

Inmunogenética e inmunopatología de la diabetes insulino dependiente tipo I

Gloria Garavito¹, Kelly Del Toro², Eduardo Egea B³, Eduardo Enrique Egea⁴, Elkin Navarro⁵

Resumen

La diabetes insulino dependiente tipo I (T1D) es una enfermedad crónica y autoinmune que altera la calidad de vida en niños desde muy temprana edad. Esta patología genera un alto costo para la salud pública y produce trastornos psicoafectivos en el núcleo familiar disminuye los años de vida productiva y los años de vida saludable. La diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente tiene una prevalencia muchísimo menor que la diabetes tipo 2 o no dependiente de insulina. Sin embargo, sus secuelas crónicas debido a la microangiopatía, macroangiopatía y neuropatías producen una elevada morbimortalidad en los pacientes que la padecen. El análisis molecular revela que los loci DQA1 y DQB1 se encuentran fuertemente asociados con susceptibilidad y resistencia a la expresión de T1D. La asociación con susceptibilidad más documentada ha sido con los haplotipos DQB1*0302 – DQA1*0301 y DQB1*0201 – DQA1*0501, ambos asociados a los antígenos DR4 y DR3 respectivamente. Un estudio realizado en poblaciones de Ciudad de México, Caracas y Medellín concluyó que existe significancia estadística para considerar a los alelos DQA1 como marcadores de susceptibilidad para el desarrollo de T1D. En otro estudio realizado en pacientes norteamericanos de origen mexicano se encontró que los alelos DQB1*0302 DQB1*0201 se encontraban en un 91% de los pacientes comparados con el 67% de los controles, y los alelos DQA1*0501 y DQA1*0301 en el 100% de los pacientes comparado con el 74% de los controles. En estudios previos realizados por nuestro grupo informamos la caracterización molecular de genes HLA clase II por medio de la técnica PCR-SSP en una población de pacientes mestizos en el litoral caribe de Colombia. Analizamos los loci: HLA DRB1 y HLA DQB1. Los alelos con mayor expresión en controles sanos en el locus DQB1 fueron: HLA-DQB1*0301, con

Fecha de recepción: Abril de 2005
Fecha de aceptación: Junio de 2005

¹ Médico inmunólogo, PhD. Profesor- investigador grupo de investigación en Inmunología y Biología Molecular Universidad del Norte. ggaravit@uninorte.edu.co

² Médico endocrinólogo, investigador asociado grupo de investigación en Inmunología y Biología Molecular Universidad del Norte. yelenadt2808@hotmail.com

³ Médico, inmunólogo. MSc., profesor investigador grupo de investigación en Inmunología y Biología Molecular Universidad del Norte. eegea@uninorte.edu.co

⁴ Médico, Especialista en Biomedicina Molecular, Research Fellow Brigham and Women's Hospital, Teaching affiliate of Harvard Medical School, investigador asociado grupo de investigación en inmunología y Biología Molecular Universidad del Norte. eegea@rics.bwh.harvard.edu

⁵ Biólogo, Universidad del Tolima, investigador asociado grupo de investigación en Inmunología y Biología Molecular Universidad del Norte. enavarro@uninorte.edu.co

Dirección: Universidad del Norte, Km 5 vía a Puerto Colombia, Barranquilla (Colombia)

un 23.8%, DQB1*0302 (13.8%), DQB1*0201(15.4%), DQB1*0501(12.3%) y DQB1*0602 (12.3%). En el locus DRB1, los alelos más expresados en este grupo fueron HLA – DRB1*0401 (18%), DRB1*0402 (19%), DRB1*0404 (19%) y DRB1*0405 (21%). En el grupo conformado por pacientes con T1D, los alelos más representativos fueron DRB1*0302 y DQB1*0602.

Con estos datos se describe que en esta población la susceptibilidad al desarrollo a esta enfermedad se encuentra asociada a combinaciones alélicas DRB1 y DQB1 en particular.

Palabras claves: HLA, diabetes mellitus tipo I, susceptibilidad.

Abstract

T1D is a chronic autoimmune disease that can greatly alter the quality of life of children at a young age. This condition can also generate high public health costs and produce psycho-affective disorders in the family. It can significantly reduce the years of productive and healthy life. Diabetes Mellitus Type I, or insulin dependent, has a lower prevalence than Type II, or non-insulin dependent. Diabetes nevertheless, complications like microangiopathy, macroangiopathy and neuropathy can lead to elevated mortality and morbidity. Molecular analysis show that loci DQA1 and DQB1 are strongly associated with susceptibility and resistance to T1D. HLA DQB1*0302 – DQA1* 0301 are the most strongest alleles associated with susceptibility and DQB1*0201 – DQA1* 0501 are linked to DR4 and DR3 respectively. A study performed in Mexico City, Caracas and Medellin reported that there is statistical significance to consider the DQA1 alleles as markers for susceptibility to develop T1D. Another study that looked at North Americans with Mexican origin concluded that the alleles DQB1*0302 and DQB1*0201 are found in 91% of patients, compared with 74% of controls. In previous studies, our group informed the molecular characterization of HLA Class II genes using PCR-SSP in a mestizo patient population in the Colombian Caribbean. We analyzed the loci HLA DRB1 and HLA DQB1, finding that the alleles with higher expression in healthy control subjects were HLA-DQB1*0301 with 23.8%, DQB1*0302 (13.8%), DQB1*0201(15.4%), DQB1*0501(12.3%), and DQB1*0602 (12.3%). In the DRB1 locus, the alleles mostly expressed were HLA – DRB1*0401 (18%), DRB1*0402 (19%), DRB1*0404 (19%) and DRB1*0405 (21%). In the group consisting of IDDM patients, the alleles most frequently expressed were DRB1*0302 y DQB1*0602.

This data describes that in this population, the susceptibility to develop this disease is associated with particular allelic combinations of DRB1 and DQB1.

Key words: HLA, type 1 diabetes, susceptibility.

INTRODUCCIÓN

Por consenso se considera que la diabetes mellitus tipo 1 (T1D) es una enfermedad compleja, multifactorial y poligénica, en la cual los factores ambientales parecen ser parcialmente responsables del inicio y la expresión de ella^{1, 2}. La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad autoinmune crónica cuyo primer evento fisiopatológico se basa en una «insulinitas», que se caracteriza por un infiltrado inflamatorio de los acinos inflamatorios del páncreas con predominio de linfocitos T CD8 y un número variable de CD4. La destrucción es selectiva hacia las células β, lo cual produce una muerte celular del 80% de estas células al comienzo de los síntomas. Sus secuelas crónicas debido a la microangiopatía y neuropatías producen una elevada morbi-mortalidad en los pacientes que la padecen.³

En la década de los sesenta, los resultados de varios grupos de investigación evidenciaron una similitud en la histopatología entre la tiroiditis autoinmune tipo I y el infiltrado linfomonocitario de la T1D estos hallazgos sugirieron una alteración inmunológica en la fisiopatología de la entidad. Solo hasta el año 1974 se consideró

una enfermedad autoinmune cuando se publicó y aceptó la presencia de auto anticuerpos contra la células de los islotes y una fuerte asociación estadística entre T1D y algunos genes MHC.

EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia de esta patología parece aumentar en los países cercanos al polo norte. Existe poca información referente a la incidencia y prevalencia de la enfermedad en países de Latinoamérica y/o poblaciones hispanoparlantes.³

Un estudio adelantado en Puerto Rico muestra una incidencia de 18 casos / 100.000 niños por año estudiados durante un periodo de 6 años, siendo más frecuente en niñas que en niños.⁴

En Santiago de Chile se encontró que la incidencia de esta enfermedad fue de 2.92 / 100.000 en niñas y 2.95 / 100.000 en niños.⁵ Otro estudio llevado a cabo en Sao Paulo (Brasil) describe una incidencia de 7.6 / 100.000, siendo también más elevada en niñas que en niños.⁶

ETIOLOGÍA

Genes en la predisposición al desarrollo de T1D

Está claro hoy en día que T1D además de ser una enfermedad poligénica y compleja, su expresión clínica está asociada a la influencia de factores ambientales y esta asociación o relación define el desarrollo a la misma. La T1D, de forma similar a como se comportan otras enfermedades autoinmunes, se presenta en personas con susceptibilidad genética. En la población en general el riesgo a la edad de 15 años es de 1 / 400. Este riesgo se incrementa cuando el padre padece de T1D elevándose a 1 / 40. El riesgo entre familiares hasta en tercera generación es de 1 / 20. La concordancia de la entidad en gemelos monocigóticos es del 50% y del 5% en bicigóticos, siendo estos últimos muy similar a la concordancia entre familiares cercanos. Contrasta lo anterior con el hecho que del 85 al 90% de estos pacientes no tienen un antecedente familiar con T1D. El concepto inicial que solo unos escasos genes contribuían a la patogénesis de la enfermedad ha cambiado. Actualmente se han descrito un gran numero de genes de susceptibilidad y resistencia, tanto en el modelo animal como en el humano. Los loci humanos asociados a T1D actualmente son (IDDM-15) compromete genes MHC Clase II (IDDM1); insulina (IDDM2); genes relacionados con la síntesis de proteínas de función inmune (IDDM4, ICAM y CD3, IDDM7, HOXD8, IDDM12 y CTLA4) y otros genes candidatos que no tienen un ligamiento aparente con las funciones inmunes y/o con las células β. Adicionalmente, ciertos factores de crecimiento han sido involucrados (TGβ).

Existen varios modelos experimentales que se utilizan para el estudio de T1D dos de ellos ambos modelos murino, vienen siendo estudiados desde la década de los setenta. El ratón obeso no diabético (NOD) muestra genes de asociación con un comportamiento hereditario similar al del humano. En ambos, tanto en NOD como en el ratón BB (Bio Breeding Mouse), desarrollan T1D cuando se les transfiere Linfocitos

T pasivamente de animales enfermos. Sin embargo, el modelo BB es poco utilizado en razón a que esta asociado a leucopenia y a otras enfermedades auto inmune.⁸

La identificación precisa de alelos HLA asociados a susceptibilidad en enfermedades varía dependiendo del grupo poblacional en estudio, y en muchos casos, una enfermedad puede estar asociada con múltiples alelos. También se describe la asociación de distintos alelos para una misma patología en distintas poblaciones. Lo anterior se ilustra en la tabla 1º.

Más de 20 loci han sido identificados como asociados a diabetes mellitus insulino-dependiente o también llamada diabetes tipo 1 o diabetes autoinmune¹⁰. La asociación entre haplotipos particulares HLA/MHC clase II y la ocurrencia de diabetes en humanos ha sido de particular interés. Se acepta que DRB1/04/DQA1/0301/ y DRB1/03-DQA1/0501/0201 predisponen a T1D. Más del 80% de los pacientes portan uno o ambos alelos.¹¹ En contraste, otros haplotipos MHC clase II pueden proteger de la enfermedad, como se evidencia por la reducción del riesgo seis veces menos en individuos con el haplotipo DRB1/15-DQB0602.

Un mecanismo hipotético propuesto por McDevitt como resultado de la observación es que la predisposición de los alelos HLA clase II está relacionado con la expresión de aminoácidos neutrales en la posición 57 de los alelos DQ en la población caucasoide, y de un ácido aspártico en alelos asociados a resistencia en la misma población.¹²

El aa en la posición 57 es parte de un péptido de la hendidura, en el sitio de anclaje, vital en la presentación antigénica. La sustitución del aminoácido en esta área podría afectar el anclaje de los péptido a la hendidura. Los alelos de susceptibilidad presentan péptidos diferentes, pero la contribución de este fenómeno es en el desarrollo de T1D no es muy claro igual que su significado biológico cuando se asocian un mecanismo de ligamiento. Los mecanismos de tolerancia central y periférica han sido implicados, pero no se han obtenido evidencias directas. Es importante tener en cuenta que los alelos de susceptibilidad-humana MHC clase II de la posición aminoacídica 57 con el alelo I-A^{s7} son expresados en los ratones NOD y se requiere de éstos para la predisposición de ratones NOD con T1D. Sin embargo, como se mencionó previamente, el polimorfismo en la región que codifica para los alelos MHC clase II por sí solo no puede explicar la patogénesis de la diabetes. La complejidad genética involucrada en la T1D ha sido bien descrita por Serreze¹³⁻¹⁴: «Muchos genes favorecen el desarrollo de la T1D y contribuyen en la alteración de los diferentes pasos bioquímicos en desarrollo de la vía metabólica. Por ejemplo, la expresión secuencial de cientos, si no miles, de genes podría ser esperada en el desarrollo y maduración funcional de un macrófago o célula dendrítica en un linaje de células precursoras. Este proceso no ocurre en un vacío, pero es eventual la acción indirecta por el ambiente físico. En el caso del desarrollo de la APC, la microflora y el dietario ambiental son cruciales». Por lo tanto, los genes de susceptibilidad y resistencia contribuyen a la enfermedad de una manera poligénica y multifactorial que parece ganar en complejidad, puesto que no se ha podido ser revelada. El ligamiento de factores ambientales podría ser definido por la expresión de una porción de genes y el desarrollo de la enfermedad. Un factor importante al respecto parece ser el intestino y las infecciones virales.

ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA MUCOSA INTESTINAL. SU RELACIÓN CON T1D

Con más de 400 m², la mucosa y el epitelio intestinal constituyen la más grande superficie de interacción del organismo en el ser humano con el medio ambiente y por consiguiente con los microorganismos comensales y patógenos. De hecho, la exposición a antígenos provenientes de estos microorganismos y su interacción con células y estructuras tisulares del sistema inmunológico y retículo endotelial modula la respuesta innata y adaptativa, un mecanismo de tolerancia inmunológica se cree que de manera permanente genera un equilibrio en la respuesta inmunológica del sistema linfóide asociado al intestino. Este fenómeno se atribuye en parte a la inmunomodulación mediada TG-β y a la presencia de altos niveles de IgA a nivel de mucosa intestinal.

Esto ocurre por dos mecanismos principales. Baja cantidad de antígenos podría inducir una respuesta no agresiva regulatoria del sistema inmune, mientras que altas cantidades de antígenos puede inducir anergia en los linfocitos o delección¹⁸, que probablemente lo consigue por modulación de la APC; adicionalmente, se halla una profunda alteración en una modificación de la respuesta inmune encontrada con la ausencia de una flora bacteriana en animales y plantas, lo cual nos muestra la importancia fisiológica de los antígenos foráneos en la homeostasis inmune en el intestino.¹⁸ Además, ratones NOD sólo exhiben los niveles de autoinmunidad cuando son mantenidos en un ambiente libre de patógenos, y no desarrollan T1D cuando son mantenidos bajo ciertas condiciones de suciedad.²⁰ Falta por aclarar los niveles basales de estimulación inmune que se necesita para un apropiado desarrollo del sistema inmune y qué tipo y número de células regulatorias inducidas en el intestino son involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmune. Al respecto los reguladores CD4⁺ T_H2, así como γδ linfocitos intraepiteliales (30% en ratones, 15% en humanos)²¹, han sido asociados con la tolerancia de la mucosa. Por esto, cambios en las funciones de la mucosa, infecciones del intestino o ciertos componentes de la dieta pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la T1D.

Diversos informes y estudios se han desplegado para establecer un ligamiento entre la introducción de leche de vaca y el desarrollo de T1D en niños. No se observó ligamiento entre los estudios de bebés diabéticos estadounidense, alemanes y australianos, pero un estudio epidemiológico final difirió de los otros por una observación extendida que involucraba al mismo tiempo infantes y niños que consumían leche de vaca.²² Por consiguiente, un ligamiento de la dieta entre el consumo de leche y T1D puede ser considerado improbable, pero la excluye después de una larga exposición a la albúmina de la leche u otras proteínas de ésta. Similarmente, gluten derivado de trigo e insulina derivada de leche han sido implicados como una causa de diabetes en niños. La evidencia, sin embargo, no es convincente y no ha sido establecido un ligamiento firme.²²

LA TEORÍA DE UNA ETIOLOGÍA VIRAL

Algunas observaciones soportan el concepto de una etiología viral para T1D. Una asociación entre la infección por rotavirus en infantes y las primeras ocurrencias de anticuerpos contra el islote fueron establecidas.²³

LOS ROTAVIRUS EN T1D

El rotavirus es un virus con doble cadena RNA. Infecta la mucosa intestinal y es una causa común de diarrea en niños. Puede activar policlonalmente linfocitos T y B y antígenos de éste podrían inmunológicamente mimetizar proteínas derivadas de células del islote. Sin embargo, no está claro si infecta al páncreas o directamente al islote. Otro caso puede ser causado por los enterovirus. Cocxsackie B4 virus aislado de los islotes pancreáticos de niños con T1D aguda²⁴ y Cocxsackie B3 y 4, cepas comúnmente que infectan el intestino, páncreas y corazón.²⁵ Estos producen pancreatitis; si se replican lo suficientemente podrían mimetizar el antígeno (proteína P2C) que posee reactividad cruzada con las células T con un epítipo GAD humano. Sin embargo, esta evidencia no ha podido ser replicada por otros laboratorios y es tema de controversia.²⁶ Similar a Cocxsackie, otros enterovirus, como polio y echovirus, han sido detectados en el páncreas y pueden aumentar los efectos de destrucción del islote en individuos con riesgo prediabético. El establecimiento de una asociación firme entre infecciones virales y T1D es difícil, debido a que el mecanismo fundamental de ligamiento establecido en diversos modelos animales permite a los virus depurados ante que se desarrolle la autoinmunidad (por ejemplo, en el RIP-LCMV) y no necesariamente se necesita inducir respuestas directas de células T reactivas al islote.

LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR Y EL DESARROLLO DE T1D

Pender propuso que las enfermedades autoinmunes humanas se basan en la infección de linfocitos T autorreactivos por parte del virus de Epstein-Barr (EBV), bajo el siguiente escenario: durante la infección primaria, las células B autorreactivas son infectadas por EBV, proliferan y llegan de manera latente a células B de memoria, las cuales resisten a la apoptosis que ocurre durante la homeostasis de una célula B normal, ya que éstas expresan moléculas antiapoptóticas codificadas por EBV. La susceptibilidad genética a los efectos de la célula B infectada por EBV conduce a un incremento en el número de células B de memoria infectadas y latentes que se alojan en órganos donde sus antígenos blancos son expresados, actuando como células presentadoras de antígeno. Cuando las células T CD4+ que reconocen antígenos dentro de los órganos blanco son activadas dentro de los órganos linfoides por reactividad cruzada con agentes infecciosos, éstos migran hasta los órganos blancos, fallan en la apoptosis, pues reciben una señal coestimuladora por parte de la célula B infectada con EBV. Las células T autorreactivas entonces proliferan y producen citocinas, las cuales reclutan otras células proinflamatorias, lo cual daña el órgano blanco como resultado, y se establece así una enfermedad autoinmune crónica²⁷.

Retrovirus endógenos humanos y autoinmunidad

Los HERV (por sus siglas en inglés) pueden conducir a autoinmunidad directamente codificando autoantígenos o indirectamente afectando la expresión de genes reguladores de la respuesta inmune y la tolerancia inmunológica^{28,29}. La expresión de HRES-1 (human- T-cell-lymphotropic-virus-related endogenous sequence 1) y HERV-3 ha sido documentada en lupus eritematoso sistémico y anticuerpos contra HRES-1/p28 y la proteína env de HERV fue detectada en pacientes con lupus y en madres de bebés con lupus neonatal respectivamente.

Dicha reactividad cruzada entre antígenos propios y proteínas virales ha sido propuesta como un claro elemento disparador de autoinmunidad en lupus. HRES-1 fue el primer HERV que se demostró que estaba expresado a nivel de proteína²⁹.

Mimetismo molecular

La similitud de secuencias entre los agentes infecciosos y proteínas o péptidos propios son propuestos como el principal mecanismo para la inducción de autoinmunidad. Sin embargo, ha resultado particularmente difícil la identificación de péptidos microbianos que activan las células T autorreactivas utilizando alineaciones convencionales de secuencias, para lo cual es necesario apoyarse en técnicas que incluyen el análisis de características estructurales que son importantes para el reconocimiento del TCR y de los péptidos unidos a la molécula de HLA^{30,31}.

INMUNOPATOLOGÍA

Un segundo evento disparador de la autoinmunidad, el cual en la actualidad no está bien definido, es requerido para que se den los cambios inmunológicos. Se cree que los autoanticuerpos encontrados en estos pacientes son contra las moléculas que el sistema inmune ataca en fases tempranas de la enfermedad; sin embargo, hay quienes opinan que estas inmunoglobulinas son el resultado de la destrucción celular, con lo cual se expone una cantidad anormalmente alta de antígenos. Existen varios tipos de autoanticuerpos, cada uno con un blanco específico e implicaciones clínicas diferentes. Los autoanticuerpos anticitoplasma de células de islote (ACCI) están directamente relacionados con el riesgo de padecer IDDM en relación a sus títulos y edad de aparición, aunque pueden estar presentes en sujetos normales. Los anticuerpos dirigidos contra la insulina aparecen en casi el 50% de quienes son diagnosticados con la enfermedad, lo cual aumenta la probabilidad si se les encuentra un haplotipo HLA DR4³. Se han detectado antígenos de los ACCI que se encuentran en sus configuraciones nativas, lo cual sugiere que no son producto de la desnaturalización que se produce luego de la lisis de las células β , sino que, por el contrario, pueden estar jugando un papel en la etiopatogenia inicial de esta enfermedad. Uno de estos antígenos ha sido identificado como una isoforma de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Se ha demostrado que estos ACCI no reaccionan contra fragmentos de GAD, lo cual prueba que están dirigidos hacia epítopes conformacionales. Por otro lado, también se han encontrado anticuerpos antiGAD que reaccionan a epítopes lineales, lo cual podría sugerir una autoinmunización secundaria a antígenos derivados de la lisis celular de células. Los glucolípidos han sido reconocidos como antígenos ACCI. Un gangliósido, GM2-1, ha sido específicamente implicado como un antígeno ACCI; así mismo se han descubierto otros antígenos de 37 y 40 kD, cuyos autoanticuerpos son un factor predictivo más preciso que los dirigidos contra GAD²⁷.

La detección de anticuerpos antígeno-específicos contra proteínas del islote es una herramienta esencial en la identificación de individuos prediabéticos y en el monitoreo de la progresión de enfermedad clínica y subclínica. Procedimientos de detección de autoanticuerpos han sido substancialmente refinados y estandarizados en todo el mundo. Datos de estudios clínicos soportan la noción que con la progresión de la fase prediabética la generación de anticuerpos específicos al islote se incrementa.²⁸⁻³⁰

La respuesta de las células T humanas a los antígenos del islote no se encuentran bien estudiada y pueden variar considerablemente entre laboratorios. Una razón para esto puede ser que el recurso de células T que son generadas en sujetos para análisis específicos: células CD4⁺ o células CD8⁺ de la sangre pueden no reflejar la distribución específica y frecuencias de células T con memoria adaptativa al islote como órgano blanco. Estos son, el páncreas y sus nódulos de drenaje linfático. Los de células T derivadas del bazo específicas al islote obtenidas de ratones NOD y analizadas en ensayos de proliferación han mostrado variaciones entre diferentes colonias de NOD.³¹

INMUNOGENÉTICA

Hay relación entre la posición de ciertos aminoácidos en las moléculas HLA y la propiedad de conferir protección o susceptibilidad en T1D. En estudios llevados a cabo en poblaciones caucásicas se ha demostrado que la presencia de aspartato en la posición 57 de DQB1 confiere protección, mientras que la presencia de aminoácidos neutros como la alanina, valina o serina en la misma posición se correlaciona con susceptibilidad inflamatoria y autotóxica en la fisiopatología de la enfermedad.

Posiblemente la secuencia de las bases nucleotídicas de los genes DRβ y DQA establece la secuencia aminoacídica requerida para la susceptibilidad a la T1D. Se acepta que el cambio de un solo *aa* da una información importante para que la presentación de probables péptidos diabetogénicos activen poblaciones específicas de LT/CD4⁺ y CD8⁺ responsables de generar clones celulares autorreactores. Todd y cols.¹ en 1987 notaron que la susceptibilidad a la diabetes tipo I estaba directamente relacionada con la ausencia o en forma «homocigota» del ácido aspártico en la posición 57 de la cadena β del exon DQ (Asp-57). En los haplotipos diabetogénicos (DR4, DRB/06. DRB/16, DRB/17), el *aa* en la posición 57 en sus alelos DQB1 puede ser alanina, valina o serina. A pesar de que varios estudios en caucásicos confirmaron esta observación, han aparecido importantes excepciones, como la presencia de Asp-57 en haplotipos DR9, DR4 y DQ9 en pacientes japoneses y aun en caucásicos heterocigotos DR4/DR1 y DR4/DRB08. Los resultados obtenidos en grupos étnicos no caucásicos han revelado que aunque la posición 57 de DQβ tiene gran importancia, es necesario considerar igualmente la contribución de la cadena DQA. Se ha sugerido que la presencia de arginina en la posición 52 de la cadena DQA (Arg-52) confiere susceptibilidad a la diabetes tipo I y está relacionada con la expresión de un heterodímero en la superficie de la célula, compuesto de una cadena DQA con Arg-52 y una cadena DQβ que no expresa el Asp-57. Los mismos autores y otros grupos proponen, que la combinación DQA1*0102/DQβ1*0602 confiere protección.³²⁻³⁴

En poblaciones chinas se ha observado que la ausencia de Asp en la posición 57 de los alelos DQB1, junto con la presencia de Arg en la posición 52 de DQA1, confiere predisposición para IDDM.³⁵ Esto fue corroborado por otro estudio (proyecto DIAMOND de la OMS), en el que se analizaron 16 poblaciones, revelándose variaciones significativas en la frecuencia alélica de HLA DQA1 y DQB1 entre casos y controles.³⁶ Los alelos de DQA1, la posición de arginina 52 y los alelos DQB1 con ausencia de Asp en la posición 57 se comportaron como marcadores para susceptibilidad a T1D, excepto en poblaciones japonesas.³⁷

En estudios previos realizados por nuestro grupo informamos la caracterización molecular de genes HLA clase II por medio de la técnica PCR-SSP en una población de pacientes mestizos en el litoral caribe de Colombia. Analizamos los loci: HLA DRB1 y HLA DQB1. Los alelos con mayor expresión en controles sanos en el locus DQB1 fueron: HLA-DQB1*0301 con un 23.8%, DQB1*0302 (13.8%), DQB1*0201(15.4%), DQB1*0501(12.3%) y DQB1*0602 (12.3%). En el locus DRB1, los alelos más expresados en este grupo fueron HLA – DQB1*0401 (18%), DQB1*0402 (19%), DQB1*0404 (19%) y DQB1*0405 (21%). En el grupo conformado por pacientes con T1D, los alelos más representados fueron DQB1*0302 y DQB1*0602.³⁸ Estos resultados preliminares son comparables con otros estudios de la literatura y permiten sugerir la presencia de haplotipos DRB1 / DQB1 / DQA1 de origen caucasoide o mediterráneos en nuestra población que pudieran explicar la susceptibilidad alta en poblaciones mestizas (admitted) de Colombia.

Está demostrada una fuerte asociación entre los genes del MHC y la susceptibilidad o la resistencia a esta patología. Algunos estudios atribuyen hasta un 48% la contribución de los genes MHC en la enfermedad. Se cree que en los mestizos de América los haplotipos diabetogénicos provienen de ancestros mediterráneos, mientras que la protección se debe a genes amerindios.³⁹ Está descrito que los alelos DR3 y DR4 se encuentran expresados en el 90% de los pacientes caucasoides, lo cual puede variar en otros grupos.⁴⁰

En grupos étnicos de origen africano se observa una mayor expresión del alelo DR7.⁴¹ Por otra parte, en estudios llevados a cabo en grupos étnicos japoneses la asociación con susceptibilidad está dada con el HLA-DR4 y DR9.⁴² Otros estudios en poblaciones chinas describen una asociación con el HLA-DR3 y DR9.⁴³ En otro estudio realizado en familias de Nueva York y Sao Paulo se observó una vez más que los alelos DR3 y DR4 se encontraban marcadamente aumentados en los pacientes en relación a los controles;⁴⁴ de igual manera, en otro estudio realizado con familias caucásicas se observó que el alelo DR2, asociado al haplotipo DRB1*1501 – DQA1*0102 – DQB1*0602, se encontraba disminuido en los pacientes, mientras que los heterocigotos DR3 / DR4 se encontraban sobre-expresados en la población de pacientes.⁴⁵

El análisis molecular revela que los loci DQA1 y DQB1 se encuentran fuertemente asociados con la susceptibilidad y la resistencia a la expresión de T1D.⁴⁶ La asociación con susceptibilidad más documentada ha sido con los haplotipos DQB1*0302 / DQA1*0301 y DQB1*0201 / DQA1*0501, ambos haplotipos asociados a los antígenos DR4 y DR3 respectivamente⁴⁷⁻⁴⁸; sin embargo, no son muchos los estudios que han analizado la asociación entre DQA1 y sus diferentes haplotipos.⁴⁹

Un estudio realizado en poblaciones de Ciudad de México, Caracas y Medellín concluyó que existe significancia estadística para considerar a los alelos DQA1 como marcadores de susceptibilidad en el desarrollo de T1D.³⁹

Otro estudio realizado en pacientes norteamericanos de origen mexicano encontró que los alelos DQB1*0302 DQB1*0201 se encontraban en un 91% de los pacientes comparados con el 67% de los controles, y los alelos DQA1*0501 y DQA1*0301 en el 100% de los pacientes comparado con el 74% de los controles. Lo anterior sugiere que en esta población la susceptibilidad al desarrollo de T1D se encuentra asociada con las combinaciones alélicas DQA y DQB en particular.⁴⁹

La protección conferida por HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 se ha encontrado dominante sobre el riesgo conferido por otros haplotipos, tales como DQA1*0301-DQB1*0302 o DQA1*0501-DQB1*0201. De manera adicional se descubrió el haplotipo DRB1*1401-DQA1*0101-DQB1*0503, un haplotipo poco común, que confiere protección y que está mediado específicamente por el alelo HLA-DRB1*1401 en desequilibrio de enlace con DQA1*0101-DQB1*0503, en pacientes de dos bases de datos independientes que incluyeron a individuos caucásicos⁵⁰.

La mayor parte de los estudios entre HLA y diabetes tipo 1 se han enfocado al exón 2 de los genes polimórficos de clase II -DRB1*, -DQA1* y -DQB1*. Sin embargo, existen estudios que sugieren la presencia de polimorfismos adicionales que pueden estar influenciando, aunque en menor grado, el desarrollo de T1D. Tal es el caso del alelo 3 del microsatélite D6S2223, localizado 4.9 Mb telomérico a HLA-DQ, en la región de clase I extendida, y que se encontró asociado con una reducción del riesgo conferido por el haplotipo HLA-DQ2-DR3 en poblaciones de Suecia y Francia.^{51,52}

En 1996, Montoya *et al.* verificaron en familias antioqueñas con T1D la presencia de los alelos DRB y DQ, que confieren susceptibilidad para sufrir la enfermedad, y pudieron establecer otros haplotipos relacionados con la susceptibilidad o la resistencia a la enfermedad. Ellos concluyeron que los haplotipos de susceptibilidad en las familias antioqueñas son: DRB*10301-DQA1* 0501-DQB1* 0201, con una frecuencia del 50% frente al 12.5% en los sujetos sanos; y DRB1 04- DQA1 03-DQB1 0302, con una frecuencia del 53.8% frente al 28.6% en los sujetos sanos⁵³.

Recientemente se han investigado varios loci involucrados con T1D diferentes del HLA, con resultados controvertidos. De estos loci, el más conocido es el polimorfismo 5' flanqueante del gen de la insulina (VNTR-INS), localizado en el cromosoma 11 y que en la actualidad se designa como IDDM2⁵⁴, el cual consiste en un VNTR (número variable de repeticiones en tándem) que presenta tres alelos (S, M, L). Dadas las dificultades técnicas para su genotipificación directa (mediante Southern blot), se prefiere el uso del polimorfismo Hph I, el cual se encuentra estrechamente ligado a aquél, y su presencia o ausencia ha permitido inferir el alelo VNTR en algunas poblaciones ya caracterizadas⁵⁵. En el brazo largo de este mismo cromosoma se ha identificado otra región de susceptibilidad para esta enfermedad.⁵⁶

CONCLUSIÓN

Existen varios estudios que han evidenciado el papel que desempeñan las moléculas de HLA en varias enfermedades autoinmunes. Tanto los alelos HLA descritos como susceptibles y no susceptibles pueden presentar péptidos derivados de autoantígenos, pero sólo las interacciones con alelos de susceptibilidad conducen a autoinmunidad.

Hoy treinta años después no se discute el origen autoinmune de la T1D. Esta claro la participación de clonos T autorreactores que reaccionan sobre antígenos de las células β de los islotes de langerhan productoras de insulina. Estos hallazgos sumados a la presencia de auto anticuerpos dirigidos específicamente contra antígenos de las células β, son los responsables de la inflamación y destrucción de los islotes. Es importante resaltar que los alelos HLA clase II que han sido asociados a T1D com-

parten cambios aminoacídicos en la posición 57 y que estos hallazgos son similares a los descritos para el modelo experimental de diabetes del ratón NOD. No obstante, debe mencionarse que el polimorfismo genético y molecular del sistema MHC y sus alelos HLA por sí solos no explican la patogénesis y la predisposición de T1D.

Adicionalmente, se ha especulado sobre la participación de los factores ambientales como elementos disparadores de diversos procesos patológicos. El mecanismo por el cual lo hacen no ha sido resuelto aún. Futuras investigaciones en las áreas de unión péptido - MHC, así como la definición de secuencias consenso entre los diferentes alelos de HLA y cada patología, conducirán al esclarecimiento de los mecanismos operantes en la enfermedad autoinmune.

Tabla 1
Principales enfermedades autoinmunes y alelos HLA asociados⁹

ENFERMEDAD AUTOINMUNE	ALELO HLA ASOCIADO
Artritis crónica (peruanos)	DRB1*4, DRB1*1501
Artritis reumatoide (caucásicos)	DRB1*0404, DRB1*0101, DRB1*0401
Artritis reumatoide (indios americanos)	DRB1*1402
Artritis reumatoide (japoneses)	DRB1*0405
Artritis reumatoide juvenil periarticular	DRB1*0801, DRB1*11
Cardiomiopatía tardía familiar	DRB1*4
Dermatomiositis juvenil	DQA1*0501
Enfermedad celiaca	DQB1*0201, DQB1*0302
Enfermedad de Addison	DRB1*0404
Enfermedad de Graves	DRB1*0301
Esclerodermia	DRB1*11
Esclerosis múltiple	DRB1*4, DRB1*1501
Esclerosis múltiple (en Sicilia)	DRB1*4, DRB1*3
Hepatitis autoinmune (argentinos)	DRB1*1302
Hepatitis autoinmune (caucásicos)	DRB1*0301, DRB1*0401
Hipotiroidismo autoinmune	DRB1*0301
IDDM* (caucásicos)	DRB1*0302, DRB1*0201
IDDM* (japoneses)	DRB1*0405-DQB1*0401, DRB1*0901-DQB1*0303
Miastenia gravis	DRB1*0301
Miastenia gravis de Lambert-Eaton	DRB1*0301-DQB1*0201
Pemphigus foliáceo	DRB1*0404, DRB1*14
Pemphigus vulgaris	DRB1*0402
Pemphigus vulgaris (asiáticos)	DRB1*14-DQB1*0503
Síndrome autoinmune a la insulina	DRB1*0406
Síndrome de berilio crónico	DPB1*0201
Síndrome de Goodpasture	DRB1*15
Síndrome de Sjögren	DRB1*0301-DQB1*0201
* Diabetes mellitus insulino dependiente.	

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por la Fundación Universidad del Norte.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno

Referencias

1. Todd, J.A., Bell, J.I. & McDevitt, H.O. HLA-DQ beta gene contribuyes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329:599-604.
2. Mc Devitt, H.O. & Tyan, M.L. Genetic control of the antibody response in inbred mice. Transfer to response by spleen cells and linkage to the mayor histocompatibility (H-2) locus. *J Exp Med* 1968; 128(1): 1-11.
3. Diabetes mellitus insulino-dependiente. ILADIBA. Enero de 1995 : 14-8.
4. Frazer de Llado, T.E., González de Pijem & Hawk, B. Incidente of IDDM in children living in Puerto Rico. Puerto Rico IDDM Coalition. *Diabetes Care* 1998; 21(5): 744-6.
5. Carrasco, E., Pérez, F., Calvillan, M., López, G., Wolf, C., Castano, A. & García de los Ríos, M. Incidente of insulin-dependent diabetes mellitus in Santiago, Chile (1990-1993). *Revista Médica de Chile* 1996; 124(5): 561-6.
6. Ferreira, S.R., Franco, L.J., Vivolo, M.A., Negrato, C.A., Simoes, A.C. & Ventureli, C.R. Population-based incidente of IDDM in The state of Sao Paulo, Brazil. *Diabetes Care* 1993; 16(5): 701-4.
7. Bach, J.F. Predictive medicine in autoimmune diseases: from the identification of genetic predisposition and environmental influence to precocious immunotherapy. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:156-161.
8. Wicker, L.S., Todd, J.A. & Peterson, L.B. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 1995;13:179-200.
9. MHC: Polimorfismos genéticos en autoinmunidad. *REVISTA NAL EN FRES P MEX*, abril-junio, 2004, segunda época, vol. 17, N° 2.
10. Gebe, J.A, Swanson, E. & Kwok, W.W. HLA class II peptide - binding and autoimmunity. *Tissue Antigens* 2002;59:78-87.
11. McDevitt, H., Singer, S. & Tisch, R. The role of MHC class II genes in susceptibility and resistance to type I diabetes mellitus in the NOD mouse. *Horm Metab Res* 1996; 28:287-288.
12. Morel, P.A., Dorman, J.S., Todd, J.A. *et al.* Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8111-8115.
13. Serreze, D.V. & Leiter, E.H. Genes and cellular requirements for autoimmune diabetes susceptibility in nonobese diabetic mice. *Curr Dir Autoimmun* 2001; 4:31-67.
14. Von Herrath, M.G. *Molecular pathology of type 1 diabetes mellitus*. Basel: S. Karger AG, 2001.
15. Blumberg, R.S., Sauberman, L.J. & Strober, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Cur Opin Immunol* 1999;11:648-656.
16. Van Houten, N. & Blake, S.F. Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction. *J Immunol* 1996;157:1337-1341.
17. Weinner, H.L. Oral tolerante: mobilizing the gut. *Hosp Pract*(Off Ed) 1995;30: 53-58.
18. Benson, J.M. & Whitacre, C.C. The role of clonal deletion and anergy in oral tolerante. *Res immunol* 1997;148:533-541.
19. Maeda, Y., Noda, S., Tanaka, K. *et al.* The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patces under germfree conditions. *Immunobiology* 2001; 204:442-457.
20. Atkinson, M.A. & Maclararen, N.K. The patogénesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331:1428-1436.
21. Boismenu, R., Feng, L., Xia, Y.Y. *et al.* Chemokine expresión by intrepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 1996; 157:985-992.
22. Karjalainen, J., Martin, J.M., Knip, M. *et al.* A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-depent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1992; 302-307.
23. Honeyman, M.C., Coulson, B.S., Stone, N.L. *et al.* Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 2000; 49:1319-1324.

24. Lonrot, M., Korpela, K., Knip, M. *et al.* Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes* 2000;49:1314-1318.
25. Mena, I., Fischer, C., Gebhard, J.R. *et al.* Coxsackie infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology. *Virology* 2000; 271:276-288.
26. Atkinson, M.A. & Maclaren, N.K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331: 1428-1436.
27. Pender, M.P. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 2003; 24:584-588.
28. Urnovitz, H.B. & Murphy, W.H. Human endogenous retroviruses: natural, occurrence and clinical implications in human diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996; 1:72-99.
29. Osmola, A., Namysl, J., Jagodzinski, P.P. & Prokop, J. Genetic background of cutaneous forms of lupus erythematosus: update on current evidence. *J Appl Genet* 2004;45:77-86.
30. Wucherpfennig, K.W. Structural basis of molecular mimicry. *J Autoimmun* 2001;16:293-302.
31. Massa, M., Mazzoli, F., Pignatti, P., de Benedetti, F., Passalia, M., Viola, S. *et al.* Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2721-2729.
25. Noel, Maclaren and Kevin, Lafferty. The 12th International Immunology and Diabetes Workshop. *Diabetes*, 1993; vol. 42.
26. Eisenbath, G.A. Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986; 314: 1360-1368.
27. Durinovic-Bello I., Hummel, M. & Ziegler, A.G. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes* 1996; 45:795-800.
28. Fuchtenbusch, M., Keredel, K., Bonifacio, E. *et al.* Exposure to exogenous insulin promotes IgG1 and the T-helper 2-associated IgG4 responses to insulin but not to other islet autoantigens. *Diabetes* 2000; 49:918-925.
29. Kaufman, D.L., Tisch, R., Sarventnick, N. *et al.* Report from the 1st International NOD Mouse T-Cell Workshop and the follow-up mini-workshop. *Diabetes* 2001; 50:2459-2463.
30. Prieur, A.M. *et al.* Juvenile Chronic Arthritis (JCA). 12th International Histocompatibility Workshop study HLA Genetics diversity of HLA. Functional and Medical implication. Dominique Charron (Ed.), 1997: 398-405.
31. Wicks, Y. *et al.* New perspectives on rheumatoid arthritis. *Immunology Today* 1994; vol. 15: 553-556.
32. Mercuariai, F. *et al.* Involvement of DPB1*0201 allele in the pathogenesis of juvenile chronic arthritis JCA. 12th International Histocompatibility Workshop study HLA Genetics diversity of HLA. Functional and Medical implication. Dominique Charron (Ed.), 1994: 663-667.
33. Begovich, A.B., McClure, G.R., Suraj, V.C. *et al.* Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* 1992; 148:249-58.
34. Dorman, J. Molecular epidemiology of insulin dependent diabetes mellitus: WHO Diamond Project. WHO Diamond molecular epidemiology Sub-Proyect Group. *Gaceta Médica de México*. 1997;133, Suppl 1: 151-4.
35. Harrison, L.C. & Tait, B.D. *Balliere's clinical endocrinology and metabolism*, vol. 5. *Genetics of diabetes*, parts I and II. London: Baillere Tindall, 1991.
36. Garavito, G., Deltoro, K., Ordóñez, J., Rebolledo, E., Egea, E.E., Hernández, C., Cure, C., Rosero, S., Egea, E. P39.10 (H3) HLA-DRB1 and DQB1 alleles expression in IDDM Caribbean Colombians mestizos. Its relation to type I diabetes susceptibility. *Tissue Antigens* 19; vol. 59: 137.
37. Gorodezky, C., Olivo, A. & Alaez, C. High and low risk molecular sequences in autoimmune diseases. Analyses of susceptibility and resistances of type 1 diabetes in Latin America. *Gaceta Médica de México* 1997; 133 Suppl 1: 125-32.

38. Tiwarj, J.L. & Teseraki, P.I. *Insulin dependent diabetes. HLA and Disease Associations*. Nueva York, Springer Verlag, 1985.
- 39: Fletcher, J., Mijovic, C., Odugbesan, O., Jenkins, D., Bradwell, A.R. & Barnett, A.H. Transracial studies implicate HLA-DQ as a component of genetic susceptibility to type I diabetes. *Diabetol*, 1988, 31: 864-870.
40. Bertrams, J. & Baur, M.P. Insulin dependent diabetes mellitus. En E. Albert, M.P. Baur & W.R. Mayr (Eds). *Histocompatibility testing*. Berlín, Springer Verlag, 1984: 358-384.
41. Bashir, H., Juji, T. & Moffit, P. Diabetes mellitus: En M.J. Simmons & B.D. Tait (eds). *Proceedings of the 2nd Asia and Oceania Histocompatibility Workshop-Conference*. Toorak, Immunopublishing, 1983: 332-342.
42. Carrier, C., Ginsberg, F., Russo, E. & Rubinstein, P. DRB1, DQA1-QAP and DQB1-QBP haplotypes in 58 IDDM families. 12th International Histocompatibility Workshop Study. In D.J. Charron (Ed.). *HLA in medicine: genetics diversity of HLA.....*
43. Begovich, A.B., McClure, G.R., Suraj, V.C. *et al.* Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* 1992; 148:249-58.
44. Morel, P.A., Dorman, J.S., Tood, J.A., McDevitt, H.O. & Trucco, M. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQB chain protects against type I diabetes: A family study. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988; 85:8.111-8.115.
45. Morel, P.A., Dorman, J.S., Tood, J.A., McDevitt, H.O. & Trucco, M. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQB chain protects against type I diabetes: A family study. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988; 85:8111-8115.
46. Rooningen, K.S., Sprukland, A., Tait, B.D., Drummond, B., López Larrea, C., Gorodezky, C., Baranda, F.S. y col. HLA class II associations in insulin dependent diabetes mellitus among Blaks, Caucasians and Japanese. En K. Tsuki, M. Aizawa & T. Sasasaki (eds). *HLA 1991*, Vol. 1. Oxford, Oxford University Press, 1992: 713-722.
47. Sanjeev, C.B., Zeidler, A., Shaw, S., Rotter, J., Nepom, G.T., Costin, G., Raffael, L. & Eastman, S. Analysis of HLA-DQA1 and DQB1 genes in Mexican Americans with insulin dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 1993 ; 42(2):72-7.
50. Redondo, M.J., Kawasaki, E., Mulgrew, C.L., Noble, J.A., Erlich, H.A., Freed, B.M. *et al.* DR- and DQ-associated protection from type 1A diabetes: Comparison of DRB1*1401 and DQA1*0102-DQB1*0602*. *JCE & M* 2000; 85:3793-3797.
51. Johansson, S., Lie, B.A., Todd, J.A., Pociot, F., Nerup, J., Cambon-Thomsen, A. *et al.* Evidence of at least two type 1 diabetes susceptibility genes in the HLA complex distinct from HLA-DQB1, -DQA1 and -ARB1. *Genes Immun* 2003; 4:46-53.
52. Johansson, S., Lie, B.A., Pociot, F., Nerup, J., Cambon - Thomsen, A., Kockum, I. *et al.* HLA associations in type 1 diabetes: DPB1 alleles may act as markers of other HLA-complex susceptibility genes. *Tissue Antigens* 2003;61:344-351.
53. Montoya, F., Bedoya, C.I., Restrepo, M.C., Villegas, A., Posada, S.C., García, H.I. *et al.* Determinación de marcadores genéticos en pacientes con diabetes tipo 1 y población sana. *Acta Med Colom* 1996; 21:10-16.
54. Spielman, R.S., Baur, M.P. & Clerget-Dsrpoux, F. Genetic analysis of IDDM: Summary of GAW5 IDDD results. *Genet Epidemiol* 1989; 6:43-548.
55. Julier, C., Hyer, R.N., Davis, J. & Merlin, F. Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature* 1991; 354: 155-159.
56. Hashimoto, L., Habita, C., Beressi, J.P., Delepine, M., Besse, C., Cambom-Thomsen, A. *et al.* Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature*. 1994; 371: 161- 164.