras poblaciones (43-45), donde se encuentra una asociación de susceptibilidad a la enfermedad con los haplotipos DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 y DRB1*04-DQA1*03-DQB1*0302; estos mismos haplotipos han sido encontrados

en caucásicos y en las poblaciones venezolana y mexicana, lo cual demuestra la relación con la raza blanca.

Conclusión

1. Hasta el momento no se han encontrado en la literatura médica colombiana publicaciones acerca de la asociación del complejo mayor de histocompatibilidad y la diabetes.

2. Se lograron determinar las frecuencias de los diferentes antígenos HLA clase I y clase II en diabéticos y en una población sana de la ciudad de Medellín.

3. Se determinaron asociaciones entre antígenos que podrían conferir susceptibilidad a la enfermedad, iguales a las encontradas por otros autores y se hallaron nuevos antígenos relacionados con susceptibilidad y resistencia a la enfermedad.

4. Como en nuestra población se encuentran distintos grupos étnicos, se sugiere ampliar el estudio hacia otras comunidades, para poder determinar los distintos marcadores de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad.

Summary

Twenty six insulin-dependent diabetic patients, as well as 56 healthy controls were studied in the city of Medellín. Both class I and II of the major histocompatibility complex were determined with 240 antisera using the microlymphotoxicity technique of Terasaki. Class II HLA antigens were also analyzed following the protocols of the XI International Histocompatibility Workshop, using PCR for DNA amplification while hybridizations were performed with selected oligonucleotide probes for HLA-DRB1, DQA1

and BQB1. Among class I antigens, HLA B1 was found to be increased in 46% of patients versus 12.5% of the control group, with a relative risk (RR) of 5.7; the opposite occurred with the antigen B44, which was found in 7.6% of the diabetic group versus 25% of the control group. In class II, alleles DRB1*0405 and *0301 were found to be correlated with susceptibility to the disease, with a RR of 61.3 and 6.6, respectively.

Referencias

1. Cardonnet LA. Epidemiología de la diabetes. En: Ruiz M, ed. Diabetes mellitus. Buenos Aires: Akadia; 1986.
2. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of Diabetes Mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1974; **28**: 1039-1057.
3. OMS. Comité de Expertos en Diabetes Sacarina. Tercer informe. Serie de Informes Técnicos. 1985; **727**: 10-21.
4. Bottazzo GF, et al. Direct evidence of various immunological phenomena associated with the insulinitis process. *Diabetologia* 1983; **25**: 142-146.
5. Lernmark A, et al. Autoimmunity of Diabetes. *Endocrinol Metabol Clin North Amer* 1991; **20**: 589-617.
6. Bottazzo GF, et al. Pathogenesis of Type I diabetes: Possible mechanisms of autoimmune damage. *Brit Med Bull* 1989; **45**: 37-57.
7. Yoon JW, et al. Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1979; **300**: 1173-1179.
8. Nelson PG, Pika D, Cudwor Th A, Woodrow J, Batchelor J. Histocompatibility antigens in diabetes identical twins. *Lancet* 1975; **II**: 193-194.
9. Segall M. Perspectives in Diabetes HLA and Genetics of IDDM. Holism Vs Reductionism? *Diabetes* 1988; **37**: 1005-1008.
10. Nerup J, et al. HLA antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 1974; **II**: 864-867.
11. Cudworth AG, Woodrow JC. HLA antigens and diabetes mellitus. *Diabetes* 1975; **24**: 345-349.
12. Rotter JI, et al. HLA genotypic study of insulin-dependent diabetes: the excess of DR3/DR4 heterozygotes allows rejection of the recessive hypothesis. *Diabetes* 1983; **32**: 169-174.
13. Svejgaard A, Platz P, Ryder LP. HLA and disease 1982. A survey. *Immunol Rev* 1983; **70**: 193-218.

14. Farid NR, et al. HLA-D-related (DRw) antigens in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1979; **28**: 552-557.
15. Deschamps I, et al. Segregation of HLA-DR2 among affected offspring of 66 families with type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1984; **27**: 80-90.
16. Schreuder G et al. HLA-DQ polymorphism associated with resistance to type I diabetes detected with monoclonal antibodies, isoelectric point differences, and restriction fragment length polymorphism. *J Exp Med* 1986; **164**: 938-942.
17. Ronningen KS, et al. The Amino Acid at position 57 of the HLA-DQB chain and susceptibility to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Human Immunol* 1989; **26**: 215-225.
18. Todd JA, et al. Identification of susceptibility loci for insulin dependent diabetes mellitus by trans-racial gene mapping. *Nature* 1989; **338**: 587-591.
19. Baisch JM, et al. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1836-1844.
20. Khalil I, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp 57 negative and HLA-DQ alpha Arg 52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990; **85**: 1315-1319.
21. Trucco M. To be or not to be ASP 57, that is the question. *Diabetes Care* 1992; **15**: 705-715.
22. Mijovic CH, Jenkins D, Jacobs KH, Penny MA, Fletcher JA, Barnett AH. HLA DQA1 alleles associated with genetic susceptibility to IDDM in black population. *Diabetes* 1991; **40**: 748.
23. Todd JA, Mijovic C, Fletcher J, Jenkins D, Bradwell AR, Barnett AH. Identification of susceptibility loci for insulin-dependent diabetes mellitus by trans-racial gene mapping. *Nature* 1989; **338**: 587.
24. Bao MZ, Wang JX, Dorman JS, Trucco M. HLA DQB non -Asp 57 allele and incidence of diabetes in China and the USA. *Lancet* 1989; **II**: 497.
25. Sakurami T, et al. HLA-DR specifications in Japanese with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1982; **31**: 105-106.
26. Yamagata K, Nakajima H, Hanafusa T, Noguchi T, Miyazaki A, Miyagawa J, Sada M, Amemiya H, Tanaka T, Kono N, Tarui S. Aspartic acid at position 57 of DQB chain does not protect against type I (insulin dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia* 1989; **32**: 762.
27. Aparicio JMR, Wakisaka A, Takada A, Matsuura N, Aizawa M. HLA DQB system and insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese does it contribute to the development of IDDM as it does in Caucasians? *Immunogenetics* 1988; **28**: 240.
28. Hu Ch Y, Allen M, Chuang LM, Lin BJ, Gyllensten U. Association of Insulin-dependent diabetes mellitus in Taiwan with HLA class II DQB1 and DRB1 alleles. *Human Immunol* 1993; **38**: 105-114.
29. Giordano BP, et al. Performance of seven blood glucose testing systems at high altitude. *Diabetes Educator* 1989; **15**: 444-448.
30. Boyum A. Separation of leucocyte from blood and bone marrow scand. *J Clin Lab Invest* 1968; **204**: 998-1000.
31. Terasaki PI, et al. Histocompatibility testin 1980. Los Angeles. California. UCLA Tissue Typing Laboratory. 1980.
32. Dehomoy K, et al. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 1991; **19**: 5444.
33. Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, et al. A molecular basis for MHC class II associated autoimmunity. *Science* 1988; **24**: 1003-1009.
34. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQB gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; **329**: 599-604.
35. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350-1354.
36. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffels S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239**: 487.
37. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified B globin and HLA-DQ alpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; **324**: 163.
38. Reference protocols (General Remarks). 11 th International HLA Workshop. DNA component.
39. Haidane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956; **20**: 309-314.
40. Mehta CR, Peti NR, Gray R. J Am Stat Assoc. Referenciado en Software Epi Info versión 5.00. 1985; **78**: 969-973.
41. Svejgaard A, Platz P, Ryder LP. Insulin dependent diabetes mellitus; joint results of the 8 th Workshop Study. Histocompatibility Testing 1980. Terasaki PI ed. Los Angeles, CA. UCLA Tissue Typing Lab. 1980; 638-656.
42. MacLaren N, et al. Initial pathogenic event in IDDM. *Diabetes* 1989; **38**: 534-542.
43. Vicario JL, Martínez-Lazo J, Corell A, Martín-Villa JM, Morales P, Lledo, Segurado OG, De Juan D, Arnaiz-Villena A. Comparison between HLA-DRB and DQ DNA sequences and classic serological markers as Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus predictive risk markers in the Spanish population. *Diabetologia* 1992; **35**: 47-48.
44. Abdulkadir J, Worku Y, Giphart MJ, et al. Susceptibility alleles at HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 loci in Ethiopian Childhood insulin-dependent. *Human Immunol* 1994; **41**: 171-172.
45. Balducci-Silano PL, Layrisse Z, Domínguez E, et al. HLA-DQA, and DQB, allele and genotype contribution to IDDM susceptibility in an ethnically mixed population. *Eur J Immunogen* 1994; **21**: 1-10.