

ARTÍCULO ORIGINAL

Polimorfismos de un solo nucleótido representativos para los alelos clásicos del antígeno leucocitario humano en familias antioqueñas con diabetes mellitus tipo 1

Diana Clobeth Sarrazola¹, Alejandra Marcela Rodríguez¹, Martín Toro², Alejandra Vélez³, Jorge García-Ramírez⁴, María Victoria Lopera², Cristian M. Álvarez⁵, Vital Balthazar González^{†,1,6}, Juan Manuel Alfaro^{1,6}, Nicolás Pineda-Trujillo¹

¹ Grupo de Mapeo Genético, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² IPS Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Pontificia Universidad Bolivariana, Medellín, Colombia

⁴ Instituto Antioqueño de Diabetes, Medellín, Colombia

⁵ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, GICIC, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁶ Sección de Endocrinología Pediátrica, Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La región del antígeno leucocitario humano (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) se ha asociado claramente con enfermedades autoinmunitarias, como la diabetes mellitus de tipo 1. Los polimorfismos representativos de un solo nucleótido (*tag Single Nucleotide Polymorphism*, tag SNP) constituyen una forma alternativa de evaluar los alelos clásicos del HLA. En la población europea se ha reportado un grupo de tag SNP para múltiples alelos clásicos relacionados con la predisposición o la resistencia frente a dicha enfermedad.

Objetivo. Validar la metodología basada en los tag SNP enfocada en la inferencia de alelos HLA clásicos, y evaluar su asociación con la diabetes mellitus de tipo 1 en una muestra de familias antioqueñas.

Materiales y métodos. Se estudió una muestra de 200 familias antioqueñas con uno a dos hijos afectados por diabetes mellitus de tipo 1. Se genotipificaron 13 SNP mediante el ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*) con cuatro iniciadores, o mediante la PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Además, se evaluó la validez de los tag SNP de 1.000 genomas reportados en europeos en una muestra de 60 individuos de la población colombiana de Medellín. Se hicieron las pruebas de desequilibrio de la transmisión, de desequilibrio de ligamiento y de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Resultados. En la población de estudio no se encontró suficiente desequilibrio de ligamiento entre los SNP y los alelos clásicos evaluados, por lo cual no fue posible inferir los alelos clásicos del HLA para el conjunto de familias con diabetes mellitus de tipo 1. El estudio de asociación evidenció que esta región aporta factores tanto de riesgo como de protección para el desarrollo de la enfermedad. Los tag SNP apropiados para la muestra de estudio se determinaron usando los SNP ubicados en la región HLA en la base de datos del *1000 Genomes Project* en la mencionada población.

Conclusiones. Los patrones de desequilibrio de ligamiento en la población estudiada fueron diferentes a los reportados para la población europea. A pesar de esto, se encontró evidencia clara sobre el papel de la región HLA en el riesgo de padecer diabetes mellitus de tipo 1 en la población de estudio.

Palabras clave: diabetes mellitus de tipo 1; complejo mayor de histocompatibilidad; desequilibrio de ligamiento; enfermedades autoinmunitarias.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3768>

Classical HLA alleles tag SNP in families from Antioquia with type 1 diabetes mellitus

Introduction: The HLA region strongly associates with autoimmune diseases, such as type 1 diabetes. An alternative way to test classical HLA alleles is by using tag SNP. A set of tag SNP for several classical HLA alleles has been reported as associated with susceptibility or resistance to this disease in Europeans.

Contribución de los autores:

Alejandra Marcela Rodríguez, Vital Balthazar González, Juan Manuel Alfaro y Nicolás Pineda-Trujillo: idea y diseño del estudio
Diana Clobeth Sarrazola, Martín Toro, Alejandra Vélez, Jorge García-Ramírez y María Victoria Lopera: obtención de la muestra y de los datos clínicos y moleculares

Diana Clobeth Sarrazola, Cristian M. Álvarez y Nicolás Pineda-Trujillo: análisis genéticos y moleculares, escritura del manuscrito

Objective: We aimed at validating the methodology based on tag SNP focused on the inference of classical HLA alleles, and at evaluating their association with type 1 diabetes mellitus in a sample of 200 families from Antioquia.

Materials and methods: We studied a sample of 200 families from Antioquia. Each family had one or two children with T1D. We genotyped 13 SNPs using tetra-primer ARMS-PCR or PCR-RFLP. In addition, we tested the validity of the tag SNP reported for Europeans in 60 individuals from a population of Colombians living in Medellín (CLM) from the 1000 Genomes Project database. Statistical analyses included the Hardy-Weinberg equilibrium, the transmission disequilibrium and the linkage disequilibrium tests.

Results: The linkage disequilibrium was low in reported tag SNP and classical HLA alleles in this CLM population. Association analyses revealed both risk and protection factors to develop type 1 diabetes mellitus. Appropriate tag SNPs for the CLM population were determined by using the genotype information available in the 1000 Genome Project database.

Conclusions: Although linkage disequilibrium patterns in this CLM population were different from those reported in Europeans, we did find strong evidence of the role of HLA in the development of type 1 diabetes mellitus in the study population.

Key words: Diabetes mellitus, type 1; major histocompatibility complex; linkage disequilibrium; autoimmune diseases.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3768>

La región HLA (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) del complejo mayor de histocompatibilidad en humanos comprende aproximadamente 4 Mb de ADN, y en ella se codifican alrededor de 200 genes. Se encuentra localizada en el brazo corto del cromosoma 6, región 6p21.3. Esta región se ha subdividido en tres con base en las proteínas codificadas: la HLA de clase I, en la que se codifican las moléculas clásicas HLA-A, HLA-B y HLA-C; la HLA de clase II, en la que se codifican las moléculas clásicas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, y la HLA de clase III, en la cual se codifican otras proteínas involucradas en la inmunidad (1).

La diabetes mellitus de tipo 1 es una enfermedad compleja causada por la destrucción autoinmunitaria de las células β de los islotes pancreáticos. Esta destrucción se ha descrito como un proceso crónico que, generalmente, se inicia en la infancia o la adolescencia, el cual genera deficiencia en la producción y la liberación de insulina, así como pérdida de la regulación del metabolismo de la glucosa (2).

Como sucede en la mayoría de las enfermedades autoinmunitarias, las variaciones en la región del HLA representan el mayor riesgo genético para el desencadenamiento de la diabetes mellitus de

tipo 1. De hecho, se ha descrito que esta región aporta cerca del 50 % del riesgo genético de desarrollarla (3).

En la población caucásica, dicho riesgo es conferido por las moléculas de HLA de clase II, especialmente los alelos DRB1*03 y DRB1*04 cuando se encuentran en haplotipos con los alelos DQB1*02:01 y DQB1*03:02, respectivamente (4). Asimismo, se ha observado que ciertos alelos HLA de clase I confieren el riesgo de ser afectado por la enfermedad, siendo el alelo HLA-A*24:02 el de mayor asociación reportada (5).

También, se ha observado que algunos alelos, como el HLA-DQB1*06:02 y el HLA-A*03:01, confieren protección frente al riesgo de padecer esta enfermedad. Además, se ha observado que los alelos HLA-I, en conjunto con los HLA-II, pueden conferir un alto grado de protección. Por ejemplo, se ha determinado que el alelo A*32:01 y el DRB1*11:01 en combinación con el DQB1*03:01, así como el A*11:01 y el DRB1*15:01 en combinación con el DQB1*06:02 o con el DRB1*07:01 y el DQB1*02, configuran haplotipos que confieren protección frente al riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo 1 (6,7).

En Antioquia, Colombia, el único reporte sobre la asociación entre el desarrollo de esta enfermedad y la región HLA, ha sido el de Montoya, *et al.*, quienes llevaron a cabo un estudio de casos y controles en 1996 para establecer la posible asociación con la enfermedad de los alelos clásicos de los HLA de clases I y II (8). En este estudio no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los

Correspondencia:

Nicolás Pineda Trujillo, Grupo de Mapeo Genético, Departamento de Pediatría y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D N° 62-29, Medellín, Colombia
Teléfono: (54) 219 6065
nicolas.pineda@udea.edu.co

Recibido: 21/02/17; aceptado: 12/12/17

alelos clásicos de los HLA de clase I y la enfermedad, pero sí entre el alelo HLA-DRB1*03:01 y un riesgo cuatro veces mayor de desarrollarla.

Se sabe que los genes del complejo mayor de histocompatibilidad se heredan como bloques de haplotipos, lo cual se traduce en un gran desequilibrio de ligamiento en la región. Este hecho favorece los estudios basados en metodologías como la de los polimorfismos representativos de un solo nucleótido (*tag Single Nucleotide Polymorphism*, tag SNP), pues con ellas no se requiere caracterizar todas las variantes presentes en la región y es posible obtener información acerca de la mayor parte de ellas e, incluso, asignar los alelos clásicos de los HLA presentes en una población (9).

En su estudio, de Bakker, *et al.*, genotipificaron más de 7.500 SNP dentro de la región HLA de clase I y de clase II en cuatro poblaciones, africana (YRI), europea (CEU), china (CHB) y japonesa (JPT)), y determinaron la variación dentro de esta región genética. En ese estudio se identificaron los tag SNP informativos para la captura de variantes en la región HLA en cada una de estas poblaciones (9), con lo cual se pudieron capturar los alelos clásicos del HLA.

Esta metodología ofrece una alternativa atractiva cuando no se requiere una exactitud del 100 %, lo que permite analizar la asociación entre la región del HLA y las enfermedades autoinmunitarias y, además, llevar a cabo estudios epidemiológicos en los cuales el tipo de HLA puede ser la causa potencial de una enfermedad. Además, es una alternativa económica para predecir el riesgo de recurrencia en los familiares de pacientes con enfermedades como la diabetes mellitus tipo 1 (10,11).

El propósito de este estudio fue validar los tag SNP de los alelos HLA clásicos reportados para población europea (9) y evaluar su asociación en una muestra de 200 familias antioqueñas nucleares con integrantes afectados por la diabetes mellitus de tipo 1.

Materiales y métodos

Muestras

Se contó con una muestra de 200 familias antioqueñas conformadas por 192 tríos familiares (los dos padres y un hijo con diabetes mellitus de tipo 1), y ocho familias con dos hijos afectados. Los pacientes fueron seleccionados en el Servicio de

Endocrinología Pediátrica de la Universidad de Antioquia, el Hospital Universitario San Vicente Fundación, la Clínica UPB-Medellín, la IPS Universitaria-Universidad de Antioquia y el Instituto Antioqueño de Diabetes, Metabolismo y Nutrición.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1) tener un diagnóstico clínico acorde con los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA) y confirmado por el laboratorio (12); 2) haber sido diagnosticado antes de los 15 años de edad; 3) contar con ambos padres vivos, y 4) tener ancestro 'paisa' según la información de la propia familia en la encuesta que se hizo para recopilar los datos demográficos y sobre la procedencia de los bisabuelos del paciente. Se asumió que si al menos seis de los ocho bisabuelos eran de ascendencia paisa, el caso podría ingresar al estudio.

Elección y genotipificación de los tag SNP

Se genotipificaron 13 marcadores dentro de la región HLA, así: rs2844821, rs762324, rs9380122, rs1611430, rs2523933, rs29243, rs2844535, rs3094117, rs3819294, rs1265100, rs7745906, rs2524074, para la región HLA de clase I, y rs2854275 para la región HLA de clase II. Estos marcadores fueron propuestos por de Bakker, *et al.*, como tag SNP para alelos clásicos de HLA en la población europea asociados con la protección o el riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo 1 (9).

La genotipificación se hizo mediante el ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*), o mediante la PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*). La elección de los iniciadores se hizo con la aplicación diseñada por Ye, *et al.* (13), y la de las enzimas de restricción, con el programa NEBcutter™, versión 2.0. (New England Biolabs, Inc.) diseñado por Vincze, *et al.* (14). Estos dos métodos se basan en las PCR, las cuales se realizaron en un termociclador Dyad Dual-Bay™ (BioRad). El cuadro suplementario 1 presenta la secuencia de oligonucleótidos y las enzimas de restricción usadas para el proceso de genotipificación.

Análisis por simulación computacional y elección de los tag SNP para la población antioqueña

Se tomaron los datos de 60 individuos pertenecientes a la población de colombianos que viven en Medellín participantes en la fase 3 del proyecto de

mil genomas (*1000 Genomes Project*) iniciada en mayo de 2013 (15). Se contaba con la información de los alelos de estos individuos para los SNP mencionados, así como de los alelos HLA clásicos (16). El objetivo era validar que estos tag SNP estuvieran en desequilibrio de ligamiento con los alelos clásicos de HLA que se querían analizar en esta población. La información sobre la diversidad de HLA para esta población, se tomó de los ensayos de tipificación realizados por Gourraud, *et al.*, en el 2013 (16), cuyos datos están disponibles en la página del *1000 Genomes Project* (<http://www.internationalgenome.org/>). Los cálculos y gráficos del desequilibrio de ligamiento se hicieron con el programa Haploview™, versión 4.2 (Broad Institute of MIT and Harvard) (17).

La búsqueda de los SNP en acentuado desequilibrio de ligamiento con los alelos clásicos HLA, se hizo en la población colombiana registrada en la base de datos del *1000 Genomes Project*. Para ello, se tomaron todos los SNP reportados en dicha base de datos ubicados dentro de la región HLA de clases I y II, clásica y extendida. En total, se tomaron 133.289 SNP que abarcan una región de 6,86 Mb.

Dado el gran número de SNP, primero se calculó el desequilibrio de ligamiento de los SNP con los alelos clásicos reportados para 60 individuos de esta población usando el paquete Plink™, versión 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) (18), y así, se hallaron los marcadores con un desequilibrio de ligamiento moderado ($R^2 > 0,5$). Posteriormente, usando la función *tagger* del programa Haploview™, versión 4.2 (17), se obtuvieron los tag SNP ($R^2 > 0,8$) más apropiados para la población antioqueña.

Análisis de asociación e interacción

El análisis de asociación entre los marcadores y la diabetes mellitus de tipo 1, se hizo usando la prueba no paramétrica de desequilibrio de transmisión (*Transmission Disequilibrium Test*, TDT), la cual mide las transmisiones desde los padres heterocigotos hacia los hijos afectados (19), con el programa Unphased™, versión 3.1.7 (S. Karger AG, Basel) (20). La interacción se analizó con el paquete *Trio logic regression* implementado por el R Project™, versión 3.2.0 (The R Foundation) (21), entre los 13 marcadores de HLA y los siguientes nueve marcadores en otros genes asociados con la diabetes mellitus de tipo 1 genotificados en un estudio previo (22): rs2476601, rs1217418 y rs2488457 para el gen *PTPN22*; rs1990760,

rs3747517 y rs10930046 para el gen *IFIH1*, y los SNP rs231775, rs3087243 y rs231779 para el gen *CTLA4*.

El valor corregido de *p* se asumió como 0,0023 para mantener una significación alfa de 0,05, y se usó tanto para los análisis de asociación como para los de interacción.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado aprobado para este estudio.

Resultados

En el cuadro 1 se presentan los valores de desequilibrio de ligamiento entre los tag SNP (9) y los alelos clásicos en la población del *1000 Genomes Project*. Ninguno de los SNP (solos o en haplotipos) obtuvo un $R^2 > 0,8$. Por lo tanto, no se puede decir que estos marcadores sean *tags* apropiados para inferir los alelos clásicos del HLA en esta población. Por su parte, el SNP analizado para la región de HLA-II (rs2854275) registró un acentuado desequilibrio de ligamiento ($R^2 = 0,826$) con el alelo clásico HLA-DRB1*03:01 para esta población.

Los tag SNP basados en la CLM del 1000 Genomes Project

Dados los resultados que se presentan en el cuadro 1, se hizo necesario identificar los tag SNP propios de la población en estudio. Para ello, se usó la información de los SNP presentes en la región HLA de clase I y II, clásica y extendida.

Para la región clásica y la extendida de los HLA de clase I, se analizaron 98.743 marcadores comprendidos entre la posición 25.730.000 y la 31.480.000, la cual abarca una región de 5,75 Mb. Para la región clásica y la extendida de los HLA de clase II, se analizaron 34.546 SNP comprendidos entre las posiciones 32.260.000 y 33.370.000, las cuales abarcan una región de 1,11 Mb.

Tres (HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:02, HLA-DRB1*04:05) de los 19 alelos clásicos de interés por su asociación con la diabetes mellitus de tipo 1, no se pudieron analizar por su baja frecuencia en la población objeto. Para otros cuatro alelos (HLA-A*02:01, HLA-B*15:01, HLA-C*03:04 y HLA-DQB*06:02) no se encontraron SNP que tuvieran un acentuado desequilibrio de ligamiento ($R^2 > 0,8$). Para los restantes doce alelos HLA clásicos, se pudieron obtener *tags* con un $r^2 > 0,8$ para esta población (cuadro 2).

Cuadro 1. Medidas del desequilibrio de ligamiento D' y r² entre los tag SNP reportados y los alelos clásicos de HLA en población colombiana en la base de datos del 1000 Genomes Project

rs2844821 – HLA-A*02:01 – rs762324			rs9380122 – rs1611430 – HLA-A*03:01		
Haplotipo	D'	R ²	Haplotipo	D'	R ²
A-A-C	-0,8511	0,4925	A-A-A	-1	0,01182
A-A-T	-0,6284	0,03748	A-A-C	-1	1,019e-010
A-C-C	0,6565	0,4154	A-G-A	1	0,00277
A-C-T	0,9227	0,01026	A-G-C	1	0,008097
G-A-C	0,8511	0,4925	G-A-A	1	0,01182
G-A-T	0,6284	0,03748	G-A-C	1	1,019e-010
G-C-C	-0,6565	0,4154	G-G-A	-1	0,00277
G-C-T	-0,9227	0,01026	G-G-C	-1	0,008097

rs3094117 – HLA-B*15:01 – rs3819294			rs1265100 – rs7745906 – HLA-C*03:03		
Haplotipo	D'	R ²	Haplotipo	D'	R ²
G-A-C	0,9703	3,982e-014	C-A-C	0,7163	0,3534
G-A-T	-0,2897	0,0009646	C-G-C	-0,585	0,2795
G-C-C	0,8224	0,03469	T-A-A	1	0,007444
G-C-T	-1	0,03704	T-A-C	-0,7163	0,3534
T-A-C	-0,9703	3,982e-014	T-G-A	1	3,079e-012
T-A-T	0,2897	0,0009646	T-G-C	0,585	0,2795
T-C-C	-0,8224	0,03469			
T-C-T	1	0,03704			

Los haplotipos se componen de dos tag SNP reportados para la población europea (CEU) y el alelo HLA clásico con el cual fueron asociados en dicha población. En la posición del alelo clásico se colocó A/C para la presencia o ausencia del alelo analizado. Se presentan los resultados para la población de estudio con base en cuatro alelos HLA clásicos y sus tag SNP según de Bakker, *et al.* (9).

Cuadro 2. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en desequilibrio de ligamiento con alelos clásicos de HLA en población colombiana

Alelo clásico	Frecuencia*	Tag SNP	Sustitución	Alelos	MAF	R ²
HLA-A*03:01	0,150	rs1736995	T/C	T	0,0769	0,928
HLA-A*24:02	0,175	rs140232731	C/A	A	0,1078	0,944
HLA-A*30:02	0,042	rs3893467	T/C	C	0,0276	1,0
HLA-B*07:02	0,050	rs3130497	C/T	T	0,0511	0,826
HLA-B*08:01	0,017	rs2394980	C/T	T	0,0701	1,0
HLA-C*01:02	0,108	rs9368669	T/C	T	0,0697	1,0
HLA-C*03:03	0,025	rs114411923	A/T	T	0,0134	1,0
HLA-C*07:01	0,092	rs2853949	C/T	T	0,0923	1,0
HLA-DRB1*03:01	0,042	rs2856674	T/C	C	0,0649	0,826
HLA-DRB1*15:01	0,058	rs3117100	C/T	T	0,0375	1,0
HLA-DQB1*02:01	0,133	rs9273494	G/T	T	0,1645	1,0
HLA-DQB1*03:02	0,183	rs9275437	C/T	T	0,0851	1,0

* Frecuencia de alelos clásicos en la población de colombianos de Medellín; MAF: frecuencia del alelo menor; R²: coeficiente de determinación. Los datos que dieron origen a este cuadro provienen de www.1000genomes.org, particularmente los de la población de colombianos de Medellín.

La figura 1 muestra el desequilibrio de ligamiento entre el alelo HLA-B*07:02 y doce marcadores (SNP) dentro de la región de HLA-I, los cuales tienen un perfecto desequilibrio de ligamiento entre sí, es decir, cualquiera de estos marcadores serviría como *tag* para este alelo HLA clásico en la población de estudio.

Análisis de asociación

En el cuadro 3 se presentan los resultados de asociación de los 13 SNP probados en las 200 familias nucleares antioqueñas. Se observó que los

SNPs rs29243 ($p=2,634e-5$; *odds ratio* (OR)=2,85 [1,67-4,85]) y rs2854275 ($p=1,27e-7$; OR=2,71 [1,82-4,02]) contribuyen al riesgo genético de padecer la enfermedad en la población analizada.

Los marcadores rs9380122 ($p=4,19e-6$; OR=0,24 [0,12-0,47]) y rs1611430 ($p=0,002$; OR=0,63 [0,51-0,86]) están asociados con la protección frente al riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo 1. Los demás marcadores no superaron el nivel de confianza del 95 % después de la corrección para múltiples comparaciones.

El análisis de interacción entre los marcadores analizados para el HLA no evidenció interacciones estadísticamente significativas, pues ninguna de ellas superó el valor de p corregido (0,0023) para múltiples comparaciones.

Discusión

Las causas del desequilibrio de ligamiento son diversas. Una de ellas es la cercanía física entre los *loci*, por lo cual la probabilidad de que ocurra un evento de recombinación entre ambos disminuye. Otra fuente de este desequilibrio es la mezcla de dos poblaciones que pueden estar inicialmente en equilibrio de Hardy-Weinberg y que poseen diferentes frecuencias alélicas (23).

En este estudio se estimó el desequilibrio de ligamiento entre los tag SNP analizados (reportados por de Bakker, *et al.*) y los alelos clásicos de HLA reportados para la población CLM en el *1000 Genomes Project* para validar si estos SNP eran *tags* apropiados de los alelos clásicos en la población de estudio.

Teniendo en cuenta la ascendencia predominantemente europea de los antioqueños (24,25), se eligieron los marcadores reportados por de Bakker, *et al.*, en el 2006 para población europea residente entonces en los Estados Unidos (CEU) (9).

El análisis reveló diferencias en el desequilibrio de ligamiento en la región de HLA entre la población europea y la antioqueña. Tales diferencias pueden estar relacionadas con el efecto de mezcla y con el crecimiento poblacional de esta última en relativo aislamiento. Además, la ascendencia amerindia y africana de los antioqueños también contribuye a diferenciar los bloques de haplotipos definidos por eventos de recombinación (23,26).

Con el propósito de identificar los tag SNP de los alelos HLA clásicos para esta población de Antioquia, se usó la información disponible en la base de datos del *1000 Genomes Project*. Se logró la identificación de los tag SNP de 12 de 19 alelos HLA clásicos. A diferencia de lo observado por de Bakker, *et al.*, en población europea, en la cual se

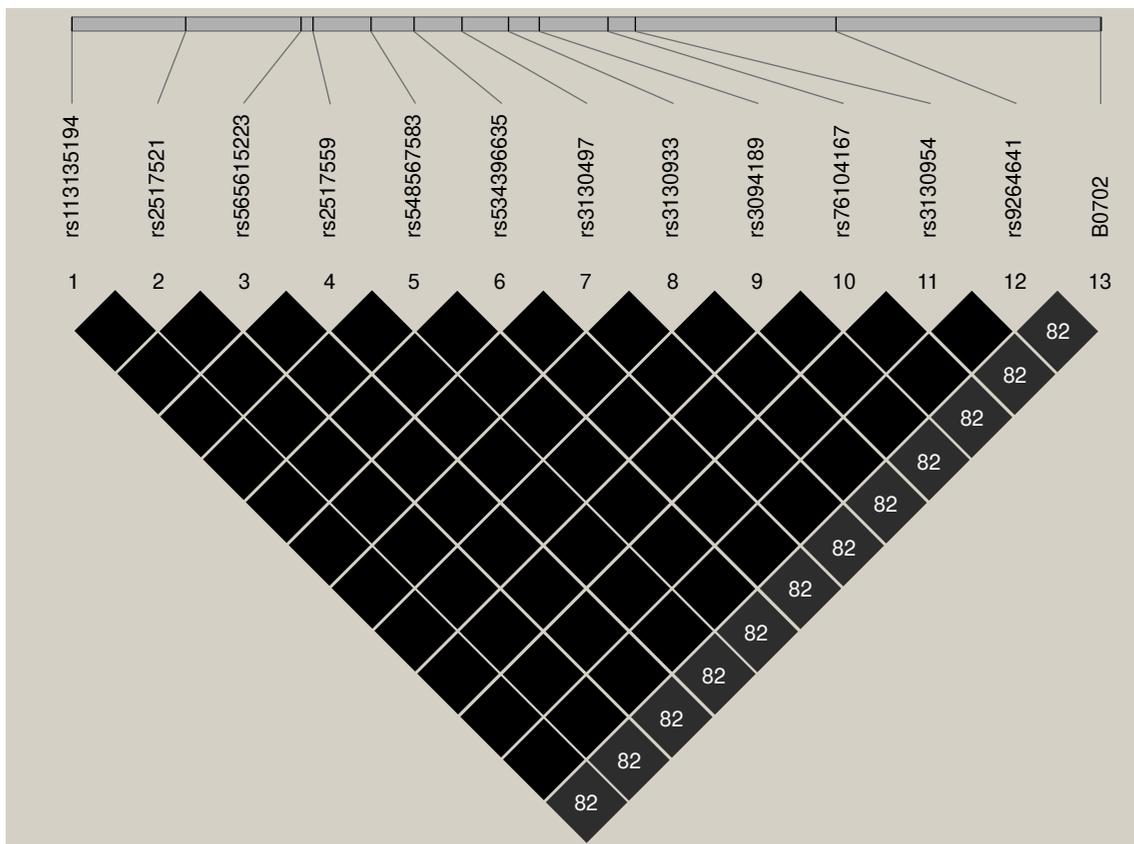


Figura 1. Desequilibrio de ligamiento entre el alelo HLA-B*07:02 y doce marcadores en la región HLA de clase I. Valores expresados en R². El intervalo entre los polimorfismos de un solo nucleótido incluye una región física de 248,322 pb. El alelo clásico se localiza en posición centromérica (identificado con la marca # 13).

Cuadro 3. Asociación alélica de los tag SNP con la diabetes mellitus de tipo 1 establecida mediante la prueba TDT

SNP	Alelo	T:UT	Frec. T:UT	χ^2	p	Odds ratio (IC _{95%})
rs9380122	G	10:42	0,025:0,105	21,17	4,19e-6	0,24 (0,12-0,47)
	A	388:356	0,97:0,89			
rs29243	T	58:22	0,15:0,06	17,67	2,634e-5	2,85 (1,67-4,85)
	C	320:356	0,85:0,94			
rs2844821	G	63:79	0,17:0,21	1,76	0,18	0,802(0,58-1,11)
	A	317:301	0,83:0,79			
rs1611430	G	159:206	0,46:0,59	9,57	0,002	0,63 (0,51-0,86)
	A	189:142	0,54:0,41			
rs2523933	A	123:105	0,31:0,26	1,98	0,16	1,25 (0,92-1,69)
	C	273:291	0,69:0,73			
rs762324	C	358:368	0,904:0,93	1,48	0,22	0,74 (0,46-1,204)
	T	38:28	0,096:0,071			
rs3094117	G	226:201	0,57:0,51	2,35	0,13	1,21 (0,95-1,54)
	T	172:197	0,43:0,49			
rs1265100	C	153:121	0,39:0,31	5,37	0,02	1,402(1,05-1,87)
	T	243:275	0,61:0,69			
rs7745906	A	82:118	0,23:0,33	6,88	0,009	0,68 (0,51-0,91)
	G	278:242	0,77:0,67			
rs2524074	C	63:77	0,17:0,20	2,05	0,15	0,75 (0,49-1,12)
	T	317:303	0,83:0,79			
rs3819294	T	56:90	0,15:0,25	8,76	0,003	0,59 (0,42-0,84)
	C	310:276	0,85:0,75			
rs2844535	A	125:161	0,32:0,41	6,47	0,01	0,69 (0,53-0,92)
	C	263:227	0,68:0,59			
rs2854275	T	145:86	0,41:0,24	27,90	1,27e-7	2,71 (1,82-4,02)
	G	207:266	0,59:0,76			

SNP: *Single nucleotide polymorphism*; T:U: transmisiones Vs. no transmisiones; Frec. T:UT: frecuencias de transmisiones Vs. no transmisiones. Las negrillas representan los resultados significativos.

requerían dos SNP para alcanzar un valor de R^2 por encima de 0,8, se observó que en la población del presente estudio un SNP era suficiente para alcanzar dicho valor.

Este hallazgo puede explicarse por el reciente cuello de botella experimentado por la población antioqueña. Con la colonización europea se diezmo la población amerindia y llegaron esclavos africanos. Entre estos tres grupos étnicos ocurrieron cruces que originaron la nueva población (27). Durante las migraciones, no todos los cromosomas de la población parental han de quedar representados en la población naciente. Se acepta que ha existido un mayor número de generaciones desde el origen de la población europea que desde el origen de la población antioqueña, lo cual implica que ha ocurrido un mayor número de meiosis en aquella población que en la antioqueña. A su vez, este fenómeno aumenta la probabilidad de que hayan ocurrido más eventos de recombinación en la región HLA de los europeos que en la de los antioqueños, y explicaría por qué el desequilibrio de ligamiento es mayor en estos, además con alelos diferentes (28).

Llama la atención que varios marcadores se encuentran en perfecto desequilibrio de ligamiento ($R^2=1,0$) con los alelos clásicos HLA y

entre ellos (figura 1). Esta observación concuerda con el fuerte desequilibrio de ligamiento que se ha descrito previamente para la región de HLA y con el bajo número de generaciones después de ocurrida la mezcla.

El análisis de asociación entre los marcadores analizados y la diabetes mellitus tipo 1 evidenció que estos marcadores influyen en el riesgo genético para desarrollar la enfermedad. Cuatro de los 13 marcadores analizados mostraron asociación estadísticamente significativa al aplicar la prueba no paramétrica de desequilibrio de transmisión (*Transmission Disequilibrium Test*, TDT). De los doce marcadores de HLA de clase I analizados, rs29243(T) se asoció con un aumento de más de dos veces en el riesgo de desarrollar la enfermedad, en tanto que los marcadores rs9380122(G) y rs1611430(G) se asociaron con una disminución importante del riesgo de padecerla. También, se observó que el haplotipo G-G de los marcadores rs9380122 y rs1611430 es un elemento claramente protector frente al riesgo de desarrollar la enfermedad (no se presentan los datos). Estos marcadores no se encuentran dentro de un gen, pero pueden estar en desequilibrio con otros SNP dentro de los genes del HLA-I y, probablemente, con un alelo HLA clásico.

Según de Bakker, *et al.*, estos tres SNP serían marcas apropiadas para los alelos clásicos HLA-A*30:02 y HLA-A*03:01. Los SNP rs9380122 y rs1611430 aparecen como *tags* de HLA-A*03:01, en tanto que el SNP rs29243 aparece como *tag* del alelo clásico HLA-A*30:02 (9). Según nuestros análisis, esta inferencia habría sido imprecisa para nuestra población.

En el estudio de Montoya, *et al.*, en 1996, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los alelos clásicos de HLA de clase I y la diabetes mellitus de tipo 1 (8). Sin embargo, estos autores sí encontraron una asociación del alelo HLA-DRB1*03:01 con un riesgo cuatro veces mayor de desarrollar la enfermedad (28).

El presente análisis de asociación no permite concluir cuáles alelos HLA clásicos estarían implicados en la asociación identificada. La imposibilidad de inferirlos se debió al bajo desequilibrio de ligamiento ($R^2 < 0,8$) de los tag SNP usados como referencia (9), y los alelos HLA clásicos reportados para la población CLM (16). No obstante, es evidente la fuerte asociación entre la región HLA y la predisposición o la protección frente a la diabetes mellitus de tipo 1.

En la región HLA de clase II solo se analizó un marcador (rs2854275), el cual está en un alto desequilibrio de ligamiento ($R^2 = 0,83$) con el alelo clásico HLA-DRB1*03:01 según los datos del *1000 Genomes Project*. En la prueba TDT este marcador evidenció una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo 1, resultado que concuerda con lo reportado en otros estudios, en los cuales este alelo clásico se ha asociado claramente con el riesgo de desarrollar la enfermedad en varios grupos poblacionales, incluidos algunos de Colombia y Latinoamérica (7,8,29-31).

No se hallaron interacciones estadísticamente significativas entre los marcadores de HLA analizados. Se ha reportado que los alelos HLA de clase I influyen en el riesgo de padecer diabetes mellitus de tipo 1 cuando se expresan conjuntamente con alelos HLA de clase II. Es el caso del HLA-A*24, que aumenta en un 2,04 el riesgo de padecer la enfermedad cuando se expresa conjuntamente con el haplotipo DQA1*03-DQB1*03:02 (DQ8) (32). Tampoco se encontró evidencia de interacción entre los marcadores de HLA y los de otros genes (*PTPN22*, *IFIH1* y *CTLA4*) asociados con esta enfermedad (22).

En conclusión, el desequilibrio de ligamiento en la región HLA para la población antioqueña (CLM) analizada no se comportó de manera similar a lo reportado para la población europea (CEU). Por lo tanto, es importante tener en cuenta los tag SNP específicos aquí reportados para la población de estudio. Asimismo, dicho comportamiento debería ser objeto de otros estudios que incluyan el análisis de HLA en población latinoamericana. En el presente estudio, además, se confirmó que la región HLA contribuye a la predisposición o protección frente a la diabetes mellitus de tipo 1 en la población analizada.

El equipo de investigación está actualmente en proceso de evaluar los tag SNP aquí reportados para los alelos HLA clásicos en todo el conjunto de familias con diabetes mellitus de tipo 1.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existió conflicto de intereses en el desarrollo de este estudio.

Financiación

Proyecto código 2548, financiado por el CODI, Universidad de Antioquia.

Referencias

1. Kim MS, Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res.* 2005;64:180-8. <https://doi.org/10.1159/000089190>
2. Černá M. Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr.* 2008;158:2-12. <https://doi.org/10.1007/s10354-007-0448-0>
3. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med.* 2009;360:1646-54. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0808284>
4. Al-Mutairi HF, Mohsen AM, Al-Mazidi ZM. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Kuwait Med J.* 2007;39:107-15.
5. Sia C, Weinem M. The role of HLA class I gene variation in autoimmune diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2005;2:97-109. <https://doi.org/10.1900/RDS.2005.2.97>
6. Noble JA, Valdés AM, Varney MD, Carlson JA, Moonsamy P, Fear AL, *et al.* HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: Results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes.* 2010;59:2972-9. <https://doi.org/10.2337/db10-0699>
7. Cruz-Tapias P, Pérez-Fernández OM, Rojas-Villarraga A, Rodríguez-Rodríguez A, Arango M-T, Anaya JM. Shared HLA class II in six autoimmune diseases in Latin America: A meta-analysis. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:569728. <https://doi.org/10.1155/2012/569728>
8. Montoya F, Bedoya CI, Restrepo MC, Villegas A, Posada SC, García HI, *et al.* Determinación de marcadores genéticos en pacientes con diabetes tipo I y población sana. *Acta Médica Colombiana.* 1996;21:10-6.

9. **de Bakker PI, McVean G, Sabeti PC, Miretti MM, Green T, Marchini J, et al.** A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet.* 2006;38:1166-72. <https://doi.org/10.1038/ng1885>
10. **Halperin E, Kimmel G, Shamir R.** Tag SNP selection in genotype data for maximizing SNP prediction accuracy. *Bioinformatics.* 2005;21(Suppl.1):i195-203. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1021>
11. **Barker JM, Triolo TM, Aly TA, Baschal EE, Babu SR, Kretowski A, et al.** Two single nucleotide polymorphisms identify the highest-risk diabetes HLA genotype potential for rapid screening. *Diabetes.* 2008;57:3152-5. <https://doi.org/10.2337/db08-0605>
12. **American Diabetes Association.** Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39(Supl.1):S13-22. <https://doi.org/10.2337/dc16-er09>
13. **Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN.** An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:E88-8.
14. **Vincze T, Posfai J, Roberts R.** NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3688-91.
15. **Durbin RM, Altshuler DL, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, et al.** A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467:1061-73. <https://doi.org/10.1038/nature09534>
16. **Gourraud PA, Khankhanian P, Cereb N, Yang SY, Feolo M, Maiers M, et al.** HLA diversity in the 1000 genomes dataset. *PLoS One.* 2014;9:e97282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097282>
17. **Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ.** Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21:263-5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
18. **Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al.** PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81:559-75. <https://doi.org/10.1086/519795>
19. **Spielman RS, Ewens WJ.** The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet.* 1996;59:983-9.
20. **Dudbridge F.** Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered.* 2008;66:87-98. <https://doi.org/10.1159/000119108>
21. **Li Q, Fallin MD, Louis TA, Lasseter VK, McGrath JA, Avramopoulos D, et al.** Trio logic regression - detection of SNP-SNP interactions in case-parent trios. *Genet Epidemiol.* 2010;34:396-406. <https://doi.org/10.1002/gepi.20488>
22. **Rodríguez A, Alfaro JM, Balthazar V, Pineda-Trujillo N.** Association analysis of *PTPN22*, *CTLA4* and *IFIH1* genes with type 1 diabetes in Colombian families. *J Diabetes.* 2015;7:402-10. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12192>
23. **Slatkin M.** Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* 2008;9:477-85. <https://doi.org/10.1038/nrg2361>
24. **Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, et al.** Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:7234-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508716103>
25. **Gravel S, Zakharia F, Moreno-Estrada A, Byrnes JK, Muzzio M, Rodríguez-Flores JL, et al.** Reconstructing Native American migrations from whole-genome and whole-exome data. *PLoS Genet.* 2013;9:e1004023. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004023>
26. **Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, et al.** Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science.* 2001;293:489-93. <https://doi.org/10.1126/science.1059431>
27. **Federal Research Division Library of Congress.** Colombia: A country study. 5th ed. Washington, D.C.; U.S. Government Printing Office Official Editions; 2010. p. 541.
28. **Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, Hunt S, et al.** A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2005;76:634-46. <https://doi.org/10.1086/429393>
29. **Rani R, Sood A, Goswami R.** Molecular basis of predisposition to develop type 1 diabetes mellitus in North Indians. *Tissue Antigens.* 2004;64:145-55. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00246.x>
30. **Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, et al.** Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:14074-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606349103>
31. **Noble JA, Martin A, Valdés AM, Lane JA, Galgani A, Petrone A, et al.** Type 1 diabetes risk for HLA-DR3 haplotypes depends on genotypic context: Association of DPB1 and HLA class I loci among DR3 and DR4 matched Italian patients and controls. *Hum Immunol.* 2008;69:291-300. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.02.003>
32. **Mbunwe E, van der Auwera BJ, Weets I, van Crombrugge P, Crenier L, Coeckelberghs M, et al.** In antibody-positive first-degree relatives of patients with type 1 diabetes, HLA-A*24 and HLA-B*18, but not HLA-B*39, are predictors of impending diabetes with distinct HLA-DQ interactions. *Diabetologia.* 2013;56:1964-70. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2951-8>

Cuadro suplementario 1. Iniciadores y enzimas de restricción usadas para la genotipificación de los tag SNP reportados por de Bakker, *et al.*

HLA, alelo clásico	Tag SNP	Iniciadores	Enzimas
HLA-A*02:01	rs2844821	rs2844821F:CTGGATTACGTAGAGACAATAGACAGCC rs2844821R:AGCCATTACTCAGGAGATTGTACTACTG	ApaLI
	rs762324	rs762324R: ATCCCGTTTCcaggctaaat rs762324F: TGCTCTAATGAAGGGGTTGG	HhaI
HLA-A*03:01	rs9380122	rs9380122Fi(A):GATTACAGTACAGGGGTGACGGCGCTCTA rs9380122Ri(G): ATTCAGGACCGGATAATGGCCATCAGGC rs9380122Fo: CCCTCATTAGTCTAGTGGTGTGGCTGCCA rs9380122Ro: TGTCCACTTGTGCCTCCCATTATGGTG	--
	rs1611430	rs1611430Fi(A):CCTGTTGTAATGCTTTCAGACACATTTCTA rs1611430Ri(G):AAAATGTAACCTTTGGCCCTTGAGAC rs1611430Fo:TGAGGTGAATAAAGTCTGTACTGGCTCC rs1611430Ro:GGCGTAGAGACAGGTTTTGTGTTTTTTT	--
HLA-A*24:02	rs3893538	rs3893538Fi(G):AGGGTATGTTCCATCCACTGAGGCGG rs3893538Ri(A):AGCTGCGACGTGGACTCGGACTGCCGT rs3893538Fo:GTACCTGGGCACTGCAGCCTCTCCTTCC rs3893538Ro: ACCGGATTCCATTTTCAGTTCAGGCCCA	--
	rs2523933	rs2523933Fi(c):GAATTTCTGCTTAGCTGGCAGGACCCC rs2523933Ri(A):AGAGACAGCAGCATCCTCCTGGGTGAT rs2523933Fo:TCTGCAGAAATGCAGAGGGAGTCTCCTC rs2523933Ro:GCCACTCTCGGAAGATCCCCCTCAGTTTA	--
HLA-A*30:02	rs29243	rs29243Fo:TTCCTGCCAGTGGACTATGAGATTGAGT rs29243Ro: TCAATGTTATAGGCCAATGATCAGTGGC	TaaI
HLA-B*07:02	rs2596438	rs2596438Fi(A):AAAGTATGACTCATTACAGGAAAAGAAA rs2596438Ri(G):GTTCTTCAGGAACAATTTCTTTTCGAC rs2596438Fo: AACAGACACATAGACCAATGGAATAGAA rs2596438Ro: TGCTATTTAGTGAACATAGTCTCCTCG	-
	rs805288	rs805288Fi(G):CCCTAGAGGAGGTGGGGTACAGAGTGC rs805288Ri(A):GAGGCAAGGGCTAGGCTCACACACT rs805288Fo: GTCCCCTCCAGGATTTAAGCCTCTGTTC rs805288Ro: CTTGGATTCTGATGCTGCTGCACAAAT	--
HLA-B*08:01	rs6457374	rs6457374Fi(C):AAAAAACAGATAGGTTTAGTGGGGC rs6457374Ri(T):CAAACCTCCTGCATCTGTAAAGAAGAAA rs6457374Fo:TCTGCATGAAAACAAGCTTGAAGAAATA rs6457374Ro:GAGCTGAGCTGTGTTTATGAAATCGAAT	--
	rs2844535	rs2844535R: TGGTTCAGTCCCTCACACCTG rs2844535F: CACCTCCTTCTCTGCCTCTG	SfiI
HLA-B*15:01	rs3094117	rs3094117R: GCAGCAAGGATGACTCACAA rs3094117F: CAGGTTCCCAAGGTCTGTGA	SfaNI
	rs3819294	rs3819294R:ACCTTAGGAGGGCAGTTGGT rs3819294F: CACTTACACGCAGCCTGAGA	HaeIII
HLA-C*01:02	rs9380234	rs9380234Fi(A): CATGAAGAAGTACTGCCAAGTCATCTTCA rs9380234Ri(G): AGTTGCATCTGGGTGTGGCAATTAC rs9380234Fo: ACTTGCAAGACTGTCTTCGCTGAGCAC rs9380234Ro: CTGCCAAACACTTGTTCACAGGTACCT	-
HLA-C*03:03	rs1265100	rs1265100R: GCTTCCATGAAACGGAAAAA rs1265100F: gaggcagaatagcgtgaacc	MluCI
	rs7745906	rs7745906Fo: GCAGAGATTTTGTATTAGGCCAGTTTT rs7745906Ro: AAGGAAGGAAGGAGGAAAGAAAGAAAGA	TspRI
HLA-C*03:04	rs4713391	rs4713391Fi(T): CCCAAGGCCCATTTGCACAGGACATTT rs4713391Ri(c): AAGATGCACTTTTCAAGTGGGAAAGTCAG rs4713391Fo:GCATCTGGGCAGCAGGTTTAGAAGGAAT rs4713391Ro: ACTGCTAGCTGGATTGAAGCACACCTCC	rs4713391 1Fo:GCATCTGGGCAGCAGGTTTAGAAGGAAT
	rs7745906	rs7745906Fo: GCAGAGATTTTGTATTAGGCCAGTTTT rs7745906Ro: AAGGAAGGAAGGAGGAAAGAAAGAAAGA	TspRI
HLA-C*07:01	rs2524074	rs2524074Fo: GGCCCATTCACAGGAgAGT rs2524074Ro: ACTGCTAGCTGGATTGAAGCACACCTCC	MlyI
	rs7382297	rs7382297Fi(G):ATTTTGAGTAAGTTCAGTGTCTTCTCAG rs7382297Ri(T):AAAATAGCTTTGCCCTGTCAATTTTCA rs7382297Fo: CATGTGGTCTTTCTGTGAAACTTAGA rs7382297Ro: TTTAAGATAAAGATTTAGCGCACCCAAAT	-
DR3/DR4-DQB2/ DQB8	rs3104413	rs3104413Fi(C): AGTAGGGGTGTGGCCAGCAGCCTGGTC rs3104413Ri(G): CCACTGCAGGAGAAGCAAGCCAATAGGTGC rs3104413Fo: CAGGGCTCTGGAGCTGGGTGTAACGTGGC rs3104413Ro: TGAGAGGACCTTCTTCTGCCCAACTCCCA	--
	rs2854275	rs2854275Fi(G): AGCCTTAAGTTCAGTGTCTTCTTATG rs2854275Ri(T): AGCTGTGGTTCTGGCTCCACATTCAA rs2854275Fo: TAATATTTAGCCATGATCCAGTGTGGG rs2854275Ro: TCTTCTGGGGAATATGAAGGGTTCAAGTC	--
	rs9273363	rs9273363Fi(A): ATGTCTGCTTTCAGGGTTCAGGCCCTA rs9273363Ri(C): GAGTCTGGGAGCTTCTGCGAGGTTATAGG rs9273363Fo: AATCTCAAGTGTGGTGCCTCTTTGTGC rs9273363Ro: TCTGAGCTCCCTTTGTCAATTGACGTTGT	--