

Alelos HLA-DQ y diabetes mellitus tipo I en Uruguay

Dra. Adriana Beatriz Mimbacas¹, Dra. Susana González Rodríguez¹,
Dr. Horacio Cardoso², Lic. Rossana Poggio³, Dr. Gerardo Javiel⁴,
Dra. Silvia García Barrera⁵, Dra. María del Rosario Bueno Perera⁶,
Dra. Laura Gallego Pereira⁵.

Resumen

Los principales genes que participan en la susceptibilidad para la diabetes tipo I están asociados a ciertos grupos HLA. Dentro de éstos, el locus HLA-DQ contiene alelos fuertemente asociados al riesgo de desarrollar la afección y alelos protectores. Se observa que en la diabetes tipo I existen variaciones en la presencia de alelos en las diferentes poblaciones y etnias. Nuestro grupo estudió comparativamente poblaciones de afectados, a riesgo y control desde el punto de vista molecular. Se realizó la amplificación por PCR del exón 2 del gen DQ β . Los resultados obtenidos indican que en el grupo de pacientes diabéticos el genotipo principalmente asociado fue: DQ β *0302 X DQ β *0201,02 y los alelos considerados como protectores fueron DQ β *0603,0604,0607. Estos datos coinciden con los de otras poblaciones caucásicas, hecho concordante con nuestro origen mayoritariamente europeo.

Palabras clave: HLA-DQ antígenos - genética
Diabetes mellitus insulino dependiente - genética
Uruguay

Introducción

La diabetes mellitus tipo I puede definirse como un trastorno crónico de base genética⁽¹⁾. Comprende la gran mayoría de los casos debido principalmente a la destrucción de las células β pancreáticas⁽²⁾. Su herencia es poligénica y su característica etiopatogénica es de tipo inmune⁽³⁾. Es una de las enfermedades más frecuentes en clínica humana, y su incidencia global ha aumentado pro-

gresivamente en las últimas décadas como consecuencia de factores como envejecimiento global de la población, mayor esperanza de vida en el diabético, mayor fecundidad de las madres diabéticas, aumento de la obesidad y aumento del consumo de azúcares refinados, entre otros⁽⁴⁾. En cuanto a su frecuencia, existen notables diferencias entre distintas zonas geográficas y sobre todo entre distintas razas. Desde el punto de vista genético los principales genes que participan en la susceptibilidad a la diabetes tipo I están localizados dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la región HLA ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 humano⁽⁵⁾.

Los antígenos HLA constituyen el principal sistema que determina genéricamente la compatibilidad hística en el hombre. Se ha demostrado una asociación clara entre determinadas dotaciones antigénicas y algunas enfermedades hereditarias de base autoinmune dentro de las cuales se encuentra la diabetes tipo I⁽⁶⁾. El número exacto de loci genéticos de HLA que afectan la susceptibilidad de un individuo a la diabetes tipo I, así como su localiza-

1. Doctora en biología.

2. Médico genetista.

3. Licenciado en biología

4. Médico diabetólogo.

5. Médico genetista

6. Médica endocrinóloga-diabetóloga.

División Citogenética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Servicio de Medicina Hospital Pasteur

Policlínica de Diabetes "Dra. Perla Temesio", Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay.

Correspondencia: Dra. A. Mimbacas. Instituto Clemente Estable. Avenida Italia 3318. Montevideo. Uruguay.

Presentado 24/3/98. Aceptado 27/11/98

Tabla 1. Frecuencia de los alelos HLA-DQ β 1 presentes en pacientes diabéticos y controles positivos

DQ β 1 (alelos)	Pacientes DMID %	Control %	p	RR (95% CI)
201,02	40,00	23,30	< 0,05	2,03
301	6,67	26,67	< 0,05	0,03
302	36,67	13,3	< 0,01	0,89
603	3,33	6,67	< 0,05	0,02

p: probabilidad; RR: riesgo relativo; DMID: diabetes mellitus insulino dependiente

Tabla 2. Genotipos HLA β DQ1 en pacientes diabéticos y controles

DQ β 1 Genotipo	DMID Frecuencia %	Control Frecuencia %	p	RR (95% CI)
0201/302	53,3	15,4	< 0,001	1,8
0302/X	66,7	86,6	< 0,001	7,0
0201/X	73,3	40,0	< 0,001	18,3
0201/603-04-07	6,7	20,0	NS	0,2
301/603-04-07	6,7	40,0	< 0,001	0,4

p: probabilidad; RR: riesgo relativo; DMID: diabetes mellitus insulino dependiente

ción, es aún desconocido⁽³⁾. Sin embargo, el locus HLA-DQ presenta marcadores de riesgo fuertemente asociados a esta enfermedad, y alelos protectores que reflejan la relevancia del rol del HLA-DQ en la patogénesis de la diabetes tipo I⁽⁵⁾.

Las probables combinaciones alélicas no son exactamente las mismas para todos los grupos étnicos e incluso varían de acuerdo a regiones geográficas, lo que sugiere la interrelación entre factores genéticos y ambientales⁽⁷⁾. En nuestro país no se conocían cuáles eran los alelos involucrados con esta enfermedad, por lo que se planteó el estudio de una muestra piloto para establecer en base a los marcadores HLA DQ β las asociaciones de alto riesgo tanto en individuos afectados por diabetes tipo I, individuos considerados población en riesgo, como en individuos controles.

Material y método

El objetivo de este trabajo fue analizar los alelos del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) relacionados, en nuestro país, con la diabetes tipo I. Para ello se analizó el grupo de alelos HLA clase II y dentro de éste, se estudiaron los loci DQ (cadena β) con técnicas de tipificado de alta resolución. Se emplearon un total de 42 individuos para dicho estudio: 15 de ellos (controles) individuos sanos (sin antecedentes) para la afección, 15 pacientes afectados y sus correspondientes familiares de primer grado provenientes de la Policlínica de Diabetes del Hospital Maciel "Dra. Perla Temesio", Montevideo, Uru-

guay. Se realizó la extracción de sangre periférica para la obtención de ADN genómico a partir de linfocitos. Con dicho ADN se realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando el exón 2 del gen DQ β 1 (158 pb). Posteriormente se realizó la reacción de hibridación con secuencias alelo específicas (ASO reverso) diseñadas según el 11° y 12° Workshop Internacional de Histocompatibilidad. Con los resultados obtenidos se realizaron las pruebas estadísticas de χ^2 , se estimó el riesgo relativo mediante la fórmula $(a \times d)/(b \times c)$, en la cual a y b son los números de pacientes que fueron positivos y negativos para un marcador respectivamente y c y d los respectivos números de los individuos controles.

Resultados

La frecuencia de los alelos DQ β presentes en los pacientes diabéticos, grupo control y de riesgo se muestran en la figura 1. La distribución de los genotipos definidos por la detección de los alelos se muestra en la figura 2. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre los genotipos encontrados en el grupo de pacientes diabéticos y el grupo control. El análisis de varianza mostró una $F=20,9778$ con una $p < 0,05$.

En las tablas 1 y 2 pueden observarse los diferentes grados de susceptibilidad y protección entre los distintos alelos. El mayor riesgo fue asociado con la forma heterocigota para DQ β *0201 y DQ β *0302, pero también es detectado un riesgo elevado con la sola presencia del alelo

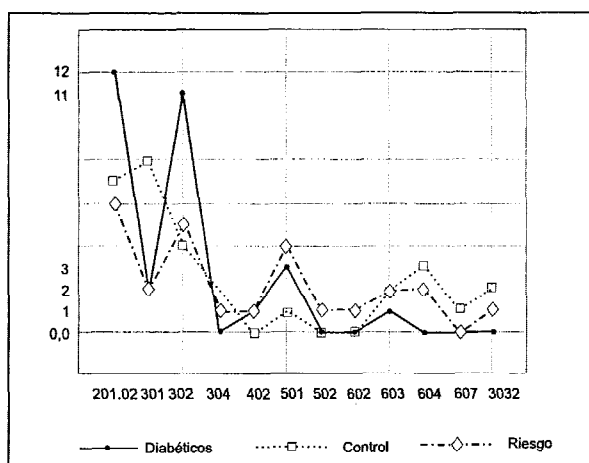


Figura 1. Alelos HLA-DQB1

DQB*0302 (RR=5,5). A su vez, el alelo DQB*0201 presentó una asociación moderada (DQB*0201/X RR=2,19). Los alelos asociados a bajo riesgo fueron DQB*0603,0604,0607 aún en presencia del marcador DQB*0201 (RR=0,08). No se observó entre los pacientes diabéticos la asociación entre el alelo DQB*0302 (de alto riesgo) y alelos protectores. El alelo DQB*0301 daría protección pasiva ya que el riesgo relativo de este alelo fue 0,19 y sólo se encuentra asociado en los pacientes diabéticos cuando se presenta junto con los alelos DQB*0302 y DQB*0201. Similares patrones fueron encontrados entre los familiares considerados como población de riesgo.

Discusión

De las enfermedades que presentan un componente genético, la diabetes es una de las más interesantes de estudiar porque su diagnóstico no es ambiguo y es factible encontrar grupos familiares que la presentan. Si bien existe mucha información sobre la relación existente entre HLA y diabetes tipo I, en nuestro país no existe ningún antecedente molecular sobre el tema. Estas razones nos llevaron a plantear la determinación, en la población uruguaya, de aquellos alelos de HLA presentes en individuos afectados por esta enfermedad. Existen en la literatura evidencias que ciertas combinaciones de alelos dentro del complejo HLA, particularmente dentro de HLA-DQ, están asociadas con resistencia o susceptibilidad a diabetes tipo I⁽⁸⁾. Específicamente se ha encontrado que DQB1*0302 confiere “susceptibilidad dominante” mientras que DQB1*0602 confiere “protección dominante”⁽⁹⁻¹⁶⁾. Nuestros datos indicarían que el alelo DQB1*0302 se encuentra presente en los pacientes afectados de diabetes tipo I en una proporción mayor de lo

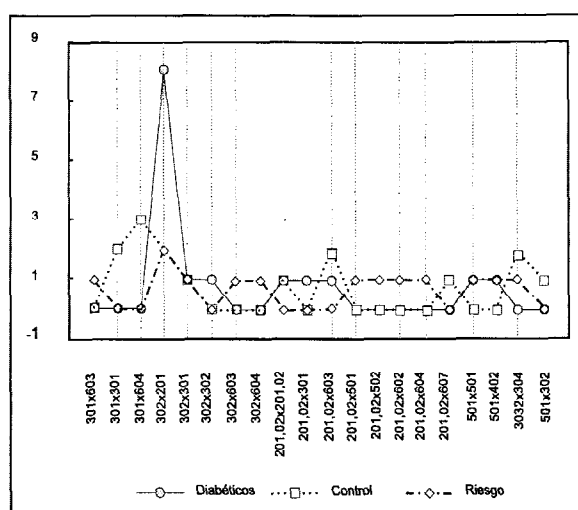


Figura 2. Distribución de los genotipos

esperable, teniendo en cuenta los datos de la población control. Este alelo, por lo tanto, estaría fuertemente asociado a dicha afección en nuestra población, mientras que el alelo DQB*0201 estaría débilmente relacionado. En los familiares de riesgo de pacientes con la enfermedad, la presencia de los alelos DQB*0603,604,607 estaría indicando el no desarrollo de la enfermedad. Esto concuerda con los datos de la literatura, que consideran estos alelos como protectores^(3,13-15,17).

Según la distribución de genotipos, pudimos observar que la mayor asociación con la enfermedad estaría dada por la forma heterocigota DQB*0201 x DQB*0302. Al considerar estos alelos junto con los alelos protectores el riesgo relativo disminuye.

El análisis de los alelos de HLA a través de la utilización de la técnica de PCR-ASO, nos da la posibilidad de estudiar los marcadores HLA por métodos de estudio del ADN, que son más exactos que los marcadores serológicos clásicos⁽¹⁸⁾. A partir de los datos presentados aquí, estaríamos en condiciones de establecer un correcto asesoramiento genético en cuanto a la predisposición a desarrollar esta enfermedad en la población de riesgo (familiares directos de los afectados). Esto adquiere mayor relevancia si consideramos que la diabetes mellitus es una enfermedad muy frecuente en Uruguay, presentándose en 6/100 individuos⁽¹⁹⁾. Si bien aún no está bien establecido qué porcentaje de estos pacientes corresponden a diabetes tipo I, se podría estimar en alrededor de 10% de los afectados. Esto haría un promedio de seis individuos cada 1.000 de nuestra población (3.000.000 de habitantes), que en algún momento de su vida podrían desarrollar la enfermedad, lo que haría un total de 18.000 individuos susceptibles. De acuerdo a nuestra tasa de natalidad, nacerían por año 360 niños potencialmente diabéticos. La

predicción del riesgo genético individual tiene por tanto, un considerable interés, particularmente con respecto a la prevención ya que permite realizar investigaciones dirigidas, en un futuro, a una correcta terapia.

Agradecimientos

A los Dres. Maximino Ruiz (Argentina) y Roberto Estrade (Uruguay) por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Gustavo Freschtel del Dpto. de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Farmacología y Bioquímica de la UBA (Argentina) y su equipo por la gran colaboración brindada.

Al personal de la Policlínica de Diabetes "Dra. Perla Temesio" del Hospital Maciel.

El presente trabajo fue realizado gracias a la financiación de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

Summary

The most important genes involved in the determination of the susceptibility to type 1 diabetes are associated to some HLA specific groups. Among them, HLA-DQ locus presents certain alleles associated either to develop or to prevent the onset of the disease.

Some variations related to population or ethnic differences between such associations have been described.

From the molecular point of view our group studied a sample of affected and risk populations as well as the control population in a comparative way. Exon 2 from DQB locus was analyzed by PCR amplification. The results obtained showed that in the affected individuals the main genotype observed was: DQB1*0302 x DQB1*02201,02.

The protective alleles were: DQB1*603, 0604 AND 0607. These data are coincident with other Caucasian populations and are also concordant with our mainly European origin.

Résumé

Les principaux gènes qui participent au possible développement d'un diabète type 1, sont associés à certains groupes HLA.

Parmi ceux-ci, le locus HLA-DQ a autant d'allèles associés au risque de développer cette maladie, que d'allèles protecteurs.

Il existe, dans ce type de diabète, des variantes à la présence des allèles, selon les différentes ethnies et populations.

Notre groupe de travail a comparé des populations de malades, de risque et de contrôle moléculaire.

On a réalisé l'amplification au moyen de la technique du PCR de l'exon 2 du gène DQB.

Les résultats montrent que dans le groupe de malades, le génotype le plus associé a été: DQB1*0302 X DQB1*0201, 02; les allèles protecteurs: DQB1*0603, 0604 et 0607.

Ces données correspondent à celles d'autres populations caucasiennes, vu notre origine européenne.

Bibliografía

1. **Hitman GA, Fennessy M, Metcalfe K.** Diabetes: from phenotype to genotype and back to phenotype. In: Humphries SE, Malcolm S. From genotype to phenotype. Oxford: Bios Scientific, 1994: 233-48.
2. **Diagnóstico y clasificación de diabetes mellitus IDF-OMS. Informe Comité de expertos para el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus.** Diabetes Care 1997; 20: 1-15.
3. **Itonen J, Reijonen H, Herva E, Sjöroos M, Iitiä A, Lövgren T et al.** Rapid HLA-DQβ genotyping for four alleles in the assessment of risk for IDDM in the finnish population. Diabetes Care 1996; 19(8): 795-800.
4. **Figuerola D.** Metabolismo de los hidratos de carbono. In: Medicina Interna. Barcelona: Doyma, 1988: 1719-89.
5. **Thorsby E, Ronningen KS.** Role of HLA genes in predisposition to develop Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. Ann Med 1993; 24(6): 523-31.
6. **Thorsby E, Ronningen KS.** Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type-1 (Insulin-Dependent) Diabetes-Mellitus. Diabetología 1993; 36(5): 371-7.
7. **Buzzetti R, Nistico L, Osborn JF, Giovannini C, Chersi A, Sorrentino R.** HLA-DQα1 and DQB1 gene polymorphism in type-1 diabetic patient from central Italy and their use for risk prediction. Diabetes 1993; 42(8): 1173-8.
8. **Baisch JM, O'Brien ME, Hoover ML, Capra JD.** Analysis of HLA genotypes and susceptibility to Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus-HLA-DQα complements HLA-DQβ. Scandinavian J Immunol 1993; 36(2): 321-30.
9. **Erlich HA, Bugawan T.** HLA Class II gene polymorphism: DNA typing, evolution, and relationship to Disease susceptibility. In: PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton, 1989: 193-208.
10. **Gutiérrez López MD, Bertera S, Chantres MT, Vavassori C, Dorman JS, Trucco M, et al.** Susceptibility to type-1 (Insulin-Dependent) diabetes-mellitus in spanish patients correlates quantitatively with expression of HLA-DQ alpha Arg 52 and HLA-DQ beta non-asp 57 alleles. Diabetología 1992; 35(6): 583-8.
11. **Sorrentino R, Constanzi S, Cascino I, Tosi R.** Probe less genomic typing of Arg52 (Type 1 Diabetes-associated) and non-Arg52 (non-type-1 Diabetes-associated) HLA-DQα1 alleles. Autoimmunity 1992; 13(4): 269-74.
12. **Kockum I, Wassmuth R, Holmberg E, Michelsen B, Lernmark A.** HLA-DQ primarily confers protection and HLA-DR susceptibility in type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes studied in population-based affected families and controls. Am J Hum Genet 1993; 53(1): 150-67.
13. **Tosi G, Mantero G, Magalini AR, Primi D, Soffiati M, Pinelli L et al.** HLA-DQB1 typing of north east italian IDDM patients using amplified DNA, oligonucleotide probes and a rapid DNA-enzyme immunoassay (DEIA). Mol Immunol 1993; 30(1): 69-76.
14. **Forbes LV, Brown LJ, Scott RS.** HLA-DQ-beta typing and

- non-asp57 alleles in IDDM and nondiabetic subjects in New Zealand. *Diabetes Care* 1993; 16(8): 1179-83.
15. **Cavan DA, Jacobs KH, Penny MA, Kelly MA, Mijovic C, Jenkins D et al.** Both DQ α 1 Genes are implicated in HLA-associated protection from type I (Insulin-Dependent) Diabetes-Mellitus in a british caucasian population. *Diabetología* 1993; 36(3): 252-7.
 16. **Cucca F, Muntoni F, Lampis R, Frau F, Argiolas L, Silveti M et al.** Combinations of specific DR β 1, DQ α 1, DQ β haplotype are associated with Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus in Sardinia. *Human Immunology* 1993; 37(2): 85-94.
 17. **Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, Awdeh ZL, Alper CA, Erlich HA et al.** HLA-DQ β *602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* 1995; 44(6): 608-13.
 18. **Vicario JL, Martinezlazo J, Corell A, Martinvilla JM, Morales P, Lledo G et al.** 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. *Diabetología* 1992; 35(5): 475-81.
 19. **Torres J, Bonifazino JL.** *Diabetes*. 2a ed. Montevideo: Librería Médica, 1989: 300.