

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología I**



**TESIS DOCTORAL**

Estudio de marcadores genéticos asociados a diabetes tipo 1 en  
población española con debut pediátrico y adulto

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Espino Paisán

Directores

**Elena Urcelay**  
**José Luis Santiago**

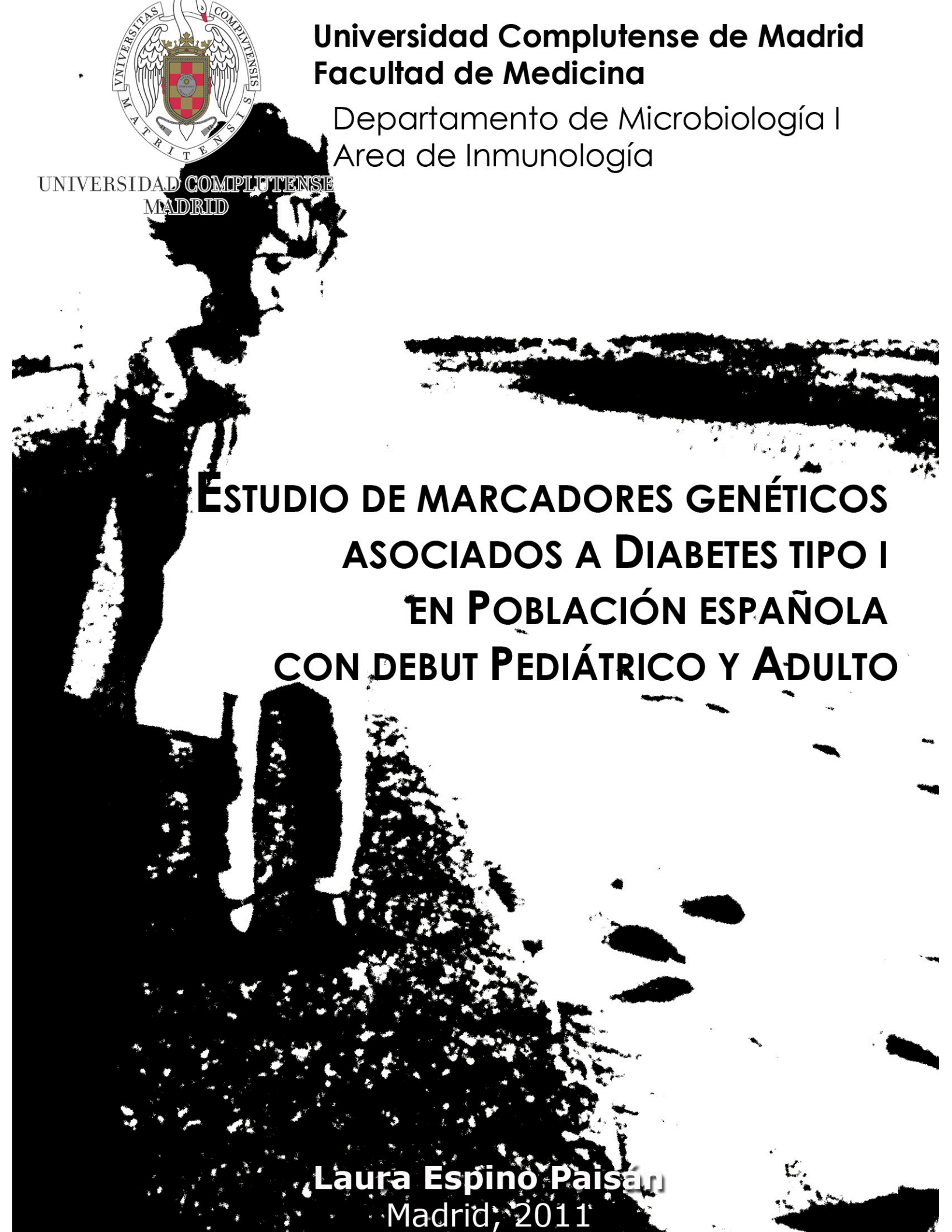
**Madrid, 2012**



**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Medicina**

Departamento de Microbiología I  
Área de Inmunología

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID



**ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS  
ASOCIADOS A DIABETES TIPO I  
EN POBLACIÓN ESPAÑOLA  
CON DEBUT PEDIÁTRICO Y ADULTO**

**Laura Espino Paisán**  
Madrid, 2011

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina  
Departamento de Microbiología I**

**Estudio de marcadores genéticos  
asociados a diabetes tipo 1 en población  
española con debut pediátrico y adulto**

**Trabajo presentado por la  
licenciada Laura Espino Paisán para  
optar al grado de Doctor**

**Madrid, 2011**



"The ones who really love you,  
walk up and down outside the Wall..."  
Pink Floyd, The Wall

¡Muchas gracias...!

A los doctores Elena Urcelay y José Luis Santiago por su labor de dirección de esta tesis. A Elena, por corregir velozmente todo lo que le he puesto sobre la mesa en estos meses (y no ha sido poco) y por tener siempre cinco minutos para resolver cualquier duda a pesar de lo complicado que ha sido este año. A José Luis, por ayudarme a empezar en el mundo de la genética de la diabetes, por tener siempre un momento y por encajar mis ocasionales borderías.

Al doctor Hermenegildo de la Calle, por abrirme la puerta de su despacho como se le abre la puerta de casa a un amigo. Por tener siempre una historia clínica preparada para demostrarme que la diabetes no es tan sencilla como dicen los libros y por renunciar a su hora de comida más de una vez para proporcionarme datos y resolver mis dudas.

Al doctor Miguel Fernández Arquero, a su agenda, su buen humor y su habilidad para reducir los entresijos de la Biología Molecular a un coche que se dirige a Vitoria pasando por Burgos.

A la doctora Jezabel Varadé, por traer una parte de las muestras de diabetes del hospital Ramón y Cajal.

Al doctor Emilio Gómez de la Concha, por impulsar en su momento la investigación en el servicio de Inmunología para que los residentes tengamos la oportunidad de realizar la tesis doctoral.

A la doctora Concepción Núñez Pardo de Vera, por su capacidad para estar literalmente enterrada bajo una pila de trabajo y aún así sacar la cabeza y decir "si necesitas ayuda, ¡aquí estoy!". Porque su claridad de ideas, su rapidez mental y su dedicación al trabajo son un ejemplo (y un salvavidas) para los que trabajamos con ella. En definitiva, porque hace que los que le rodeamos queramos ser mejores investigadores. A Conchi, por los momentos chascarrillo que ayudan a desengrasar el cerebro entre p y p, por su sensatez en los buenos y en los malos momentos y por invitarme a su piscina cuando la temperatura de esta ciudad supera lo que un cuerpo acostumbrado al norte es capaz de aguantar. Si dentro de diez años no sigues investigando, es que algo va muy mal en este país.

A la doctora Ana González Vigo, porque es una gran investigadora y una gran persona, porque me encanta su sentido del humor y su forma de contar las cosas (especialmente cuando incluyen a Sofía). Espero que tengas la suerte que te mereces y que los que te rodean vean siempre lo mucho que vales. Se te echa de menos.

A los residentes y becarios con los que he compartido rotaciones, comidas, estrecheces, turnos en el ordenador de las bases de datos, termocicladores, pipetas, poyatas, protocolos y chascarrillos durante estos cuatro años. Y para que no haya peleas, voy por orden cronológico: a Raquel (Doctora Vallecana), por enseñarle a una medio burgalesa medio gallega como yo lo que significa ser de Vallecas (¡ej qué!) y por darle un nuevo significado a la palabra "resquemor". A Ana Márquez (Doctora Sensata), por su sensatez en medio de esta pandilla de adorables insensatas y su impecable estilo. A Nadia por su *glamour*, sus conversaciones con los Dioses, su *pie* de limón y por transmitirme su calma lama en mi primera rotación por Serología. A Manmen por su salero *grandáino*, sus buenas noches a plena luz del día, su fatiga (de vergüenza) y su *ozú, mae mía, que ahte*. Ya sabes que siempre serás mi R4, aunque te conociera como R2. A Bárbara (¡Doctora de España!), por sus historias surrealistas, por ser tan mona, tan pequeñita, tan adorable... y tan valiente de salir del nido y aterrizar nada menos que en Washington (¿no había nada más cerca?). A Carlos, por aportar un cromosoma Y a un laboratorio por aquel entonces saturado de cromosomas X. Por sus avistamientos en el gimnasio y por su conocimiento enciclopédico de los restaurantes de Madrid. A Nieves (Doctora Veterinaria), por su capacidad para olvidarse de su teléfono, de su ordenador y de cualquier otra cosa que no lleve pegada al cuerpo, y aún así ser una investigadora de primera. Por su inglés digno de la megafonía del aeropuerto de Heathrow y porque siempre nos quedará el Muro de Berlín. A María (Doctora Esclerótica), por su duelo de historias surrealistas con Bárbara. Por su sonrisa y su buen estar a pesar de los malos momentos. Por su capacidad de trabajo y su buen juicio. Porque es una de las personas más buenas que he conocido y se merece lo mejor. A Gorka, por su agudeza, su

inteligencia, su descacharrante sentido del humor, su capacidad para trabajar sin hacer ruido y por ser como es. A Arturo, por su inigualable combinación de caballerosidad y sarcasmo, y por su forma de bromear con toda la seriedad del mundo. Por descubrirnos que en México hasta las golosinas son picantes. Por sus fotos voladoras entre pisco y pisco. Porque tiene una familia adorable. A Luzma, por esa mezcla perfecta de encanto y genio castellanoleonés (y cuando digo "genio" quiero decir "mala leche"). Por suceder a Nadia en el puesto de "Residente Más Fotogénica". Por aguantar estoicamente un año entero ella sola en el duro campo de combate de Serología y salir victoriosa. A Romina por esa combinación de ironía, mala leche y acento argentino. Por sus mordaces comentarios sobre lo que es ser médico y pasar consulta. A Miguel Ángel, porque es un encanto. Por encajar todas las bromas con elegancia. Por su sentido autoparódico y su colección de pamelas. Porque vale mucho y va a llegar lejos. A Félix, porque también es un encanto, por sus aportaciones a las charlas de las comidas y porque me alegro de haberle conocido después de tantos saludos formales en el secuenciador. Y finalmente, a Alejandro, por compartir su extensa agenda personal con nosotros, por su cara de gatito de *Shreck*, aunque tras ella esconda al Tigre de Monterrey, por su pose *Zoolander* y sus innegables dotes de camarero, especialmente si es una chica la que le pide la comida.

A María, de la unidad de Esclerosis Múltiple, por compartir aquellos tiempos de preinscripciones, inscripciones, cursos de doctorado, trabajos, exposiciones, DEAs y proyectos. Suerte con tu tesis que, aunque no lo parezca, realmente tiene un final.

A todo el personal del servicio de Inmunología. A la doctora Mari Ángeles Figueredo, por mejorar cada año. A Amparo, por tener siempre una respuesta para todo y por decir las cosas claras. A Ángeles, con la que da gusto trabajar y que es todo un ejemplo de cómo afrontar las peores rachas que uno se pueda imaginar. Espero que en algún día no muy lejano empiece a tener toda la buena suerte que se merece... que es mucha. A Carmen Poyo por su capacidad para hacer cuatro técnicas a la vez y no perder la sonrisa, por su inagotable sentido del humor, sus diálogos con el Triturus, su número erótico (el 69, por supuesto), sus neutrófilos de hombres maduritos y de buen ver, sus envidiables viajes... en definitiva, por convertir el trabajo en el laboratorio en una fiesta sin perder la profesionalidad. Ah, y por defendernos siempre a capa y espada. A Pepa por su trabajo calladito y constante desde primeras horas de la mañana. A Pilar por sus descansos para "echar gasolina" y sus nefelómetros puntuales. A Marisa, porque siempre nos tenía una bolsa de cajas de puntas preparada... a pesar de lo mucho que llegamos a gastar en los mejores momentos. A Menchu por sus bailes, sus viajes (también envidiables), su carácter de rompe y rasga y su conocimiento enciclopédico de la Historia (así, con Mayúsculas) del servicio. A Toñi, por su coordinación para compartir termocicladores e hibridaciones. A Ángel, mujer a pesar de su nombre, por llegar todas las mañanas con una sonrisa de oreja a oreja y no perderla ni un solo minuto. Por su prodigiosa velocidad a la hora de hacer diluciones y otros trabajos de chinos. Por descubrirnos las increíbles rosquillas de su madre. A Carmen Martínez (Carmencita Querida), por su brutal sinceridad. Y si, brutal es una palabra muy fuerte, pero tu sinceridad, Carmencita, también es muy fuerte. No la pierdas.

A Inés, Gabi, Raquel e Inma, del hospital Ramón y Cajal, y a Pilar, Juan y Alberto, del Hospital La Paz, por acogerme durante mis rotaciones en sus servicios. A Gabi, por proporcionarme velozmente la información sobre los kits de anticuerpos a pesar de estar enterrada en sus trabajos de master. A Vanesa, por hacer más amenas las esperas entre la consulta y el citómetro en La Paz y por darme ánimos para enfrentarme todas las tardes a la tesis en una época en la que podría fácilmente haber tirado la toalla. A Ernesto, Lali, Antonio, Mari Cruz y cualquier otra persona que haya compartido sus conocimientos conmigo en estos cuatro años.

A todos los autores que amablemente me enviaron sus artículos cuando mi búsqueda llegaba a la temible frase "*Your institution does not provide access to this paper*".

A la doctora Soledad Ruiz Álvarez, de la Facultad de Biología de Santiago de Compostela, por darme mi primera oportunidad en el mundo investigador. Tú bien sabes que cuando acabé la carrera no quería ni oír hablar de hacer una tesis, y contigo cambié de opinión. Gracias por demostrarme que esto no se me da mal del todo, por enseñarme que un jefe puede entusiasmarse por mi trabajo más aún que yo misma, por tu apoyo y, en definitiva, por echarme a andar para que cuando me tocase dar los pasos a mí solita no me costase mucho. Sin los años que pasé trabajando contigo, este trabajo me hubiera costado el doble. Por cierto, el fantasma de Dixon ha planeado sobre esta tesis en varias ocasiones... y he echado de menos tus *Metaradiografías* para echarme unas risas.

A Sofía I, Sofía II, Miguelete, Diego y Nerea, por recordarnos con sus historias de pañales, biberones, llantos a media noche, primeros dientes, guarderías y colegios que hay vida más allá de la p.

A los que me acompañaban (a todo volumen) ya fuera entre placa y placa, entre vic, hetero y fam o a altas horas de la tarde y han evitado más de una vez que un ordenador salga volando por los aires: al Boss por *Badlands* y *Bobby Jean*, por *Born to Run* del minuto 1 al 39, por los incidentes en la calle 57 y por existir en general. A los solos de guitarra que te dejan *Comfortably Numb*. A *Animals*, *Wish you were here* y *The Wall*. A los miserables de bolsillo (que no de espíritu), las canciones de alquiler y las óperas-rock divinas. Al Libro de las Ilusiones y todos los libros dignos de ese nombre, al cine (el de la pantalla grande y la pequeña), a los correos perdidos de los lunes por la tarde, a los partidos de tenis interminables y a todo lo que ayuda a recargar pilas para volver el lunes al trabajo. A los "casos clínicos" de las doce de la mañana (clásicos, ondulados, artesanos o con sabor a jamón), los menús de la cafetería (dignos de otra tesis), los diversos colores de las patatas fritas, la variable densidad del gazpacho veraniego, las micro-nécoras, al zumito, al donut de chocolate, al aceite (uno por ensalada), a la ironía de tener gelatina de postre en un hospital, al comoflán de sabores y a la naranjina.

A mi familia, que es la que me aguanta desde hace treinta años, aunque ahora lo haga a distancia. A mi padre, que tiene tantas ganas de ver esta tesis que lleva cinco meses preguntándome la fecha de lectura para cogerse un billete de avión y venir, literalmente, volando. A mi madre, que me ha enseñado con el ejemplo a pasar de lo malo y quedarme con lo bueno. A mi hermana Esther, porque el mundo realmente es mucho más aburrido sin ella. A mi hermano Javi, perfecto compañero de piso y perfecto cocinero (¡ese arroz negro!), por su ayuda en esta jungla madrileña y su apoyo económico en los últimos meses, y a mi cuñada Belén, por descubrirme el *curry* de verdad, el té ruso y la lasaña tamaño campo-de-tenis, por llenarme la casa de comida cada vez que le hago una visita y porque es un encanto.



|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abreviaturas</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Resumen</b>   | <b>3</b>  |
| <b>Summary</b>   | <b>5</b>  |
| <br>   |           |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>7</b>  |
| 1. Definición, diagnóstico y comorbilidad                                      | 9         |
| 2. Epidemiología   | 10        |
| 3. Enfermedades autoinmunes asociadas  | 11        |
| 4. Factores implicados en el desarrollo de la DT1                              | 11        |
| 4.1. Factores ambientales  | 11        |
| 4.2 Factores genéticos   | 12        |
| 4.2.1 El complejo principal de histocompatibilidad y su asociación a DT1       | 13        |
| 4.2.2 Asociaciones a DT1 en genes no HLA                                       | 14        |
| 5. El estudio de la genética de la DT1   | 16        |
| 5.1 Era pre-GWAS (1974-2007)   | 16        |
| 5.2 Era GWAS (2007-2011)   | 17        |
| 6. Influencia de la genética en la edad de debut de la DT1                     | 19        |
| 7. El sistema inmunitario y la destrucción de las células $\beta$              | 21        |
| <br>   |           |
| <b>OBJETIVOS</b>   | <b>33</b> |
| <br>   |           |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>37</b> |
| 1. Pacientes   | 37        |
| 2. Recogida de datos   | 39        |
| 3. Procesamiento de las muestras   | 42        |
| 4. Genotipado de los genes HLA   | 43        |
| 5. Genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)                    | 44        |
| 6. Análisis estadístico de los datos   | 46        |
| <br>   |           |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | <b>49</b> |
| Análisis de asociaciones descritas en la era pre-GWAS                          | 51        |
| Región 6p21 (genes HLA)  | 53        |
| Región 11p15 (gen <i>INS</i> )   | 61        |
| Región 2q33 (gen <i>CTLA4</i> )  | 65        |
| Regiones 4q27, 10p15 y 22q13 (genes <i>IL2</i> , <i>IL2RA</i> e <i>IL2RB</i> ) | 69        |



|   |            |
|---|------------|
| Análisis de asociaciones descritas en la era GWAS                         | 75         |
| Región 5p13 (genes <i>CAPSL-IL7R</i> )                                    | 77         |
| Región 7q32 (gen <i>IRF5</i> )  | 83         |
| Región 12p13 (genes <i>KLRB1-CLEC2D</i> )                                 | 85         |
| Región 12q13 (gen <i>ERBB3</i> )  | 87         |
| Región 16p13 (gen <i>CLEC16A</i> )  | 95         |
| Región 18p11 (gen <i>PTPN2</i> )  | 99         |
| Región 2q24 (gen <i>G6PC2</i> )   | 105        |
| Región 2q32 (gen <i>STAT4</i> )   | 109        |
| Región 6q23 (genes <i>TNFAIP3-OLIG3</i> )                                 | 111        |
| Región 17q21 (genes <i>STAT3-PTRF</i> )                                   | 113        |
| Región 9q33 (genes <i>TRAF1-C5</i> )                                      | 117        |
| <b>DISCUSIÓN GENERAL Y NUEVAS PERSPECTIVAS</b>                            | <b>123</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>127</b> |
| <b>ANEXO I: publicaciones derivadas de este trabajo</b>                   | <b>131</b> |
| <b>ANEXO II: comunicaciones a congresos relacionadas con este trabajo</b> | <b>133</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>135</b> |



## ABREVIATURAS

|  |   |
|--|---|
| <b>ADA:</b> American Diabetes Association  | <b>ERBB3:</b> v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogen homolog 3      |
| <b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico  | <b>FOXP3:</b> forkhead box P3   |
| <b>AH:</b> ancestral haplotype   | <b>FUT2:</b> fucosyltransferase 2   |
| <b>Ala:</b> alanina  | <b>G6PC2:</b> glucose-6-phosphatase catalytic 2                             |
| <b>AR:</b> artritis reumatoide   | <b>GAD:</b> glutamic acid decarboxilase                                     |
| <b>Arg:</b> arginina   | <b>GLIS3:</b> GLIS family zinc finger 3                                     |
| <b>ARN:</b> ácido ribonucleico   | <b>Gln:</b> ácido glutámico   |
| <b>ARNm:</b> ácido ribonucleico mensajero  | <b>GoKinD:</b> Genetics of Kidney in Diabetes                               |
| <b>BACH2:</b> BTB and CNC homology 1 basic leucine zipper transcription                                  | <b>GWAS:</b> genome wide association study                                  |
| <b>C1QTNF6:</b> C1q and tumor necrosis factor related protein 6  | <b>HA:</b> hipotiroidismo autoinmune  |
| <b>CAPSL:</b> calcyphosine-like  | <b>HCSC:</b> Hospital Clínico San Carlos                                    |
| <b>CCR5:</b> chemokine C-C motif receptor 5  | <b>HLA:</b> human leukocyte antigen   |
| <b>CENPW:</b> centromere protein W   | <b>KLRB1:</b> killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1         |
| <b>CEU:</b> Centre d'Etude du Polimorphisme (Utah residents with Northern and Western European ancestry) | <b>IA2:</b> insulinome associated antigen 2                                 |
| <b>CD4:</b> cluster of differentiation 4   | <b>ICA:</b> islet cell antibodies   |
| <b>CD8:</b> cluster of differentiation 8   | <b>ICOS:</b> inducible T-cell co-stimulator                                 |
| <b>CD28:</b> cluster of differentiation 28   | <b>IFIH1:</b> interferon induced with helicase C domain 1                   |
| <b>CD69:</b> cluster of differentiation 69   | <b>IFN:</b> interferon  |
| <b>CD80:</b> cluster of differentiation 80   | <b>IKZF4:</b> ICAROS family zinc finger 4                                   |
| <b>CD86:</b> cluster of differentiation 86   | <b>IL1<math>\beta</math>:</b> interleucina 1 $\beta$                        |
| <b>CD161:</b> cluster of differentiation 161   | <b>IL2:</b> interleucina 2  |
| <b>CD226:</b> cluster of differentiation 226   | <b>IL6:</b> interleucina 6  |
| <b>CD:</b> célula dendrítica   | <b>IL7:</b> interleucina 7  |
| <b>CDc:</b> célula dendrítica convencional   | <b>IL12:</b> interleucina 12  |
| <b>CDp:</b> célula dendrítica plasmacitoide  | <b>IL15:</b> interleucina 15  |
| <b>CLEC2D:</b> C-type lectin domain family 2 member D  | <b>IL21:</b> interleucina 21  |
| <b>CLECL16A:</b> C-type lectin domain family 16 member A   | <b>IL23:</b> interleucina 23  |
| <b>COBL:</b> cordon-bleu homolog   | <b>IL27:</b> interleucina 27  |
| <b>CPA:</b> célula presentadora de antígeno  | <b>Ilc:</b> isoleucina  |
| <b>CTLA4:</b> cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4  | <b>IL2R:</b> interleukin 2 receptor   |
| <b>CTSH:</b> cathepsin H   | <b>IL2RA:</b> interleukin 2 receptor alpha                                  |
| <b>CU:</b> colitis ulcerosa  | <b>IL2RB:</b> interleukin 2 receptor beta                                   |
| <b>CYP27B1:</b> cytochrome P450 family 27 subfamily B polypeptide 1                                      | <b>IL7R:</b> interleukin 7 receptor alpha                                   |
| <b>DT1:</b> diabetes tipo 1  | <b>INS:</b> insulina  |
| <b>DT2:</b> diabetes tipo 2  | <b>IPEX:</b> inmunodisregulation, poliendocrinopathy, enteropathy, X-linked |
| <b>EAIT:</b> enfermedades autoinmunes tiroideas  | <b>IRF5:</b> interferon regulatory factor 5                                 |
| <b>EC:</b> enfermedad celiaca  | <b>LES:</b> lupus eritematoso sistémico                                     |
| <b>ECh:</b> enfermedad de Crohn  | <b>LLT1:</b> lectin-like transcript 1                                       |
| <b>EDTA:</b> ethylenediaminetetraacetic acid   | <b>MAF:</b> minor allele frequency  |
| <b>EGr:</b> enfermedad de Graves   | <b>MDA5:</b> melanoma differentiation associated antigen 5                  |
| <b>EII:</b> enfermedad inflamatoria intestinal   | <b>MHCIITA:</b> major histocompatibility complex class II transactivator    |
| <b>ELISA:</b> enzyme-linked immunosorbent assay  | <b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> nuclear factor kappa B                      |
| <b>EM:</b> esclerosis múltiple   | <b>NK:</b> natural killer   |
| <b>ES:</b> esclerosis sistémica  | <b>NKRP1A:</b> natural killer cell surface protein P1A                      |
|  | <b>NOD:</b> non-obese diabetic  |

**OLIG3:** oligodendrocyte transcription factor 3

**OR:** odds ratio

**PCR:** polymerase chain reaction

**PE:** phycoerythrin

**PRDM1:** PR containing-protein 1

**PRQCK:** protein kinase C theta

**PTPN2:** protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2

**PTPN22:** protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22

**PTRF:** polymerase 1 and transcript release factor

**RAB5B:** member RAS oncogene family

**RASGRP1:** RAS guanyl releasing protein

**RGS1:** regulator of G protein signalling 1

**RIG-1:** retinoid-inducible gene 1

**RNLS:** renalase FAD-dependent amine oxidase

**RT-PCR:** real time polymerase chain reaction

**SH2B3:** SH2B adaptor protein

**SMARCE1:** SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily e member 1

**SNP:** single nucleotide polymorphism

**SOCS1:** suppressor of cytokine signalling 1

**SPSS:** statistical package for the Social Sciences

**SSOP:** sequence specific oligonucleotide probe

**STAT1:** signal transducer and activator of transcription 1

**STAT3:** signal transducer and activator of transcription 3

**STAT4:** signal transducer and activator of transcription 4

**SUOX:** sulfite oxidase

**T1DGC:** Type 1 Diabetes Genetics Consortium

**TAGAP:** T-cell activation RhoGTPase activating protein

**T-bet:** T-cell specific T-box transcription factor

**TCR:** T-cell receptor

**TENR:** testis nuclear RNA-binding protein

**Th1:** T helper 1

**Th2:** T helper 2

**Th17:** T helper 17

**Thr:** treonina

**TLR3:** Toll-like receptor 3

**TLR8:** Toll-like receptor 8

**TNF:** tumor necrosis factor

**TNFAIP3:** tumor necrosis factor alpha-induced protein 3

**TRAF1:** TNF receptor-associated factor 1

**Treg:** linfocito T regulador

**TYK2:** tyrosine kinase 2

**UBASH3A:** ubiquitin associated and SH3 domain containing A

**UTR:** untranslated region

**Val:** valina

**Vi:** vitiligo

**VNTR:** variable number of tandem repeats

**WTCCC:** Wellcome Trust Case Control Consortium

**ZMIZ1:** zinc finger MIZ-type containing 1

**ZnT8:** zinc transporter 8

## Resumen

---

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción de las células  $\beta$  productoras de insulina en el páncreas. Esta destrucción está mediada por linfocitos T autorreactivos y monocitos, y además existen componentes genéticos y ambientales que influyen en la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Dentro del componente genético, el mayor determinante de la susceptibilidad a la DT1 se encuentra en la región HLA de clase II, en la que los haplotipos asociados a la enfermedad suponen el 50% de la carga genética. Los primeros estudios de asociación de genes candidatos establecieron 5 regiones que influyen en el riesgo a padecer DT1, pero el gran avance se ha dado en los últimos cinco años con el desarrollo de los estudios de barrido genómico (GWAS) que han permitido elevar a 50 el número de regiones asociadas a la enfermedad.

La DT1 puede comenzar a cualquier edad desde la primera hasta la novena década de vida, y esta diferencia en la edad de comienzo de la enfermedad podría estar influida por factores genéticos. Sin embargo, el estudio de estos factores se ha visto limitado porque la mayoría de los grandes estudios genéticos en DT1 restringen el reclutamiento de pacientes a aquéllos con un debut pediátrico de la enfermedad. El objetivo es evitar la inclusión de pacientes mal diagnosticados que padezcan diabetes tipo 2, pero mediante esta limitación se dificulta el estudio de la influencia de la genética sobre la edad de debut de la enfermedad y se ignora la posibilidad de que aquellos pacientes que debutan en edad adulta tengan un componente genético diferente a los pacientes con debut pediátrico.

En este trabajo hemos realizado el estudio de 17 regiones cromosómicas en un grupo de 451 pacientes de DT1 españoles con debut pediátrico y adulto. Entre estas regiones incluimos a) 4 regiones cromosómicas asociadas clásicamente a DT1 para estudiar su influencia en la edad de debut de la enfermedad, b) 7 regiones descubiertas en GWAS y c) 6 genes candidatos seleccionados por su función o por presentar asociación con otras enfermedades autoinmunes.

En la región HLA estudiamos varios haplotipos diferentes a los clásicamente asociados a DT1 y replicamos tres haplotipos ya descritos previamente. Además, encontramos un efecto de susceptibilidad en el haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* que no se ha descrito previamente en otras poblaciones.

En el estudio de la influencia de los genes clásicos de susceptibilidad en la edad de debut de la DT1 no encontramos efectos significativos, con lo cual podemos decir que los genes HLA de clase II, *INS*, *CTLA4* e *IL2RA* afectan por igual a los pacientes con debut pediátrico y adulto en nuestra población.

En el estudio de las 7 regiones descubiertas en GWAS, encontramos una tendencia a la asociación en las regiones 4q27 (*IL2*) y 12p13 (*KLRB1-CLEC2D*) que concuerda con los resultados previos, y replicamos las asociaciones descritas previamente en las regiones 12q13 (*ERBB3*) y 16p13 (*CLEC16A*). No observamos asociación de la región 22q13 (*IL2RB*) con la DT1. Además, encontramos que las regiones 5p13 (*CAPSL-IL7R*), 12q13 (*ERBB3*) y 18p11 (*PTPN2*) tienen una influencia sobre la edad de comienzo de la DT1.

En el estudio de 6 genes candidatos, describimos por primera vez la asociación del gen *STAT4* con DT1, replicamos una asociación descrita en el gen *TNFAIP3* y no encontramos asociación de los genes *IRF5*, *G6PC2* y *STAT3* con la DT1. En el caso del gen *TRAF1* encontramos indicios de asociación exclusivamente con la DT1 de debut adulto. De confirmarse en otras poblaciones, ésta sería la primera descripción de un gen asociado únicamente a la DT1 de debut tardío.

En conclusión, en nuestro estudio en población española encontramos pequeñas diferencias en la susceptibilidad a DT1 conferida por los genes HLA de clase II que podrían indicar la presencia de diferencias poblacionales. Además, describimos la influencia de cuatro regiones cromosómicas en la edad de comienzo de la enfermedad. Este resultado apoya la necesidad de incluir este tipo de análisis en el estudio general de la genética de la DT1, con el objetivo de determinar los factores genéticos que puedan actuar como "aceleradores" de la enfermedad. Entre los genes candidatos seleccionados, describimos por primera vez la asociación del gen *STAT4* a la DT1. Por último, la ausencia de asociación en el único gen no relacionado con el sistema inmunitario (*G6PC2*) concuerda con los estudios que apoyan que la base genética de la DT1 está formada principalmente por genes relacionados con la respuesta inmunitaria y que no existen defectos genéticos en el funcionamiento de las células beta que predispongan a la enfermedad.



## Summary

---

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease caused by the destruction of insulin-producing  $\beta$  cells in the pancreas mediated by autorreactive T cells and monocytes. There is a genetic and an environmental component that influences T1D susceptibility. The strongest genetic modifier is located in the class II HLA region, in which certain haplotypes carry 50% of the genetic load of the disease. The association studies of candidate genes established 5 regions associated with T1D, but a more significant progress has been made in the last five years with the development of the genome-wide association studies (GWAS), which have increased the number of T1D genetic associations to 50 chromosome regions.

T1D can begin at any age, from the first to the ninth decade of life, and this difference in age at disease onset could be influenced by genetic factors. However, study of the influence of genetics on age at onset of T1D has been limited, because the major genetic studies in T1D have usually restricted the recruitment of participants to paediatric-onset patients only. This precaution tries to avoid the contamination of the group of study with type 2 diabetes misdiagnosed patients, but it also makes difficult to analyze associations with age at onset of the disease and ignores the putative existence of a genetic component characteristic of adult onset T1D.

In our study, we have analyzed 17 chromosome regions in 451 T1D Spanish patients with paediatric and adult age at diagnosis. We include a) 4 chromosome regions classically associated with T1D with the aim of studying their influence in age at onset of the disease, b) 7 regions discovered in GWAS and c) 6 candidate genes selected by their function or their association with other autoimmune diseases.

We study several haplotypes in the HLA region different from the major T1D risk associations. Our results replicate three previously described haplotypes and we also find a susceptibility effect of the *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* haplotype that has not been reported in other populations.

We do not find an influence of the classical T1D associated genes in age at onset of the disease. Therefore, we can conclude that the HLA region and the *INS*, *CTLA4* and *IL2RA* genes are equally associated with the paediatric and adult onset of the disease in our population.

In the replication study of 7 chromosome regions reported in GWAS, we find a trend towards association in 4q27 (*IL2*) and 12p13 (*KLRB1-CLEC2D*) regions, that are concordant with the previously published reports. We replicate the associations previously described in regions 12q13 (*ERBB3*) and 16p13 (*CLEC16A*) and we do not find association in region 22q13 (*IL2RB*). We also describe the influence of regions 5p13 (*CAPSL-IL7R*), 12q13 (*ERBB3*) and 18p11 (*PTPN2*) in age at T1D onset.

Concerning the study of 6 candidate genes, we describe for the first time the association of the *STAT4* gene with T1D. We also replicate a previously described association in *TNFAIP3* and we do not find association of the genes *IRF5*, *G6PC2* and *STAT3* with the disease. The analysis of the *TRAF1* gene provides evidence of association exclusively with the adult-onset T1D. If this result is replicated in different populations, *TRAF1* would be the first gene to be associated only to the adult onset of the disease.

In conclusion, our study in a Spanish population provides with some interesting differences in the T1D susceptibility conferred by the HLA class II genes that could be caused by populational differences. We also describe the influence of four chromosome regions in the age at onset of T1D, a result that supports the need for including these analyses in the general study of T1D genetics to identify genetic factors that could accelerate or delay the disease onset. Among the selected candidate genes, we describe for the first time the association of *STAT4* with the disease. Finally, no association was detected in *G6PC2*, the only selected gene that is not related with the immune system. This result is concordant with previous studies supporting that the genetic basis of T1D is composed mainly of genes related with the immune response.



# Introducción



## 1. Definición, diagnóstico y comorbilidad

La diabetes tipo 1 (DT1) es una patología caracterizada por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, encargadas de la síntesis y secreción de insulina. A consecuencia de esta destrucción, el páncreas pierde la capacidad de sintetizar insulina y se produce un fallo en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, que se debe controlar administrando insulina exógena<sup>1</sup>.

La DT1 forma parte de un espectro de patologías<sup>2</sup> que afectan a la regulación del metabolismo de la glucosa y que incluye la diabetes tipo 2 (DT2), la más prevalente de las formas de diabetes, asociada a la resistencia periférica a la insulina. También existen formas monogénicas de diabetes poco frecuentes (tipo 3) y la diabetes gestacional (tipo 4).

Los síntomas de la enfermedad se desencadenan por el exceso de glucosa en sangre, y son los siguientes:

→ poliuria: exceso de filtración en el riñón para eliminar la alta concentración de glucosa. Cuando los valores de glucosa en sangre superan los 180 mg/dl, se produce glucosuria (eliminación de glucosa a través de la orina).

→ polidipsia: aumento de la ingesta de líquidos para disminuir la presión osmótica del plasma, elevada por el exceso de glucosa.

→ polifagia: la falta de glucosa en las células provoca un aumento en la ingesta de alimento para compensar la carencia de energía.

→ pérdida de peso: derivada de la utilización de los depósitos de grasa corporal para producir energía que sustituya a la glucosa.

→ cetoacidosis: es una situación grave y más frecuente en pacientes pediátricos. La utilización de lípidos como combustible celular genera cuerpos cetónicos que disminuyen el pH de la sangre y el medio interno. Si no se corrige, esta situación puede ser mortal. La cetoacidosis es frecuente en DT1 y constituye uno de los mayores riesgos en un diagnóstico tardío. Sin embargo, es muy poco frecuente en DT2 y suele ir asociada a la presencia de otras enfermedades<sup>2</sup>.

Los síntomas más comunes en el momento del diagnóstico, tanto en pacientes jóvenes como en adultos, son poliuria, polidipsia y polifagia<sup>3</sup>.

El diagnóstico de todas las formas de diabetes sigue cuatro criterios<sup>2</sup> basados en el análisis del metabolismo de la glucosa y detallados en la tabla 1. Posteriormente, y según las características que presente el paciente, se clasificará como diabetes tipo 1, 2, 3 o 4. En el caso concreto de la DT1, los pacientes presentan las siguientes características<sup>2</sup>:

→ requerimiento de insulina exógena: el suministro de insulina exógena acaba siendo necesario para la vida del paciente con DT1, a diferencia de otras formas de diabetes en las que la insulina se emplea sólo en algunos casos para ayudar al control de la glucemia<sup>2</sup>.

→ anticuerpos frente a diversos antígenos pancreáticos: positivos al diagnóstico en un 90% de los casos<sup>2,4</sup>. Existen cuatro autoanticuerpos contra antígenos

pancreáticos<sup>2,5</sup>: anticuerpos contra la insulina, contra la glutamato descarboxilasa (GAD), contra el antígeno asociado a insulinoma 2 (IA2) y contra el canal de zinc ZnT8.

→ niveles bajos o indetectables de péptido-C: el péptido-C se produce por la escisión de proinsulina a insulina con una ratio 1:1 y no se degrada ni sufre modificaciones. Por ello, es la mejor medida para evaluar los niveles de producción de insulina por el páncreas endocrino. Niveles bajos o indetectables indican una secreción de insulina baja o inexistente por parte de las células  $\beta$  <sup>2</sup>.

→ fenotipo corporal normal o delgado: aunque la obesidad no excluye la presencia de DT1, los pacientes diagnosticados de esta enfermedad raramente son obesos<sup>2</sup>, al contrario de lo que ocurre en la DT2.

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de la diabetes:

| <b>CRITERIOS DE LA AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES<sup>2</sup></b>  |
|--|
| 1. Valores de hemoglobina glicosilada superiores al 6,5%.  |
| 2. Valores de glucosa basal superiores a 126 mg/dl.  |
| 3. Valores de glucosa mayores de 200 mg/dl a las dos horas de realización de una prueba de sobrecarga oral de glucosa (ingestión de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua). |
| 4. Valores de glucosa al azar superiores a 200 mg/dl en un paciente con síntomas de hiperglicemia.   |

La hiperglicemia prolongada originada por la diabetes puede generar daños a nivel del riñón (nefropatía diabética), la retina (retinopatía), los nervios (neuropatía periférica) y el sistema cardiovascular<sup>2</sup>. Por ello es importante mantener un buen control de la glicemia mediante la administración de insulina exógena.

## 2. Epidemiología

La DT1 supone entre el 60 y el 90% de los casos de diabetes diagnosticados en pacientes menores de 15 años<sup>1</sup>. La prevalencia es muy variable de unas poblaciones a otras, oscilando desde la más baja observada en regiones de China (0.1 casos por 100.000 habitantes)<sup>6</sup> a las más altas registradas en Cerdeña y Finlandia (de 37 a 45 casos por 100.000 habitantes)<sup>7</sup>. La DT1 es una enfermedad emergente, con un incremento medio de un 3.9% anual según estudios realizados en varias poblaciones europeas<sup>8</sup>. Se desconocen las razones de este aumento continuado, pero posiblemente estén relacionadas con la presencia de factores ambientales emergentes que están aumentando el riesgo a padecer la enfermedad.

La edad de debut de la DT1 tiene una distribución bimodal, con un primer pico de debut alrededor de los 6 años y un segundo pico en la pubertad (10-14 años)<sup>9</sup>, aunque algunos autores fijan estos dos picos en los 12 y los 40 años<sup>10</sup>. Contrariamente a lo que

suele ser común en muchas enfermedades autoinmunes, no existen diferencias de prevalencia por sexo, con una proporción 1:1 de hombres y mujeres afectados<sup>11</sup>.

### 3. Enfermedades autoinmunes asociadas

Los pacientes con DT1 tienen una susceptibilidad aumentada a padecer otras enfermedades autoinmunes<sup>1</sup>. Hay dos enfermedades que aparecen con mayor frecuencia en individuos con DT1<sup>1</sup>, y cuya alta tasa de aparición conjunta ha llevado a desarrollar estudios sobre la base genética común de dichas enfermedades y DT1<sup>12,13</sup>. Éstas son la enfermedad celíaca (EC) y las enfermedades autoinmunes tiroideas (EAIT) como el hipotiroidismo autoinmune (HA) o la enfermedad de Graves (EGr).

→ Enfermedad celíaca: se caracteriza por una reacción del sistema inmunitario de la mucosa intestinal al gluten presente en ciertos cereales (trigo, cebada y centeno). La EC es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes, con una prevalencia aproximada en poblaciones caucásicas del 1%. Esta prevalencia aumenta a un 3-6% en pacientes de DT1<sup>14</sup>. Las razones de este incremento en el riesgo a padecer EC se atribuyen a la amplia base genética común entre ambas enfermedades. DT1 y EC comparten un haplotipo de susceptibilidad en el HLA (*DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*) y varios genes de susceptibilidad fuera del HLA<sup>13</sup>.

→ Enfermedades autoinmunes tiroideas: en este grupo se incluyen EGr y HA, las dos manifestaciones más frecuentes de disfunción del tiroides por razones autoinmunes. La EGr es un hipertiroidismo derivado de la sobreactivación de la glándula tiroidea por presencia de anticuerpos contra el receptor de la tirotrópica. El HA es una destrucción de los tirocitos mediada por linfocitos T autorreactivos que produce deficiencia de hormonas tiroideas. El 20% de los pacientes de DT1 tienen anticuerpos anti-tiroideos positivos y, de ese 20%, el 50% desarrolla una patología tiroidea autoinmune<sup>1</sup>. La DT1 y las EAIT comparten varios genes de susceptibilidad, entre los que se encuentra el haplotipo del HLA de clase II *DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*<sup>12</sup>.

### 4. Factores implicados en el desarrollo de la DT1

#### 4.1. Factores ambientales

Las infecciones víricas constituyen probablemente el factor ambiental más estudiado en la DT1. Existe una asociación replicada consistentemente entre la infección congénita por el virus de la rubéola y un aumento en la probabilidad de desarrollar DT1<sup>15,16</sup>. Sin embargo, en la actualidad la infección congénita por rubéola es infrecuente en países desarrollados y no explica el aumento en prevalencia de la enfermedad que se está produciendo en estos países en las últimas décadas<sup>17</sup>.

Los agentes infecciosos más estudiados en relación con la DT1 son los enterovirus humanos, en concreto los virus del género Cocksackie<sup>18</sup>. Estos virus presentan interés por su tropismo por el sistema linfóide del tracto digestivo y el páncreas, siendo capaces de infectar las células  $\beta$  de los islotes. En los últimos tiempos, se ha postulado que las

infecciones por Cocksackie generarían un estado inflamatorio en los islotes pancreáticos que atraería a células del sistema inmunitario, que son las verdaderas causantes del daño tisular<sup>18</sup>. La magnitud de la contribución de estas infecciones por Cocksackie, así como su papel en la historia natural de la DT1 (iniciador, modulador o agente exacerbante de una reacción ya existente) está aún por determinar.

Entre los factores alimentarios estudiados en DT1 se ha descrito que la introducción temprana de gluten está asociada al desarrollo de autoinmunidad<sup>17,19</sup>. Esto resulta interesante, puesto que la EC y la DT1 comparten una base genética común muy amplia. La posibilidad de que el gluten (principal factor ambiental desencadenante de EC) esté relacionado también con la patogenia de la DT1 añade un factor ambiental común entre ambas enfermedades.

Al igual que ocurre con enfermedades como la esclerosis múltiple (EM)<sup>1</sup>, en DT1 se ha observado un gradiente de prevalencia creciente en latitudes altas<sup>17</sup>. La existencia de este gradiente se ha relacionado con los niveles de vitamina D, que influye sobre el sistema inmunitario y que requiere de la radiación solar para metabolizarse a su forma activa. En este sentido, dos estudios aportan datos interesantes: la suplementación de la alimentación con vitamina D prevenía de forma importante la aparición de DT1 en un estudio con varias poblaciones europeas<sup>20</sup>. Sin embargo, este efecto no se observó cuando se realizó un estudio similar únicamente con población italiana<sup>21</sup>, algo que los autores explicaron por las mayores horas de exposición a la luz solar en los individuos de su estudio, que haría innecesaria la suplementación con vitamina D.

## 4.2. Factores genéticos

En estudios realizados en gemelos se observó que la probabilidad de desarrollar DT1 en un gemelo monocigótico con un hermano afectado era muy superior (entre el 30 y el 50%) a la de gemelos dicigóticos (8%)<sup>22</sup>. Este dato apunta a la presencia de un componente genético en el desencadenamiento de la DT1, que se cifra en un 50% aproximadamente, y un componente ambiental que actúa sobre la base genética y que supone el 50% restante.

El mayor riesgo de recurrencia de DT1 se encuentra en parejas de gemelos idénticos con un miembro afectado. Sin embargo, los familiares de un paciente de DT1 también tienen un riesgo superior al 0.4% de la población sana<sup>22</sup>. Un gemelo dicigótico con un hermano enfermo presenta un riesgo levemente aumentado (8%) con respecto a un individuo con un hermano no gemelo afecto (5%). La descendencia de dos progenitores con DT1 tiene un riesgo del 20% de padecer la enfermedad. Cuando el afectado es solo uno de los padres, los hijos tienen un riesgo ligeramente diferente según el enfermo sea el padre (5%) o la madre (3%)<sup>23</sup>. Esta diferencia se atribuye generalmente a fenómenos epigenéticos similares a los descritos en otras enfermedades, en las que la patología es más grave según se herede el gen causante de la madre o del padre. Sin embargo, un estudio propone una alternativa interesante: se ha descrito que los niños que han recibido anticuerpos contra

antígenos pancreáticos de la madre por vía transplacentaria tienen un riesgo menor de desarrollar anticuerpos y progresar a DT1<sup>24</sup>. Por tanto, es posible que esta diferencia en el riesgo conferido se deba a algún fenómeno de tolerización, que solo puede darse cuando la afectada es la madre.

Aunque existe un riesgo aumentado en los familiares de individuos con DT1, el 85-90% de los casos diagnosticados anualmente no tienen parientes en primer grado afectados<sup>22</sup>. Por tanto, el gran reto en la predicción de la DT1 es encontrar factores tanto genéticos como ambientales que ayuden a identificar individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad.

Los genes localizados en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex* o MHC) suponen el 50% de la carga genética de la DT1<sup>25</sup>, y por ello se emplean habitualmente en estudios prospectivos para seleccionar a pacientes con alto riesgo de desarrollar la enfermedad<sup>26</sup>. Se postula que el 50% de la carga genética restante se compone de variantes comunes en la población con efectos moderados o bajos sobre la DT1, variantes poco frecuentes pero con un gran efecto sobre el desarrollo de la enfermedad y posiblemente interacciones genéticas y fenómenos epigenéticos aún poco estudiados en DT1.

#### **4.2.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad y su asociación a DT1:**

El Complejo Principal de Histocompatibilidad se localiza en el cromosoma 6 (región 6p21) y se divide clásicamente en tres regiones: los genes de clase I, II y III. Los genes de clase I y II reciben este nombre porque en estas regiones se encuentran codificadas las moléculas de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de clase I (A, B y C) y II (DR, DQ y DP) respectivamente. En la clase III se localizan varios genes de interés inmunológico como el TNF o las moléculas C2 y C4 del sistema del complemento (figura 1). En total, el complejo MHC contiene cientos de genes, muchos de ellos con un elevado polimorfismo<sup>27</sup>. Además, esta región cromosómica se caracteriza por un alto grado de desequilibrio de ligamiento, que conlleva que muchas regiones se hereden en bloque sin apenas recombinación. Esta serie de peculiaridades (alto número de genes con elevado polimorfismo y un alto desequilibrio de ligamiento) convierten al MHC en una región de complicado estudio en la que resulta difícil individualizar una asociación a un gen concreto.

Los primeros estudios de asociación de genes HLA a DT1 se centraron en los genes de clase I y vincularon el HLA-B8 con la susceptibilidad a la enfermedad<sup>28</sup>. Sin embargo, en pocos años se vio que las asociaciones más fuertes provenían de los genes de clase II (tabla 2)<sup>29</sup>, en concreto del HLA *DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* (que se encuentra en un haplotipo ancestral junto con B8<sup>30</sup>) y el HLA *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*. Según estudios en varias poblaciones caucásicas, el heterocigoto *DRB1\*03 / DRB1\*04-DQB1\*03:02* confiere el riesgo más alto a padecer DT1<sup>25,31,32</sup>. Los niños que presentan esta combinación haplotípica en el HLA tienen un

riesgo estimado de entre 1:15 y 1:25 de desarrollar DT1 frente al riesgo de 1:300 de la población general. Se han descrito otros haplotipos dentro del HLA de clase II que confieren riesgo moderado, y también existen haplotipos de protección, encabezados por *DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02*<sup>31</sup>. Este haplotipo confiere una elevada protección al desarrollo de la enfermedad incluso en presencia de los haplotipos de riesgo *DRB1\*03* y *DRB1\*04-DQB1\*03:02*<sup>31</sup>.

Tabla 2.- Haplotipos de protección y susceptibilidad a DT1 descritos en el HLA de clase II<sup>31</sup>.

| HAPLOTIPO  | EFEECTO             |
|--|---------------------|
| <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i><br><i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i> | Riesgo alto         |
| <i>DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05:01</i>   | Riesgo moderado     |
| <i>DRB1*11-DQA1*05:01-DQB1*03:01</i>   | Protección moderada |
| <i>DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*03:03</i>   | Protección alta     |
| <i>DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02</i>                                      | Protección alta     |

En el HLA de clase I también se han descrito asociaciones con la DT1 en los alelos *A\*1*, *A\*30*, *B\*18*, *B\*44*, *C\*3*, *C\*8* y *C\*16*<sup>33,34</sup>, y estas asociaciones son independientes de los alelos presentes en el HLA de clase II. Además, se ha estudiado la asociación de alelos concretos con la edad de debut de la enfermedad y se ha encontrado que los alelos *A\*24* y *B\*39* están asociados a un debut más temprano de DT1<sup>33,34</sup>.

#### 4.2.2. Asociaciones a DT1 en genes no HLA:

El número de asociaciones a DT1 en regiones cromosómicas no HLA se sitúa actualmente alrededor de cincuenta<sup>32</sup>. La mayor parte de estas regiones se han descubierto en los últimos cinco años y contienen variantes comunes en la población con efectos moderados o débiles sobre la susceptibilidad a la enfermedad. Únicamente los polimorfismos en los genes *INS* (insulina) y *PTPN22* (*protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 22*) tienen unos efectos considerables (OR>1.7 para ambos)<sup>22</sup>.

Las regiones cromosómicas asociadas a DT1 hasta la fecha comparten una característica común: la inmensa mayoría contienen genes implicados en el funcionamiento del sistema inmunitario<sup>32</sup>. Incluso genes que se expresan en las células beta, como *PTPN2* (*protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 2*), *IFIH1* (*interferon induced with helicase C domain*) o *TNFAIP3* (*tumor necrosis factor alpha-induced protein 3*), forman parte de mecanismos de defensa de la célula frente a agresiones externas. Este hecho se contrapone a lo que se conoce de la genética de la DT2, en la que se han encontrado asociaciones en varios genes que participan en el funcionamiento de la célula beta<sup>35</sup>. Con lo que se sabe actualmente de la genética

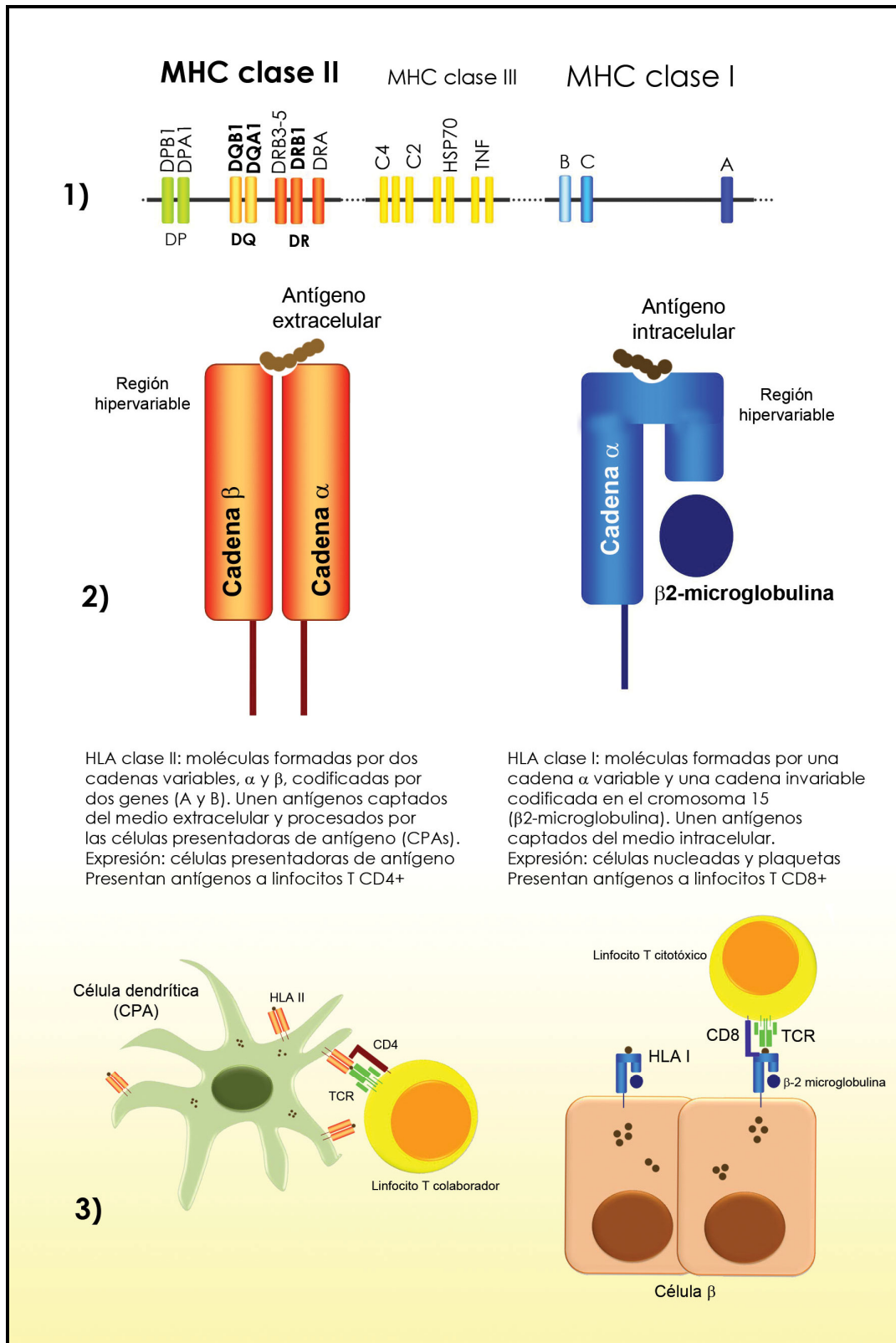


Figura 1.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Se destacan en negrita los genes del HLA estudiados en este trabajo. 1) Esquema de los genes HLA clásicos codificados en 6p21. 2) Estructura de las proteínas formadas por los genes HLA de clase I y de clase II. 3) Presentación antigénica por HLA de clase I y de clase II.

de las dos enfermedades, la DT1 y la DT2 parecen tener causas genéticas diferentes: una alteración del sistema inmunitario en el caso de la DT1, y un mal funcionamiento de la célula beta en el caso de la DT2.

## 5. El estudio de la genética de la DT1

Los estudios genéticos en enfermedades complejas como la DT1 han pasado por diferentes fases a medida que han evolucionado las técnicas de Biología Molecular. En este sentido, el desarrollo de la tecnología necesaria para realizar estudios de barrido genómico (*genome-wide association studies* o GWAS) ha supuesto un punto de inflexión en el estudio de la genética de las enfermedades complejas y ha facilitado la descripción de numerosas regiones que los estudios previos no habían tenido en consideración.

### 5.1. Era pre-GWAS (1974-2007):

Antes del desarrollo de los GWAS, el análisis de la genética de las enfermedades complejas se basó en los estudios de ligamiento y los estudios de asociación de genes candidatos. Mediante este tipo de trabajos se descubrieron cinco regiones asociadas a DT1<sup>29,36-39</sup>, desde las primeras asociaciones en el HLA en los años 70 hasta el gen *IL2RA* (*interleukin 2 receptor alpha*) en 2005. A continuación resumimos la metodología empleada en dichos estudios:

→ Estudios de ligamiento en DT1: los estudios de ligamiento constituyen uno de los abordajes más antiguos para desentrañar el componente genético de las enfermedades. Estos estudios se basan en el análisis de marcadores genéticos en familias con varios miembros afectados en busca de regiones cromosómicas que cosegreguen con los individuos enfermos. En DT1, los estudios de ligamiento siempre han replicado el locus denominado IDDM1 en 6p21, que contiene los genes HLA. Sin embargo, la detección de otras regiones ligadas a DT1 ha sido más problemática. Por ejemplo, el gen *PTPN22* no se ha detectado en estudios de ligamiento, a pesar de su fuerte efecto sobre la susceptibilidad a la enfermedad<sup>40</sup>. Esto podría deberse a la metodología empleada por los análisis de ligamiento que, al basar su mecanismo de estudio en la selección de familias con varios miembros afectados<sup>22</sup>, limita el número de individuos que puede estudiar y además selecciona dichos individuos por una característica (la agregación familiar) que podría tener un componente genético propio. Si tenemos en mente que únicamente el 10% de los pacientes diagnosticados con DT1 tienen familiares en primer grado afectados por la enfermedad<sup>1</sup>, los estudios de ligamiento están desaprovechando cerca del 90% de los casos de DT1 existentes. Quizás por ese mismo motivo, algunas regiones asociadas a DT1 mediante análisis de ligamiento no se han reproducido posteriormente en estudios de asociación. Este sería el caso de la región 6q21 (*PR containing-protein 1* o *PRDM1*), descrita en un meta-análisis reciente de estudios de ligamiento, que no se corresponde con asociaciones descritas posteriormente<sup>32,40</sup>. A pesar de estas limitaciones, los estudios de ligamiento

son una buena herramienta para detectar variantes que tengan un gran efecto en la enfermedad pero cuya frecuencia en la población sea baja<sup>41</sup>.

→ Estudios de asociación de genes candidatos en DT1: estos estudios permiten detectar variantes con efectos bajos o moderados, siempre que dichas variantes sean frecuentes en la población<sup>22</sup>. En un estudio de asociación se seleccionan genes, habitualmente por su función, que sean buenos candidatos a participar en la patogenia de la enfermedad. La asociación de estos genes con la enfermedad se analiza mediante diseños caso-control (comparación de las frecuencias de la variante a estudio entre un grupo de pacientes y un grupo control sano) o familiares (estudio de la transmisión de la variante seleccionada de padres heterocigotos al individuo enfermo). Mediante este tipo de estudios, principalmente de tipo caso-control, se describieron las cinco regiones cromosómicas clásicamente asociadas a DT1: 6p21 (HLA)<sup>29</sup>, 11p15 (*INS*)<sup>36</sup>, 2q32 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* o *CTLA4*)<sup>37</sup>, 1p13 (*PTPN22*)<sup>38</sup> y 10p15 (*IL2RA*)<sup>39</sup>.

## 5.2. Era GWAS (2007-2011):

Los GWAS pueden explorar la variabilidad de todo el genoma sin realizar una selección de los genes a estudiar<sup>42</sup>. Este tipo de abordaje sin hipótesis previa permite encontrar asociaciones en genes cuya función aún no se conoce y en genes pertenecientes a rutas que no se habían considerado vinculadas a la enfermedad en estudio, dos limitaciones importantes de los estudios de asociación de genes candidatos.

Los GWAS se basan en el análisis de un elevado número de polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms* o SNPs) a lo largo de todo el genoma, de modo que cubren una variabilidad muy elevada y permiten un estudio mucho más amplio que los abordajes previos. Sin embargo, cuentan con una gran desventaja: el elevado número de polimorfismos estudiados (del orden de cientos de miles) implica un número muy alto de comparaciones estadísticas y una alta probabilidad de obtener falsos positivos. Por tanto, estos estudios requieren una corrección estadística muy exigente<sup>35</sup>. Además, los resultados obtenidos deben replicarse en distintas poblaciones para asegurar i) que dicho resultado no es un falso positivo que haya escapado a la corrección estadística, ii) que la asociación descrita en el GWAS no se deba a estratificación poblacional<sup>42</sup> y iii) que la asociación descrita se mantenga con la misma magnitud en distintas poblaciones.

Fruto de la necesidad de confirmar las asociaciones encontradas en los GWAS surgen los estudios *follow-up*, que seleccionan asociaciones descritas en los GWAS con objeto de replicación<sup>42</sup>. Estos estudios *follow-up* son especialmente interesantes en todas aquellas asociaciones que se quedan al borde de la significación estadística exigida al GWAS y que requieren necesariamente estudios de replicación para asegurar que son verdaderas.

Tabla 3.- Resumen de las 50 regiones cromosómicas asociadas actualmente a DT1. Las *odds ratio* que se incluyen se han extraído del estudio que figura como referencia. Los datos proceden de la base de datos *on-line* [www.t1dbase.org](http://www.t1dbase.org) (creada por el *Type 1 Diabetes Genetics Consortium*) y se han seleccionado las regiones con resultados publicados y con una *p* menor o igual a  $10^{-5}$ . Se han excluido tres regiones que no cumplían estos criterios.

| Región cromosómica | Polimorfismo más asociado a DT1 | Gen candidato      | OR        | Referencia | Enfermedades asociadas con esta región  | Estudiada en este trabajo |
|--------------------|---------------------------------|--------------------|-----------|------------|---|---------------------------|
| 1p13.2             | rs2476601                       | <i>PTPN22</i>      | 2.05      | 13         | AR <sup>43</sup> , EGr <sup>44</sup> , Ech <sup>45</sup> , LES <sup>46</sup> , Vi <sup>47</sup> |                           |
| 1q31.2             | rs2816316                       | <i>RGS1</i>        | 0.89      | 13         | EC <sup>13</sup> , EM <sup>48</sup>   |                           |
| 1q32.1             | rs3024505                       | <i>IL10</i>        | 0.84      | 49         | LES <sup>46</sup> , CU <sup>50</sup> , Ech <sup>51</sup>  |                           |
| 2q11.2             | rs1160542                       | <i>AFF3</i>        | --        | 49         | AR <sup>52</sup>  |                           |
| 2q24.2             | rs1990760                       | <i>IFIH1</i>       | 0.86      | 13         | EGr <sup>53</sup> , LES <sup>46</sup>   |                           |
| 2q32.2             | rs7574865                       | <i>STAT4</i>       | 1.10      | 54         | AR <sup>55</sup> , LES <sup>46</sup> , ES <sup>56</sup>   | Si                        |
| 2q33.2             | rs3087243                       | <i>CTLA4</i>       | 0.82      | 13         | AR <sup>57</sup> , EC <sup>13</sup> , EGr <sup>58</sup>   | Si                        |
| 3p21.31            | rs333                           | <i>CCR5</i>        | 0.85      | 13         | EC <sup>13</sup>  |                           |
| 4p15.2             | rs10517086                      | No determinado     | 1.09      | 49         | --  |                           |
| 4q27               | rs2069763                       | <i>IL2-IL21</i>    | 1.13      | 49         | CU <sup>59</sup> , EC <sup>13</sup>   | Si                        |
| 6p21               | Varios                          | <i>HLA</i>         | 0.02-49.2 | 60         | Múltiples enfermedades <sup>61</sup>  | Si                        |
| 6q15               | rs11755527                      | <i>BACH2</i>       | 1.13      | 62         | --  |                           |
| 6q22.32            | rs9388489                       | <i>CENPW</i>       | 1.17      | 49         | --  |                           |
| 6q23.3             | rs10499194                      | <i>TNFAIP3</i>     | 0.90      | 54         | AR <sup>63</sup> , EC <sup>64</sup> , LES <sup>46</sup> , CU <sup>59</sup>                      | Si                        |
| 6q25.3             | rs1738074                       | <i>TAGAP</i>       | 0.92      | 13         | EC <sup>13</sup>  |                           |
| 7p15.2             | rs7804356                       | <i>SKAP2</i>       | 0.88      | 49         | --  |                           |
| 7p12.1             | rs4948088                       | <i>COBL</i>        | 0.77      | 49         | --  |                           |
| 9p24.2             | rs7020673                       | <i>GLIS3</i>       | 0.88      | 49         | --  |                           |
| 10p15.1            | rs12722495                      | <i>IL2RA</i>       | 0.62      | 13         | AR <sup>35</sup> , EM <sup>65</sup> , Vi <sup>47</sup>  | Si                        |
| 10p15.1            | rs11258747                      | <i>PRKCG</i>       | 0.69      | 66         | --  |                           |
| 10q22.3            | rs1250558                       | <i>ZMIZ1</i>       | --        | 49         | EII <sup>67</sup>   |                           |
| 10q23.31           | rs10509540                      | <i>RNLS</i>        | 0.75      | 49         | --  |                           |
| 11p15.5            | rs689                           | <i>INS</i>         | 0.42      | 13         | --  | Si                        |
| 12p13.31           | rs4763879                       | <i>CLEC2D-CD69</i> | 1.09      | 49         | EM <sup>68</sup>  | Si                        |
| 12q13.3            | rs10877012                      | <i>CYP27B1</i>     | 1.22      | 69         | EM <sup>70</sup>  |                           |
| 12q13.2            | rs2292239                       | <i>ERBB3</i>       | 1.31      | 49         | --  | Si                        |
| 12q24.12           | rs3184504                       | <i>SH2B3</i>       | 1.28      | 13         | AR <sup>71</sup> , EC <sup>1</sup> , EM <sup>72</sup>   |                           |
| 13.32.3            | rs9585056                       | <i>GRP183</i>      | 1.15      | 73         | --  |                           |
| 14q24.1            | rs1465788                       | Varios             | 0.86      | 49         | --  |                           |
| 14q32.2            | rs4900384                       | No determinado     | 1.09      | 49         | --  |                           |
| 14q32.2            | rs941576                        | <i>DLK1</i>        | 0.90      | 74         | --  |                           |
| 15q14              | rs17574546                      | <i>RASGRP1</i>     | 1.21      | 75         | --  |                           |
| 15q25.1            | rs3825932                       | <i>CTSH</i>        | 0.86      | 13         | --  |                           |
| 16p13.13           | rs12708716                      | <i>CLEC16A</i>     | 0.81      | 13         | EM <sup>72</sup> , LES <sup>46</sup> , EC <sup>64</sup>   | Si                        |
| 16p11.2            | rs4788084                       | <i>IL27</i>        | 0.86      | 49         | EII <sup>67</sup> , Ech <sup>51</sup>   |                           |
| 16q23.1            | rs7202877                       | Varios             | 1.28      | 49         | --  |                           |
| 17q12              | rs2290400                       | Varios             | 0.87      | 49         | CU <sup>59</sup> , Ech <sup>45</sup>  |                           |
| 17q21.2            | rs7221109                       | <i>SMARCE1</i>     | 0.95      | 49         | --  |                           |
| 18p11.21           | rs45450798                      | <i>PTPN2</i>       | 1.28      | 13         | EC <sup>13</sup> , Ech <sup>51</sup>  | Si                        |
| 18q22.2            | rs763361                        | <i>CD226</i>       | 1.16      | 13         | EM <sup>72</sup>  |                           |
| 19p13.2            | rs2304256                       | <i>TYK2</i>        | 0.86      | 74         | --  |                           |
| 19q13.32           | rs425105                        | Varios             | 0.86      | 49         | --  |                           |
| 19q13.4            | rs602662                        | <i>FUT2</i>        | --        | 49         | ECh <sup>6</sup>  |                           |
| 20p13              | rs2281808                       | Varios             | 0.90      | 49         | --  |                           |
| 21q22.3            | rs3788013                       | <i>UBASH3A</i>     | 1.13      | 13         | AR <sup>71</sup> , EC <sup>1</sup> , Vi <sup>47</sup>   |                           |
| 22q12.2            | rs5753037                       | Varios             | 1.10      | 49         | EII <sup>67</sup> , Ech <sup>51</sup>   |                           |
| 22q12.3            | rs3218253                       | <i>IL2RB</i>       | --        | 49         | AR <sup>63</sup>  | Si                        |
| 22q13.1            | rs229541                        | <i>C1QTNF6</i>     | 1.11      | 62         | Vi <sup>47</sup>  |                           |
| Xp22.2             | rs5979785                       | <i>TLR7-TLR8</i>   | 0.84      | 49         | EC <sup>64</sup>  |                           |
| Xq28               | rs2664170                       | Varios             | 1.16      | 49         | --  |                           |

AR: artritis reumatoide; CU: colitis ulcerosa; EC: enfermedad celíaca; Ech: enfermedad de Crohn; EGr: enfermedad de Graves; EII: enfermedad inflamatoria intestinal; EM: esclerosis múltiple; ES: esclerosis sistémica; LES: lupus eritematoso sistémico; Vi: vitiligo.

Gracias al desarrollo de los GWAS y a los estudios posteriores que han confirmado las asociaciones descritas, el conocimiento de la genética de la DT1 se ha ampliado considerablemente en un corto periodo de tiempo, pasando de las cinco regiones cromosómicas encontradas mediante estudios de asociación de gen candidato hasta 2007 a las 50 regiones descritas desde entonces hasta la actualidad (tabla 3).

## **6. Influencia de la genética en la edad de debut de DT1**

La edad de debut de la DT1 tiene una distribución bimodal<sup>9,10</sup>. Sin embargo, la enfermedad puede comenzar a cualquier edad desde la primera hasta la novena década de vida, y existen tantos individuos con DT1 de debut pediátrico como adulto<sup>2</sup>. La enfermedad puede presentarse con una progresión rápida, más frecuente en la infancia, o como una reacción autoinmune más lenta con anticuerpos positivos durante largo tiempo antes del diagnóstico<sup>4</sup>. Se desconoce la causa de estas diferencias en la duración de la reacción autoinmune y probablemente se deba, igual que el desarrollo de la propia enfermedad, a una mezcla de factores genéticos y ambientales. En este sentido, un estudio en parejas de gemelos monocigóticos con un miembro afectado<sup>77</sup> aporta datos que apoyan la existencia de un componente genético más fuerte en la DT1 de debut pediátrico. En este estudio se describía que la probabilidad de que el gemelo monocigótico sano desarrollase DT1 a largo plazo era mucho mayor si el individuo afectado por DT1 había debutado antes de los 25 años (riesgo para el miembro no afecto del 38%) que si el miembro enfermo había debutado a los 25 años o más (riesgo para el miembro no afecto menor del 6%). Esto parece indicar que la DT1 de debut temprano tiene un componente genético mayor o más agresivo que la enfermedad con un debut adulto, lo que daría como resultado el riesgo aumentado que se observa en este estudio.

El estudio de la influencia de la genética en la edad de debut de la DT1 se encontró con un obstáculo en los primeros GWAS: la selección de los pacientes con debut adulto. Hasta los 19 años, la DT1 es la causa más frecuente de diabetes (90% de los casos diagnosticados<sup>1</sup>), de modo que la probabilidad de clasificar erróneamente a un adolescente con síntomas de diabetes es baja. Sin embargo, entre los adultos la proporción se invierte y la DT1 supone menos del 10% de los casos de diabetes diagnosticados<sup>2</sup>. En estos casos, la presencia de anticuerpos contra antígenos pancreáticos es de gran ayuda para diagnosticar la enfermedad, pero la clasificación de un paciente inequívocamente como DT1 en la edad adulta puede suponer más problemas que en la edad pediátrica. Por esta razón, varios de los grandes estudios en genética de DT1, que resumimos en la tabla 4, establecen el diagnóstico en edad pediátrica entre sus criterios para la selección de pacientes, lo cual dificulta el estudio de las diferencias que puedan existir en el componente genético de la DT1 pediátrica y adulta. Algunos grupos han recogido pacientes con unos límites de edad de diagnóstico más altos: el GWAS de Cooper et al, publicado en 2008<sup>62</sup>, estudia la población GoKinD (*Genetics of Kidney in Diabetes*), un grupo de 1785 pacientes de

DT1 recogido originariamente para estudiar la nefropatía diabética. Esta población admite pacientes con una edad de debut de hasta 30 años<sup>78</sup>. Sin embargo, los estudios genéticos que se han realizado con ella<sup>49,62</sup> no incluyen un análisis de la influencia de los genes en la edad de debut.

Tabla 4.- Estudios de barrido genómico y *follow-up* realizados en DT1. Todos los GWAS posteriores al del WTCCC realizaron meta-análisis con sus datos. El estudio de Barrett *et al* incluye un meta-análisis de tres GWAS (WTCCC, Cooper y Barrett).

| ESTUDIO                        | AÑO DE PUBLICACIÓN                          | POBLACIÓN  | LÍMITE DE EDAD                   | Análisis de la genética en la edad de debut |
|--------------------------------|---|--|----------------------------------|---|
| WTCCC <sup>35</sup>            | 2007 GWAS                                   | 2000 pacientes británicos  | Diagnóstico antes de los 17 años | No  |
| Todd et al <sup>79</sup>       | 2007 <i>Follow-up</i> del WTCCC             | 4000 pacientes y 2997 familias británicas  | Diagnóstico antes de los 17 años | Si  |
| Hakonarson et al <sup>80</sup> | 2007 GWAS                                   | 563 pacientes y 1422 familias de Gran Bretaña, EEUU y Australia                                  | Diagnóstico antes de los 18 años | No  |
| Cooper et al <sup>62</sup>     | 2008 GWAS                                   | Población GoKinD <sup>a</sup><br>1785 pacientes EEUU   | Diagnóstico antes de los 31 años | No  |
| Smyth et al <sup>13</sup>      | 2008 Estudio en DT1 de genes asociados a EC | 8064 pacientes y 3064 familias de EEUU, Finlandia, Irlanda, Noruega y Rumania                    | Diagnóstico antes de los 17 años | No  |
| Barrett et al <sup>49</sup>    | 2009 GWAS                                   | Población T1DGC <sup>b</sup><br>3983 pacientes y 2319 familias de Gran Bretaña, EEUU y Australia | Diagnóstico antes de los 35 años | No  |

<sup>a</sup>GoKinD: *Genetics of kidneys in diabetes*. Población estadounidense recopilada para el estudio de enfermedades renales en pacientes DT1<sup>78</sup>.

<sup>b</sup>T1DGC: *Type 1 Diabetes Genetics Consortium*. Consorcio formado en el año 2002 con objeto de facilitar recursos para el estudio de la genética de la DT1.

La única de las grandes poblaciones analizadas en GWAS que está incluyendo de manera regular estudios de la influencia genética en la edad de debut es la recogida por el *Type 1 Diabetes Genetics Consortium* (T1DGC). Esta población incluye individuos diagnosticados hasta los 35 años de edad<sup>81</sup>, aunque la población tiene una edad media de debut que oscila alrededor de los 10 años<sup>81,82</sup> y, por tanto, la mayor parte de sus individuos tienen un debut pediátrico.

El estudio de la edad de debut de la DT1 ha ganado interés en los últimos tres años y varios trabajos han incluido análisis de la influencia de la genética en la edad de debut de la enfermedad<sup>79,81-84</sup>. Los primeros trabajos publicados en la era GWAS describen asociaciones genéticas relacionadas con el adelanto en la edad de debut de la DT1. No existe actualmente ningún estudio que describa un gen asociado

exclusivamente a la edad adulta, algo que es comprensible puesto que pocos estudios incluyen pacientes con debut adulto, y aquéllos que lo hacen se centran generalmente en replicar asociaciones que se describieron por primera vez en individuos con debut pediátrico. Por tanto, a pesar de las primeras asociaciones descritas (muchas de ellas aún no replicadas en poblaciones independientes), el estudio de los factores genéticos que influyen en la edad de debut de la DT1 es un campo en el que aún queda mucho por estudiar y que resulta muy interesante de cara a la predicción del riesgo genético a padecer la enfermedad.

## **7. El sistema inmunitario y la destrucción de las células $\beta$**

La destrucción de las células  $\beta$  que desencadena la DT1 está mediada por un conjunto de alteraciones del sistema inmunitario. La principal es la presencia de linfocitos T autorreactivos en los islotes pancreáticos, pero numerosos experimentos en modelos animales y observaciones en pacientes de DT1 apuntan también a una participación del sistema inmunitario innato y a una respuesta inflamatoria exacerbada frente a un estímulo desencadenante aún por determinar<sup>85</sup>.

En este trabajo estudiamos la asociación de 17 regiones cromosómicas con la DT1, que resumimos en la tabla 5 ordenadas cronológicamente según el año en que se publicó la primera asociación. Dentro de las regiones seleccionadas, 15 contienen genes relacionados directamente con el funcionamiento del sistema inmunitario o con la respuesta de las células  $\beta$  a la inflamación. Las dos regiones restantes contienen el gen de la insulina que, aunque no tiene función inmunitaria, está relacionado con el desarrollo de la autoinmunidad, y el gen **G6PC2** (*glucose-6-phosphatase catalytic 2*) que codifica una variante de la glucosa-6-fosfatasa expresada exclusivamente en las células  $\beta$  y es el único gen incluido en este trabajo que no tiene una función relacionada con el sistema inmunitario. Los ratones *knock-out* para *G6PC2* tienen una concentración basal de glucosa en suero un 13% menor que los ratones *wild-type* y en estudios de barrido genómico completo se ha descrito la relación de polimorfismos en este gen con niveles ligeramente más bajos de glucosa basal en humanos<sup>86,87</sup>.

A continuación, daremos una visión general de lo que se sabe sobre los mecanismos que desencadenan la DT1 y situaremos los genes que hemos seleccionado para este trabajo en su contexto funcional.

### **7.1. Generación de linfocitos T autorreactivos en el timo:**

Durante la generación de repertorios de linfocitos T en el timo, estas células deben formar receptores (TCRs: *T cell receptors*) que sean capaces de reconocer las moléculas de HLA propias y que unan los complejos "HLA-antígeno propio" con una avidéz media. De este modo, se obtiene un repertorio de linfocitos que son capaces de reconocer lo propio y no activarse en respuesta a autoantígenos. Para ello, los linfocitos generados en el timo pasan por dos procesos de selección: la selección

Tabla 5.- Resumen de las regiones cromosómicas estudiadas en este trabajo.

|                     | 1ª asociación a DT1 | Región cromosómica     | Gen candidato  | Asociado a otras enfermedades                            | Tipo de estudio en el que se descubrió   | Estudios previos de edad de debut | Estudio realizado en este trabajo                   | Expresión                   |
|---------------------|---------------------|------------------------|--|--|--|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| <b>Era pre-GWAS</b> | 1970-1980           | 6p21                   | <i>HLA</i>   | Múltiples enfermedades autoinmunes                       | Gen candidato <sup>28,29</sup><br>Estudios de ligamiento <sup>40</sup>           | Si                                | Replicación de gen candidato                        | Timo<br>Cel. SI<br>Páncreas |
|                     | 1984                | 11p15                  | <i>INS</i>   | No   | Gen candidato <sup>36</sup>  | Si                                | Replicación de gen candidato                        | Timo / Páncreas             |
|                     | 1996                | 2q33                   | <i>CTLA4</i>   | EC <sup>13</sup> , EAIT <sup>58</sup> , AR <sup>57</sup> | Gen candidato y estudio de ligamiento <sup>37</sup>                              | No                                | Replicación de gen candidato                        | Cel. SI                     |
|                     | 2005<br>2007        | 10p15<br>4q27<br>22q13 | <i>IL2RA</i><br><i>IL2<sup>a</sup></i><br><i>IL2RB<sup>a</sup></i> | AR <sup>35,88</sup> , EM <sup>89</sup>                   | Gen candidato <sup>39</sup><br>Gen candidato <sup>88</sup><br>GWAS <sup>35</sup> | Si                                | Replicación de gen candidato<br>Replicación de GWAS | Cel. SI                     |
| <b>Era GWAS</b>     | 2006                | 5p13                   | <i>CAPSL-IL7RA</i>   | EM <sup>68</sup>   | GWAS <sup>90</sup>   | No <sup>b</sup>                   | Replicación de GWAS                                 | Cel. SI                     |
|                     | 2007                | 7q32                   | <i>IRF5</i>  | EM <sup>91</sup> , LES <sup>92</sup> , ECh <sup>93</sup> | Gen candidato <sup>94</sup>  | No                                | Estudio de gen candidato                            | Cel. SI                     |
|                     |                     | 12p13                  | <i>KLRB1-CLEC2D</i>  | EM <sup>68</sup>   | GWAS <sup>35</sup>   | No                                | Replicación de GWAS                                 | Cel. SI                     |
|                     |                     | 12q13                  | <i>ERBB3</i>   | No   | GWAS <sup>35</sup>   | Si                                | Replicación de GWAS                                 | Cel. SI / Páncreas          |
|                     |                     | 16p13                  | <i>CLEC16A</i>   | EM <sup>68</sup>   | GWAS <sup>35</sup>   | No                                | Replicación de GWAS                                 | Cel. SI                     |
|                     | 18p11               | <i>PTPN2</i>           | ECh <sup>35</sup> , AR <sup>35</sup> , EC <sup>13</sup>            | GWAS <sup>35</sup>                                       | No <sup>b</sup>  | Replicación de GWAS               | Cel. SI / Páncreas                                  |                             |
| 2008                | 2q24                | <i>G6PC2</i>           | DT2 <sup>96</sup>  | Gen candidato  | No   | Estudio de gen candidato          | Páncreas  |                             |
|                     | 2q32                | <i>STAT4</i>           | AR <sup>55</sup> , LES <sup>55</sup>                               | Gen candidato <sup>95</sup>                              | Si   | Estudio de gen candidato          | Cel. SI   |                             |
| 2009                | 6q23                | <i>TNFAIP3</i>         | AR <sup>96</sup> , EC <sup>97</sup> , LES <sup>98</sup>            | Gen candidato <sup>54</sup>                              | No   | Estudio de gen candidato          | Páncreas  |                             |
|                     | 17q21               | <i>STAT3</i>           | ECh <sup>35</sup> , EM <sup>99</sup>                               | Gen candidato <sup>54</sup>                              | No   | Estudio de gen candidato          | Cel. SI   |                             |
| 2010                | 9q33                | <i>TRAF1</i>           | AR <sup>100</sup>  | Gen candidato <sup>56</sup>                              | No   | Estudio de gen candidato          | Páncreas  |                             |

Cel. SI: células del sistema inmunitario; GWAS: *genome-wide association study*.

<sup>a</sup>Los genes *IL2* e *IL2RB* se han incluido en el apartado de genes descubiertos en la era pre-GWAS por cuestiones funcionales. Aunque el primer estudio de asociación de ambos a la DT1 fue el WTCCC, consideramos que en este caso resulta más sencillo agrupar el análisis de las tres regiones estudiadas en la ruta IL2-IL2R, en lugar de respetar el orden cronológico empleado en el resto del trabajo.

<sup>b</sup>En el presente trabajo se describe por primera vez la asociación de los genes *CAPSL-IL7R* y *PTPN2* con la edad de debut de la DT1. Ambos trabajos han sido publicados<sup>101,102</sup>.

positiva, en la que se eliminan todos los linfocitos que han formado TCRs incapaces de reconocer las moléculas de HLA propias, y la selección negativa en la que se eliminan los linfocitos T que poseen TCRs autorreactivos. Estos linfocitos unen el complejo "HLA-autoantígeno" con alta avididad y, si escapasen del timo y reconocieran uno de estos complejos, podrían activarse e iniciar una respuesta autoinmune<sup>27</sup>.

En DT1, se cree que la generación de linfocitos T reactivos a antígenos pancreáticos (figura 2) está mediada por los haplotipos de susceptibilidad en el **HLA**, que unirían los antígenos pancreáticos con menor afinidad y permitirían que los linfocitos T con TCRs contra antígenos pancreáticos pudiesen sobrevivir a la selección negativa. En estos casos, la unión "HLA-autoantígeno-TCR autorreactivo" tendría una avididad disminuida, debida a la menor afinidad del complejo HLA-autoantígeno, que permitiría al linfocito T autorreactivo sobrevivir al proceso de selección negativa<sup>31,60</sup>, continuar con la maduración y salir a la circulación periférica.

Los polimorfismos en el gen **INS** tienen un papel importante en la generación de linfocitos T autorreactivos. El polimorfismo con una mayor asociación a la DT1 es un minisatélite de tipo VNTR (*variable number of tandem repeats*), cercano a la región promotora del gen, que influye en los niveles de transcripción de insulina en el timo<sup>103,104</sup>. La unidad de repetición de este VNTR puede formar hasta 194 alelos distintos, aunque gracias a la bajísima frecuencia que presentan los alelos de tamaño intermedio se pueden clasificar todos estos alelos en tres clases: alelos cortos o de clase I (26 a 63 repeticiones), alelos intermedios o de clase II (64 a 139 repeticiones) y alelos largos o de clase III (140 a 210 repeticiones). Los alelos largos están relacionados con una mayor expresión de insulina en el timo<sup>104</sup>, y se postula que esta mayor expresión aumenta la probabilidad de contacto con el antígeno y dificulta el escape de linfocitos T reactivos a insulina. Esto concuerda con las observaciones que señalan que pacientes con DT1 portadores de alelos largos en el VNTR de la insulina tienen títulos más bajos de anticuerpos anti-insulina que aquellos que portan los alelos cortos de susceptibilidad<sup>105</sup>.

Durante el desarrollo tímico, los linfocitos expresan el receptor de la interleucina 7 (IL7R), compuesto por la subunidad alfa específica (**IL7R** o *interleukin 7 receptor*) y la cadena gamma común ( $\gamma c$ ), presente en los receptores de varias citoquinas<sup>27</sup>. El eje IL7-IL7R es imprescindible para la maduración de los linfocitos T en el timo, y se ha observado que defectos en IL7R en humanos causan una inmunodeficiencia combinada severa caracterizada por la ausencia de linfocitos T<sup>27</sup>. Además, algunos estudios<sup>106</sup> apuntan a un papel del eje IL7-IL7R en el desarrollo de los linfocitos T reguladores (Tregs) en el timo. La región 5p13 que incluimos en este trabajo, está asociada a DT1 y alberga el gen *IL7R*, pero también codifica un gen de función desconocida (*CAPSL* o *Calciphosine-like*). El alto desequilibrio de ligamiento en el bloque que contiene estos dos genes dificulta determinar el causante de la asociación y, aunque *IL7R* es un mejor candidato a participar en la patogenia de las

enfermedades autoinmunes a las que se ha descrito asociado, los estudios genéticos no pueden descartar la implicación del gen *CAPSL*.

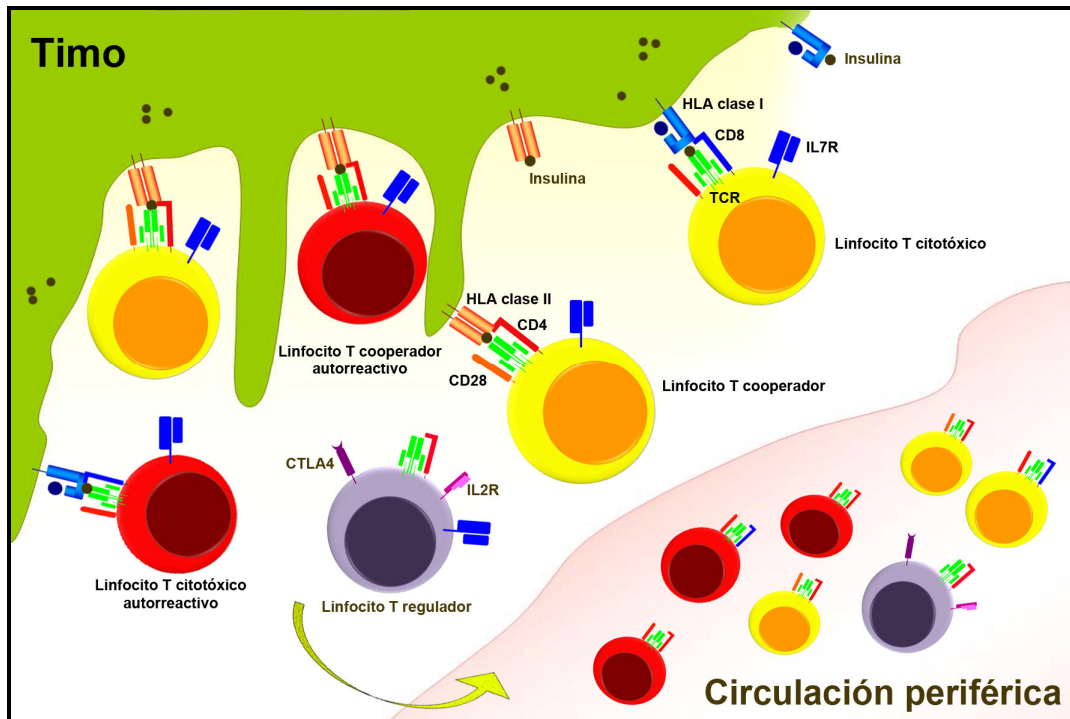


Figura 2.- Generación de linfocitos T en el timo.

## 7.2. La reacción autoinmune en los islotes pancreáticos

Se pueden definir tres fases<sup>107</sup> en el proceso que lleva a la destrucción de las células  $\beta$  en los islotes de Langerhans (figura 3):

a) Inducción de la inflamación de los islotes (insulitis): uno o varios estímulos de naturaleza desconocida desencadenan un proceso inicial de apoptosis en las células  $\beta$ . Esta apoptosis genera señales que i) desencadenan la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de las propias células del islote y ii) atraen a células del sistema inmunitario innato.

b) Amplificación de la insulitis: las células del sistema inmunitario innato responden al ambiente proinflamatorio de los islotes generando nuevas señales inflamatorias que atraen a las células del sistema inmunitario adaptativo.

c) Mantenimiento de la insulitis o resolución: una vez que se activa el sistema inmunitario adaptativo, éste puede resolver la agresión que desencadenó la insulitis o prolongar y amplificar el estado inflamatorio hasta que se produce la pérdida suficiente de células  $\beta$  para desencadenar los síntomas de la DT1, algo que será más probable en individuos genéticamente predispuestos a padecer la enfermedad.



### Participación de la inflamación en la inducción de la insulinitis

Se cree que la causa inicial de la muerte de las células  $\beta$  es la inducción de un estado inflamatorio en el islote pancreático, retroalimentado por las propias células  $\beta$ , que desemboca en la activación de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo<sup>107</sup>. El agente detonante de la inflamación en humanos no se conoce. En modelos animales se ha estudiado extensamente la inflamación causada por infecciones víricas. Las células  $\beta$  tienen sensores para captar productos de la replicación viral como el ARN de doble cadena y, ante estos estímulos, moléculas como TLR3 (*Toll like receptor 3*), RIG-1 (*retinoid inducible gene 1*) o MDA5 (*melanoma differentiation associated antigen 5*, codificado por *IFIH1*, un gen asociado a DT1<sup>90</sup>) desencadenan la producción por parte de la célula  $\beta$  de interferones de tipo I y citoquinas proinflamatorias<sup>85</sup>. Algunos estudios describen que los interferones de tipo I expresados en exceso o durante largo tiempo pueden desencadenar la apoptosis de la célula beta<sup>108,109</sup>. En este trabajo estudiamos el gen **IRF5** (*interferon regulatory factor 5*), que codifica un factor regulador de la expresión de interferones de tipo I e induce la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ <sup>110,111</sup>. Estas y otras citoquinas atraen células del sistema inmunitario (macrófagos, células NK, linfocitos T y B) que a su vez producen IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Estas señales estimulan a las células  $\beta$  a i) producir más citoquinas proinflamatorias y ii) entrar en apoptosis, liberando autoantígenos al medio que pueden ser captados por células presentadoras de antígeno (CPAs) y presentados por **HLA de clase II**<sup>107</sup>. La producción de interferones de tipo I, citoquinas proinflamatorias y la apoptosis de las células  $\beta$  retroalimentan el estado de insulinitis del islote pancreático y favorecen el reclutamiento de células del sistema inmunitario.

Las células  $\beta$  tienen mecanismos para amplificar la inflamación, pero al mismo tiempo cuentan con otros mecanismos para protegerse de la apoptosis. En este estudio analizamos tres genes con actividad anti-inflamatoria que se expresan en la célula beta. La tirosin-fosfatasa codificada por el gen **PTPN2** es un inhibidor de la producción de IFN- $\gamma$ <sup>112</sup>. La señalización a través del receptor de IFN- $\gamma$  activa el factor de transcripción STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*). Esta molécula se fosforila, dimeriza y transloca al núcleo, activando el factor de transcripción T-bet (*T-cell specific T-box transcription factor*) que desencadena la producción de IFN- $\gamma$ . La enzima PTPN2 actúa inhibiendo la fosforilación de STAT1 e impidiendo su translocación al núcleo. Experimentos funcionales recientes apuntan a que el papel más importante de esta enzima en la patogenia de la DT1 podría darse a nivel de la célula  $\beta$ : en cultivos de islotes pancreáticos en los que se ha silenciado la expresión de **PTPN2**, se observa que las células  $\beta$  son más sensibles a la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias, una sensibilidad que se recupera cuando se restablece la expresión de **PTPN2**<sup>113</sup>. Otro de los genes estudiados es **TNFAIP3**, que codifica la proteína A20, una molécula con actividad antiapoptótica que inhibe la acción proinflamatoria de NF- $\kappa$ B y TNF- $\alpha$ <sup>114</sup>. Según un estudio, **TNFAIP3** es el gen que sufre una mayor activación en la respuesta temprana de los islotes a estímulos pro-apoptóticos<sup>115</sup>. La pérdida de

expresión de A20 en las células  $\beta$  las vuelve muy susceptibles a estímulos proapoptóticos como TNF- $\alpha$ . Por último, hemos analizado el gen **TRAF1** (*TNF receptor-associated factor 1*), un miembro de la familia de factores asociados al receptor del TNF (TRAF) que forma parte, al igual que *TNFAIP3*, de los mecanismos de protección de las células  $\beta$  contra la apoptosis mediada por citoquinas pro-inflamatorias<sup>116</sup>. Se cree que TRAF1 actúa junto con TNFAIP3 y otras moléculas elevando el umbral necesario de inflamación para desencadenar la apoptosis en las células  $\beta$ <sup>116</sup>.

### La respuesta inmunitaria innata y la amplificación de la insulinitis

A pesar de la falta de especificidad de la inmunidad innata, este tipo de respuesta tiene una gran importancia en la pérdida de células  $\beta$  en los islotes, puesto que contribuye a generar el medio rico en citoquinas proinflamatorias que atrae y activa la respuesta inmunitaria adaptativa.

**Monocitos/macrófagos:** los macrófagos producen IL-12<sup>117</sup>, que estimula la producción de IFN- $\gamma$  y genera una respuesta linfocitaria tipo Th1. También sintetizan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y especies reactivas de oxígeno que inducen la apoptosis en las células del islote<sup>118</sup>. Estudios recientes en ratones NOD (*non-obese diabetic*, principal modelo animal de DT1) apuntan a que el reclutamiento de macrófagos a los islotes pancreáticos se produce por la secreción de quimiocinas por las células  $\beta$  y los linfocitos T CD4<sup>119,120</sup>. Por su parte, los macrófagos colaboran en el desarrollo de los linfocitos T CD8 autorreactivos que atacan a las células beta<sup>121</sup>. En DT1, un estudio reciente<sup>84</sup> ha encontrado relación entre variantes genéticas localizadas en el gen **ERBB3** (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral encogen homolog 3*), que codifica un receptor de membrana, y la expresión de esta molécula en monocitos estimulados con agentes que mimetizan un estado infeccioso. Además, en experimentos *in vitro*, los mismos autores describen que cultivos de CPAs con niveles de expresión más altos de ERBB3 tienen una mayor capacidad de estimulación de linfocitos T CD4. En monocitos también se expresan las moléculas de **HLA de clase II** y **CLEC2D** (*C-type lectin domain family 2 member D*), que codifica LLT1 (*lectin-like transcript*), un receptor de membrana que interacciona con el receptor NKR1A (*natural killer cell surface protein P1A*), expresado en la membrana de células *natural killer* (NK).

**Células Natural Killer (NK):** en experimentos en ratones NOD se ha descrito que las células NK extraídas de los infiltrados del páncreas tienen un fenotipo activado, proliferan más y producen espontáneamente mayores cantidades de IFN- $\gamma$ <sup>122,123</sup>. Además, la depleción de NKs previene la aparición de DT1 en varias cepas de ratones NOD<sup>124,125</sup>. La región 12p13, incluida en este trabajo, comprende los genes **KLRB1** (*killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1*) y **CLEC2D** que codifican respectivamente a los receptores NKR1A (expresado en células NK y linfocitos T) y LLT1 (expresado en monocitos, células dendríticas y linfocitos B)<sup>126</sup>. La unión de LLT1 a NKR1A produce la disminución de la expresión de este último, protege a la célula que porta LLT1 de la lisis e inhibe la expresión de IFN- $\gamma$ . En células NK también se expresa

**CLECT16A** (*C-type lectin domain family 16 member A*)<sup>80</sup>, un gen que codifica una proteína de membrana de función desconocida presente en las CPAs. No se conoce su función pero se ha visto que la proteína que codifica este gen tiene un dominio de lectina tipo C, propio de proteínas dependientes de calcio que unen polisacáridos y que tienen diversas funciones en la respuesta inmunitaria<sup>27</sup>.

**Células dendríticas convencionales (CDc) y células dendríticas plasmacitoides (CDp):** las CDc se encargan de la presentación de antígenos por **HLA de clase II**<sup>27</sup>, mientras que las CDp están especializadas en el reconocimiento de ácidos nucleicos virales<sup>127</sup>. En DT1 se han descrito experimentos que apoyan un papel de las células dendríticas (CDs) tanto en la protección como en la patogénesis de la enfermedad, y la diferencia parece radicar en el momento en que actúan estas células. En experimentos con ratones NOD, cuando se estimulaba la proliferación de CDs en las primeras fases de la respuesta autoinmune, esta proliferación inducía el aumento de Tregs y protegía contra el desarrollo de la enfermedad<sup>128</sup>. En cambio, cuando se estimulaba a ratones que ya presentaban linfocitos T autorreactivos en sangre, la proliferación de las CDs producía un adelanto en el desarrollo de la DT1<sup>129</sup>, probablemente porque su papel de CPAs induciría en etapas tardías la activación de linfocitos T autorreactivos, mientras que en fases tempranas favorecería la activación de Tregs. Los genes **CLECT16A**, **ERBB3** y **CLEC2D** descritos anteriormente, también se expresan en las CDs<sup>80,84,126</sup>.

La capacidad de las CDp de producir IFNs de tipo I se ha relacionado con el desencadenamiento de la DT1<sup>129</sup>. Esto es interesante puesto que uno de los agentes ambientales más estudiados en la DT1 son las infecciones virales, que estimularían a las CDp a producir IFNs de tipo I, regulados por una serie de factores de transcripción entre los que se incluye el gen **IRF5**.

### La respuesta inmunitaria adaptativa y el mantenimiento de la insulinitis

La implicación del sistema inmunitario adaptativo en la patogenia de la DT1 se conoce desde antiguo<sup>130</sup>. Los componentes del sistema inmunitario adaptativo participan en la destrucción de las células  $\beta$  (a cargo de linfocitos T autorreactivos), en la regulación de la autoinmunidad (Tregs) y producen autoanticuerpos (linfocitos B) que permiten detectar de forma sencilla la presencia de una reacción autoinmune que puede desencadenar en la DT1.

**Linfocitos T:** las células T CD4 y CD8 tienen un papel imprescindible en la destrucción de las células  $\beta$ . En experimentos en ratones NOD se ha observado que la enfermedad solo se reproduce en un ratón sano cuando se inocula una mezcla de linfocitos T CD4 y CD8, pero no cuando se transfiere aisladamente una de las dos poblaciones<sup>131</sup>. Por tanto, aunque los linfocitos T CD8 se consideran principales actores en el daño celular<sup>1</sup>, no pueden ejercer su papel sin la ayuda de linfocitos T CD4. Los linfocitos T CD8 pueden provocar la muerte celular por citotoxicidad mediada por HLA-

I, y tanto éstos como los linfocitos T CD4 producen citoquinas que inducen a la célula  $\beta$  a la apoptosis y favorecen el reclutamiento de células del sistema inmunitario<sup>85</sup>.

Según los estímulos que reciba un linfocito T, éste puede responder activando genes que conduzcan a una respuesta Th1 (contra patógenos intracelulares), Th2 (contra parásitos extracelulares) o Th17 (relacionada con la inflamación)<sup>27</sup>. El factor de transcripción **STAT4** (*signal transducer and activator of transcription 4*) se activa en respuesta a la señalización por IL-12 y desencadena la producción de IFN- $\gamma$ , que polariza la respuesta inmunitaria hacia Th1<sup>27</sup>. Esto ocurre tanto en linfocitos T como en células NK, poblaciones en las que se expresa el receptor de la IL-12. En experimentos en ratones NOD se observa que el bloqueo de la expresión de *Stat4* evita que los ratones sufran la diabetes espontánea que les caracteriza<sup>132</sup>.

El factor de transcripción **STAT3** (*signal transducer and activator of transcription 3*) pertenece a la misma familia que STAT4. Sus funciones son muy amplias, participando en procesos de apoptosis, orientación de los axones neuronales y activación de la respuesta inmunitaria, aunque el proceso más interesante para el estudio de las patologías autoinmunes es su participación como factor de diferenciación de linfocitos Th17<sup>133</sup>, una subpoblación de linfocitos T relacionados con la inflamación que ha ganado mucha importancia en la patogenia de estas enfermedades.

El gen **KLRB1**, que codifica el receptor de membrana NKR1A, se expresa en un subgrupo de linfocitos T CD4 que producen IL-17 y tienen tropismo por el intestino<sup>134</sup>. En ECh se ha observado que esta población aparece en las lesiones de la enfermedad activa, y se postula que es un subgrupo de células Th17 que participa en la producción de dichas lesiones<sup>134</sup>. La DT1 se ha considerado tradicionalmente una enfermedad producida por una respuesta Th1 exacerbada<sup>135</sup>. La participación de la respuesta Th17 en DT1 está menos estudiada que en otras enfermedades como ECh, pero no se puede descartar que los linfocitos Th17 tengan algún papel en el desarrollo de la DT1. Por tanto, la asociación que se observa en 12p13 podría estar relacionada con la función del gen *KLRB1* en este subgrupo de linfocitos T.

**Linfocitos T reguladores (Tregs):** esta subpoblación de linfocitos T CD4 expresa constitutivamente el factor de transcripción Foxp3 (*forkhead box P3*), CTLA-4 y el receptor de alta afinidad de la IL-2, y tiene un papel muy importante en la supresión de la autoinmunidad<sup>136</sup>. Existe una inmunodeficiencia humana infrecuente denominada IPEX (inmunodisregulación, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X), causada por una mutación en el factor de transcripción *FOXP3*, que produce la ausencia de Tregs<sup>137</sup>. Los pacientes con esta enfermedad desarrollan DT1, un hecho que refuerza la importancia de las Tregs en la prevención de la enfermedad.

El gen **CTLA4** codifica un regulador negativo de la activación de linfocitos T que se expresa tras la activación del linfocito por una CPA vía contacto CD80-86 (CPA) – CD28 (linfocito T)<sup>27</sup>. En la subpoblación de Tregs, *CTLA4* se expresa de forma constitutiva<sup>58</sup>, una característica probablemente relacionada con el papel de esta población celular en la regulación de la autoinmunidad. Otra molécula que se

expresa de forma constitutiva en Tregs es el receptor de alta afinidad de la IL-2<sup>138</sup>, formado por las subunidades alfa (**IL2RA**) y beta (**IL2RB** o *interleukin 2 receptor beta*, compartida con el receptor de la IL-15), y la cadena gamma común ( $\gamma_c$ , compartida con los receptores de varias citoquinas). La subunidad que confiere especificidad a este receptor es la cadena alfa, codificada por **IL2RA**, y su expresión en membrana es una de las características de los Tregs. El eje **IL2-IL2R** es muy importante para el mantenimiento de los Tregs y ésta es la única función de este eje no redundante con otras citoquinas<sup>138</sup>.

**Linfocitos B:** el papel de las células B en la DT1 parece reducirse a la presentación de autoantígenos a linfocitos T CD4 por el **HLA de clase II** y la síntesis de anticuerpos frente a antígenos pancreáticos<sup>85,139</sup>. En los linfocitos B también se expresan las moléculas codificadas por los genes **CLEC16A**, **CLEC2D** y **ERBB3**<sup>80,84,126</sup>. Estudios de transferencia de anticuerpos de ratones NOD enfermos a ratones sanos demuestran que los anticuerpos producidos por los linfocitos B autorreactivos solo son una manifestación de la reacción autoinmune que está teniendo lugar y no tienen capacidad patogénica<sup>140</sup>. En humanos, estos autoanticuerpos traspasan la placenta durante la gestación, y se ha observado que desaparecen a los pocos meses del nacimiento sin provocar daños en el recién nacido<sup>139</sup>, algo que no es compatible con una hipotética capacidad patogénica. Además, la descripción de un paciente con ausencia de linfocitos B por enfermedad de Bruton que desarrolló DT1<sup>141</sup> replantea el papel de los linfocitos B en la patogenia de la enfermedad. Actualmente, el papel más aceptado y demostrado es el de presentadores de antígeno a los linfocitos T y sintetizadores de autoanticuerpos que, aunque no son patogénicos, permiten detectar la presencia de autoinmunidad años antes del debut de la enfermedad.

La presencia aislada de un anticuerpo frente a antígenos pancreáticos no sirve para predecir la enfermedad puesto que hay individuos que pueden presentar positividad para un anticuerpo sin otras manifestaciones de DT1. Sin embargo, la positividad para dos o más anticuerpos o el cambio de positividad para un anticuerpo a positividad múltiple en un corto espacio de tiempo son signos indicativos de un alto riesgo de padecer la enfermedad<sup>142,143</sup>. Por tanto, aunque los anticuerpos contra los antígenos pancreáticos no son patogénicos, constituyen una manera sencilla y poco invasiva de realizar un seguimiento a individuos con alto riesgo, principalmente parientes en primer grado de un individuo afectado de DT1.

A pesar de toda la información proporcionada por los modelos animales y por los estudios que se han podido realizar en pacientes de DT1, aún existen grandes incógnitas en la patogenia de la DT1. La principal de ellas es cuál es el estímulo desencadenante de la insulinitis que desemboca en la enfermedad, pero también existen otras como qué papel desempeñan las infecciones por enterovirus (más frecuentes en pacientes de DT1 que en individuos sanos<sup>18</sup>), o cuál es el curso de la reacción autoinmune (¿es una reacción continua y progresiva o sigue un patrón

remitente-recurrente?), todas ellas cuestiones importantes para lograr prevenir la enfermedad o para desarrollar estrategias encaminadas a frenar la reacción autoinmune una vez comenzada.



# Objetivos



Nuestro objetivo principal en este trabajo es analizar la asociación de una serie de regiones cromosómicas con la susceptibilidad o protección a desarrollar DT1 y estudiar la influencia de las variantes genéticas seleccionadas en la edad de debut de la enfermedad. Dentro de este objetivo general, establecemos unos objetivos concretos:

### 1. Estudio de genes asociados a la DT1 en la era pre-GWAS:

- Estudio de la susceptibilidad o protección a DT1 conferida por genes y haplotipos dentro de la región HLA de clase II diferentes a los clásicamente asociados a la enfermedad.
- Análisis de la influencia de genes clásicos asociados a DT1 (HLA, *INS*, *CTLA4* e *IL2RA*) en la edad de debut de la enfermedad.

### 2. Asociaciones genéticas descubiertas en la era GWAS:

- Replicación en población española de regiones cromosómicas asociadas a DT1 descubiertas en estudios de barrido genómico (4q27, 5p13, 12p13, 12q13, 16p13, 18p11, 22q13).
- Estudio del efecto en la predisposición a DT1 de genes candidatos que se han descrito asociados al riesgo a sufrir otras enfermedades autoinmunes (*IRF5*, *STAT4*, *TNFAIP3*, *STAT3*, *TRAF1*) y de un gen candidato relacionado con el metabolismo de la glucosa (*G6PC2*).
- Análisis de la influencia de las regiones cromosómicas seleccionadas en la edad de debut de la DT1.



Material,  
métodos y  
pacientes



## 1. Pacientes:

Este trabajo se ha realizado con 451 pacientes y 888 controles sanos reclutados entre donantes de sangre y personal del Hospital Clínico San Carlos. A continuación se describen las características de ambas poblaciones.

### → Pacientes de DT1:

Disponemos de muestras de ADN y datos clínicos de 451 individuos (47% mujeres) caucásicos de ascendencia española. El 62.5% de la muestra de pacientes procede del Servicio de Endocrinología del Hospital General Universitario Ramón y Cajal. El resto provienen de los servicios de Pediatría, Endocrinología y Medicina Interna del Hospital Clínico San Carlos (HCSC). Todos los pacientes han sido diagnosticados según los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA)<sup>2</sup>.

Nuestra población está compuesta por individuos con debut pediátrico y adulto de la enfermedad. Disponemos del dato de edad de debut en 415 pacientes, dentro de los cuales la edad de debut mínima es inferior a un año y la máxima de 65 años. La media es de 18.6 años ( $\pm 11.1$ ) y la mediana de 16 años.

Los pacientes adultos se han clasificado como DT1 en función de tres criterios: presencia de autoanticuerpos, complexión delgada y requerimiento de insulina exógena desde el momento del diagnóstico. En caso de ausencia de autoanticuerpos, algo que puede ocurrir en el 10-15% de los pacientes de DT1, el diagnóstico se ha realizado basándose en los criterios de la ADA más criterios de complexión física y requerimiento de insulina. Cabe resaltar que los pacientes adultos con un diagnóstico más tardío (+35 años), que son aquellos que pueden presentar mayor dificultad, presentaron todos autoanticuerpos positivos al diagnóstico.

Hemos recopilado los datos de autoanticuerpos de 264 pacientes. Se ha considerado a un paciente positivo para autoanticuerpos cuando presenta en suero uno o más de los siguientes: anti-islotos pancreáticos (ICAs), anti-IA2 y anti-glutamato descarboxilasa (anti-GAD). Los anticuerpos anti-islotos pancreáticos se han determinado mediante inmunofluorescencia indirecta (IMMCO Diagnostics, USA). Los anticuerpos anti-IA2 y anti-glutamato descarboxilasa se han determinado mediante ELISA (RSR Ltd, UK).

Disponemos del tipaje de HLA para 442 pacientes. En la distribución de los distintos haplotipos (tabla 6) se puede observar la predominancia de los haplotipos de susceptibilidad *DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* y *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02* (aproximadamente el 90% de los pacientes posee al menos uno de ellos) y la baja frecuencia del haplotipo de protección *DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02*.

Todos los pacientes eran insulín-dependientes en el momento de la incorporación a la muestra. En todos los casos se pidió el consentimiento informado para la inclusión en el estudio. Se pueden consultar más datos sobre la población en la tabla 6.

→ **Controles:**

Nuestra población control está integrada por un máximo de 888 personas (53.7% mujeres) sin antecedentes personales o familiares de enfermedades autoinmunes. Parte de la muestra procede de donantes de sangre y otra parte ha sido recogida entre trabajadores del Hospital Clínico San Carlos. La edad de los individuos en el momento de recogida de la muestra es superior a los dieciocho años, y todos proceden del área metropolitana de Madrid. Solo se han incorporado al estudio controles caucásicos de ascendencia española.

Por problemas de disponibilidad de muestra, el tipaje de HLA se ha realizado en 619 individuos, lo que supone el 69.6% de la población control. Los haplotipos *DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* y *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*, que son mayoritarios en la población de pacientes de DT1, aparecen en el 38% de los controles, una frecuencia que concuerda con la observada para dichos haplotipos en población caucásica.

Se pueden consultar más datos sobre la población y su comparación con la muestra de pacientes de DT1 en la tabla 6.

## **2. Recogida de datos:**

Se han recopilado los siguientes datos de cada paciente en una base de datos Access:

- Nombre y apellidos, para evitar la repetición de muestras y controlar la inclusión de parientes (especialmente hermanos).
- Sexo.
- Hospital de procedencia.
- Edad de debut y presencia de anticuerpos mediante estudio de las historias clínicas.
- Fecha de incorporación a la muestra de estudio.
- Diagnóstico de diabetes tipo 1 positivo.
- Etnia caucásica y ascendencia española.

En el caso de los individuos control, se recogen los siguientes datos:

- Nombre y apellidos, con objeto de evitar la repetición de muestras.
- Sexo.
- Fecha y lugar de nacimiento, del que se extraen la edad actual y el origen del individuo.
- Fecha de incorporación a la muestra de estudio.
- Ausencia de enfermedades autoinmunes en el sujeto o familiares de 1º grado.

Tanto en el caso de los individuos control como de los pacientes, a cada muestra se le asigna un número identificativo que sustituye al nombre y apellidos, y con el cual se trabajará en lo sucesivo. Ambas bases de datos han sido protegidas por contraseña para salvaguardar la privacidad de los participantes en el estudio.

Tabla 6.- Datos generales de las muestras de pacientes DT1 y controles empleadas en el estudio.

|   | DT1         |                   | CONTROLES  |                   |
|---|-------------|-------------------|--|-------------------|
|   | N           | %                 | N  | %                 |
| <b>TOTAL</b>  | 451         |                   | 888  |                   |
| <b>SEXO</b>   |             |                   |  |                   |
| Pacientes con dato  | 449         | 99.6              | 874  | 98.4              |
| Hombres   | 239         | 53.2 <sup>a</sup> | 395  | 45.2 <sup>a</sup> |
| Mujeres   | 210         | 46.8 <sup>a</sup> | 477  | 54.6 <sup>a</sup> |
| <b>PROCEDENCIA</b>  |             |                   |  |                   |
| H.G.U. Ramón y Cajal  | 282         | 62.5              | 0  | 0.0               |
| HCSC y otros  | 169         | 37.5              | 888  | 100.0             |
| <b>HLA</b>  |             |                   |  |                   |
| Pacientes con dato  | 442         | 98.0              | 619  | 69.6              |
| <i>DRB1*03 o DRB1*04 –DQB1*03:02</i>                                    | 393         | 88.9 <sup>b</sup> | 234  | 37.8 <sup>b</sup> |
| No <i>DRB1*03</i> , no <i>DRB1*04-DQB1*03:02</i> , no <i>DRB1*15:01</i> | 49          | 11.1 <sup>b</sup> | 296  | 47.8 <sup>b</sup> |
| <i>DRB1*03 / DRB1*04-DQB1*03:02</i>                                     | 111         | 25.1 <sup>b</sup> | 19   | 3.1 <sup>b</sup>  |
| <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i>                                    | 280         | 63.4 <sup>b</sup> | 159  | 25.7 <sup>b</sup> |
| <i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i>                                    | 224         | 50.7 <sup>b</sup> | 97   | 15.7 <sup>b</sup> |
| <i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:01</i>                                    | 14          | 3.2 <sup>b</sup>  | 26   | 4.2 <sup>b</sup>  |
| <i>DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02</i>                                 | 3           | 0.7 <sup>b</sup>  | 112  | 18.1 <sup>b</sup> |
| <b>EDAD de DEBUT</b>  |             |                   |  |                   |
| Pacientes con dato  | 415         | 92.0              |  |                   |
| Media   | 18.6 años   |                   |  |                   |
| Desviación estándar   | 11.1        |                   |  |                   |
| Mediana   | 16 años     |                   |  |                   |
| Rango intercuartílico   | 11.0 - 25.0 |                   |  |                   |
| Mínimo  | 0 años      |                   |  |                   |
| Máximo  | 65 años     |                   |  |                   |
| <b>ANTICUERPOS</b>  |             |                   |  |                   |
| Pacientes con dato  | 264         | 58.5              |  |                   |
| Positivos   | 184         | 69.7              | Porcentajes referidos al n° de pacientes con dato de anticuerpos.            |                   |
| Negativos   | 80          | 30.3              |  |                   |
| Pediátricos<br>(debut 16 años o menos)                                  | 126         |                   |  |                   |
| Positivos   | 73          | 57.9              | Porcentajes referidos al n° de pacientes pediátricos con dato de anticuerpos |                   |
| Negativos   | 53          | 42.1              |  |                   |
| Adultos<br>(debut mayor de 16 años)                                     | 134         |                   |  |                   |
| Positivos   | 108         | 80.6              | Porcentajes referidos al n° de pacientes adultos con dato de anticuerpos     |                   |
| Negativos   | 26          | 19.4              |  |                   |

<sup>a</sup> Porcentajes referidos al n° total de pacientes o controles con el dato SEXO.

<sup>b</sup> Porcentajes referidos al n° total de pacientes o controles con el dato HLA.

### **3. Procesamiento de las muestras:**

De cada participante se obtiene una muestra de sangre de 5 o 10 ml anticoagulada con EDTA. De ella se aíslan los núcleos de las células nucleadas de la sangre (linfocitos, granulocitos y monocitos), y de estos núcleos se extrae el ADN por un proceso de precipitación salina o *salting out*<sup>144</sup>.

#### Obtención de los núcleos celulares

La sangre entera se diluye en un tampón de lisis que contiene Tritón X-100, sacarosa y sales minerales. Dicho tampón tiene la fuerza suficiente para lisar las membranas celulares y los eritrocitos, pero deja las membranas nucleares intactas, permitiendo separar los núcleos celulares por centrifugación.

#### Aislamiento de ADN

El aislamiento de ADN se lleva a cabo mediante la técnica de *salting out*, elegida por su alto rendimiento y facilidad de ejecución, que permite obtener altas cantidades de ADN de una pureza óptima a bajo coste.

Mediante la técnica de *salting out*, se degradan las membranas nucleares de los núcleos extraídos en el paso anterior, liberando el ADN y las proteínas al medio de reacción. El exceso de proteínas se elimina mediante una incubación con la enzima proteinasa K y precipitación con cloruro sódico. Posteriormente, el ADN se precipita con isopropanol, que produce su agregación en una típica forma de medusa. Esta medusa se resuspende para su conservación en tampón TE o agua destilada.

Mediante esta técnica se obtienen muestras de 800  $\mu\text{l}$  de ADN con una concentración que oscila generalmente entre los 200 y los 500  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

#### Cuantificación y conservación de las muestras

Las muestras se cuantifican en un espectrofotómetro Nanodrop V1000. Este aparato permite la cuantificación de ADN a partir de volúmenes muy pequeños (1-2  $\mu\text{l}$ ) y únicamente requiere que las muestras estén muy bien homogeneizadas ya que, debido al escaso volumen sobre el que se realiza la cuantificación, se podrían obtener mediciones erróneas en muestras que presenten agregados de ADN.

La cuantificación del ADN por espectrofotometría se realiza a partir de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nanómetros, radiación ultravioleta que el ADN absorbe específicamente. Al mismo tiempo se mide la absorbancia de la muestra a 280 nanómetros, específica del enlace peptídico y que sirve para cuantificar la cantidad de proteína que contiene la muestra. La ratio entre la absorbancia a 260 nm (ADN) y la absorbancia a 280 nm (proteínas) es una medida de la pureza de la muestra. Se considera una muestra con una buena pureza cuando su ratio ADN:proteínas oscila entre 1.7 y 1.9, es decir, la muestra contiene aproximadamente el doble de ADN que de proteínas.

Una vez cuantificadas las muestras y comprobada su pureza, se procede a realizar

diluciones de trabajo a una concentración estándar de 10 ng/μl a partir de la muestra madre. Las diluciones de trabajo se conservan refrigeradas a 4°C mientras que las muestras madre de ADN se congelan a -70°C.

#### **4. Genotipado de los genes HLA:**

El tipaje de los alelos del HLA de clase II se ha llevado a cabo por la técnica PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probe*) en dos métodos distintos: *dot blot* y tecnología Luminex. En los dos casos, el fundamento de la técnica consiste en la amplificación por PCR del gen a tipar (*DRB1*, *DQA1* o *DQB1*), la hibridación de los amplificadores con sondas específicas de alelo y la detección de los conjuntos "sonda específica-amplificado".

##### Genotipado de HLA de clase II por dot-blot:

El tipaje por *dot-blot*<sup>61</sup> es una técnica de bajo coste que permite procesar varias muestras a la vez ofreciendo un tipaje de baja resolución. La técnica consiste en la amplificación por PCR del segundo exón de los genes HLA *DRB1*, *DQA1* y *DQB1*, en el que se encuentra la mayor variabilidad. Estos amplificadores se transfieren a membranas de *nylon* y se hibridan con sondas específicas de un alelo o un conjunto de alelos. Las sondas están marcadas y se revelan por quimioluminiscencia. En función de las sondas hibridadas se determinarán los alelos HLA de clase II presentes en el individuo.

##### Genotipado de HLA de clase II por tecnología Luminex:

La tecnología Luminex permite el tipaje de baja o alta resolución, dependiendo de las características del *kit* utilizado. En este estudio se han empleado *kits* de baja resolución que ofrecen unos resultados comparables a los de la técnica de *dot-blot* con una mayor rapidez (cinco horas frente a tres días) y una mayor facilidad de interpretación de los resultados, con la contrapartida de un coste más alto.

El genotipado del HLA por tecnología Luminex consiste en la amplificación por PCR del segundo exón de los genes HLA *DRB1*, *DQA1* y *DQB1*. Los amplificadores se hibridan posteriormente con sondas específicas de uno o varios alelos que están unidas a unas bolas sintéticas o *beads*. Estas bolas están coloreadas con la combinación de dos fluorocromos en distintas proporciones, lo cual les confiere una coloración diferente en función de la cantidad de cada fluorocromo que posean. Este procedimiento permite la creación de hasta cien poblaciones distintas de fluoroesferas, y por tanto, la presencia de cien sondas diferentes para la hibridación, una por cada tipo de bola.

En el proceso de PCR, los amplificadores quedan marcados con biotina en la región del *primer*. Estos amplificadores se hibridan con las bolas o *beads* que contienen las sondas específicas de alelo. Una vez finalizada la hibridación, se añade estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE) al medio de reacción. La estreptavidina se unirá a la biotina de los *primers* marcados y todo el medio de reacción (exceso de estreptavidina, exceso de amplificado, bolas no conjugadas y los conjuntos "bola +

amplificado marcado con estreptavidina-PE") se lee en un citómetro Luminex X100. El citómetro reconocerá como positiva únicamente la fluorescencia de los conjuntos "bola hibridada + amplificado marcado con estreptavidina-PE". A partir del "color" de la bola, el *software* de interpretación de resultados reconocerá la sonda que lleva unida y el alelo o alelos a los que corresponde dicha sonda. De este modo, en función de las sondas positivas, el programa proporcionará el tipaje de la muestra.

## **5. Genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs):**

El genotipado de SNPs se lleva a cabo mediante tecnología TaqMan. Esta tecnología consiste en la realización de una PCR a tiempo real (RT-PCR) con un conjunto de *primers* que acotan la región donde se encuentra el alelo a genotipar y dos sondas complementarias de cada uno de los alelos posibles, marcadas con un fluorocromo diferente y un secuestrador de fluorescencia o *quencher*. Cuando la sonda está íntegra, el *quencher* absorbe la fluorescencia del fluorocromo. En cambio, si la sonda hibrida con el ADN, se degradará durante la síntesis de cada amplificado debido a la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa, liberando el fluorocromo y el *quencher* al medio de reacción y permitiendo que el primero emita fluorescencia.

En cada ensayo, se realiza la PCR con dos sondas específicas de los dos alelos posibles y marcadas con un fluorocromo (FAM™ o VICT®). A medida que la reacción de PCR avanza, se observará un incremento en la fluorescencia que marca el alelo o alelos presentes en el individuo, debido a la degradación de sonda marcada que acompaña a la síntesis de cada amplificado. De este modo, al final de la reacción los individuos homocigotos presentarán un aumento en una sola fluorescencia, mientras que los heterocigotos mostrarán una elevación de las dos fluorescencias.

El genotipado de las muestras se realiza mediante sondas TaqMan en un aparato de PCR a tiempo real 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en las siguientes condiciones estándar: 1) 2 minutos, 50°C (activación de amperasa presente en la *master mix*), 2) desnaturalización del ADN (10 minutos, 95°C), 3) cuarenta ciclos de amplificación mediante un primer paso de desnaturalización (15 segundos, 92°C) y un segundo de hibridación de *primers* y síntesis de ADN (1 minuto, 60°C).

Se puede consultar un listado de todos los polimorfismos analizados en este trabajo en la tabla 7.

Tabla 7.- Listado de polimorfismos incluidos en el estudio. MAF (*minor allele frequency*) calculada en controles.

| Región   | Gen candidato          | SNP        | Referencia    | Localización       | Cambio nucleotídico | Cambio aminoacídico | MAF controles |
|----------|------------------------|------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| 2q24.3   | G6PC2                  | rs1402837  | C_8813497_10  | Promotor           | C/T                 | --                  | T (0.20)      |
|          |                        | rs16856159 | C_34242909_10 | Intrón             | A/G                 | --                  | A (0.13)      |
|          |                        | rs560887   | C_323082_10   | Intrón (frontera)  | C/T                 | --                  | T (0.27)      |
|          |                        | rs17539351 | C_3424899_10  | 3' UTR             | C/T                 | --                  | T (0.08)      |
| 2q32.3   | STAT4                  | rs7574865  | C_29882391_10 | Intrón             | G/T                 | --                  | T (0.21)      |
|          |                        | rs9967792  | C_29484664_10 | Intrón             | C/T                 | --                  | T (0.40)      |
| 2q33.2   | CTLA-4                 | rs5742909  | C_27834180_10 | Promotor           | C/T                 | --                  | T (0.09)      |
|          |                        | rs231775   | C_2415786_20  | Exón               | G/T                 | Thr17Ala            | T (0.29)      |
|          |                        | rs3087243  | C_3296043_10  | 3' UTR             | A/G                 | --                  | G (0.48)      |
| 4q27     | IL2-IL21<br>TENR       | rs11938795 | C_26012982_10 | Región intergénica | C/T                 | --                  | C (0.27)      |
|          |                        | rs17388568 | C_33129431_10 | Intrón             | A/G                 | --                  | A (0.27)      |
|          |                        | rs6822844  | C_28983601_10 | Región intergénica | G/T                 | --                  | T (0.13)      |
| 5p13.2   | CAPSL                  | rs1010601  | C_8811808_10  | Intrón             | C/T                 | --                  | C (0.41)      |
|          |                        | rs1445898  | C_8811801_1   | Exón               | C/T                 | Arg75Gln            | T (0.45)      |
|          | IL7R                   | rs6897932  | C_2025977_10  | Exón               | C/T                 | Thr244Ile           | T (0.26)      |
|          |                        | rs987106   | C_8811858_10  | Intrón (frontera)  | A/T                 | --                  | T (0.47)      |
| 6q23.3   | TNFAIP3                | rs3194051  | C_25616805_10 | Exón               | A/G                 | Ile356Val           | G (0.29)      |
|          |                        | rs6920220  | C_29431952_10 | Región intergénica | A/G                 | --                  | A (0.19)      |
|          |                        | rs10499194 | C_1575581_10  | Región intergénica | C/T                 | --                  | T (0.32)      |
| 7q32     | IRF5                   | rs4728142  | C_2691222_10  | Promotor           | A/G                 | --                  | A (0.47)      |
|          |                        | rs3807306  | C_2691231_10  | Intrón             | G/T                 | --                  | G (0.49)      |
| 9q33.2   | TRAF1/C5               | rs10818488 | C_2783655_10  | 3' UTR             | A/G                 | --                  | A (0.36)      |
|          |                        | rs3761847  | C_2783640_10  | Promotor           | A/G                 | --                  | G (0.36)      |
|          |                        | rs2416806  | C_2783641_10  | Promotor           | C/G                 | --                  | G (0.30)      |
|          |                        | rs2269059  | C_15875924_10 | Intrón             | A/T                 | --                  | A (0.07)      |
|          |                        | rs13440146 | C_30830632_10 | Intrón             | G/T                 | --                  | T (0.06)      |
| 10p15.1  | IL2RA<br>RBM17         | rs2104286  | C_16095542_10 | Intrón             | C/T                 | --                  | C (0.22)      |
|          |                        | rs41295061 | By design     | Región intergénica | A/C                 | --                  | A (0.07)      |
|          |                        | rs11594656 | C_11646696_10 | Promotor           | A/T                 | --                  | A (0.32)      |
| 11p15.5  | INS                    | rs689      | C_1223317_10  | Intrón (frontera)  | A/T                 | --                  | A (0.28)      |
| 12p13.31 | KLRB1<br>CLEC2D        | rs4763655  | C_2661112_10  | Intrón             | A/G                 | --                  | A (0.36)      |
|          |                        | rs11052552 | C_32169467_10 | 3' UTR             | G/T                 | --                  | G (0.49)      |
| 12q13.2  | ERBB3<br>SUOX<br>RAB5B | rs2292239  | C_15967467_10 | Intrón             | A/C                 | --                  | A (0.40)      |
|          |                        | rs10876864 | C_1523411_10  | 3' UTR             | A/G                 | --                  | G (0.48)      |
|          |                        | rs773107   | C_8340401_10  | Intrón             | A/G                 | --                  | G (0.38)      |
| 16p13.13 | CLEC16A                | rs2903692  | C_15941578_10 | Intrón             | A/G                 | --                  | A (0.42)      |
|          |                        | rs6498169  | C_29080959_10 | Intrón             | A/G                 | --                  | G (0.32)      |
|          |                        | rs11074956 | C_3189858_10  | Región intergénica | G/T                 | --                  | T (0.39)      |
| 17q21.2  | STAT3<br>PTRF          | rs3809758  | C_25800969_10 | Intrón             | C/T                 | --                  | C (0.21)      |
|          |                        | rs1026916  | C_7530551_20  | Intrón             | A/G                 | --                  | A (0.38)      |
|          |                        | rs744166   | C_3140282_10  | Intrón             | A/G                 | --                  | G (0.42)      |
|          |                        | rs12948909 | C_31652022_10 | Intrón             | A/C                 | --                  | C (0.29)      |
| 18p11.21 | PTPN2                  | rs2542151  | C_3043363_10  | 3' UTR             | G/T                 | --                  | G (0.14)      |
|          |                        | rs478582   | C_1623598_10  | Intrón             | C/T                 | --                  | C (0.48)      |
| 22q12.3  | IL2RB                  | rs3218253  | C_27917605_10 | Intrón             | A/G                 | --                  | A (0.29)      |
|          |                        | rs743777   | C_2403397_10  | Promotor           | A/G                 | --                  | G (0.36)      |
|          |                        | rs9622555  | C_29519411    | Promotor           | G/T                 | --                  | T (0.33)      |

## 6. Análisis estadístico de los resultados:

Una vez finalizado el genotipado de las muestras, los datos de los genotipos de cada individuo se incorporan a la base de datos para su análisis.

En primer lugar, se comprueba que las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo en la población control cumplen los criterios del equilibrio de Hardy-Weinberg. En caso de que la diferencia entre las frecuencias esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg y las observadas en la muestra sea significativa ( $p < 0.05$ ), se descarta el análisis de dicho polimorfismo.

Como medidas de control de calidad del genotipado, en aquellos genes en los que se analiza más de un polimorfismo se comprueba que el desequilibrio de ligamiento entre dichos polimorfismos (medido como  $D'$  y  $r^2$ ) concuerda con el estimado para la población caucásica incluida en el Proyecto Hapmap<sup>145</sup>. El porcentaje de éxito del genotipado (proporción de muestras con genotipo) supera el 95% en todos los casos. Además, se repite el genotipado en el 5-10% de las muestras, con un porcentaje de concordancia superior al 99%.

A partir de las frecuencias genotípicas, se calculan las frecuencias alélicas y las frecuencias de portadores de cada alelo en la población control, en la muestra de pacientes general y en la misma muestra estratificada por edad de debut para realizar un estudio de la influencia de la genética en la edad de comienzo de la enfermedad. Este estudio se ha realizado en todos los genes, incluso aunque no se encuentre asociación entre el gen y la DT1 general, por dos razones:

1) para estudiar separadamente la asociación del gen en una población comparable en edad a las de los grandes estudios genéticos (pediátrica), y en la población excluida de dichos estudios (adulta).

2) para averiguar si existe alguna asociación que se restrinja únicamente a un grupo de edad y que podría verse diluida al estudiar dicho grupo con otro en el que no hay asociación o la asociación es más débil.

Para el análisis estratificado por edad de debut se ha dividido la población en dos estratos, tomando como edad límite los 16 años y considerando a aquellos pacientes con edad de debut igual o inferior a 16 años como pacientes con debut pediátrico y a los pacientes con edad de debut superior a 16 años como pacientes con debut adulto de la enfermedad. Se ha seleccionado esta edad por ser el límite más usado en los grandes estudios genéticos en DT1 para la inclusión de pacientes, y además por coincidir con la mediana de nuestra distribución.

Los análisis caso-control y por estratos se realizan mediante la construcción de tablas de contingencia 2x2 y comparación por el test Chi-cuadrado o Test exacto de Fisher, cuando la frecuencia esperada de alguno de los valores es inferior a cinco. Ambos análisis se han llevado a cabo con el programa Statcalc (EpiInfo v6).

El análisis de la edad como variable continua se ha realizado mediante test no paramétricos debido a que la edad de debut en DT1 no cumple los criterios de una distribución normal. Se ha utilizado el test U de Mann Whitney para el análisis de la

edad estratificada por alelos o portadores de un alelo, y el test de Kruskal-Wallis para el análisis de la edad de debut estratificada por genotipos. En algunos casos también se ha estudiado la edad de debut mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, considerando el período de supervivencia como el tiempo que el individuo permanece libre de la enfermedad (desde el nacimiento hasta el diagnóstico de DT1). Dichos análisis, así como el cálculo de los distintos estadísticos de la muestra y sus estratos, se realizaron con el paquete estadístico SPSS v.15.0 (Chicago, Illinois, USA).

En aquellos genes o regiones génicas en los que se han estudiado varios polimorfismos en desequilibrio de ligamiento, se ha analizado la distribución de los haplotipos formados por dichos polimorfismos. Los haplotipos se han estimado mediante el algoritmo Expectación-Maximización implementado en el programa Haploview v4.0.

En algunos casos se ha realizado un análisis de la homogeneidad de nuestra población con las poblaciones de estudios ya publicados. Este análisis se ha llevado a cabo mediante el test de homogeneidad y el estadístico  $I^2$  incluidos en el programa Review Manager 5.0 (Copenhague: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2008). Según este test se considera que las poblaciones analizadas son heterogéneas cuando el valor  $p$  es inferior a 0.10 y el valor del estadístico  $I^2$  superior a 60-65%. También se ha realizado meta-análisis con datos de otras poblaciones mediante la evaluación de la homogeneidad de las muestras en estudio y el análisis conjunto de las poblaciones seleccionadas con el test de Mantel-Haenzel, implementados ambos en el programa Review Manager 5.0 (Copenhague: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2008).



# Resultados y discusión



# Análisis de asociaciones descritas en la era pre-GWAS

En este capítulo incluimos el estudio de genes clásicos de susceptibilidad a DT1. En la mayoría de los casos la asociación a la enfermedad ya está consolidada, pero consideramos que su estudio en nuestra población es interesante por las siguientes razones:

→ El estudio de estos genes nos permite evaluar el trasfondo genético clásico de la DT1 en nuestra población y compararlo al de otras poblaciones más estudiadas, como las norte-europeas. Esto es especialmente interesante en la susceptibilidad conferida por los genes HLA, que presentan una variabilidad geográfica más acusada que otros genes.

→ El estudio del gen *INS*, uno de los pocos que están asociados únicamente a DT1, nos permite aportar pruebas de que nuestra población de debut adulto está formada por individuos con un trasfondo genético característico de la DT1, y que no incluye individuos diagnosticados incorrectamente.

→ La influencia de los genes clásicos de susceptibilidad en la edad de diagnóstico de la DT1 se ha estudiado poco. Nuestra población contiene un 50% de pacientes con debut adulto y, por tanto, ofrece la oportunidad de estudiar estas asociaciones en una muestra con un margen de edades más amplio que muchos estudios realizados hasta la fecha.

|  |           |
|--|-----------|
| Región 6p21 ( <i>HLA</i> )   | 1974      |
| Región 11p15 ( <i>INS</i> )  | 1984      |
| Región 2q33 ( <i>CTLA4</i> )   | 1996      |
| Regiones 4q27, 10p15 y 22q13<br>( <i>IL2</i> , <i>IL2RA</i> e <i>IL2RB</i> ) | 2005-2007 |



## Región 6p21 (genes HLA)

Primer estudio en DT1: Nerup *et al* (1974)<sup>28</sup>

### Replicación de genes candidatos

El complejo HLA es la región cromosómica con una mayor asociación a la DT1, suponiendo el 50% de la carga genética total de la enfermedad<sup>25</sup>. El efecto de los principales haplotipos de susceptibilidad (*DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* y *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*) y protección (*DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02*) descritos para la enfermedad<sup>31</sup> se replica en nuestra muestra (tabla 8).

Tabla 8.- Estudio de los principales haplotipos clásicos que confieren susceptibilidad o protección a DT1. Se presentan las diferentes combinaciones ordenadas por riesgo (medido como *odds ratio*) decreciente.

| GENOTIPO   | DT1<br>(n=442) | Controles<br>(n=618) | p                     | OR                 |
|--|----------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| Homocigoto <i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i>                              | 23 (5.2%)      | 1 (0.2%)             | 1.0x10 <sup>-7</sup>  | 33.92 (5.45-1399)  |
| Homocigoto <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i>                              | 63 (14.3%)     | 9 (1.5%)             | 3.0x10 <sup>-16</sup> | 11.27 (5.34-24.57) |
| <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i><br><i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i> | 111 (24.9%)    | 19 (3.1%)            | 3.6x10 <sup>-27</sup> | 10.59 (6.24-18.15) |
| <i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i> – X (no DR3)                            | 113 (25.1%)    | 76 (12.3%)           | 2.5x10 <sup>-8</sup>  | 2.45 (1.76-3.43)   |
| <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i> – X (no DR4)                            | 163 (36.9%)    | 135 (21.8%)          | 7.3x10 <sup>-8</sup>  | 2.09 (1.58-2.77)   |
| <i>DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02</i> – X                                  | 3 (0.7%)       | 112 (18.1%)          | 2.3x10 <sup>-19</sup> | 0.03 (0.01-0.09)   |

Los haplotipos de riesgo en diferentes combinaciones están presentes aproximadamente en el 90% de los enfermos de DT1 frente al 38% en controles sanos (OR=13.20 [9.29-18.79], p=1.5x10<sup>-62</sup>). En este estudio, nos proponemos analizar el resto de pacientes que no portan los principales haplotipos de susceptibilidad/protección (*DRB\*03*, *DRB1\*04* y *DRB1\*15:01*), en busca de otros alelos en el HLA que puedan estar asociados a la DT1. Este estudio supone una ampliación de un trabajo anterior de nuestro grupo<sup>30</sup> en el que se analizaban haplotipos diferentes a los clásicos que hemos detallado en la tabla 8. Desde la publicación de dicho artículo en el año 2005, se ha aumentando el subgrupo de pacientes sin alelos clásicos de susceptibilidad en el HLA de 29 a 49 individuos. Por tanto, resulta interesante reanalizar de nuevo los datos para determinar si las asociaciones descritas anteriormente se fortalecen con un aumento en el tamaño de muestra.

Por otro lado, estudiamos la influencia de los haplotipos de susceptibilidad y protección clásicos en la edad de debut de la enfermedad.

- *Estudio de haplotipos no clásicos dentro del HLA:*

En la bibliografía se han descrito asociaciones a DT1 en alelos del HLA diferentes a los clásicos asociados a la enfermedad. Estos haplotipos tienen principalmente efecto protector, como sería el caso del DR7 o el DR5 (*DRB1\*11*)<sup>22,31,146</sup>. En nuestro estudio, seleccionamos la población negativa para los haplotipos de susceptibilidad y protección clásicos, y analizamos el efecto de los alelos del gen *DRB1*, de algunos haplotipos de clase II enteros y de haplotipos *DQA1-DQB1* descritos anteriormente en otros trabajos. Se pueden consultar todos los resultados en la tabla 2.

El alelo *DRB1\*01* se encuentra elevado en pacientes de DT1 con respecto a controles (tabla 9). Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en población europea, el alelo *DRB1\*01* siempre forma haplotipo con los alelos *DQA1\*01:01-DQB1\*05:01*, al igual que el alelo *DRB1\*10*. El haplotipo *DQA1\*01:01-DQB1\*05:01* se ha descrito anteriormente como un haplotipo que confiere susceptibilidad moderada<sup>31</sup>. En este estudio, replicamos esta asociación y observamos una asociación parecida en el gen *DRB1\*01*, que se debe a que prácticamente todos los haplotipos que incluyen *DQA1\*01:01-DQB1\*05:01* llevan el alelo *DRB1\*01*. No tenemos potencia suficiente para dilucidar si los genes *DRB1\*01* y *DRB1\*10* influyen en la susceptibilidad que confiere el haplotipo *DQA1\*01:01-DQB1\*05:01*, pero observamos que el efecto de susceptibilidad de este haplotipo, que ya habíamos encontrado en nuestro primer estudio<sup>30</sup>, se mantiene con el aumento del tamaño de muestra.

En publicaciones previas, algunos autores sugieren un posible efecto protector del haplotipo *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:01*<sup>25</sup>. En nuestro grupo de enfermos no observamos efecto protector, sino un aumento de dicho haplotipo en enfermos con respecto a controles (tabla 9). Sin embargo, la significación no soporta la corrección estadística requerida a un resultado nuevo. Sería interesante ampliar el tamaño de muestra para confirmar esta asociación.

El alelo DR6 se subdivide en los alelos *DRB1\*13* y *DRB1\*14*. Previamente se ha descrito el efecto protector en DT1 de los haplotipos *DRB1\*13-DQA1\*01:03-DQB1\*06:03* y *DRB1\*14-DQA1\*01:01-DQB1\*05:03*<sup>31,147</sup>. En nuestro estudio analizaremos el alelo DR6, puesto que la técnica empleada en el genotipado del gen *DRB1* no nos permite discriminar entre los alelos *DRB1\*13* y *DRB1\*14*. En el análisis del gen *DRB1* encontramos que DR6 está disminuido en enfermos de DT1 con respecto a controles (22.4% frente a 42.3%, OR=0.35 [0.16-0.76]; p=0.004). Ahora bien, el alelo DR6 forma varios haplotipos con los genes *DQA1* y *DQB1*. Por tanto, estudiamos aisladamente algunos de estos haplotipos para comprobar si la asociación que encontramos se debe al alelo DR6 o a un haplotipo concreto formado por este alelo. De los cinco haplotipos estudiados, encontramos cuatro con efecto protector (tabla 9), y en el análisis conjunto de todos ellos observamos un efecto similar al encontrado en el análisis general del alelo DR6 (OR=0.30 [0.12-0.69]; p=0.002). Sería interesante aumentar el tamaño de muestra para poder estudiar cada uno de estos haplotipos de protección y el haplotipo de susceptibilidad por separado con una potencia estadística adecuada.

Tabla 9.- Estudio de haplotipos no clásicos de susceptibilidad y protección en pacientes DT1 y controles negativos para los haplotipos clásicos (DR3-DR4-DRB1\*15:01).

| HAPLOTIPO  | DT1 No DR3, no DR4,<br>no DRB1*15:01<br>(n=49) |        | CONTROLES No DR3,<br>no DR4, no DRB1*15:01<br>(n=296) |        | p      | OR                |
|--|--|--------|---|--------|--------|-------------------|
|  | Presente (%)                                   |        | Presente (%)  |        |        |                   |
|  | <b>DRB1*01</b>                                 | 23     | (46.9)  | 83     |        |                   |
| <b>DQA1*01:01-DQB1*05:01</b><br><small>Forma haplotipos con DRB1*01 y DRB1*10</small>                            | 24   | (49.0) | 89  | (30.1) | 0.009  | 2.23 (1.16-4.30)  |
| <b>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:01</b>   | 7  | (14.3) | 17  | (5.7)  | 0.04   | 2.74 (0.96-7.55)  |
| <b>DR6 (DRB1*13 y DRB1*14)</b>   | 10   | (22.4) | 125   | (42.3) | 0.004  | 0.35 (0.16-0.76)  |
| <b>DQA1*01:01-DQB1*05:03</b>   | 1  | (2.0)  | 19  | (6.4)  | 0.2    | 0.30 (0.01-2.21)  |
| <b>DQA1*01:02-DQB1*06:02</b>   | 4  | (8.2)  | 8   | (2.7)  | 0.07   | 3.20 (0.77-12.38) |
| <b>DR6 DQA1*01:02-DQB1*06:04</b>   | 3  | (6.1)  | 21  | (7.1)  | 0.5    | 0.85 (0.19-3.19)  |
| <b>DQA1*01:03-DQB1*06:03</b>   | 2  | (4.1)  | 49  | (16.6) | 0.02   | 0.21 (0.02-0.87)  |
| <b>DQA1*05:01-DQB1*03:01</b>   | 2  | (4.1)  | 28  | (9.5)  | 0.2    | 0.41 (0.05-1.71)  |
| <b>DRB1*07</b>   | 31   | (63.3) | 123   | (41.6) | 0.005  | 2.42 (1.24-4.75)  |
| <b>DRB1*07 DQA1*02:01-DQB1*02:02</b>   | 30   | (61.2) | 103   | (34.8) | 0.0004 | 2.96 (1.52-5.78)  |
| <b>DQA1*02:01-DQB1*03:03</b>   | 1  | (2.0)  | 25  | (8.4)  | 0.09   | 0.23 (0.01-1.45)  |
| <b>DRB1*08-DQA1*04:01-DQB1*04:02</b><br><small>Único haplotipo formado por DRB1*08 en población española</small> | 7  | (14.3) | 23  | (7.8)  | 0.1    | 1.98 (0.72-5.24)  |
| <b>DRB1*10</b>   | 1  | (2.0)  | 6   | (2.0)  | 0.7    | 1.01 (0.02-8.58)  |
| <b>DRB1*11-DQA1*05:01-DQB1*03:01</b><br><small>Único haplotipo formado por DRB1*11 en población española</small> | 9  | (16.3) | 91  | (30.7) | 0.08   | 0.51 (0.22-1.14)  |
| <b>DQA1*05:01- DQB1*03:01</b><br><small>Forma haplotipos con DR6 y DRB1*11</small>                               | 11   | (22.5) | 129   | (43.6) | 0.005  | 0.37 (0.17-0.80)  |

En el caso del alelo *DRB1\*07*, en DT1 se ha descrito el efecto protector del haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*03:03*<sup>31,147</sup>. En nuestro estudio analizamos el alelo *DRB1\*07* y los dos haplotipos que forma en población española (tabla 9). En el análisis del alelo *DRB1\*07*, observamos un aumento de la frecuencia en enfermos con respecto a controles. Si estudiamos la distribución de los dos haplotipos que incluyen *DRB1\*07*, podemos comprobar que esta alta frecuencia se debe a un claro aumento del haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* (DT1: 61.2%, controles: 34.8%; OR=2.96 [1.52-5.78]; p=0.0004). Este haplotipo se ha descrito en algunas publicaciones con un débil efecto protector<sup>31,148</sup>, y en otras como un haplotipo neutral sin asociación a la enfermedad<sup>147</sup>. En nuestro estudio previo<sup>30</sup>, observábamos que el haplotipo *DQA1\*02:01-DQB1\*02:02*, que en población europea siempre forma haplotipos con *DRB1\*07*, se encontraba aumentado en enfermos con respecto a controles (OR=2.35; p=0.03). Con el aumento de pacientes que supone el presente estudio, observamos un claro efecto de susceptibilidad para los portadores del haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* que soporta la corrección estadística requerida a un nuevo hallazgo ( $p_c=0.0064$ ). En uno de los últimos estudios que ha abordado la susceptibilidad conferida por los alelos HLA en DT1 en población caucásica<sup>25</sup>, los autores encuentran un efecto protector a DT1 en el haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* (OR=0.58 [0.38-0.87]; p=0.015) cuando eliminan de la población de análisis nueve haplotipos de protección y susceptibilidad, entre los que se incluyen *DRB1\*03*, *DRB1\*04*, *DRB1\*15:01*, los haplotipos formados por DR6 y *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*03:03*. En nuestro estudio encontramos que el haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* confiere susceptibilidad en población española cuando eliminamos los haplotipos de protección y susceptibilidad más frecuentes (*DRB1\*15:01*, *DRB1\*03* y *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*). En cuanto al haplotipo descrito con mayor frecuencia como protector (*DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*03:03*), encontramos una disminución de la frecuencia en enfermos con respecto a controles que no llega a ser significativa, probablemente por falta de potencia del estudio.

En población europea, el alelo *DRB1\*08* forma haplotipo con los alelos *DQA1\*04:01-DQB1\*04:02*<sup>149</sup>. Dicho haplotipo se ha descrito previamente asociado a susceptibilidad moderada a DT1<sup>31,150</sup>. El análisis en nuestro estudio no llega a ser estadísticamente significativo, probablemente por falta de potencia, pero podemos observar un aumento de la frecuencia de *DRB1\*08-DQA1\*04:01-DQB1\*04:02* en enfermos con respecto a controles (14.3% frente a 7.8%, OR=1.98 [0.72-5.24]).

El haplotipo *DRB1\*11-DQA1\*05:01-DQB1\*03:01* se ha asociado previamente a protección moderada a DT1<sup>31,151</sup>. En población española, este haplotipo es prácticamente el único que incluye al gen *DRB1\*11*<sup>149</sup>. Observamos una disminución de la frecuencia de dicho haplotipo en enfermos con respecto a controles (16.3% frente a 30.7%, OR=0.51 [0.22-1.14]) pero esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa.

Por último, analizamos la distribución del haplotipo *DQA1\*05:01-DQB1\*03:01*, combinación que ya encontrábamos en nuestro estudio anterior con un efecto protector<sup>30</sup>. Este haplotipo puede aparecer en combinación con *DRB1\*11* (DR5) o con *DRB1\*13* (DR6). Anteriormente se ha descrito el efecto protector de DR5<sup>151</sup> (que incluye *DRB1\*11* y *DRB1\*12*), que en población europea siempre forma haplotipos con *DQA1\*05:01-DQB1\*03:01*<sup>149</sup>, y del haplotipo *DQA1\*05:01-DQB1\*03:01* en todas sus combinaciones (*DRB1\*11*, *DRB1\*12* y *DRB1\*13*)<sup>147</sup>. En nuestro estudio replicamos el efecto protector conferido por el haplotipo *DQA1\*05:01-DQB1\*03:01* (OR=0.37 [0.17-0.80]; p=0.005), que es más claro que los efectos de los haplotipos que *DQA1\*05:01-DQB1\*03:01* forma con *DRB1\*11* y DR6. Por tanto, en este caso parece que el efecto protector viene conferido por el haplotipo *DQA1-DQB1*.

En conclusión, en nuestro análisis de la susceptibilidad conferida por los genes HLA en pacientes DR3-DR4-*DRB1\*15:01* negativos, replicamos una serie de asociaciones descritas previamente y encontramos un efecto de susceptibilidad del haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* claramente significativo, aportando una prueba más de que este haplotipo confiere susceptibilidad a DT1 en población española.

#### - Estudio de la edad de debut en función de los haplotipos HLA clásicos:

La influencia de la carga genética en la edad de debut de la DT1 es algo que en general se ha estudiado poco, y el HLA no es una excepción. En un análisis realizado por Butty *et al*<sup>26</sup> sobre la progresión a DT1 de individuos con un pariente afectado, los autores observan que aquellos parientes en primer grado que portan el alelo *DQB1\*03:02* (mayoritario en haplotipos *DRB1\*04* en población caucásica) progresan a una edad más temprana que los que portan otros alelos. En otro estudio, Leslie *et al* recopilan varios trabajos que comparan la genética de la DT1 de debut temprano y de debut adulto<sup>152</sup>. Por un lado, describen que el heterocigoto *DRB1\*03 / DRB1\*04-DQB1\*03:02* es más frecuente en pacientes con debut pediátrico que en pacientes con debut adulto, y que, por tanto, parece estar relacionado con un debut más precoz de la enfermedad. Por otro lado, encuentran que el principal haplotipo de protección en DT1 (*DRB1\*15:01-DQB1\*06:02*) es más frecuente en pacientes con debut adulto que en pacientes pediátricos. Con estos antecedentes, nos proponemos estudiar la asociación de las siguientes combinaciones en el HLA con la edad de debut de la enfermedad: el heterocigoto de mayor riesgo *DRB1\*03 / DRB1\*04-DQB1\*03:02*, los homocigotos para *DRB1\*03* y *DRB1\*04-DQB1\*03:02*, individuos que portan al menos uno de los haplotipos de riesgo (*DRB1\*03* o *DRB1\*04-DQB1\*03:02*), individuos que portan el haplotipo ancestral de riesgo 18.2 (*B\*18-DRB1\*03*) e individuos que portan el haplotipo de protección *DRB1\*15:01-DQB1\*06:02*.

Mediante el análisis continuo de la edad de debut no encontramos diferencias significativas entre aquellos individuos que portan los haplotipos, genes o genotipos seleccionados y los que no los portan (tabla 10).

Tabla 10.- Análisis de la edad de debut como variable continua en distintas combinaciones de haplotipos de susceptibilidad y protección a DT1. Se presenta la p resultante del test U de Mann-Whitney en todas las comparaciones. En el análisis del haplotipo ancestral 18.2, la población total (281 individuos) es menor puesto que no contamos con el genotipado que nos permita distinguir los haplotipos ancestrales en los individuos incorporados más recientemente a la muestra.

| <b>GENOTIPO</b>  | <b>Efecto descrito</b> | <b>N=410</b> | <b>p</b> |
|--|------------------------|--------------|----------|
| <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i><br><i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i> | Susceptibilidad        | 106          | 0.951    |
| Homocigoto <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i>                              | Susceptibilidad        | 80           | 0.232    |
| Homocigoto <i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i>                              | Susceptibilidad        | 26           | 0.155    |
| <i>DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i> – X                                     | Susceptibilidad        | 255          | 0.853    |
| <i>DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02</i> – X                                     | Susceptibilidad        | 204          | 0.629    |
| Haplotipo ancestral 18.2 ( <i>B*18-DRB1*03-DQB1*02:01</i> )                  | Susceptibilidad        | 64 (n=281)   | 0.626    |
| <i>DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02</i> – X                                  | Protección             | 3            | 0.169    |

En nuestro estudio en población española no encontramos asociación del heterocigoto de riesgo a un debut más temprano de la DT1. Esto puede deberse a una falta de potencia para ver dicha diferencia, aunque es poco probable puesto que nuestra muestra tiene el tamaño suficiente para detectar los grandes efectos asociados al HLA. Por ejemplo, en el caso del heterocigoto *DRB1\*03 / DRB1\*04-DQB1\*03:02*, tenemos una potencia superior al 80% para detectar ORs por encima de 2.42. Como se puede observar en la tabla 8, en la que resumíamos las principales asociaciones en el HLA, la mayor parte de dichas asociaciones tienen un efecto considerablemente mayor a 2.42. Por tanto, es poco probable que, en el caso de los haplotipos más frecuentes, la falta de asociación con la edad de debut se deba a una falta de potencia. Existe otra posibilidad que explique esta discordancia entre nuestro resultado y los estudios previos: las diferencias poblacionales. El heterocigoto de riesgo está considerado como el genotipo que confiere mayor riesgo a DT1 en varias poblaciones. Sin embargo, en nuestra población el heterocigoto *DRB1\*03 / DRB1\*04-DQB1\*03:02* es la tercera combinación en riesgo conferido entre las que hemos estudiado, por detrás de los homocigotos para *DRB1\*04-DQB1\*03:02* y para *DRB1\*03*. Por esta misma razón, en nuestra población se puede apreciar el riesgo aumentado que confiere el haplotipo ancestral 18.2, un haplotipo altamente conservado que se extiende entre los genes HLA-B y HLA-DQ que contiene *DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*. Este haplotipo confiere un riesgo a padecer DT1 mayor que otros haplotipos que contienen el gen *DRB1\*03*, por ello lo incluimos en el análisis y analizamos si puede estar asociado a un debut más temprano de la enfermedad. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas.

En el caso del haplotipo de protección *DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02* tampoco observamos el efecto descrito previamente (asociación a un debut más tardío de la enfermedad), pero en este caso puede deberse a falta de potencia. Debido al fuerte efecto protector del haplotipo *DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02*

solo encontramos tres individuos que contengan este haplotipo dentro de los 410 que cuentan con tipaje HLA y dato de edad de debut, un número muy escaso para extraer conclusiones estadísticamente significativas.



## Región 11p15 (gen *INS*)

Primer estudio en DT1: Bell *et al* (1984)<sup>36</sup>

### Replicación de gen candidato

El gen *INS* constituye una de las primeras asociaciones genéticas encontradas en DT1<sup>36</sup>. El polimorfismo responsable de dicha asociación es un VNTR (*variable number of tandem repeats*) localizado en la región 5' del gen que influye en los niveles de transcripción de insulina en el timo<sup>104</sup>. Hay varios SNPs que sirven de sustitutos para determinar si un individuo tiene alelos de protección o de susceptibilidad en el VNTR cercano al gen. Por la mayor facilidad de genotipado de los SNPs frente al VNTR, la utilización de estos últimos para analizar la asociación del gen *INS* a DT1 se ha impuesto en la última década al análisis directo del VNTR. Nosotros hemos seleccionado el polimorfismo rs689, que es uno de los más utilizados para sustituir el tipaje del VNTR<sup>13,26,79</sup>. En este SNP, el alelo mayoritario A se corresponde con los alelos de clase I (cortos, susceptibilidad) del VNTR mientras que el alelo T se corresponde con los alelos de clase III (largos, protección)<sup>105</sup>.

En el caso-control general replicamos la asociación del alelo minoritario T con DT1. En la estratificación por edad no observamos diferencias significativas entre pacientes pediátricos y adultos (tabla 11). Si comparamos ambas poblaciones con controles, observamos que la asociación se mantiene tanto en la población con debut pediátrico (OR=0.49 [0.36-0.66];  $p=1.1 \times 10^{-6}$ ) como en la población con debut adulto (OR=0.55 [0.41-0.74];  $p=3.9 \times 10^{-5}$ ).

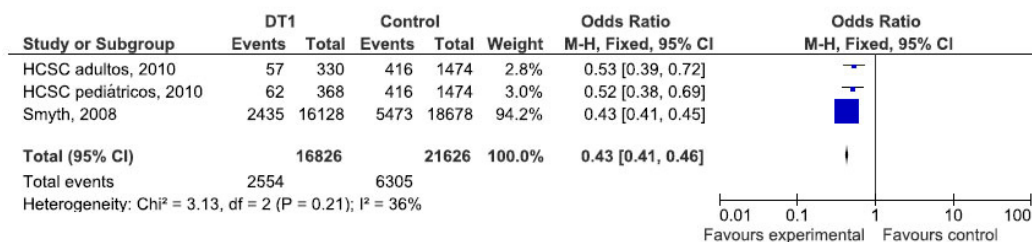
Tabla 11.- Frecuencias genotípicas y alélicas del rs689 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs689     | DT1 |      | Controles |      | p                    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|-----|------|-----------|------|----------------------|------------------|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n   | %    | n         | %    |                      |                  | n           | %    | n           | %    |     |
| <b>AA</b> | 291 | 69.8 | 382       | 51.8 | $2.8 \times 10^{-9}$ | 2.15 (1.65-2.79) | 144         | 72.7 | 128         | 68.8 | 0.4 |
| <b>AT</b> | 106 | 25.4 | 294       | 39.9 | $7.0 \times 10^{-7}$ | 0.51 (0.39-0.68) | 44          | 22.2 | 50          | 26.9 | 0.3 |
| <b>TT</b> | 20  | 4.8  | 61        | 8.3  | 0.03                 | 0.56 (0.32-0.96) | 10          | 5.1  | 8           | 4.3  | 0.7 |
| <b>A</b>  | 688 | 82.5 | 1058      | 71.8 | $8.3 \times 10^{-9}$ | 0.54 (0.43-0.67) | 332         | 83.8 | 306         | 82.3 | 0.6 |
| <b>T</b>  | 146 | 17.5 | 416       | 28.2 |                      |                  | 64          | 16.2 | 66          | 17.7 |     |

Además de ser uno de los primeros genes relacionados con la susceptibilidad genética a DT1, el gen *INS* tiene la peculiaridad de estar asociado exclusivamente a esta enfermedad, a diferencia de gran parte de las asociaciones descritas posteriormente que son comunes a otras enfermedades autoinmunes<sup>13,153</sup>. En estudios previos, se ha visto que los polimorfismos en *INS* confieren susceptibilidad en todas las poblaciones, aunque su efecto en algunas sea difícil de analizar por la baja frecuencia de los alelos de protección de clase III<sup>154,155</sup>. Por otro lado, varios estudios han analizado la asociación de estos polimorfismos con DT2 y, aunque los resultados son controvertidos, dichos estudios siempre han encontrado falta de asociación a DT2<sup>156,157</sup>

o una asociación en sentido contrario a la encontrada en DT1, en la cual los alelos de clase III protectores para DT1 confieren susceptibilidad a DT2, especialmente cuando son heredados por vía paterna<sup>158,159</sup>. Por tanto, la posible asociación que pudiera existir entre *INS* y la DT2 es sustancialmente diferente a la que se observa en DT1. Por esta razón, su estudio en una población de pacientes DT1 es siempre interesante, aunque se trate de una asociación confirmada. En nuestro estudio contamos con un 50% de pacientes con un comienzo de la enfermedad posterior a los 17 años de edad, entre los que encontramos algunos pacientes con una edad de debut que sobrepasa los 50 años. La mayor crítica a la que se enfrentan los estudios con pacientes DT1 de debut adulto es la posibilidad de contaminar la muestra con pacientes mal diagnosticados<sup>35</sup>. En la estratificación por edad de nuestros pacientes se puede observar que el alelo minoritario del rs689 confiere la misma protección en pacientes pediátricos y adultos. Además, realizamos un estudio de heterogeneidad con los datos del estudio de Smyth *et al*<sup>13</sup> en población pediátrica y observamos que tanto nuestros pacientes pediátricos como adultos son homogéneos con la población pediátrica del estudio británico (figura 3).

Figura 4.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias de alelo minoritario T del rs689 en nuestras poblaciones pediátrica y adulta, y en Smyth *et al* (2008, población pediátrica).



A la luz de nuestros resultados, podemos concluir que la asociación de *INS* a la DT1 es independiente de la edad de debut de la misma, y que, precisamente por ello, dicho gen es un buen marcador para determinar si una población de debut adulto está contaminada con pacientes DT2, en cuyo caso observaríamos una asociación de menor magnitud (o una falta completa de asociación) en el grupo adulto. Sin embargo, cabe resaltar que un estudio reciente ha encontrado un efecto de *INS* sobre la edad de debut de la DT1<sup>82</sup>. Los autores estudian la asociación de varios polimorfismos con la enfermedad en un grupo de 2300 familias con un miembro afectado. La edad media de los pacientes es de 10 años, con un mínimo y un máximo de 0 y 58 años. Por tanto, este estudio incluye población adulta, pero el grueso de sus pacientes tiene un debut pediátrico, según nos indica la media de la población. Los autores observan que el alelo de protección del polimorfismo rs689 está asociado a un retraso en el debut de la enfermedad de dos años con respecto al alelo de susceptibilidad. En nuestra población, además de realizar la estratificación por edad, analizamos la edad de debut como variable continua y no encontramos diferencias

significativas entre los pacientes que portan los alelos de susceptibilidad o protección (alelo A=  $19.31 \pm 11.8$ ; alelo T=  $18.0 \pm 10.7$ ;  $p=0.434$ ). Esto puede deberse a que el efecto sobre la edad de debut sea pequeño y nuestro estudio no tenga potencia para discriminar dicha diferencia, o bien a que dicho efecto esté sujeto a diferencias poblacionales o incluso que se trate de un falso positivo, para lo cual sería interesante realizar estudios de replicación del trabajo original de Howson *et al*<sup>82</sup>.



## Región 2q33 (gen CTLA4)

Primera asociación con DT1: Nistico *et al* (1996)<sup>37</sup>

### Replicación de gen candidato

La región 2q33, en la que se encuentra el gen *CTLA4*, es una región con varios genes de interés inmunológico. El gen *CTLA4* está flanqueado por *CD28*, que codifica su molécula antagonista, y por *ICOS* (*inducible co-stimulator*), una molécula coestimuladora de linfocitos T. Los tres genes son buenos candidatos a participar en la patogenia de enfermedades autoinmunes por su papel en la regulación de la activación de los linfocitos T. Se han estudiado varios polimorfismos en estos genes, pero solo se ha encontrado asociación a DT1 en polimorfismos situados en un bloque de desequilibrio de ligamiento que incluye *CTLA4* y el extremo 5' de *ICOS*<sup>58</sup>. En DT1, hasta el momento todos los estudios apuntan a *CTLA4* como el gen causante de la asociación de esta región, puesto que los estudios funcionales muestran una influencia de los polimorfismos estudiados en la expresión y función de *CTLA4*, pero no de *ICOS*<sup>58,160,161</sup>.

Para nuestro estudio, hemos seleccionado tres polimorfismos previamente estudiados en DT1 y con repercusiones funcionales sobre la proteína. El que tiene un mayor efecto es rs3087243<sup>58,161</sup>. Situado en el extremo 3' de *CTLA4* (posición +6230), se ha visto que el alelo minoritario está relacionado con la presencia de niveles más altos de una forma soluble de *CTLA4*<sup>161</sup> generada por *splicing* alternativo, y se cree que dicho polimorfismo determina una mayor frecuencia de este proceso de *splicing* alternativo. Esto provoca que los individuos que portan el alelo de protección en rs3087243 generen mayores cantidades de *CTLA4* soluble, algo que se relaciona con un mejor control de la respuesta inmunitaria. El segundo SNP seleccionado, rs231775, es el único polimorfismo no sinónimo encontrado en la región<sup>58</sup>. El alelo de susceptibilidad G produce un cambio aminoacídico (Thr → Ala) que rompe un lugar de glicosilación de la proteína. En experimentos *in vitro* se ha visto que esta alteración produce una disminución de la expresión en membrana de *CTLA-4*<sup>162</sup>. Por último, el polimorfismo rs5742909 se encuentra situado en la posición -318 del promotor e influye en los niveles de expresión de la proteína<sup>160</sup>. Además, un estudio señala la presencia de un haplotipo de susceptibilidad formado por el polimorfismo -318 y el polimorfismo +6230<sup>161</sup>. Por lo tanto, seleccionamos los tres polimorfismos para replicar los estudios previos y analizar la influencia de los mismos en la edad de debut de la enfermedad.

En el análisis de los polimorfismos por separado (tabla 12) encontramos un efecto protector del alelo minoritario del polimorfismo rs3087243 con una asociación nominal ( $p=0.05$ ). Observamos también un aumento en la frecuencia del alelo minoritario en el polimorfismo rs231775, pero dicho aumento no llega a ser significativo. Las frecuencias del polimorfismo rs5742909 en pacientes de DT1 y controles no presentan diferencias.

En la estratificación por edad no encontramos diferencias significativas en ninguno de los tres polimorfismos.

Tabla 12- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs5742909, rs231775 y rs3087243 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs5742909 | DT1 |      | Controles |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|-----|------|-----------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n   | %    | n         | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
| <b>CC</b> | 354 | 81.8 | 696       | 83.1 | 0.6 | -- | 157         | 80.1 | 160         | 83.3 | 0.4 |
| <b>CT</b> | 76  | 17.6 | 130       | 15.5 | 0.3 | -- | 38          | 19.4 | 30          | 15.6 | 0.3 |
| <b>TT</b> | 3   | 0.7  | 12        | 1.4  | 0.2 | -- | 1           | 0.5  | 2           | 1.1  | 0.6 |
| <b>C</b>  | 784 | 90.5 | 1522      | 90.8 | 0.8 | -- | 352         | 89.8 | 350         | 91.1 | 0.5 |
| <b>T</b>  | 82  | 9.5  | 154       | 9.2  |     |    | 40          | 10.2 | 34          | 8.9  |     |

| rs231775  | n         | %    | n    | %    | p    | OR               | n   | %    | n   | %    | p   |
|-----------|-----------|------|------|------|------|------------------|-----|------|-----|------|-----|
|           | <b>GG</b> | 202  | 46.1 | 424  | 49.2 |                  | 0.3 | --   | 98  | 47.6 | 89  |
| <b>GT</b> | 185       | 42.2 | 359  | 41.7 | 0.9  | --               | 83  | 40.3 | 85  | 42.7 | 0.6 |
| <b>TT</b> | 51        | 11.6 | 78   | 9.1  | 0.1  | --               | 25  | 12.1 | 25  | 12.6 | 0.9 |
| <b>G</b>  | 589       | 67.2 | 1207 | 70.1 | 0.1  | 1.14 (0.96-1.37) | 279 | 67.7 | 263 | 66.1 | 0.6 |
| <b>T</b>  | 287       | 32.8 | 515  | 29.9 |      |                  | 133 | 32.3 | 135 | 33.9 |     |

| rs3087243 | n         | %    | n    | %    | p    | OR               | n   | %    | n   | %    | p   |
|-----------|-----------|------|------|------|------|------------------|-----|------|-----|------|-----|
|           | <b>GG</b> | 121  | 28.4 | 205  | 23.9 |                  | 0.1 | --   | 54  | 26.9 | 61  |
| <b>GA</b> | 204       | 47.9 | 418  | 48.7 | 0.8  | --               | 96  | 47.8 | 90  | 46.6 | 0.8 |
| <b>AA</b> | 101       | 23.7 | 236  | 23.9 | 0.08 | 0.82 (0.62-1.08) | 51  | 25.4 | 42  | 21.8 | 0.3 |
| <b>G</b>  | 446       | 52.3 | 828  | 48.2 | 0.05 | 0.85 (0.72-1.00) | 204 | 50.7 | 212 | 54.9 | 0.2 |
| <b>A</b>  | 406       | 47.7 | 890  | 51.8 |      |                  | 198 | 49.3 | 174 | 45.1 |     |

Estudiamos también los haplotipos formados, por un lado, por los tres polimorfismos estudiados y, por otro lado, únicamente por los polimorfismos rs5742909 (promotor) y rs3087243 (3' UTR), para estudiar el posible efecto combinado de los polimorfismos en las regiones 3' y 5' de CTLA4<sup>161</sup> (tabla 13). En todos los análisis encontramos un haplotipo que presenta asociación o tendencia a la asociación. Sin embargo, dicho haplotipo es el único que contiene el alelo mayoritario del rs3087243, de modo que estamos viendo el efecto de dicho alelo (o de su contrario, en el caso del segundo haplotipo más frecuente formado por rs5742909 y rs3087243) y no un efecto haplotípico. Por tanto, no observamos un efecto diferente al que encontramos en el análisis de los polimorfismos aislados.

Tabla 13.- Frecuencias de los haplotipos formados por los polimorfismos rs5742909, rs231775 y rs3087243 en pacientes de DT1 y controles.

| rs5742909 | rs231775 | rs3087243 | DT1        |            | Controles  |            | OR (CI)          | p     |
|-----------|----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------------|-------|
|           |          |           | Frecuencia | Haplotipos | Frecuencia | Haplotipos |                  |       |
|           |          |           | C          | G          | A          | 0.477      | 397              | 0.517 |
| C         | T        | G         | 0.327      | 272        | 0.301      | 358        | 1.13 (0.93-1.37) | 0.22  |
| C         | G        | G         | 0.101      | 84         | 0.097      | 115        | 1.05 (0.77-1.42) | 0.76  |
| T         | T        | G         | 0.095      | 79         | 0.081      | 96         | 1.19 (0.86-1.65) | 0.27  |
| C         | A        |           | 0.475      | 400        | 0.518      | 804        | 0.84 (0.71-1.00) | 0.05  |
| C         | G        |           | 0.430      | 362        | 0.389      | 603        | 1.19 (1.00-1.41) | 0.05  |
| T         | G        |           | 0.094      | 79         | 0.091      | 141        | 1.04 (0.77-1.40) | 0.78  |

Varios polimorfismos en la región cromosómica que comprende *CTLA4* se han asociado a distintas enfermedades autoinmunes como LES<sup>163,164</sup>, AR<sup>165</sup>, EC<sup>13</sup>, HA y EGr<sup>58,166</sup>. En los estudios disponibles hasta el momento se puede observar que la magnitud de la asociación varía de una enfermedad a otra. En el caso de DT1, uno de los polimorfismos más asociado en los distintos estudios es el rs3087243<sup>35,49,58,62,161</sup>, localizado en el extremo 3'UTR y el único que encontramos asociado en nuestro estudio. Este mismo polimorfismo, que se ha descrito asociado a EC con un efecto similar al observado en DT1 (OR=1.15<sup>58</sup>), en EGr presenta una asociación notablemente mayor (OR=1.45<sup>58</sup>). La mayor parte de los estudios sobre esta región en DT1 coinciden en que la asociación con la enfermedad es de pequeña magnitud (OR<1.20<sup>58,167,168</sup>). Nuestro estudio tiene menos del 57% de potencia para ver un efecto de este tipo en cualquiera de los SNPs analizados en la región, lo cual justifica que observemos diferencias en las frecuencias alélicas de los polimorfismos rs231775 y rs3087243 pero no lleguen a ser significativas, como en el caso del primer polimorfismo, o que su significación sea ajustada, como ocurre con el rs3087243.

En el caso del polimorfismo situado en la posición -318 del promotor del gen (rs5742909), uno de los primeros estudios que describe su asociación con DT1 encuentra un efecto importante (OR=1.70<sup>161</sup>). El alelo minoritario de este SNP está relacionado con niveles de transcripción más altos de *CTLA4*, un efecto susceptible de estar relacionado con la patogenia de la DT1 y de otras enfermedades autoinmunes. En nuestro estudio tenemos un 80% de potencia para detectar ORs superiores a 1.46, y un 97.9% de potencia para la OR concreta descrita por Anjos *et al*<sup>161</sup>. Sin embargo, no observamos diferencias significativas, ni siquiera una tendencia en las frecuencias alélicas que sí observamos en los otros dos polimorfismos. Estudios posteriores, con mayor número de pacientes, y con potencia suficiente para detectar ORs>1.20, no han encontrado asociación de este polimorfismo con DT1<sup>35,49,62</sup>. Por tanto, el efecto descrito por Anjos *et al* es con toda probabilidad un falso positivo.

El estudio más reciente en esta región<sup>168</sup> apunta a que el marcador etiológico responsable de la asociación con DT1 se encuentra en el extremo 3' y localiza la asociación más fuerte de todos los polimorfismos estudiados en el rs231727, que tiene una correlación baja con el polimorfismo rs3087243 ( $D'=1$ ,  $r^2=0.423$ ) y alta con el polimorfismo rs231775 ( $D'=1$ ,  $r^2=0.829$ ). A pesar de esta alta equivalencia entre el polimorfismo rs231775 y el rs231727, es comprensible que no veamos el efecto del rs231727 que se pueda reflejar en el rs231775 puesto que el efecto original descrito en el rs231727 es moderado (OR=1.21) y tenemos un 52.05% de potencia para detectarlo. Nuestra potencia para detectar el 83% de ese efecto que se reflejaría por desequilibrio de ligamiento en el rs231775 es menor del 50%.



## Regiones 4q27, 10p15 y 22q13 (genes *IL2*, *IL2RA* e *IL2RB*)

Primera asociación con DT1: Vella *et al* (2005)<sup>39</sup>

### Replicación de gen candidato y de estudio GWAS

La primera de estas regiones en encontrarse asociada a DT1 fue 10p15<sup>39</sup>, donde se localiza el gen *IL2RA* que codifica la subunidad específica alfa del receptor de la IL2. Posteriormente, en el año 2007 y con la publicación de los primeros estudios de barrido genómico<sup>35</sup>, otro estudio encontró asociación a DT1 y AR en 4q27<sup>88</sup>. En esta región se localizan dos genes con importancia inmunológica, *IL2* e *IL21*, en un bloque de desequilibrio de ligamiento que dificulta adjudicar las señales inequívocamente a uno de los dos. Por último, en el estudio del WTCCC se encontraron señales sugerentes de asociación de la subunidad beta del receptor de la IL2<sup>35</sup>, común a este receptor y al de la IL15. En nuestro estudio seleccionamos tres marcadores en cada una de las regiones para replicar las asociaciones previamente encontradas, estudiar en DT1 asociaciones encontradas en otras enfermedades autoinmunes relacionadas (EC, AR) y estudiar la relación de estos marcadores con la edad de debut de la enfermedad.

#### - Estudio de 4q27 (*TENR-IL2-IL21*):

En la región 4q27 se seleccionaron los siguientes polimorfismos: rs11938795 por su asociación con EC<sup>169</sup>, rs6822844, asociado a EC, DT1 y AR<sup>88,169</sup>, y rs17388568, la señal con mayor asociación a DT1 en el estudio del WTCCC<sup>35</sup>.

Encontramos una tendencia a la asociación en los alelos minoritarios de los polimorfismos rs17388568 y rs6822844. En la estratificación por edad no observamos diferencias en ninguno de los casos (tabla 14). El polimorfismo rs6822844 se ha visto asociado también a EC y AR<sup>88,169</sup>, lo cual indica que esta región constituye un bloque común de susceptibilidad para varias enfermedades autoinmunes. En el análisis por edad observamos que la región 4q27 está asociada tanto a la DT1 de debut temprano como de debut adulto en nuestra población.

En el caso del rs11938795 (previamente asociado a EC, al igual que el rs6822844), no encontramos asociación en el caso-control general. Sin embargo, al realizar la estratificación por edad de debut de la enfermedad observamos una tendencia a la asociación, con el alelo minoritario C disminuido en el grupo de debut adulto con respecto al grupo pediátrico y al control (tabla 14). Al realizar el análisis de la edad como variable continua no observamos diferencias significativas en la edad media de debut entre los distintos genotipos, alelos o portadores del alelo de protección frente a homocigotos de riesgo (tabla 15). Por tanto, es posible que esta tendencia en la estratificación por edad se deba al azar y al límite de corte escogido para el análisis.

Tabla 14.- Frecuencias genóticas y alélicas de los polimorfismos rs11938795, rs17388568 y rs6822844 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs11938795 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|------------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|------|
|            | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |      |
|            | <b>431</b> |      | <b>795</b> |      |     |    | <b>204</b>  |      | <b>194</b>  |      |      |
| TT         | 245        | 56.8 | 427        | 53.7 | 0.3 | -- | 109         | 53.4 | 119         | 61.3 | 0.1  |
| TC         | 149        | 34.6 | 304        | 38.2 | 0.2 | -- | 73          | 35.8 | 60          | 30.9 | 0.3  |
| CC         | 37         | 8.6  | 64         | 8.1  | 0.7 | -- | 22          | 10.8 | 15          | 7.7  | 0.3  |
| T          | 639        | 74.1 | 1158       | 72.8 | 0.5 | -- | 291         | 71.3 | 298         | 76.8 | 0.08 |
| C          | 223        | 25.9 | 432        | 27.2 |     |    | 117         | 28.7 | 90          | 23.2 |      |

| rs17388568 | n          | %    | n          | %    | p    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|------------|------------|------|------------|------|------|------------------|-------------|------|-------------|------|-----|
|            |            |      |            |      |      |                  | n           | %    | n           | %    |     |
|            | <b>441</b> |      | <b>808</b> |      |      |                  | <b>207</b>  |      | <b>201</b>  |      |     |
| GG         | 216        | 49.0 | 438        | 54.2 | 0.08 | 0.81 (0.64-1.03) | 105         | 50.7 | 101         | 50.2 | 0.9 |
| GA         | 184        | 41.7 | 309        | 38.2 | 0.2  | --               | 79          | 38.2 | 85          | 42.3 | 0.4 |
| AA         | 41         | 9.3  | 61         | 7.5  | 0.3  | --               | 23          | 11.1 | 15          | 7.5  | 0.2 |
| G          | 616        | 69.8 | 1185       | 73.3 | 0.06 | 1.19 (0.99-1.43) | 289         | 69.8 | 287         | 71.4 | 0.6 |
| A          | 266        | 30.2 | 431        | 26.7 |      |                  | 125         | 30.2 | 115         | 28.6 |     |

| rs6822844 | n          | %    | n          | %    | p    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|------------|------|------------|------|------|------------------|-------------|------|-------------|------|-----|
|           |            |      |            |      |      |                  | n           | %    | n           | %    |     |
|           | <b>437</b> |      | <b>828</b> |      |      |                  | <b>207</b>  |      | <b>197</b>  |      |     |
| GG        | 349        | 79.9 | 618        | 74.6 | 0.04 | 1.35 (1.01-1.80) | 163         | 78.7 | 157         | 79.7 | 0.8 |
| GT        | 82         | 18.8 | 200        | 24.2 | 0.03 | 0.73 (0.54-0.98) | 41          | 19.8 | 37          | 18.8 | 0.8 |
| TT        | 6          | 1.4  | 10         | 1.2  | 0.8  | --               | 3           | 1.4  | 3           | 1.5  | 1   |
| G         | 780        | 89.2 | 1436       | 86.7 | 0.07 | 0.79 (0.60-1.02) | 367         | 88.6 | 351         | 89.1 | 0.8 |
| T         | 94         | 10.8 | 220        | 13.3 |      |                  | 47          | 11.4 | 43          | 10.9 |     |

Tabla 15.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs11938795.

| rs11938795    | N   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|---------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|               |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| TT            | 228 | 18.8 (10.4)                 | 17.5 (11.0, 25.0)               | 0.436 |
| TC            | 133 | 17.9 (11.6)                 | 15.0 (9.0, 25.0)                |       |
| CC            | 37  | 17.5 (11.1)                 | 15.0 (9.0, 26.5)                |       |
| Alelo T       | 589 | 18.6 (10.7)                 | 17.0 (11.0, 25.0)               | 0.191 |
| Alelo C       | 207 | 17.7 (11.4)                 | 15.0 (9.0, 25.0)                |       |
| Portador de C | 228 | 17.8 (11.4)                 | 15.0 (9.0, 25.0)                | 0.201 |
| TT            | 170 | 18.8 (10.4)                 | 17.5 (11.0, 25.0)               |       |

Seleccionamos el polimorfismo rs11938795 basándonos en su asociación previa a la EC<sup>169</sup>, enfermedad con una base genética común a la DT1<sup>13</sup>, y no observamos asociación en nuestra población. Este polimorfismo no se incluyó en el estudio original del WTCCC<sup>35</sup> ni en el *follow-up* posterior que Todd *et al* realizaron en DT1<sup>79</sup>. Sin embargo, se ha incluido en estudios posteriores al nuestro y no se observan indicios de asociación. El metaanálisis realizado por Barrett *et al*<sup>49</sup>, que recoge los resultados de los principales estudios de barrido genómico en DT1<sup>35,49,62</sup>, da para este polimorfismo una p=0.004, una cifra que no alcanza los umbrales de corrección requeridos para este tipo de estudios. Por tanto, a la luz de los resultados existentes, podemos concluir que el polimorfismo rs11938795 no parece estar asociado a DT1.

El bloque de desequilibrio de ligamiento que comprende el gen *IL2* incluye también el gen de otra citoquina de la misma familia, *IL21*. Debido al desequilibrio de ligamiento en la región, mediante estudios de asociación no se puede concluir cual

de los dos genes es el causante de la asociación que se observa en 4q27. En DT1, varios indicios apoyan al gen *IL2* como el responsable de esta asociación:

- En experimentos en ratones NOD se ha observado que los alelos asociados al progreso de la enfermedad influyen en los niveles de expresión de IL-2 pero no de IL-21<sup>170</sup>.

- La IL-2 tiene un papel importante en el mantenimiento de las Tregs, que son una población linfocitaria clave en el control de la autoinmunidad<sup>136</sup>.

- En experimentos en el ratón NOD se ha visto que las Tregs que se encuentran en los focos de inflamación son más sensibles a la apoptosis, y se ha observado que en estos mismos focos existe una expresión disminuida de IL2. Si estos niveles disminuidos se corrigen, se retrasa la aparición de la enfermedad en los ratones<sup>171</sup>.

- El primer gen de la ruta IL-2 que se encontró asociado a DT1 fue *IL2RA*, que codifica la subunidad alfa del receptor de IL-2<sup>39</sup>. Esta subunidad es específica del receptor de la IL-2, a diferencia de las subunidades beta y gamma, y se expresa de forma constitutiva en las Tregs, que a su vez dependen de la IL-2 para su mantenimiento<sup>138</sup>.

Sin embargo, a pesar de todas estas pruebas a favor de la IL2, sería recomendable realizar estudios para descartar que el gen *IL21* tenga alguna participación en DT1, pues se ha visto que la interleucina que codifica este gen podría tener un papel en otras enfermedades autoinmunes como LES<sup>172</sup>, EC<sup>173</sup> y EII<sup>174</sup>. Del mismo modo, queda por determinar si la asociación de esta región con otras enfermedades autoinmunes (AR, EC) es la misma o afecta a un gen en un grupo de enfermedades y a otro gen en otras. En un estudio reciente, se ha observado mediante análisis de expresión de ARNm que en EC la asociación podría apuntar al gen *IL21*<sup>64</sup>. Por tanto, sería interesante realizar nuevos estudios de expresión y funcionales que permitan determinar los polimorfismos etiológicos en esta región y el efecto que tienen a la hora de desencadenar la DT1 en humanos, así como establecer si las asociaciones encontradas tienen el mismo efecto que las asociaciones vistas en otras enfermedades.

#### - Estudio de 10p15 (*IL2RA*):

Estudios previos han encontrado tres grupos de señales independientes asociados a DT1 en esta región<sup>65,66</sup>. Para nuestro estudio, seleccionamos los tres polimorfismos representativos de estos tres grupos de señales: rs2104286, rs41295061 y rs11594656.

Replicamos la asociación más fuerte detectada en DT1, marcada por rs41295061. En la estratificación por edad no observamos diferencias (tabla 16), con lo cual proponemos que la asociación detectada en esta región afecta por igual al debut temprano y al debut tardío de la DT1.

Tabla 16.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs2104286, rs41295061 y rs11594656 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs2104286         | DT1        |          | Controles  |          | p        | OR               | DT1≤16 años |          | DT1>16 años |          | p        |
|-------------------|------------|----------|------------|----------|----------|------------------|-------------|----------|-------------|----------|----------|
|                   | n          | %        | n          | %        |          |                  | n           | %        | n           | %        |          |
|                   | <b>430</b> |          | <b>798</b> |          |          |                  | <b>204</b>  |          | <b>193</b>  |          |          |
| TT                | 277        | 64.4     | 488        | 61.2     | 0.3      | --               | 136         | 66.7     | 121         | 62.7     | 0.7      |
| TC                | 135        | 31.4     | 268        | 33.6     | 0.4      | --               | 58          | 28.4     | 66          | 34.2     | 0.2      |
| CC                | 18         | 4.2      | 42         | 5.3      | 0.4      | --               | 10          | 4.9      | 6           | 3.1      | 0.4      |
| T                 | 689        | 80.1     | 1244       | 77.9     | 0.2      | --               | 330         | 80.9     | 308         | 79.8     | 0.7      |
| C                 | 171        | 19.9     | 352        | 22.1     |          |                  | 78          | 19.1     | 78          | 20.2     |          |
| <b>rs41295061</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>p</b> | <b>OR</b>        | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>p</b> |
|                   | <b>431</b> |          | <b>811</b> |          |          |                  | <b>204</b>  |          | <b>194</b>  |          |          |
| CC                | 393        | 91.2     | 704        | 86.8     | 0.02     | 1.57 (1.05-2.37) | 187         | 91.7     | 176         | 90.7     | 0.7      |
| CA                | 35         | 8.1      | 105        | 12.9     | 0.01     | 0.59 (0.39-0.90) | 15          | 7.4      | 17          | 8.8      | 0.6      |
| AA                | 3          | 0.7      | 2          | 0.2      | 0.3      | --               | 2           | 0.9      | 1           | 0.5      | 1        |
| C                 | 821        | 95.2     | 1513       | 93.3     | 0.05     | 0.69 (0.47-1.02) | 389         | 95.3     | 369         | 95.1     | 0.9      |
| A                 | 41         | 4.8      | 109        | 6.7      |          |                  | 19          | 4.7      | 19          | 4.9      |          |
| <b>rs11594656</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>p</b> | <b>OR</b>        | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>p</b> |
|                   | <b>430</b> |          | <b>791</b> |          |          |                  | <b>203</b>  |          | <b>194</b>  |          |          |
| TT                | 205        | 47.7     | 375        | 47.4     | 0.9      | --               | 101         | 49.8     | 92          | 47.4     | 0.6      |
| TA                | 179        | 41.6     | 330        | 41.7     | 0.9      | --               | 77          | 37.9     | 84          | 43.3     | 0.3      |
| AA                | 46         | 10.7     | 86         | 10.9     | 0.9      | --               | 25          | 12.3     | 18          | 9.3      | 0.6      |
| T                 | 589        | 68.5     | 1080       | 68.3     | 0.9      | --               | 279         | 68.7     | 268         | 69.7     | 0.9      |
| A                 | 271        | 31.5     | 502        | 31.7     |          |                  | 127         | 31.3     | 120         | 30.9     |          |

En cuanto a las señales rs2104286 y rs11594656, que marcan los otros dos grupos de señales en 10p15, no observamos diferencias significativas ni en el estudio caso-control ni en la estratificación por edad (tabla 16).

Un estudio reciente en población finlandesa con debut adulto (15-40 años) describe la asociación de los polimorfismos rs11594656 y rs41295061 con la edad de debut de la DT1<sup>83</sup>. Los autores estudian varios polimorfismos clásicos (*CTLA4*, *IFIH1*, *PTPN22*) en una población con DT1 de debut adulto y encuentran asociación de todos ellos en los pacientes estudiados, pero no encuentran asociación de los polimorfismos en *IL2RA*. Al realizar un análisis de la influencia de ambos polimorfismos en la edad de debut, los autores encuentran diferencias significativas para ambas señales, lo cual indica que no observan asociación en el grupo total estudiado porque dichos polimorfismos solo se encuentran asociados a los individuos con un debut más temprano de la enfermedad, una asociación que queda diluida en el estudio caso-control. Por tanto, sería interesante estudiar si dicha asociación con la edad de debut de los polimorfismos rs11594656 y rs41295061 existe y nuestro trabajo no tiene potencia suficiente para detectarla, o si la influencia en la edad de debut pudiera deberse a diferencias poblacionales.

#### - Estudio de 22q13 (*IL2RB*):

En la región 22q13, el estudio del WTCCC<sup>35</sup> destacó un marcador, rs3218253, con una asociación a DT1 no significativa según los estándares de corrección del estudio de barrido genómico, pero susceptible de ser replicada para confirmar si se trataba de una verdadera asociación (OR=0.83 [0.76-0.92]; p=1.59x10<sup>-4</sup>). En el mismo estudio se encontró una señal dentro de la región 22q13 asociada a AR (rs743777), que en DT1

mostraba una asociación moderada semejante a la detectada en el rs3218253 (OR=0.85 [0.78-0.93];  $p=2.7 \times 10^{-4}$ ). Más tarde, el polimorfismo rs9622555 se incluyó en el estudio de barrido genómico realizado por Cooper *et al*<sup>62</sup> en DT1 y, aunque no mostró evidencias de asociación ( $p=0.096$ ), en metanálisis posteriores este SNP muestra una asociación a DT1 al límite de la significación para los estándares de los GWAS<sup>49</sup>.

Para nuestro análisis seleccionamos los tres polimorfismos mencionados anteriormente: rs3218253 (posiblemente asociado a DT1), rs743777 (asociado a AR) y rs9622555 (posiblemente asociado a DT1).

En el análisis caso-control no encontramos diferencias significativas en las distribuciones genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs3218253, rs743777 y rs9622555 (tabla 17 y tabla 17, continuación). En las estratificaciones por edad de los polimorfismos rs3218253 y rs743777 encontramos sendas asociaciones nominales ( $p=0.05$ , tabla 17). Sin embargo, al comparar los pacientes con debut pediátrico o adulto a la población control, no encontramos diferencias significativas en ninguno de los dos casos ( $p>0.079$ ). Aunque diferentes entre sí, ninguna población se diferencia significativamente del grupo control. No podemos decir que la significación que observamos en la estratificación por edad se deba al punto de corte elegido, puesto que el análisis continuo de la edad de debut también muestra diferencias significativas (tabla 18). Sin embargo, nuestros resultados no son claros, puesto que encontramos una significación ajustada en la estratificación por edad, pero no observamos diferencias significativas en la comparación de cada grupo de edad con controles. Además, los estudios previos en la bibliografía<sup>35,49,62,79</sup> no encuentran asociaciones con DT1 en esta región, a pesar de que las diferencias más grandes que observamos entre pacientes y controles se dan en el grupo pediátrico, ampliamente analizado en los grandes estudios genéticos. Por tanto, consideramos que se debería realizar un análisis en una muestra más amplia para descartar que las diferencias que vemos en la distribución por edad de debut sean un falso positivo.

Tabla 17.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs3218253 y rs743777 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs3218253 | DT1        |      | Controles  |      | p    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|-----------|------------|------|------------|------|------|------------------|-------------|------|-------------|------|------|
|           | n          | %    | n          | %    |      |                  | n           | %    | n           | %    |      |
| <b>GG</b> | <b>438</b> |      | <b>813</b> |      |      | --               | <b>206</b>  |      | <b>199</b>  |      |      |
|           | 222        | 50.7 | 416        | 51.2 | 0.9  | --               | 115         | 55.8 | 90          | 45.2 | 0.03 |
| <b>GA</b> | 185        | 42.2 | 321        | 39.5 | 0.3  | --               | 79          | 38.3 | 94          | 47.2 | 0.07 |
| <b>AA</b> | 31         | 7.1  | 76         | 9.3  | 0.2  | --               | 12          | 5.8  | 15          | 7.5  | 0.5  |
| <b>G</b>  | 629        | 71.8 | 1153       | 70.9 | 0.6  | --               | 309         | 75.0 | 274         | 68.8 | 0.05 |
| <b>A</b>  | 247        | 28.2 | 473        | 29.1 |      | 103              | 25.0        | 124  | 31.2        |      |      |
| rs743777  | n          | %    | n          | %    | p    | OR               | n           | %    | n           | %    | p    |
| <b>AA</b> | <b>434</b> |      | <b>787</b> |      |      | --               | <b>204</b>  |      | <b>197</b>  |      |      |
|           | 181        | 41.7 | 336        | 42.7 | 0.7  | --               | 94          | 46.1 | 72          | 36.5 | 0.05 |
| <b>AG</b> | 206        | 47.5 | 338        | 42.9 | 0.1  | 1.20 (0.94-1.53) | 93          | 45.6 | 102         | 51.8 | 0.2  |
| <b>GG</b> | 47         | 10.8 | 113        | 14.4 | 0.08 | 0.72 (0.50-1.06) | 17          | 8.3  | 23          | 11.7 | 0.3  |
| <b>A</b>  | 568        | 65.4 | 1010       | 64.2 | 0.5  | --               | 281         | 68.9 | 246         | 62.4 | 0.05 |
| <b>G</b>  | 300        | 34.6 | 564        | 35.8 |      | 127              | 31.1        | 148  | 37.6        |      |      |

Tabla 17 (continuación).- Frecuencias genóticas y alélicas del polimorfismo rs9622555 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs9622555 | DT1 |      | Controles |      |     | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|-----------|-----|------|-----------|------|-----|------------------|-------------|------|-------------|------|------|
|           | n   | %    | n         | %    | p   |                  | n           | %    | n           | %    |      |
| GG        | 432 |      | 797       |      | 0.7 | --               | 205         |      | 194         |      | 0.07 |
| GT        | 205 | 47.5 | 370       | 46.4 |     | --               | 106         | 51.7 | 83          | 42.8 |      |
| TT        | 189 | 43.8 | 335       | 42.1 | 0.6 | --               | 82          | 40.0 | 94          | 48.5 | 0.09 |
| T         | 38  | 8.8  | 92        | 11.5 | 0.1 | 0.74 (0.49-1.12) | 17          | 8.3  | 17          | 8.8  | 0.9  |
| G         | 599 | 69.3 | 1075      | 67.4 | 0.3 | --               | 294         | 71.7 | 260         | 67.0 |      |
| T         | 265 | 30.7 | 519       | 32.6 |     | --               | 116         | 28.3 | 128         | 33.0 | 0.2  |

Tabla 18.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario de los polimorfismos rs3218253 y rs743777.

| rs3218253       | n   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|-----------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|                 |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| GG              | 205 | 17.2 (10.7)                 | 15.0 (10.0, 24.0)               | 0.038 |
| GA              | 173 | 19.3 (10.7)                 | 18.0 (11.0, 26.5)               |       |
| AA              | 27  | 23.3 (14.8)                 | 20.0 (12.0, 31.0)               |       |
| G               | 583 | 20.3 (11.8)                 | 19.0 (11.0, 28.0)               | 0.013 |
| A               | 227 | 17.9 (10.7)                 | 16.0 (11.0, 25.0)               |       |
| Portador de A   | 200 | 19.9 (11.4)                 | 18.5 (11.0, 27.8)               | 0.019 |
| GG              | 205 | 17.2 (10.7)                 | 15.0 (10.0, 24.0)               |       |
| <b>rs743777</b> |     |                             |                                 |       |
| AA              | 166 | 17.1 (10.9)                 | 15.0 (8.8, 24.0)                | 0.031 |
| AG              | 195 | 19.1 (10.6)                 | 18.0 (11.0, 27.0)               |       |
| GG              | 40  | 22.2 (13.5)                 | 21.0 (12.3, 30.8)               |       |
| A               | 527 | 17.8 (10.8)                 | 16.0 (10.0, 25.0)               | 0.011 |
| G               | 275 | 20.0 (11.5)                 | 18.0 (11.0, 28.0)               |       |
| Portador de G   | 235 | 19.6 (11.2)                 | 18.0 (11.0, 27.0)               | 0.019 |
| AA              | 166 | 17.1 (10.9)                 | 15.0 (8.8, 24.0)                |       |

Dentro de la ruta IL-2/IL-2R, la subunidad beta del receptor de la IL-2 es la región que menos interés ha atraído y en la que se encuentran resultados más controvertidos. Los tres polimorfismos recogidos en nuestro estudio se han analizado al menos en uno de los grandes grupos de población que se incluyen en los GWAS desde 2007<sup>35,49,62</sup> y, aunque en algunos casos se observa asociación con DT1, ninguno alcanza la significación estadística requerida para este tipo de estudios. Todd *et al*<sup>79</sup> analizan el marcador rs3218253 en el estudio *follow-up* que siguió a los resultados del WTCCC y no encuentran asociación significativa, sugiriendo que la señal encontrada en el WTCCC era un falso positivo y recalando que, probablemente, toda asociación detectada en un estudio de barrido genómico con una significación menor de  $p=10^{-6}$  sea un falso positivo. En los diferentes estudios de barrido genómico en los que se han estudiado marcadores de *IL2RB*<sup>49,62</sup> no se ha encontrado ninguna asociación que supere este umbral de significación sugerido por Todd *et al*, pero se han observado asociaciones cercanas a este umbral ( $p<10^{-6}$ ). A diferencia de las regiones 4q27 (*IL2-IL21*) y 10p15 (*IL2RA*), la región 22q13 no ha sido objeto de estudios independientes de mapeo fino o secuenciación y búsqueda de nuevos polimorfismos, algo que quizás sería necesario para descartar que estos marcadores que no alcanzan los umbrales de significación estén marcando una asociación de 22q13 a DT1 aún no descubierta.

# Análisis de asociaciones descritas en la era GWAS

En este capítulo presentamos el análisis de asociaciones con DT1 descubiertas en los últimos cinco años, que incluyen estudios de replicación de asociaciones descubiertas en GWAS de DT1, y análisis de genes candidatos seleccionados en base a su función o a resultados obtenidos en otras enfermedades autoinmunes.

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| Región 5p13 ( <i>CAPSL-IL7R</i> )    | 2006 |
| Región 7q32 ( <i>IRF5</i> )          |      |
| Región 12p13 ( <i>KLRB1-CLEC2D</i> ) |      |
| Región 12q13 ( <i>ERBB3</i> )        | 2007 |
| Región 16p13 ( <i>CLEC16A</i> )      |      |
| Región 18p11 ( <i>PTPN2</i> )        |      |
| Región 2q24 ( <i>G6PC2</i> )         | 2008 |
| Región 2q32 ( <i>STAT4</i> )         |      |
| Región 6q23 ( <i>TNFAIP3-OLIG3</i> ) | 2009 |
| Región 17q21 ( <i>STAT3</i> )        |      |
| Región 9q33 ( <i>TRAF1-C5</i> )      | 2010 |



## Región 5p13 (genes CAPSL-IL7R)

Primer estudio en DT1: Smyth *et al* (2006)<sup>90</sup>

### Replicación de GWAS

La región 5p13 se asoció por primera vez a DT1 en un estudio de barrido genómico de SNPs no sinónimos<sup>90</sup> en el que fue la segunda señal nueva más asociada a la enfermedad tras la helicasa *IFIH1*. La señal descrita era el rs1445898 (Arg75Gln) situado en el exón 3 del gen *CAPSL*, de función desconocida. Este gen se encuentra en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento que el gen de la subunidad alfa específica del receptor de la interleucina IL-7 (*IL7R*), que constituye un interesante candidato a gen causal de la asociación de dicha región a la patogenia de la DT1, dada la importancia del eje IL7-IL7R en el desarrollo de los linfocitos T<sup>175</sup>. Posteriormente, Todd *et al*<sup>35</sup> encontraron una asociación moderada en otro marcador (también SNP no sinónimo) dentro del gen *IL7R*, el polimorfismo rs6897932 (Thr244Ile). Este estudio no incluyó la señal previamente descrita por Smyth *et al*<sup>90</sup> en el gen *CAPSL*.

Para el estudio de replicación hemos seleccionado los polimorfismos del gen *CAPSL* rs1010601 y rs1445898 (primera señal asociada a DT1 en la región) y los polimorfismos del gen *IL7R* rs6897932 (previamente asociado a DT1), rs3194051 y rs987106 (asociados a EM en un estudio previo<sup>176</sup>).

Entre los polimorfismos analizados en la región *CAPSL*, en el rs1445898 encontramos una disminución del homocigoto minoritario TT en enfermos que bordea la significación estadística (tabla 19). En la estratificación por edad de dicho polimorfismo, observamos una disminución de la frecuencia del alelo T con una significación nominal ( $p=0.05$ ) y de nuevo se repite la tendencia a la disminución de los homocigotos TT en pacientes con debut pediátrico con respecto a los pacientes con debut adulto. Si se comparan ambas poblaciones con el grupo control, la única que mantiene diferencias estadísticamente significativas es la población con debut pediátrico (homocigoto TT, debut pediátrico vs controles: OR=0.52 [0.29-0.90],  $p=0.01$ ). En el análisis de la edad de debut como variable continua no encontramos resultados significativos (tabla 20), pero se observan diferencias en la edad media de debut entre genotipos, alelos y homocigotos TT frente a resto de genotipos. En este último caso, se observa que los homocigotos TT debutan entre dos y tres años más tarde (según se mire la media o la mediana de la distribución) que los pacientes con otro genotipo. La falta de significación se debe probablemente a una falta de potencia estadística del estudio.

Tabla 19.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen *CAPSL* rs1010601 y 1445898 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs1010601 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n          | %    | N          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
|           | <b>304</b> |      | <b>646</b> |      |     |    | <b>149</b>  |      | <b>129</b>  |      |     |
| TT        | 92         | 30.3 | 218        | 33.7 | 0.3 | -- | 43          | 28.9 | 39          | 30.2 | 0.8 |
| TC        | 159        | 52.3 | 328        | 50.7 | 0.7 | -- | 79          | 53.0 | 71          | 55.0 | 0.7 |
| CC        | 53         | 17.4 | 100        | 15.5 | 0.4 | -- | 27          | 18.1 | 19          | 14.7 | 0.4 |
| T         | 343        | 56.4 | 764        | 59.1 | 0.3 | -- | 165         | 55.4 | 149         | 57.8 | 0.6 |
| C         | 265        | 43.6 | 528        | 40.9 |     |    | 133         | 44.6 | 109         | 42.2 |     |

| rs1445898 | n          | %    | N          | %    | p    | OR               | n          | %    | n          | %    | p    |
|-----------|------------|------|------------|------|------|------------------|------------|------|------------|------|------|
|           | <b>312</b> |      | <b>646</b> |      |      |                  | <b>154</b> |      | <b>131</b> |      |      |
| CC        | 90         | 28.8 | 190        | 29.4 | 0.9  | --               | 50         | 32.5 | 32         | 24.4 | 0.1  |
| CT        | 174        | 55.8 | 324        | 50.2 | 0.1  | 1.25 (0.95-1.66) | 86         | 55.8 | 73         | 55.7 | 1    |
| TT        | 48         | 15.4 | 132        | 20.4 | 0.06 | 0.71 (0.48-1.03) | 18         | 11.7 | 26         | 19.8 | 0.06 |
| C         | 354        | 56.7 | 704        | 54.5 |      |                  | 186        | 60.4 | 137        | 52.3 |      |
| T         | 270        | 43.3 | 588        | 45.5 | 0.4  | --               | 122        | 39.6 | 125        | 47.7 | 0.05 |

Tabla 20.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs1445898.

| rs1445898     | N   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|---------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|               |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| CC            | 82  | 16.3 (10.2)                 | 14.0 (8.0, 23.0)                | 0.291 |
| CT            | 159 | 17.1 (10.6)                 | 15.0 (9.0, 24.0)                |       |
| TT            | 44  | 19.1 (10.0)                 | 17.5 (12.0, 24.8)               |       |
| Alelo C       | 323 | 16.7 (10.4)                 | 14.0 (8.0, 24.0)                | 0.166 |
| Alelo T       | 247 | 17.8 (10.4)                 | 17.0 (10.0, 24.0)               |       |
| Portador de C | 241 | 16.8 (10.5)                 | 14.0 (8.5, 24.0)                | 0.149 |
| TT            | 44  | 19.1 (10.0)                 | 17.5 (12.0, 24.8)               |       |

Para aumentar la potencia del estudio, se realizó una colaboración con el grupo del doctor Behrooz Z. Alizadeh, del departamento de Genética Médica de la Universidad de Utrecht (Holanda). Se estudiaron las frecuencias del polimorfismo rs1445898 en un grupo de pacientes de DT1 con edad de debut igual o inferior a 16 años y controles (419 y 714 individuos respectivamente). En esta población se replica la tendencia a la disminución en las frecuencias del alelo T y del homocigoto TT en enfermos con debut pediátrico (tabla 21).

Tabla 21.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen *CAPSL* 1445898 en pacientes de DT1 y controles. Población holandesa.

| rs1445898 | DT1 (Pediátricos) |      | Controles  |      | p    | OR               |
|-----------|-------------------|------|------------|------|------|------------------|
|           | n                 | %    | n          | %    |      |                  |
|           | <b>419</b>        |      | <b>714</b> |      |      |                  |
| CC        | 149               | 35.5 | 236        | 33.1 | 0.4  | --               |
| CT        | 201               | 48.0 | 330        | 46.2 | 0.6  | --               |
| TT        | 69                | 16.5 | 148        | 20.7 | 0.08 | 0.75 (0.54-1.05) |
| C         | 499               | 59.5 | 802        | 56.2 | 0.1  | 0.87 (0.73-1.04) |
| T         | 339               | 40.5 | 626        | 43.8 |      |                  |

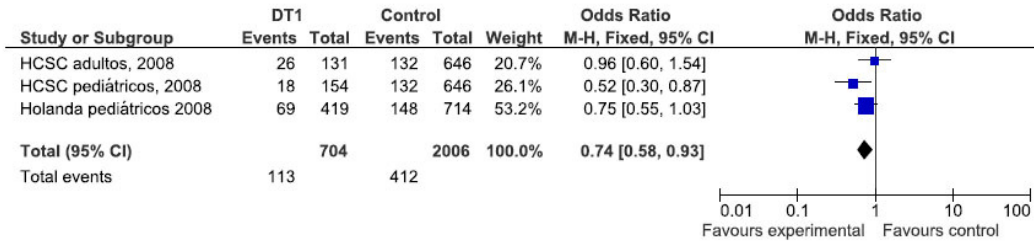
A continuación, realizamos un meta-análisis de los datos de la población holandesa con nuestros resultados. Comprobamos que nuestra población general y la de Holanda son homogéneas para las frecuencias alélicas que queremos analizar ( $I^2=0\%$ ;  $p=0.72$ ). El análisis conjunto de las frecuencias alélicas de ambas poblaciones revela una tendencia a la disminución del alelo T (OR=0.89 [0.78-1.01];  $p=0.07$ ). Si realizamos este análisis dividiendo nuestra población en debut pediátrico y adulto (figura 4), observamos además un dato interesante a favor de la asociación de este polimorfismo con la edad de debut de la enfermedad: nuestras poblaciones pediátrica y adulta son heterogéneas entre sí ( $I^2=68\%$ ;  $p=0.08$ ) y, cuando se comparan con la población pediátrica holandesa, nuestra población pediátrica es homogénea ( $I^2=0\%$ ;  $p=0.51$ ) mientras que la población adulta tiene una heterogeneidad moderada con la población pediátrica holandesa ( $I^2=49\%$ ;  $p=0.16$ ). Con estos datos, analizamos conjuntamente nuestra población pediátrica con la población pediátrica holandesa y observamos una asociación significativa del alelo T (OR=0.84 [0.73-0.97];  $p=0.02$ ).

Figura 5.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias alélicas del rs1445898 en nuestras poblaciones pediátrica y adulta, y en población holandesa (pediátrica).



Para finalizar el estudio del rs1445898, analizamos las frecuencias del homocigoto TT en conjunto con la población holandesa. El análisis de homogeneidad revela que tanto nuestra población como los subgrupos de debut pediátrico y adulto son homogéneos con dicha población ( $I^2<33\%$ ,  $p>0.20$ ; figura 5). El análisis de nuestra población general con la población holandesa revela una disminución significativa en las frecuencias del homocigoto TT en pacientes de DT1 (OR=0.74 [0.58-0.93];  $p=0.01$ ). Si realizamos el mismo análisis únicamente con nuestra población pediátrica o adulta y la población holandesa, solo el meta-análisis con el grupo de debut pediátrico es estadísticamente significativo (población pediátrica y población holandesa: OR=0.68 [0.52-0.88];  $p=0.004$ ).

Figura 6.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias del homocigoto TT del rs1445898 en nuestras poblaciones pediátrica y adulta, y en población holandesa (pediátrica).



Entre los polimorfismos analizados en el gen *IL7R* (tabla 22), encontramos en el rs6897932 un efecto parecido al observado en el polimorfismo rs1445898 del gen *CAPSL*. No detectamos asociación en el estudio caso-control, pero cuando realizamos la estratificación por edad observamos una tendencia a la disminución del alelo T en pacientes pediátricos ( $p=0.06$ ) y una clara disminución de la frecuencia del homocigoto TT ( $p=0.01$ ). Cuando comparamos ambos grupos a controles, las diferencias en la frecuencia del homocigoto TT solo son significativas para el grupo de debut pediátrico (homocigoto TT, debut pediátrico vs controles:  $OR=0.32$  [0.06-1.02],  $p=0.047$ ; debut adulto vs controles:  $p=0.3$ ). Mediante el análisis de la edad de debut como variable continua (tabla 23), observamos que los individuos homocigotos TT debutan aproximadamente cinco años más tarde que los portadores del alelo C, y que esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p=0.026$ ). Además, se observan diferencias cercanas a la significación en los análisis de la edad media de debut en genotipos y alelos, y se puede apreciar que el retraso en la edad de debut solo se produce en el grupo de individuos con el alelo de protección T en homocigosis.

Dentro del gen *IL7R*, estudiamos los marcadores rs987106 (tabla 22) y rs3194051 (tabla 22, continuación), seleccionados en base a un estudio previo realizado en EM<sup>176</sup>. No observamos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos polimorfismos. El estudio de haplotipos formados por los tres polimorfismos en *IL7R* y los dos polimorfismos en *CAPSL* no aporta información adicional (datos no mostrados).

Tabla 22.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen *IL7R* rs6897932 y rs987106 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs6897932 | DT1 |      | Controles |      |     | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|-----------|-----|------|-----------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|------|
|           | n   | %    | n         | %    | p   |    | n           | %    | n           | %    |      |
| <b>CC</b> | 169 | 55.4 | 352       | 54.5 | 0.8 | -- | 88          | 58.7 | 67          | 51.5 | 0.2  |
| <b>CT</b> | 119 | 39.0 | 255       | 39.5 | 0.9 | -- | 59          | 39.3 | 52          | 40.0 | 0.9  |
| <b>TT</b> | 17  | 5.6  | 39        | 6.0  | 0.8 | -- | 3           | 2.0  | 11          | 8.5  | 0.01 |
| <b>C</b>  | 457 | 74.9 | 959       | 74.2 | 0.7 | -- | 235         | 78.3 | 186         | 71.5 | 0.06 |
| <b>T</b>  | 153 | 25.1 | 333       | 25.8 |     |    | 65          | 21.7 | 74          | 28.5 |      |

| rs987106  | n   | %    | n   | %    | p   | OR | n   | %    | n   | %    | p   |
|-----------|-----|------|-----|------|-----|----|-----|------|-----|------|-----|
| <b>AA</b> | 104 | 33.5 | 193 | 29.9 | 0.3 | -- | 46  | 30.3 | 50  | 37.9 | 0.2 |
| <b>AT</b> | 138 | 44.5 | 301 | 46.6 | 0.5 | -- | 72  | 47.4 | 54  | 40.9 | 0.3 |
| <b>TT</b> | 68  | 21.9 | 152 | 23.5 | 0.6 | -- | 34  | 22.4 | 28  | 21.2 | 0.8 |
| <b>A</b>  | 346 | 55.8 | 687 | 53.2 | 0.3 | -- | 164 | 53.9 | 154 | 58.3 | 0.3 |
| <b>T</b>  | 274 | 44.2 | 605 | 46.8 |     |    | 140 | 46.1 | 110 | 41.7 |     |

Tabla 22 (continuación).- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen *IL7R* rs3194051 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs3194051 | DT1 |      | Controles |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|-----|------|-----------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n   | %    | n         | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
| <b>AA</b> | 146 | 47.3 | 310       | 48.0 | 0.8 | -- | 65          | 42.8 | 66          | 50.4 | 0.2 |
| <b>AG</b> | 141 | 45.6 | 288       | 44.6 | 0.8 | -- | 76          | 50.0 | 56          | 42.7 | 0.2 |
| <b>GG</b> | 22  | 7.1  | 48        | 7.4  | 0.9 | -- | 11          | 7.2  | 9           | 6.9  | 0.9 |
| <b>A</b>  | 433 | 70.1 | 908       | 70.3 |     |    | 206         | 67.8 | 188         | 71.8 |     |
| <b>G</b>  | 185 | 29.9 | 384       | 29.7 | 0.9 | -- | 98          | 32.2 | 74          | 28.2 | 0.3 |

Tabla 23.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs6897932.

| rs6897932            | N   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|----------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|                      |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| <b>CC</b>            | 155 | 16.9 (11.2)                 | 14.0 (8.0, 23.0)                | 0.061 |
| <b>CT</b>            | 111 | 17.2 (9.3)                  | 16.0 (10.0, 24.0)               |       |
| <b>TT</b>            | 14  | 22.5 (8.3)                  | 21.0 (16.8, 27.5)               |       |
| <b>Alelo C</b>       | 421 | 16.9 (10.7)                 | 15.0 (9.0, 24.0)                | 0.06  |
| <b>Alelo T</b>       | 139 | 18.3 (9.3)                  | 17.0 (12.0, 25.0)               |       |
| <b>Portador de C</b> | 266 | 17.0 (10.5)                 | 15.0 (9.0, 24.0)                | 0.026 |
| <b>TT</b>            | 14  | 22.5 (8.3)                  | 21.0 (16.8, 27.5)               |       |

Nuestro estudio supone la primera replicación independiente de los polimorfismos no sinónimos rs1445898 (*CAPSL*) y rs6897932 (*IL7R*), que se han encontrado asociados previamente a DT1. Además, como novedad en este trabajo, encontramos una asociación con la edad de debut de DT1 en estos dos marcadores, con una disminución del alelo minoritario en pacientes con debut temprano de la enfermedad. La magnitud de la asociación es mayor en el polimorfismo situado en el gen *IL7R* (homocigoto TT: OR=0.32), lo cual indicaría que dicho polimorfismo es un mejor marcador de la variante etiológica situada en esta región. Sin embargo, debido al alto desequilibrio de ligamiento en el bloque que comprende los genes *CAPSL* e *IL7R*, serán necesarios nuevos estudios para determinar cuál es el gen responsable de la asociación de 5p13.

El último trabajo que aborda el análisis de esta región estudia el polimorfismo del *CAPSL* rs1445898 y no encuentra evidencias de asociación<sup>82</sup>. Sin embargo, los propios autores admiten que su estudio tiene menor potencia estadística (un máximo del 80% para ORs=1.20 y MAF=0.25) que el estudio de Todd *et al*<sup>79</sup> en el que se replica la señal original descrita por Smyth *et al*<sup>90</sup>. Todd *et al* encuentran una OR=0.89. El estudio de Howson *et al*<sup>82</sup> tiene menos del 60% de potencia para replicar este efecto con los estándares de corrección que ellos mismos fijan en su estudio (asociaciones significativas con p=0.0024).



## Región 7q32 (gen *IRF5*)

Primer estudio en DT1: Qu et al (2007)<sup>94</sup>

### Estudio de gen candidato

El gen *IRF5* se encontró asociado por primera vez a LES<sup>92,177</sup> mediante el estudio de dos polimorfismos funcionales: rs2280714 (extremo 5' del gen, influye en los niveles de ARNm) y rs2004640 (intrónico, modula el *splicing* alternativo del ARNm). Estos mismos polimorfismos se estudiaron en DT1, sin que se encontrasen asociaciones significativas<sup>94</sup>. Sin embargo, el gen *IRF5* es un candidato interesante en la patología de las enfermedades autoinmunes por sus funciones en la inducción de IFNs tipo 1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), importantes en la respuesta contra virus, y de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ )<sup>110,111</sup>. Diversos estudios apoyan la participación de virus (especialmente enterovirus) en el desencadenamiento de DT1<sup>18,178</sup>. Además, la presencia de citoquinas proinflamatorias está directamente relacionada con la destrucción de las células beta pancreáticas<sup>107</sup>.

Estudios posteriores a los efectuados en LES han encontrado asociación de nuevos polimorfismos dentro del gen *IRF5* con EM<sup>179</sup>, AR<sup>180</sup>, ECh<sup>93</sup> y enfermedad de Sjögren<sup>181</sup>. De los polimorfismos descritos, seleccionamos rs4728142 y rs3807306, asociados a EM, para su estudio en DT1. El polimorfismo rs3807306 se analizó previamente en DT1 como parte del estudio del WTCCC pero se excluyó del análisis final porque no alcanzaba el porcentaje de éxito de genotipado requerido<sup>35</sup>. Por otra parte, la correlación de estos polimorfismos con los asociados previamente a LES y ya estudiados en DT1 es moderada ( $r^2$  entre 0.48 y 0.72) y no descarta que exista asociación de rs4728142 y rs3807306 a la enfermedad. Por tanto, analizamos estos dos polimorfismos basándonos en las asociaciones previas descritas en EM<sup>91,179</sup>.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre DT1 y controles en el análisis de los polimorfismos rs4728142 (tabla 24) y rs3807306 (tabla 24, continuación). Tampoco observamos diferencias en la estratificación por edad de debut de la enfermedad. En el estudio caso-control tenemos una potencia de 80% para detectar ORs superiores a 1.29. Por tanto, podemos descartar un efecto mayor de ambos polimorfismos en nuestra muestra.

Tabla 24.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs4728142 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs4728142 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
| <b>GG</b> | <b>413</b> |      | <b>685</b> |      |     | -- | <b>193</b>  |      | <b>188</b>  |      |     |
|           | 113        | 27.4 | 198        | 28.9 | 0.6 | -- | 48          | 24.9 | 53          | 28.2 | 0.5 |
| <b>GA</b> | 201        | 48.6 | 332        | 48.5 | 0.9 | -- | 101         | 52.3 | 86          | 45.7 | 0.2 |
| <b>AA</b> | 99         | 24.0 | 155        | 22.6 | 0.6 | -- | 44          | 22.8 | 49          | 26.1 | 0.5 |
| <b>G</b>  | 427        | 51.7 | 728        | 53.1 | 0.5 | -- | 197         | 51.0 | 192         | 51.1 |     |
| <b>A</b>  | 399        | 48.3 | 642        | 46.9 |     |    | 189         | 49.0 | 184         | 48.9 | 1   |

Tabla 24 (continuación).- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs3807306 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs3807306 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
|           | <b>409</b> |      | <b>649</b> |      |     |    | <b>192</b>  |      | <b>186</b>  |      |     |
| <b>TT</b> | 116        | 28.4 | 178        | 27.4 | 0.7 | -- | 55          | 28.6 | 54          | 29.0 | 0.9 |
| <b>TG</b> | 200        | 48.9 | 310        | 47.8 | 0.7 | -- | 99          | 51.6 | 88          | 47.3 | 0.4 |
| <b>GG</b> | 93         | 22.7 | 161        | 24.8 | 0.4 | -- | 38          | 19.8 | 44          | 23.7 | 0.4 |
| <b>T</b>  | 432        | 52.8 | 666        | 51.3 |     |    | 209         | 54.4 | 196         | 52.7 |     |
| <b>G</b>  | 386        | 47.2 | 632        | 48.7 | 0.5 | -- | 175         | 45.6 | 176         | 47.3 | 0.6 |

Posteriormente a nuestros resultados, en el metanálisis realizado por Barrett *et al* en 2009<sup>49</sup> se incluyó el genotipado del polimorfismo rs4728142 y un reanálisis de los datos del polimorfismo rs3807306, y no se encontró asociación a DT1 en ninguno de ellos. Por tanto, con todos los estudios hasta la fecha no hay evidencias de asociación del gen *IRF5* a DT1.

Un estudio reciente analiza la función de *IRF5* en ratones *knockout* para el gen y encuentra que podría tener un papel importante en el desarrollo de los linfocitos B y su evolución a célula plasmática<sup>182</sup>, y no solo en la ruta de inducción de IFNs tipo I. Además, los autores también encuentran indicios de que *IRF5* puede tener importancia en la respuesta Th2 de los linfocitos T, una ruta *a priori* poco importante en el desarrollo de la DT1<sup>135</sup>. Aunque sería interesante un estudio más profundo para descartar la existencia de polimorfismos asociados a DT1, cabe la posibilidad de que la influencia de *IRF5* en las rutas que determinan el desencadenamiento de la enfermedad no sea tan importante como en otras enfermedades autoinmunes a las que sí se ha visto asociado. A modo de ejemplo, en los últimos años se ha visto tanto en LES<sup>183</sup> como en EM<sup>184</sup> un incremento de la importancia de los linfocitos B en la patogenia de dichas enfermedades, mientras que la contribución de los linfocitos B a la DT1 parece restringirse más a una presentación antigénica defectuosa (explicada por los alelos HLA) que activa a las poblaciones linfocitarias realmente responsables del daño en células beta<sup>139</sup>.

## Región 12p13 (genes *KLRB1*-*CLEC2D*)

Primer estudio en DT1: Wellcome Trust Case-Control Consortium (2007)<sup>35</sup>

### Replicación de GWAS

La región 12p13 se asoció por primera vez a DT1 en el estudio del WTCCC<sup>35</sup>. En dicho estudio, se analizaron varios polimorfismos y se encontró que el más asociado a DT1 era el rs11052552, situado en la región 3' del gen *CLEC2D*. Un estudio posterior en EM<sup>68</sup> identificó otra señal, rs4763655, en el gen *KLRB1* en esta misma región. Estudiamos estas dos señales en nuestros pacientes de DT1: rs11052552 para replicar la asociación previamente descrita en el WTCCC y rs4763655 para analizar otra variante en esta región relacionada con enfermedades autoinmunes.

Encontramos una tendencia a la asociación en el polimorfismo rs11052552 (tabla 25), con el alelo minoritario disminuido en pacientes de DT1 con respecto a controles (OR=0.85 [0.71-1.01]; p=0.06). En la estratificación por edad no observamos diferencias significativas. En el caso del polimorfismo rs4763655 (tabla 25), asociado a EM, no encontramos diferencias significativas en el estudio caso-control ni en la estratificación por edad de debut de la enfermedad.

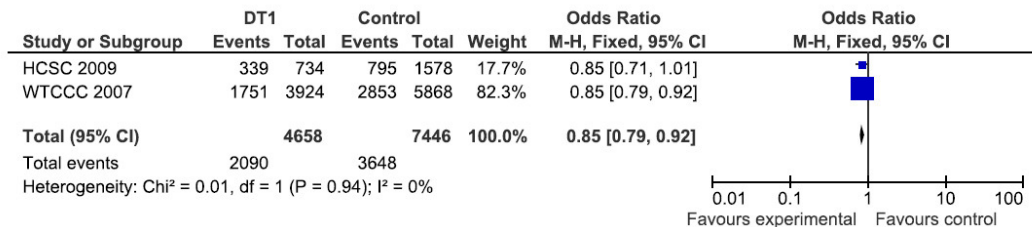
Tabla 25.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs11052552 y rs4763655 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs11052552       | DT1        |          | Controles  |          | p        | OR               | DT1≤16 años |          | DT1>16 años |          |     |
|------------------|------------|----------|------------|----------|----------|------------------|-------------|----------|-------------|----------|-----|
|                  | n          | %        | n          | %        |          |                  | n           | %        | n           | %        |     |
|                  | <b>367</b> |          | <b>789</b> |          |          |                  | <b>175</b>  |          | <b>162</b>  |          |     |
| GG               | 108        | 29.4     | 202        | 25.6     | 0.2      | --               | 50          | 28.6     | 50          | 30.9     | 0.6 |
| GT               | 179        | 48.8     | 379        | 48.0     | 0.8      | --               | 85          | 48.6     | 75          | 46.3     | 0.7 |
| TT               | 80         | 21.8     | 208        | 26.4     | 0.09     | 0.78 (0.57-1.06) | 40          | 22.9     | 37          | 22.8     | 1   |
| G                | 395        | 53.8     | 783        | 49.6     | 0.06     | 0.85 (0.71-1.01) | 185         | 52.9     | 175         | 54.0     | 0.8 |
| T                | 339        | 46.2     | 795        | 50.4     |          |                  | 165         | 47.1     | 149         | 46.0     |     |
| <b>rs4763655</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>p</b> | <b>OR</b>        | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>n</b>    | <b>%</b> |     |
|                  | <b>373</b> |          | <b>797</b> |          |          |                  | <b>178</b>  |          | <b>164</b>  |          |     |
| GG               | 156        | 41.8     | 318        | 39.9     | 0.5      | --               | 72          | 40.4     | 68          | 41.5     | 0.8 |
| GA               | 166        | 44.5     | 380        | 47.7     | 0.3      | --               | 83          | 46.6     | 73          | 44.5     | 0.7 |
| AA               | 51         | 13.7     | 99         | 12.4     | 0.6      | --               | 23          | 12.9     | 23          | 14.0     | 0.8 |
| G                | 478        | 64.1     | 1016       | 63.7     | 0.9      | --               | 227         | 63.8     | 209         | 63.7     | 1   |
| A                | 268        | 35.9     | 578        | 36.3     |          |                  | 129         | 36.2     | 119         | 36.3     |     |

La tendencia a la asociación del alelo minoritario del polimorfismo rs11052552 está en consonancia con la asociación previamente descrita en el estudio del WTCCC<sup>35</sup>, como se puede observar en el análisis de heterogeneidad de ambas poblaciones presentado en la figura 6 ( $I^2=0\%$ ; p=0.94). En este estudio, dicha señal fue la más asociada a DT1 en la región 12p13. Todd *et al*<sup>79</sup> analizaron posteriormente otra señal (rs3764021) prácticamente equivalente a la descrita por el WTCCC ( $D'=1$ ,  $r^2=0.95$ ) y encontraron asociación en la región, pero de menor magnitud que la descrita por primera vez. Por último, Barrett *et al*<sup>49</sup> retoman el estudio de 12p13 en DT1 y encuentran otra señal más asociada, rs4763879 ( $D'=1$ ,  $r^2=0.5$  con rs11052552), que se encuentra

situada en el gen *CD69*, un marcador temprano de activación de células del sistema inmunitario.

Figura 7.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias alélicas del rs11052552 en nuestras poblaciones pediátrica y adulta, y en la población del estudio WTCCC (pediátrica).



La región 12p13 incluye numerosos genes, y una parte de ellos tienen funciones en el sistema inmunitario. El gen *KLRB1* (también conocido como *CD161* o *NKR-P1A*) codifica un receptor de función desconocida miembro de la superfamilia de lectinas tipo C que se expresa sobre todo en células NK, en linfocitos T CD4 de memoria y efectoras, en linfocitos T CD8 y en más de la mitad de los repertorios de células NKT<sup>126</sup>. Curiosamente, el gen *CLEC2D*, en el que se localiza la segunda señal más fuerte asociada a DT1 en la región 12p13, codifica LLT1, que es ligando de *KLRB1* y se expresa en monocitos, CD8 y linfocitos B<sup>126</sup>. Estudios funcionales sugieren que la unión de *NKR-P1A* y LLT1 inhibe la citotoxicidad mediada por células NK. A falta de estudios que determinen el efecto de los marcadores asociados a DT1 en la región, estos hallazgos podrían apuntar a una implicación de las células NK en la patogenia de la enfermedad, algo que ya se describe en algunos estudios funcionales<sup>122,123,185</sup>.

## Región 12q13 (gen *ERBB3*)

Primer estudio en DT1: Wellcome Trust Case-Control Consortium (2007)<sup>35</sup>

### Replicación GWAS

La región 12q13 se asoció por primera vez a DT1 en el estudio del WTCCC<sup>35</sup>. La señal más asociada, rs2292239, se encuentra en el intrón 7 del gen *ERBB3*, pero el elevado desequilibrio de ligamiento a lo largo de una región en la que se localizan más de diez genes dificulta la tarea de determinar si *ERBB3* es el gen causal asociado a la enfermedad.

Tras el descubrimiento de la primera señal en 12q13 en el estudio del WTCCC, el *follow-up* de Todd *et al*<sup>79</sup> analizó otra señal, rs11171739, que presentaba una asociación menor que rs2292239 y una alta equivalencia con el mismo ( $D'=1$ ,  $r^2=0.71$ ). Posteriormente, Hakonarson *et al*<sup>81</sup> abordaron un estudio de replicación de 24 marcadores moderadamente asociados a DT1 en un estudio de barrido genómico realizado previamente por el grupo<sup>80</sup>. Las tres señales con mayor asociación en este estudio de replicación se encontraban localizadas en tres genes a lo largo de 12q13: *RAB5B* (*member RAS oncogene family*, rs773107), *SUOX* (*sulfite oxidase*, rs10876864) e *IKZF4* (*ICAROS family zinc finger 4*, rs17017704), y las tres presentaban una correlación moderada ( $rs10876864$ ,  $r^2=0.57$ ) o alta ( $r^2>0.80$ ) con el polimorfismo rs2292239. Además, en este estudio describen por primera vez una tendencia a la asociación de 12q13 con la edad de debut de DT1. Mediante un análisis de la edad de debut de cada genotipo en los tres polimorfismos, los autores encuentran que los individuos que portan los genotipos de riesgo tienen una edad de debut un año menor que los que portan el genotipo de protección. Esta diferencia es estadísticamente significativa en el estudio del polimorfismo rs773107 ( $p=0.047$ ) y bordea la significación en los otros dos polimorfismos<sup>81</sup>. Aunque estas tres señales se encuentran alejadas del gen *ERBB3*, la correlación entre los polimorfismos descritos por Hakonarson *et al* y el rs2292239 es alta, lo que dificulta determinar cuál o cuáles son los polimorfismos causales de la asociación y, por extensión, qué genes están implicados.

La asociación de 12q13 con la edad de debut de la DT1 se ha explorado en dos estudios más: el primero, realizado por Awata *et al*<sup>186</sup> en población japonesa, analiza la asociación descrita por el WTCCC (rs2292239) en un grupo de enfermos con edad de debut pediátrica y adulta, parte de ellos complicados con enfermedades tiroideas. El segundo estudio, llevado a cabo por Wang *et al*<sup>84</sup> en población estadounidense de origen mayoritariamente caucásico, analiza 19 polimorfismos a lo largo de la región 12q13, incluidos los cinco citados anteriormente, en un grupo de enfermos con debut pediátrico y adulto. Tanto el estudio de Awata *et al* como el de Wang *et al* analizan la asociación de cada SNP en poblaciones de debut pediátrico y adulto por separado, para lo cual dividen los grupos totales de enfermos por 20 y 17 años respectivamente.

Finalmente, juntan ambos grupos y evalúan la asociación de los polimorfismos en el grupo total de enfermos. Ninguno de los estudios encuentra diferencias por edad en la asociación de los polimorfismos analizados.

Con el objetivo de clarificar estos resultados divergentes, seleccionamos tres polimorfismos a lo largo de 12q13: la señal original detectada en el WTCCC (rs2292239), el polimorfismo que presenta una mayor asociación con la edad de debut de DT1 en el estudio de Hakonarson *et al* (rs773107) y el SNP en este mismo estudio que tiene una menor correlación con la señal original detectada en el WTCCC (rs10876864,  $r^2=0.58$  con rs2292239).

En el estudio caso-control encontramos diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos rs773107 y rs2292239 (tabla 26). En ambos casos, el alelo minoritario se encuentra elevado en enfermos con respecto a controles. Cuando realizamos la estratificación por edad, observamos diferencias significativas en el rs773107 y, aunque en el rs2292239 las frecuencias alélicas no son significativamente diferentes entre el grupo pediátrico y el adulto ( $p=0.1$ ), en ambos polimorfismos el homocigoto para el alelo de riesgo está significativamente aumentado en pacientes pediátricos con respecto a los adultos, lo cual sugiere que también existen diferencias en la distribución del rs2292239 según la edad de debut. Si comparamos cada grupo de edad de debut por separado con controles, en los dos polimorfismos observamos que únicamente el grupo pediátrico es estadísticamente diferente del grupo control (comparación de frecuencias alélicas, rs773107: OR=1.55 (1.24-1.94),  $p=8 \times 10^{-5}$ ; rs2292239: OR=1.40 (1.12-1.75);  $p=0.002$ ) mientras que en la comparación entre pacientes con debut adulto y controles no existen diferencias estadísticamente significativas (frecuencias alélicas, rs773107:  $p=0.33$ ; rs2292239:  $p=0.27$ ).

Con estos datos, analizamos en ambos polimorfismos las diferencias en edad de debut entre los genotipos, alelos y homocigotos de riesgo frente al resto de genotipos (tabla 27). En ambos casos, encontramos diferencias estadísticamente significativas en todas las categorías y observamos que los homocigotos de riesgo para cualquiera de los dos polimorfismos debutan casi cinco años antes que los que portan otro genotipo, algo que se puede ver claramente si comparamos la edad de debut mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (figuras 7 y 8).

Tabla 26.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs773107 y rs2292239 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

|                  | DT1        |      | Controles  |      | p     | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p     |
|------------------|------------|------|------------|------|-------|------------------|-------------|------|-------------|------|-------|
|                  | n          | %    | n          | %    |       |                  | n           | %    | n           | %    |       |
| <b>rs773107</b>  | <b>433</b> |      | <b>832</b> |      |       |                  | <b>202</b>  |      | <b>199</b>  |      |       |
| AA               | 132        | 30.5 | 314        | 37.7 | 0.01  | 0.72 (0.56-0.93) | 54          | 26.7 | 61          | 30.7 | 0.4   |
| AG               | 223        | 51.5 | 399        | 48.0 | 0.2   | --               | 98          | 48.5 | 113         | 56.8 | 0.1   |
| GG               | 78         | 18.0 | 119        | 14.3 | 0.08  | 1.32 (0.95-1.82) | 50          | 24.8 | 25          | 12.6 | 0.002 |
| A                | 487        | 56.2 | 1027       | 61.7 | 0.008 | 1.25 (1.06-1.49) | 206         | 51.0 | 235         | 59.0 | 0.02  |
| G                | 379        | 43.8 | 637        | 38.3 |       |                  | 198         | 49.0 | 163         | 41.0 |       |
| <b>rs2292239</b> | <b>434</b> |      | <b>846</b> |      |       |                  | <b>202</b>  |      | <b>200</b>  |      |       |
| CC               | 127        | 29.3 | 304        | 35.9 | 0.02  | 0.74 (0.57-0.95) | 56          | 27.7 | 56          | 28.0 | 0.9   |
| CA               | 225        | 51.8 | 403        | 47.6 | 0.2   | --               | 96          | 47.5 | 115         | 57.5 | 0.05  |
| AA               | 82         | 18.9 | 139        | 16.4 | 0.3   | --               | 50          | 24.8 | 29          | 14.5 | 0.009 |
| C                | 479        | 55.2 | 1011       | 59.8 | 0.03  | 1.21 (1.02-1.43) | 208         | 51.5 | 227         | 56.8 | 0.1   |
| A                | 389        | 44.8 | 681        | 40.2 |       |                  | 196         | 48.5 | 173         | 43.2 |       |

Tabla 27.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario de los polimorfismos rs773107 y rs2292239.

|                  | n   | Edad de debut (años)        |                                 | p      |
|------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|--------|
|                  |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |        |
| <b>rs773107</b>  |     |                             |                                 |        |
| AA               | 115 | 19.5 (9.9)                  | 18.0 (12.0, 26.0)               | 0.002  |
| AG               | 211 | 19.4 (11.4)                 | 17.0 (11.0, 27.0)               |        |
| GG               | 75  | 15.0 (11.4)                 | 13.0 (6.0, 23.0)                |        |
| A                | 441 | 19.5 (10.6)                 | 18.0 (12.0, 26.0)               | 0.003  |
| G                | 361 | 17.6 (11.5)                 | 15.0 (8.0, 25.0)                |        |
| Portador de A    | 326 | 19.4 (10.9)                 | 17.5 (12.0, 26.3)               | 0.0004 |
| GG               | 75  | 15.0 (11.4)                 | 13.0 (6.0, 23.0)                |        |
| <b>rs2292239</b> |     |                             |                                 |        |
| CC               | 112 | 18.9 (10.0)                 | 16.5 (12.0, 25.0)               | 0.001  |
| AC               | 211 | 19.9 (11.4)                 | 18.0 (12.0, 28.0)               |        |
| AA               | 79  | 14.8 (10.8)                 | 13.0 (6.0, 23.0)                |        |
| C                | 435 | 19.4 (10.7)                 | 17.0 (12.0, 26.0)               | 0.013  |
| A                | 369 | 17.7 (11.4)                 | 15.0 (9.0, 25.0)                |        |
| Portador de C    | 323 | 19.6 (11.0)                 | 18.0 (12.0, 27.0)               | 0.0002 |
| AA               | 79  | 14.8 (10.8)                 | 13.0 (6.0, 23.0)                |        |

Figura 8.- Polimorfismo rs773107: curvas de Kaplan-Meier para los portadores del alelo A (*línea continua*) y homocigotos GG (*línea punteada*). Se puede observar que los homocigotos GG tienen un debut más temprano y, por tanto, su curva está más desplazada hacia la izquierda. Log-rank  $p=0.01$ .

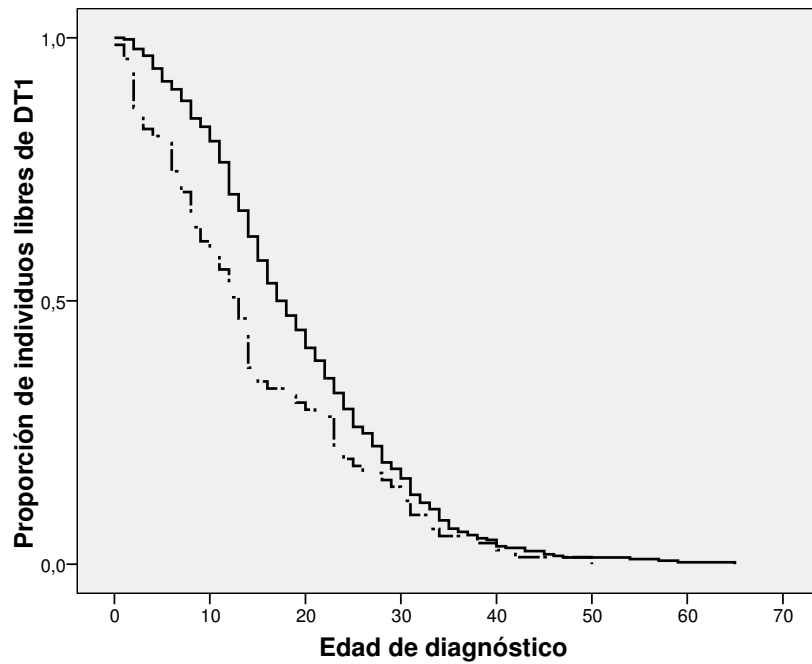
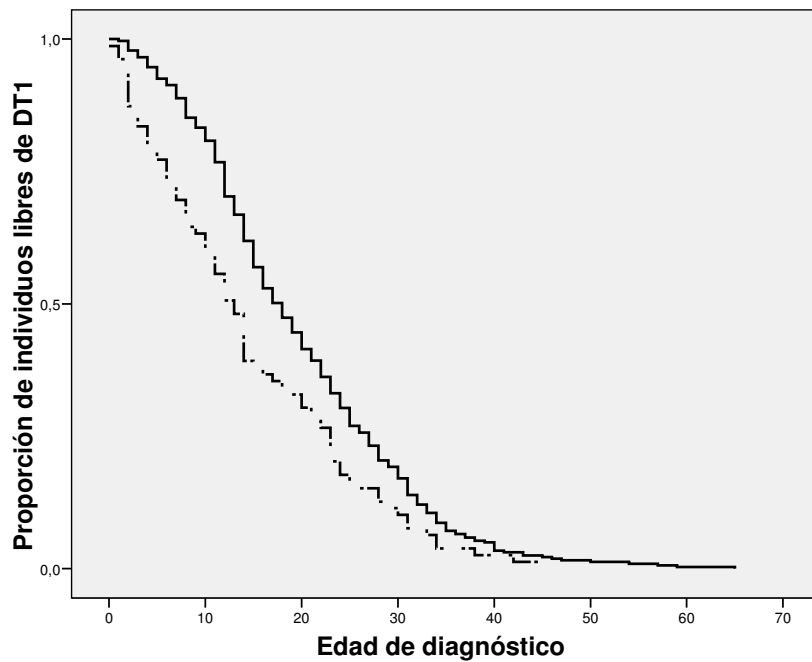


Figura 9.- Polimorfismo rs2292239: curvas de Kaplan-Meier para los portadores del alelo C (*línea continua*) y homocigotos AA (*línea punteada*). Se puede observar que los homocigotos AA tienen un debut más temprano y, por tanto, su curva está más desplazada hacia la izquierda. Log-rank  $p=0.002$ .



Respecto al rs10876864, encontramos también diferencias en las frecuencias alélicas aunque éstas no llegan a ser significativas ( $p=0.06$ , tabla 28). En la estratificación por edad observamos una tendencia a la diferencia entre el grupo de debut pediátrico y adulto, con un incremento del alelo minoritario G en pacientes pediátricos ( $p=0.08$ ). Al igual que ocurre con los polimorfismos anteriores, si se comparan los grupos de edad con el grupo control, solo el grupo pediátrico difiere significativamente de la población sana (frecuencias alélicas pediátricos vs controles: OR=1.37 [1.09-1.71],  $p=0.005$ ; adultos vs controles:  $p=0.59$ ). En el análisis de la edad como variable continua (tabla 29), las diferencias en la edad media de debut en alelos y portadores del genotipo GG frente a resto de genotipos bordean la significación. En este último caso, observamos que aquellos pacientes que portan el alelo de susceptibilidad (G) en homocigosis tienen una edad media de debut casi tres años menor que los portadores del alelo A.

El estudio de los haplotipos formados por los tres polimorfismos no aporta información adicional (datos no mostrados).

Tabla 28.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs10876864 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs10876864 | DT1 |      | Controles |      | P    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|------------|-----|------|-----------|------|------|------------------|-------------|------|-------------|------|------|
|            | n   | %    | n         | %    |      |                  | n           | %    | n           | %    |      |
| <b>AA</b>  | 427 |      | 842       |      |      |                  | 201         |      | 194         |      |      |
|            | 96  | 22.5 | 234       | 27.8 | 0.04 | 0.76 (0.57-1.00) | 38          | 19.0 | 47          | 24.2 | 0.2  |
| <b>AG</b>  | 218 | 51.2 | 408       | 48.5 | 0.3  | --               | 101         | 50.5 | 102         | 52.6 | 0.7  |
| <b>GG</b>  | 112 | 26.3 | 200       | 23.8 | 0.3  | --               | 61          | 30.5 | 45          | 23.2 | 0.1  |
| <b>A</b>   | 410 | 48.1 | 876       | 52.0 |      |                  | 177         | 44.2 | 196         | 50.5 |      |
| <b>G</b>   | 442 | 51.9 | 808       | 48.0 | 0.06 | 1.17 (0.99-1.38) | 223         | 55.8 | 192         | 49.5 | 0.08 |

Tabla 29.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs10876864.

| rs10876864        | n   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|-------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|                   |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| <b>GG</b>         | 106 | 16.7 (10.4)                 | 15.0 (8.8, 24.0)                | 0.127 |
| <b>GA</b>         | 203 | 19.0 (11.6)                 | 17.0 (11.0, 26.0)               |       |
| <b>AA</b>         | 85  | 19.7 (10.3)                 | 19.0 (12.0, 26.0)               |       |
| <b>Alelo G</b>    | 415 | 17.8 (11.0)                 | 15.0 (10.0, 25.0)               | 0.051 |
| <b>Alelo A</b>    | 373 | 19.3 (11.0)                 | 18.0 (12.0, 26.0)               |       |
| <b>Portador A</b> | 288 | 19.2 (11.2)                 | 17.0 (11.3, 26.0)               | 0.058 |
| <b>GG</b>         | 106 | 16.7 (10.4)                 | 15.0 (8.8, 24.0)                |       |

En el estudio caso-control de los tres polimorfismos analizados en DT1, replicamos la asociación descrita por el WTCCC<sup>35</sup> en el rs2292239 y la asociación descrita en el rs773107 por Hakonarson *et al*<sup>81</sup>. Además, encontramos asociaciones significativas con la edad de debut de la enfermedad, siendo las más fuertes la señal original descrita por el WTCCC (rs2292239) y el marcador del estudio de Hakonarson *et al* que presentaba una mayor asociación a la edad de debut de la DT1 (rs773107). En su

trabajo, Hakonarson *et al* analizaron un polimorfismo que, según se observa en la población caucásica (CEU) del Proyecto HapMap<sup>145</sup>, tiene una alta correlación con el rs2292239 (rs1701704,  $r^2=0.88$ ). Por tanto, aunque en el estudio de Hakonarson no se incluyó el marcador original, es presumible que si hubieran analizado el rs2292239 habrían encontrado efectos sobre la edad de debut de una magnitud semejante a los que observaron en el rs1701704. Por otra parte, en nuestro estudio replicamos la asociación más fuerte con la edad de debut descrita en el estudio de Hakonarson *et al* (rs773107). Curiosamente, en población española encontramos una correlación entre los polimorfismos rs2292239 y rs773107 ( $r^2=0.66$ ) ligeramente menor que la descrita en el Proyecto HapMap ( $r^2=0.81$ ), y sin embargo observamos la misma influencia en la edad de debut en ambos polimorfismos: un adelanto del comienzo de la enfermedad en cinco años para los homocigotos de riesgo. Este dato parece sugerir que ambos polimorfismos están en un desequilibrio de ligamiento similar con la variante responsable de este efecto en la edad de debut.

Hakonarson *et al*<sup>81</sup> incluyeron en su grupo de estudio a pacientes con edad de debut de hasta 35 años. En los datos del análisis por edad, los autores proporcionan la mediana y el rango intercuartílico de los grupos de pacientes que portan cada genotipo, y en esos datos se puede observar que la mediana de su población oscila entre 8 y 9 años y que el tercer cuartil se corresponde a los 13 años en todos los casos, con lo cual el 75% de la población estudiada tiene una edad de debut inferior a 13 años. En nuestro caso, la mediana de nuestra población de estudio es 16 años y el 75% de la población tiene una edad de debut inferior a 25 años. Por tanto, disponemos de un rango de edades más amplio, que nos permite discriminar mejor las diferencias observadas previamente.

Posteriormente al estudio de Hakonarson *et al*<sup>81</sup>, dos estudios más analizan el efecto de polimorfismos en 12q13 en la edad de debut de la DT1. El primer estudio<sup>186</sup> se centra en el rs2292239 y estudia la asociación de este polimorfismo en una muestra de población japonesa con edad media de debut de 30 años y un 25.7% de pacientes complicados con EAIT (EGr o HA). Awata *et al*<sup>186</sup> estudian la influencia del polimorfismo en la edad de debut dividiendo la población en debut temprano (menor o igual de 20 años) y debut tardío (mayor de 20 años), y comparan ambos grupos sin encontrar diferencias significativas. En el estudio caso-control del rs2292239, los autores solo encuentran asociaciones significativas en el grupo total de enfermos o en aquellos complicados con EAIT, pero no en el subgrupo mayoritario de enfermos de DT1 sin complicaciones tiroideas, algo que no se ha observado en ninguna población caucásica. Esta diferencia entre los resultados de los autores y la asociación descrita anteriormente nos lleva a tomar con precaución un estudio en una población que, como se ha visto anteriormente, guarda ciertas diferencias genéticas con la población caucásica<sup>187,188</sup>.

El segundo estudio<sup>84</sup> se llevó a cabo en población norteamericana de origen caucásico. Wang *et al*<sup>84</sup> estudiaron 19 polimorfismos, entre los que se incluyeron los

seleccionados en nuestro estudio, y analizaron la asociación de dichos polimorfismos con la edad de debut dividiendo la población en debut pediátrico (menor o igual a 17 años, 62% del grupo total de pacientes) y debut adulto (mayor o igual a 18 años, 38%). Los autores estudiaron las asociaciones en cada grupo por separado y en el total de enfermos, y no encontraron diferencias significativas para el rs2292239 o el rs773107. Aunque los autores no lo desarrollan en el artículo, en el caso del rs10876864 se puede observar una pequeña diferencia entre los resultados en población pediátrica (OR=1.3,  $p=2 \times 10^{-5}$ ) y adulta (OR=1.2,  $p=0.03$ ), y el análisis de heterogeneidad entre ambas poblaciones bordea la significación ( $p=0.10$ ). Los autores analizan la edad de debut mediante la división de la población en dos grupos. Sería interesante analizar la edad como variable continua en esta población y observar si no hay diferencias significativas en la edad media de debut según la dotación genética que se porte.

La región 12q13 es una zona densamente poblada de genes, y algunos se han vinculado con un posible papel en la patogenia de la DT1. Wang *et al*<sup>84</sup> aportan pruebas de la alteración de la expresión del gen *ERBB3* en pacientes de DT1, con un aumento de la expresión de ARNm en enfermos. Además, en experimentos funcionales incluidos en el mismo trabajo, los autores describieron una menor expresión de *ERBB3* en la membrana celular en monocitos y células dendríticas estimulados con lipopolisacárido, disminución asociada al homocigoto para el alelo de susceptibilidad de rs2292239. Al mismo tiempo, observaron que estos menores niveles de *ERBB3* se correlacionaban con una menor activación de linfocitos T cuando se cultivaban en contacto con los monocitos estimulados<sup>84</sup>. Aún queda por determinar como *ERBB3*, un receptor de membrana relacionado con la regulación de la supervivencia celular y el tráfico vesicular<sup>81</sup>, influye en la activación de linfocitos T por monocitos y células dendríticas. Dentro de la región 12q13, otro buen candidato por su relación con las Tregs es *IKZF4*<sup>189</sup>. Debido al alto desequilibrio de ligamiento en toda la zona es difícil determinar qué SNPs y qué genes son los causantes de la asociación de 12q13 a la DT1 y no es descartable que todas las señales detectadas en la región apunten a la vinculación de más de un gen con la enfermedad. Es posible que en esta región coexistan un gen que influye en la edad de debut de la enfermedad con otro u otros que afecten a todos los pacientes por igual.



## Región 16p13 (gen *CLEC16A*)

Primer estudio en DT1: Wellcome Trust Case-Control Consortium (2007)<sup>35</sup>

### Replicación de GWAS

El estudio del WTCCC<sup>35</sup> encontró asociación de 16p13 a DT1. La asociación se localizaba en un bloque de desequilibrio de ligamiento que se extiende más de 200 kb y en el que solo se encuentra un gen de función desconocida, *CLEC16A*. Posteriormente esta región se ha asociado también a EM<sup>68,190,191</sup>. El gen *CLEC16A* se encuentra flanqueado por otros dos genes con función inmunológica: el transactivador de clase II (*MHCIITA*) y *SOCS1* (*suppressor of cytokine signalling 1*), que codifica un inhibidor de los factores de transcripción STAT.

En nuestro estudio seleccionamos los polimorfismos rs2903692 (asociado previamente a DT1<sup>80</sup>), rs6498169 (asociado a EM<sup>68</sup>) y rs11074956, cercano al gen *SOCS1*, con el objetivo de explorar la variabilidad de este gen cercano.

En el estudio del rs2903692 replicamos la asociación del alelo minoritario previamente descrita (tabla 30). Además, no observamos ninguna diferencia en el análisis estratificado por la edad de debut ni en el análisis de la edad como variable continua, con lo cual concluimos que este factor está asociado a la DT1 en nuestra población independientemente de la edad de debut de la enfermedad.

Tabla 30.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs2903692 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs2903692 | DT1 |      | Controles |      | p     | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|-----|------|-----------|------|-------|------------------|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n   | %    | n         | %    |       |                  | n           | %    | n           | %    |     |
| <b>GG</b> | 306 |      | 532       |      |       |                  | 149         |      | 132         |      |     |
|           | 128 | 41.8 | 187       | 35.2 | 0.05  | 1.33 (0.98-1.79) | 62          | 41.6 | 54          | 40.9 | 0.9 |
| <b>GA</b> | 131 | 42.8 | 247       | 46.4 | 0.3   | --               | 67          | 45.0 | 52          | 39.4 | 0.3 |
| <b>AA</b> | 47  | 15.4 | 98        | 18.4 | 0.3   | --               | 20          | 13.4 | 26          | 19.7 | 0.2 |
| <b>G</b>  | 387 | 63.2 | 621       | 58.4 | 0.049 | 0.82 (0.66-1.01) | 191         | 64.1 | 160         | 60.6 | 0.4 |
| <b>A</b>  | 225 | 36.8 | 443       | 41.6 |       |                  | 107         | 35.9 | 104         | 39.4 |     |

En el caso-control general no encontramos asociación del polimorfismo rs6498169 (tabla 31). En la estratificación por edad encontramos una gran diferencia en las distribuciones de los genotipos que portan el alelo mayoritario A entre individuos con debut pediátrico y debut adulto. Sin embargo, si comparamos las frecuencias alélicas no encontramos diferencias significativas (p=0.2). Al realizar el análisis de la edad de debut como variable continua (tabla 32), las diferencias se mantienen en la comparación por genotipos y por portadores del alelo A frente a no portadores. En cambio, la edad de debut en función de cada alelo es prácticamente idéntica (p=0.971) y se da la contradicción de que el alelo más aumentado en población pediátrica (G) es el que, en homocigosis, produce un mayor retraso en la edad de

debut de la enfermedad. Con estas inconsistencias, consideramos que la asociación que se ve en el análisis estratificado por edad es probablemente un falso positivo.

Tabla 31.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs6498169 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs6498169 | DT1        |      | Controles  |      | P   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p     |
|-----------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-------|
|           | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |       |
|           | <b>303</b> |      | <b>548</b> |      |     | -- | <b>148</b>  |      | <b>130</b>  |      |       |
| AA        | 130        | 42.9 | 258        | 47.1 | 0.2 | -- | 53          | 35.8 | 67          | 51.5 | 0.008 |
| AG        | 139        | 45.9 | 227        | 41.4 | 0.2 | -- | 82          | 55.4 | 45          | 34.6 | 0.005 |
| GG        | 34         | 11.2 | 63         | 11.5 | 0.9 | -- | 13          | 8.8  | 18          | 13.8 | 0.2   |
| A         | 399        | 65.8 | 743        | 67.8 |     |    | 188         | 63.5 | 179         | 68.8 |       |
| G         | 207        | 34.2 | 353        | 32.2 | 0.4 | -- | 108         | 36.5 | 81          | 31.2 | 0.2   |

Tabla 32.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs6498169.

| rs6498169  | N   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|            |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| AA         | 120 | 18.3 (10.8)                 | 18.0 (10.3, 25.0)               | 0.004 |
| AG         | 127 | 15.4 (9.7)                  | 15.4 (8.0, 21.0)                |       |
| GG         | 31  | 21.2 (10.4)                 | 23.0 (12.0, 31.0)               |       |
| Alelo A    | 367 | 17.3 (10.5)                 | 16.0 (9.0, 24.0)                | 0.971 |
| Alelo G    | 189 | 17.3 (10.3)                 | 15.0 (10.0, 25.0)               |       |
| Portador A | 247 | 16.8 (10.4)                 | 15.0 (9.0, 23.0)                | 0.017 |
| GG         | 31  | 21.2 (10.4)                 | 23.0 (12.0, 31.0)               |       |

Por último, el polimorfismo rs11074956 (tabla 33), cercano al gen *SOCS1*, no muestra diferencias significativas en el análisis caso-control ni en la estratificación por edad de debut de la enfermedad.

Tabla 33.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs11074956 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs11074956 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|------------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|            | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
|            | <b>298</b> |      | <b>757</b> |      |     |    | <b>145</b>  |      | <b>128</b>  |      |     |
| GG         | 108        | 36.2 | 295        | 39.0 | 0.4 | -- | 50          | 34.5 | 46          | 36.0 | 0.8 |
| GT         | 138        | 46.3 | 337        | 44.5 | 0.6 | -- | 71          | 49.0 | 57          | 44.5 | 0.5 |
| TT         | 52         | 17.4 | 125        | 16.5 | 0.7 | -- | 24          | 16.6 | 25          | 19.5 | 0.5 |
| G          | 354        | 59.4 | 927        | 61.2 |     |    | 171         | 59.0 | 149         | 58.2 |     |
| T          | 242        | 40.6 | 587        | 38.8 | 0.4 | -- | 119         | 41.0 | 107         | 41.8 | 0.9 |

En nuestro estudio replicamos la asociación del polimorfismo rs2903692 con DT1 encontrada en estudios previos en 16p13<sup>80</sup> y observamos que la asociación se extiende a los individuos con edad de debut superior a 17 años. No encontramos asociación del polimorfismo rs6498169 (asociado a EM<sup>68</sup>). Por último, la señal estudiada en *SOCS1* no muestra ninguna asociación significativa, en consonancia con el estudio de Todd *et al*<sup>79</sup> que explora la región de *SOCS1* más próxima a *CLEC16A* sin encontrar asociación a DT1. Por tanto, los resultados de los análisis en esta región parecen

centrarse en el gen *CLEC16A* como responsable de la asociación a DT1. Estudios en la secuencia de dicho gen lo han catalogado como una proteína con un dominio lectina tipo C y otro dominio ITAM de activación. Asimismo, se ha observado que se expresa únicamente en células del sistema inmunitario (células dendríticas, linfocitos B y células NK). Un estudio reciente en EM<sup>192</sup> apunta a la posibilidad de que los polimorfismos en *CLEC16A* alteren la proporción en el timo de dos transcritos del gen. El mismo estudio no encuentra estas alteraciones en sangre periférica, un hecho que apuntaría a que la importancia de *CLEC16A* en el desencadenamiento de EM y DT1 reside en su papel (aún desconocido) en la regulación de los múltiples procesos que ocurren en el timo.



## Región 18p11 (gen *PTPN2*)

Primer estudio en DT1: Wellcome Trust Case-Control Consortium (2007)<sup>35</sup>

### Replicación de GWAS

La región 18p11 es una de las cuatro regiones que presentaron mayor asociación en el estudio del WTCCC<sup>35</sup> y que posteriormente fueron replicadas en el *follow-up* de Todd *et al*<sup>79</sup>. Los marcadores encontrados apuntaban a un bloque de desequilibrio de ligamiento que se extiende a lo largo de 114 kilobases y en el que únicamente se encuentra el gen *PTPN2*, una tirosin-fosfatasa con función supresora de la actividad inflamatoria.

Los estudios anteriores han hecho hincapié principalmente en tres polimorfismos dentro de esta región: rs2542151, originalmente descubierto en el estudio del WTCCC<sup>35</sup> y situado en la región 5' del gen; rs1893217, un polimorfismo equivalente al descubierto en el WTCCC ( $D'=1$ ,  $r^2=1$ ) y situado en el intrón 7 de *PTPN2*<sup>79</sup>; y rs478582, situado en el intrón 3 y que constituye una señal independiente de la anterior<sup>79</sup>.

Para nuestro estudio seleccionamos los polimorfismos rs2542151 y rs478582, señales independientes asociadas previamente a DT1, con el objetivo de replicar dichas asociaciones y estudiar el posible efecto sobre la edad de debut de la enfermedad.

En el caso del polimorfismo rs2542151 (tabla 34), no encontramos asociación en el estudio caso-control (frecuencias alélicas,  $p=0.2$ ). Sin embargo, en la estratificación por edad observamos una tendencia a la significación en la comparación de las frecuencias alélicas, con un incremento del alelo minoritario G en los pacientes con debut pediátrico ( $p=0.07$ ). Debido a la baja frecuencia del alelo G en población caucásica (14%), decidimos realizar el estudio de los portadores del alelo G, para el que tenemos una mayor potencia estadística, y en este caso la diferencia entre pacientes con debut pediátrico y adulto sí que es significativa (portadores de G, debut pediátrico vs adulto,  $p=0.023$ ). Si comparamos las frecuencias de portadores de G en ambos grupos con controles, solo los pacientes con debut pediátrico se diferencian significativamente de la población sana (portadores de G, debut pediátrico vs controles: OR=1.61 [1.14-2.26],  $p=0.005$ ; debut adulto vs controles:  $p=0.84$ ). Con estos resultados, realizamos el análisis de la edad de debut como variable continua (tabla 35) y encontramos una tendencia a la significación ( $p=0.064$ ) en la edad media de debut de los portadores del alelo de susceptibilidad G frente a los homocigotos TT, con los portadores del alelo de susceptibilidad debutando casi tres años antes.

Tabla 34.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs2542151 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

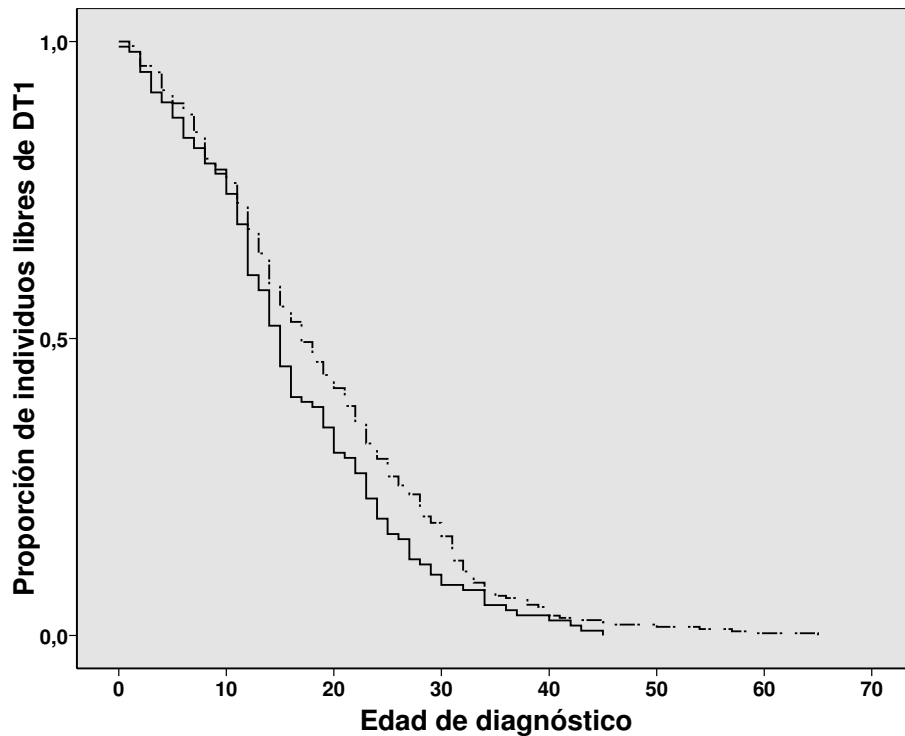
| rs2542151 | DT1        |      | Controles  |      | p    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|-----------|------------|------|------------|------|------|------------------|-------------|------|-------------|------|------|
|           | n          | %    | n          | %    |      |                  | n           | %    | n           | %    |      |
| <b>TT</b> | <b>419</b> |      | <b>861</b> |      |      |                  | <b>197</b>  |      | <b>189</b>  |      |      |
| TT        | 295        | 70.4 | 641        | 74.5 | 0.1  | 0.82 (0.62-1.07) | 127         | 64.5 | 142         | 75.1 | 0.02 |
| TG        | 116        | 27.7 | 199        | 23.1 | 0.07 | 1.27 (0.97-1.68) | 67          | 34.0 | 42          | 22.3 | 0.01 |
| GG        | 8          | 1.9  | 21         | 2.4  | 0.6  | --               | 3           | 1.5  | 5           | 2.6  | 0.5  |
| T         | 706        | 84.2 | 1481       | 86.0 | 0.2  | --               | 321         | 81.5 | 326         | 86.2 | 0.07 |
| G         | 132        | 15.8 | 241        | 14.0 |      |                  | 73          | 18.5 | 52          | 13.8 |      |

Tabla 35.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs2542151.

| rs2542151         | N          | Edad de debut (años)        |                                 | p            |
|-------------------|------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------|
|                   |            | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |              |
| <b>TT</b>         | <b>269</b> | <b>19.1 (11.4)</b>          | <b>17.0 (11.0, 27.0)</b>        | <b>0.096</b> |
| TG                | 109        | 16.3 (9.5)                  | 15.0 (10.0, 22.5)               |              |
| GG                | 8          | 20.5 (13.7)                 | 24.0 (5.3, 33.3)                |              |
| <b>Alelo T</b>    | <b>647</b> | <b>18.6 (11.1)</b>          | <b>17.0 (11.0, 26.0)</b>        | <b>0.148</b> |
| <b>Alelo G</b>    | <b>125</b> | <b>16.9 (10.1)</b>          | <b>15.0 (10.0, 23.5)</b>        |              |
| <b>Portador G</b> | <b>269</b> | <b>16.6 (9.9)</b>           | <b>15.0 (10.0, 23.0)</b>        | <b>0.064</b> |
| TT                | 117        | 19.1 (11.4)                 | 17.0 (11.0, 27.0)               |              |

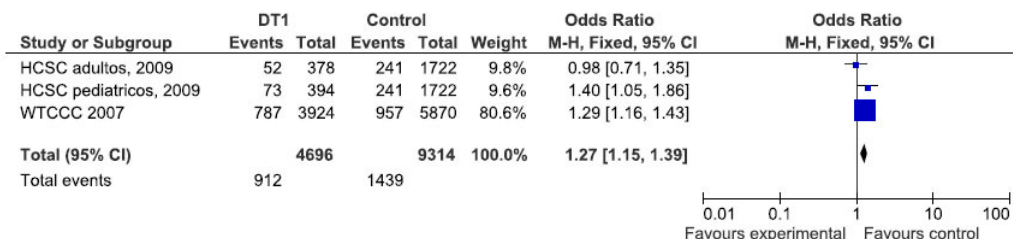
Debido a lo ajustado de la significación mediante los test no paramétricos de comparación de medias, probamos a analizar la edad de debut mediante la construcción de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para estudiar si se mantiene esta tendencia a la asociación del rs2542151 con la edad de debut (figura 9). Construimos una curva para la edad de comienzo de la enfermedad de los portadores del alelo G y otra curva para los homocigotos TT y observamos que ambas curvas son estadísticamente diferentes (log-rank p=0.034).

Figura 10.- Polimorfismo rs2542151: curvas de Kaplan-Meier para los portadores del alelo G (línea continua) y homocigotos TT (línea punteada). Se puede observar que los homocigotos TT tienen un debut más tardío y, por tanto, su curva está más desplazada hacia la derecha. Log-rank p=0.034



Para explorar esta diferencia entre las poblaciones con debut pediátrico y adulto, realizamos un análisis de homogeneidad con los datos de la población del WTCCC<sup>35</sup> (figura 10), con edad de debut inferior a 17 años, que sería equivalente a nuestra población con debut pediátrico. Observamos que nuestra población con debut adulto mostraba tendencia a la heterogeneidad tanto con nuestra población de debut pediátrico ( $I^2=61\%$ ,  $p=0.11$ ) como con la población de enfermos del WTCCC ( $I^2=60\%$ ,  $p=0.11$ ), mientras que nuestra población pediátrica y la del estudio WTCCC eran homogéneas ( $I^2=0\%$ ,  $p=0.60$ ), lo cual refuerza la idea de que nuestra población adulta se diferencia de la pediátrica en la distribución del rs2542151 y que existe algún efecto de este polimorfismo en la edad de debut de la enfermedad.

Figura 11.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias alélicas del rs2542151 en nuestras poblaciones pediátrica y adulta, y en la población del estudio WTCCC (pediátrica).



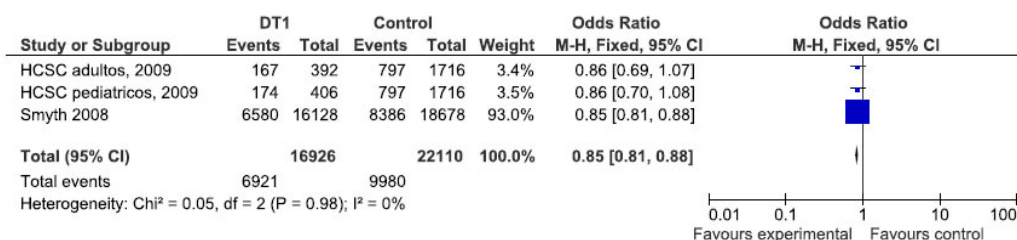
En el caso del rs478582 (tabla 36), encontramos una disminución del alelo minoritario en el estudio caso-control que no llega a ser estadísticamente significativa, aunque muestra una tendencia ( $p=0.1$ ). En el análisis estratificado por edad de debut no encontramos diferencias ( $p=0.9$ ). Estudiamos la homogeneidad de nuestra población con los datos disponibles de la replicación que Smyth *et al*<sup>13</sup> realizan sobre el *follow-up* de Todd *et al*<sup>79</sup> (ambos con población pediátrica) y observamos que, aunque en nuestro estudio no llegamos a ver diferencias significativas, nuestras poblaciones pediátrica y adulta son homogéneas con la población pediátrica del citado estudio (figura 11). Además, en el estudio caso-control detectamos una OR semejante a la descrita anteriormente<sup>13,79</sup>. Por tanto, la falta de significación se debe con toda probabilidad a la baja potencia estadística de nuestro estudio.

El estudio de los haplotipos formados por los dos polimorfismos estudiados no aporta información adicional (datos no mostrados).

Tabla 36.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs2542151 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs478582  | DT1 |      | Controles |      | p   | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|-----|------|-----------|------|-----|------------------|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n   | %    | n         | %    |     |                  | n           | %    | n           | %    |     |
| <b>TT</b> | 134 | 31.0 | 238       | 27.8 | 0.2 | --               | 68          | 33.5 | 59          | 30.1 | 0.5 |
| <b>TC</b> | 222 | 51.4 | 443       | 51.6 | 0.9 | --               | 96          | 47.3 | 107         | 54.6 | 0.1 |
| <b>CC</b> | 76  | 17.6 | 177       | 20.6 | 0.2 | --               | 39          | 19.2 | 30          | 15.3 | 0.3 |
| <b>T</b>  | 490 | 56.7 | 919       | 53.6 | 0.1 | 0.88 (0.74-1.04) | 232         | 57.1 | 225         | 57.4 | 0.9 |
| <b>C</b>  | 374 | 43.3 | 797       | 46.4 |     |                  | 174         | 42.9 | 167         | 42.6 |     |

Figura 12.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias alélicas del rs478582 en nuestras poblaciones pediátrica y adulta, y en la población del estudio de Smyth *et al* (pediátrica).



En nuestro estudio, replicamos la asociación del rs2542151 descrita previamente en DT1 y proponemos que el alelo minoritario no está asociado al debut tardío de la enfermedad, un hecho que no se ha descrito anteriormente. No replicamos la asociación descrita por Todd *et al*<sup>79</sup> para el rs478582, con toda probabilidad por un problema de falta de potencia estadística, ya que observamos una tendencia a la significación ( $p=0.1$ ) y detectamos una OR comparable a la de estudios previos (OR=0.88). En el estudio por edad no observamos ningún indicio de diferencia entre poblaciones pediátrica y adulta (frecuencias alélicas,  $p=0.9$ ).

Según Todd *et al*<sup>79</sup>, los polimorfismos rs2542151 y rs478582 marcan efectos independientes, con lo cual es posible que uno de ellos marque una variante

etiológica que influya en la edad de debut mientras que el otro esté relacionado con otra variante asociada a la enfermedad que afecte a cualquier grupo de edad. Lo interesante en este caso es que ambas variantes se encuentran en un bloque de desequilibrio de ligamiento en el que solo hay un gen, *PTPN2*. Nuestros resultados apuntarían a que existen dos variantes que influyen sobre el mismo gen con efectos distintos para el desencadenamiento de la DT1, algo que es probable si tenemos en cuenta las múltiples funciones de *PTPN2* y las múltiples vías por las que puede influir en la patogenia de la enfermedad: *PTPN2* es una tirosin-fosfatasa que inhibe la producción de IFN- $\gamma$  bloqueando la acción del factor de transcripción STAT1. Los ratones deficientes en *PTPN2* tienen una serie de defectos sistémicos que afectan sobre todo al sistema inmunitario, a la hematopoyesis, el sistema digestivo y el control de la inflamación<sup>112</sup>. Esta tirosin-fosfatasa también se expresa en los islotes pancreáticos, donde protege a las células  $\beta$  de la apoptosis mediada por citoquinas proinflamatorias<sup>113</sup>. Además, *PTPN2* se expresa en las células del epitelio intestinal y contribuye a mantener la integridad de la barrera intestinal<sup>193</sup>, que se ha observado alterada en enfermos de DT1<sup>194</sup>.



## Región 2q24 (gen G6PC2)

No estudios de asociación en DT1

Asociado a los niveles basales de glucosa en sangre: Bouatia-Naji *et al* (2008)<sup>86</sup>

**Estudio de gen candidato**

El alelo minoritario del polimorfismo rs560887, situado en el intrón 3 del gen G6PC2, está asociado a una ligera disminución de los niveles basales de glucosa<sup>86</sup>. Este gen codifica una variante de la glucosa-6-fosfatasa que solo se expresa en los islotes pancreáticos. Por esta función y por la especificidad en la localización de su expresión, resulta un buen gen candidato a estar asociado a la patogenia de la DT1.

Realizamos un estudio de replicación de un *tagging* diseñado por el doctor Beehroz Z. Alizadeh, del departamento de Genética Médica de la Universidad de Utrecht (Holanda), y para ello genotipamos cuatro polimorfismos a lo largo del gen G6PC2: rs1402837 (situado en el promotor del gen), rs16856159 (intrónico), rs560887 (intrónico) y rs17539351 (situado en 3'). No encontramos asociación en ninguno de ellos, ni en el estudio caso-control ni en la estratificación por edad (tabla 37). El estudio de haplotipos no aporta información adicional (datos no mostrados).

Tabla 37.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen G6PC2 rs1402837, rs16856159, rs560887 y rs17539351 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut. Población española.

| rs                | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-------------------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|                   | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
| <b>rs1402837</b>  | <b>375</b> |      | <b>727</b> |      |     |    | <b>179</b>  |      | <b>165</b>  |      |     |
| CC                | 246        | 65.6 | 469        | 64.5 | 0.7 | -- | 123         | 68.7 | 103         | 62.4 | 0.2 |
| CT                | 114        | 30.4 | 223        | 30.7 | 0.9 | -- | 50          | 27.9 | 53          | 32.1 | 0.4 |
| TT                | 15         | 4.0  | 35         | 4.8  | 0.5 | -- | 6           | 3.4  | 9           | 5.5  | 0.3 |
| C                 | 606        | 80.8 | 1161       | 79.8 | 0.6 | -- | 296         | 82.7 | 259         | 78.5 | 0.2 |
| T                 | 144        | 19.2 | 293        | 20.2 |     |    | 62          | 17.3 | 71          | 21.5 |     |
| <b>rs16856159</b> | <b>377</b> |      | <b>716</b> |      |     |    | <b>180</b>  |      | <b>166</b>  |      |     |
| GG                | 279        | 74.0 | 549        | 76.7 | 0.3 | -- | 134         | 74.4 | 127         | 76.5 | 0.7 |
| GA                | 87         | 23.1 | 150        | 20.9 | 0.4 | -- | 39          | 21.7 | 36          | 21.7 | 1   |
| AA                | 11         | 2.9  | 17         | 2.4  | 0.6 | -- | 7           | 3.9  | 3           | 1.8  | 0.2 |
| G                 | 645        | 85.5 | 1248       | 87.2 | 0.3 | -- | 307         | 85.3 | 290         | 87.3 | 0.4 |
| A                 | 109        | 14.5 | 184        | 12.8 |     |    | 53          | 14.7 | 42          | 12.7 |     |
| <b>rs560887</b>   | <b>379</b> |      | <b>775</b> |      |     |    | <b>181</b>  |      | <b>167</b>  |      |     |
| CC                | 200        | 52.8 | 427        | 55.1 | 0.5 | -- | 87          | 48.1 | 91          | 54.5 | 0.2 |
| CT                | 150        | 39.6 | 285        | 36.8 | 0.4 | -- | 79          | 43.6 | 62          | 37.1 | 0.2 |
| TT                | 29         | 7.7  | 63         | 8.1  | 0.8 | -- | 15          | 8.3  | 14          | 8.4  | 1   |
| C                 | 550        | 72.6 | 1139       | 73.5 | 0.6 | -- | 253         | 69.9 | 244         | 73.1 | 0.4 |
| T                 | 208        | 27.4 | 411        | 26.5 |     |    | 109         | 30.1 | 90          | 26.9 |     |
| <b>rs17539351</b> | <b>378</b> |      | <b>743</b> |      |     |    | <b>182</b>  |      | <b>165</b>  |      |     |
| CC                | 310        | 82.0 | 627        | 84.4 | 0.3 | -- | 150         | 82.4 | 133         | 80.6 | 0.7 |
| CT                | 63         | 16.7 | 110        | 14.8 | 0.4 | -- | 29          | 15.9 | 30          | 18.2 | 0.6 |
| TT                | 5          | 1.3  | 6          | 0.8  | 0.5 | -- | 3           | 1.7  | 2           | 1.2  | 1   |
| C                 | 683        | 90.3 | 1364       | 91.8 | 0.3 | -- | 329         | 90.4 | 296         | 89.7 | 0.8 |
| T                 | 73         | 9.7  | 122        | 8.2  |     |    | 35          | 9.6  | 34          | 10.3 |     |

En el estudio holandés, los autores encuentran asociación a la enfermedad para los alelos minoritarios de los polimorfismos rs16856159 (OR=1.39 [1.02-1.89]; p=0.03) y rs17539351 (OR=0.58 [0.39-0.85]; p=0.003), por tanto decidimos hacer un análisis conjunto por si nuestra falta de asociación se debiera a un problema de potencia estadística. Para el polimorfismo rs16856159, nuestra población general y la población pediátrica de Holanda son homogéneas ( $I^2=0\%$ ,  $p=0.34$ , figura 12). Al realizar el meta-análisis, se mantiene la asociación observada en la población holandesa (OR=1.24 [1.02-1.51];  $p=0.03$ , figura 12). En el caso del polimorfismo rs17539351, en un análisis preliminar observamos que el grupo de controles holandés no cumple con los criterios del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=0.03$ ) y que nuestra población y la de dicho estudio son claramente heterogéneas ( $I^2=89\%$ ,  $p=0.003$ , figura 13). Por tanto, debemos descartar su análisis desde un principio.

Figura 13.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias del alelo minoritario del rs16856159 en nuestra población general y en población holandesa (pediátrica).

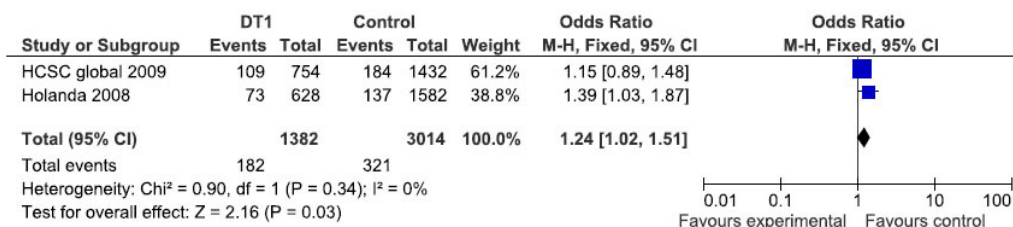
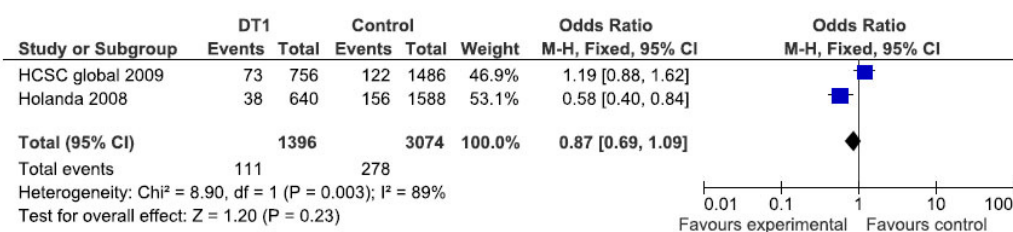


Figura 14.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias del alelo minoritario del rs17539351 en nuestra población general y en población holandesa (pediátrica).



El polimorfismo más estudiado en esta región es el rs560887. Situado en la frontera del tercer intrón de *G6PC2*, se cree que puede estar relacionado con alteraciones en el proceso de *splicing* del ARNm y el alelo minoritario se ha encontrado asociado a un menor nivel de glucosa basal en sangre<sup>86</sup>. Este polimorfismo se ha estudiado en DT2, pero no se han encontrado pruebas concluyentes de su asociación con la enfermedad<sup>87,195</sup>. De los polimorfismos estudiados en este trabajo, solo dos (rs1402837 y rs560887) se han incluido en un estudio de barrido genómico centrado en DT1<sup>49</sup>, y no se ha encontrado asociación a la enfermedad en ninguno de ellos. Igualmente, en el estudio original del WTCCC<sup>35</sup> se analizó un polimorfismo que mantenía una alta

equivalencia con el rs560887 ( $r^2=0.72$ ,  $D'=1$ , rs563694) sin que se encontrase asociación con DT1.

El estudio holandés encuentra una asociación del alelo minoritario del polimorfismo rs16856159 en sus pacientes de DT1 (OR=1.39 [1.03-1.87];  $p=0.03$ ). Esta asociación se mantiene, aunque con una OR menor, cuando realizamos un meta-análisis con nuestra población general (OR=1.24 [1.02-1.51];  $p=0.03$ , figura 12). Sin embargo, en el análisis en nuestra población (en el que tenemos más potencia estadística que el grupo holandés que encuentra originalmente la señal), no observamos diferencias significativas, lo cual podría indicar que el resultado encontrado en población holandesa es un falso positivo. En estudios de barrido genómico se han incluido polimorfismos que tienen una equivalencia total ( $r^2=1$ ) con el rs16856159. El GWAS de Cooper *et al*<sup>62</sup> encuentra una  $p=0.05$ , que no supera los límites de corrección exigidos al estudio. A la vista de todos los estudios previos y de los resultados encontrados en nuestra población, la señal observada en población holandesa es probablemente un falso positivo. Sin embargo, sería interesante realizar un estudio más extenso para descartar que estos indicios de asociación que no superan la corrección estadística estén marcando señales asociadas a la DT1 con bajo efecto en la región.



## Región 2q32 (gen *STAT4*)

Primer estudio en DT1: Martínez *et al* (2008)<sup>95</sup>

### Estudio de gen candidato

El factor de transcripción *STAT4* forma parte de la ruta de señalización Th1, importante en el desarrollo de la patología de la DT1. En experimentos en ratones NOD deficientes en *Stat4* se ha visto que la ausencia del factor de transcripción protege de la enfermedad<sup>132</sup>. Por ello, *STAT4* constituye un buen gen candidato para la DT1. Estudiamos dos polimorfismos dentro de este gen: el rs7574865, asociado previamente a AR<sup>55</sup>, y el rs9967792, que presentaba una asociación al borde de la significación en los estudios de barrido genómico realizados en DT1 desde 2007<sup>35,49,62</sup>.

En el estudio del polimorfismo rs7574865 (tabla 38), encontramos un aumento del alelo minoritario en enfermos con respecto a controles (OR=1.33 (1.05-1.68); p=0.01). No encontramos diferencias en el análisis por edad, con lo cual proponemos que el efecto observado no influye en la edad de debut de la enfermedad.

Tabla 38.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs7574865 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs7574865 | DT1        |      | Controles  |      | p    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|------------|------|------------|------|------|------------------|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n          | %    | n          | %    |      |                  | n           | %    | n           | %    |     |
|           | <b>308</b> |      | <b>723</b> |      |      |                  | <b>150</b>  |      | <b>132</b>  |      |     |
| <b>GG</b> | 177        | 57.5 | 472        | 65.3 | 0.02 | 0.72 (0.54-0.95) | 88          | 58.7 | 73          | 55.3 | 0.6 |
| <b>GT</b> | 114        | 37.0 | 224        | 31.0 | 0.06 | 1.31 (0.98-1.75) | 53          | 35.3 | 52          | 39.4 | 0.5 |
| <b>TT</b> | 17         | 5.5  | 27         | 3.7  | 0.2  | --               | 9           | 6.0  | 7           | 5.3  | 0.8 |
| <b>G</b>  | 468        | 76.0 | 1168       | 80.8 | 0.01 | 1.33 (1.05-1.68) | 229         | 76.3 | 198         | 75.0 | 0.7 |
| <b>T</b>  | 148        | 24.0 | 278        | 19.2 |      |                  | 71          | 23.7 | 66          | 25.0 |     |

En el caso del rs9967792, con una asociación que no alcanza los estándares de corrección requeridos en los dos GWAS en los que se ha incluido<sup>35,49</sup>, no observamos asociación en el caso-control (tabla 39). Encontramos una tendencia a la asociación en la estratificación por edad, con el alelo minoritario aumentado en el grupo con debut adulto. Sin embargo, cuando analizamos la edad como variable continua (tabla 40) no encontramos diferencias significativas en la edad de debut entre genotipos, alelos o portadores del alelo T frente a homocigotos CC. Por tanto, la tendencia a la asociación que vemos en la estratificación por edad es un falso positivo, derivado de la arbitrariedad del corte escogido para definir los grupos de edad.

Tabla 39.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs9967792 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs9967792 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|-----------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|------|
|           | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |      |
| <b>CC</b> | <b>306</b> |      | <b>648</b> |      |     | -- | <b>149</b>  |      | <b>131</b>  |      |      |
|           | 109        | 35.6 | 235        | 36.3 | 0.8 | -- | 46          | 30.9 | 55          | 42.0 | 0.05 |
| <b>CT</b> | 142        | 46.4 | 312        | 48.1 | 0.6 | -- | 75          | 50.3 | 56          | 42.7 | 0.2  |
| <b>TT</b> | 55         | 18.0 | 101        | 15.6 | 0.4 | -- | 28          | 18.8 | 20          | 15.3 | 0.4  |
| <b>C</b>  | 360        | 58.8 | 782        | 60.3 |     |    | 167         | 56.0 | 166         | 63.4 |      |
| <b>T</b>  | 252        | 41.2 | 514        | 39.7 | 0.5 | -- | 131         | 44.0 | 96          | 36.6 | 0.08 |

Tabla 40.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs9967792.

| rs9967792            | n   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|----------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|                      |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| <b>CC</b>            | 101 | 18.4 (10.8)                 | 18.0 (11.0, 25.0)               | 0.254 |
| <b>CT</b>            | 131 | 16.3 (10.2)                 | 14.0 (8.0, 23.0)                |       |
| <b>TT</b>            | 48  | 17.9 (10.1)                 | 15.0 (10.3, 26.5)               |       |
| <b>Alelo C</b>       | 333 | 17.6 (10.6)                 | 16.0 (10.0, 25.0)               | 0.577 |
| <b>Alelo T</b>       | 227 | 17.0 (10.2)                 | 15.0 (9.0, 24.0)                |       |
| <b>Portador de T</b> | 179 | 16.8 (10.2)                 | 15.0 (9.0, 24.0)                | 0.208 |
| <b>CC</b>            | 101 | 18.4 (10.8)                 | 18.0 (11.0, 25.0)               |       |

En nuestro estudio describimos por primera vez la asociación del polimorfismo rs7574865 en DT1<sup>95</sup>. Dicho polimorfismo se describió por primera vez asociado a una enfermedad autoinmune en un mapeo fino de la región que comprende los genes *STAT1* y *STAT4* y que se realizó en pacientes de AR y LES<sup>55</sup>. Nuestro grupo replicó la asociación encontrada en AR y describió la asociación de dicho polimorfismo en otras enfermedades autoinmunes, entre ellas DT1.

El polimorfismo rs9967792, independiente de rs7574865 ( $D^1=0.223$ ,  $r^2=0.027$ ), se analizó por primera vez en el estudio del WTCCC<sup>35</sup>, en el que se encontró una señal sugerente de asociación ( $p=10^{-5}$ ) que hacía interesante la inclusión de este polimorfismo en nuevos estudios genéticos. Sin embargo, estudios sucesivos<sup>49,62</sup> no han mejorado estos resultados, algo que apunta a que esta señal es un falso positivo. En nuestro estudio no observamos asociación, pero tenemos menos del 50% de la potencia estadística requerida para replicar la OR descrita en el WTCCC<sup>35</sup>. Con estos datos, nuestros resultados no son concluyentes. Esta señal debería ser estudiada en mayor profundidad para descartar que se trate de un falso positivo.

## Región 6q23 (genes *TNFAIP3*-*OLIG3*)

Primer estudio en DT1: Fung *et al* (2009)<sup>54</sup>  
Asociado previamente a artritis reumatoide  
**Estudio de gen candidato**

Dentro de esta región, el polimorfismo rs6920220 se ha encontrado asociado a AR<sup>96</sup>, EC<sup>97</sup> y LES<sup>98</sup>, siendo AR y EC dos enfermedades con las que DT1 comparte una base genética común<sup>13,196</sup>. Este polimorfismo se encuentra en una amplia región intergénica situada entre los genes *OLIG3* y *TNFAIP3*. Por su función, *TNFAIP3* parece el gen más adecuado para justificar la asociación a las tres enfermedades autoinmunes citadas anteriormente. Este gen codifica la proteína A20, un inhibidor del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La estimulación con TNF- $\alpha$  (un estímulo proinflamatorio) activa la transcripción de A20, que a su vez inhibe NF- $\kappa$ B. De este modo, A20 contrarresta el potencial inflamatorio de TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B<sup>114</sup>. En este sentido, se ha observado en experimentos con ratones *knock-out* para *TNFAIP3* que dichos ratones sufren inflamación multiorgánica espontánea debido a la ausencia de A20<sup>197</sup>. Además, A20 tiene un papel protector frente a la apoptosis en las células beta de los islotes pancreáticos<sup>115</sup>. En cambio, *OLIG3* codifica un factor que contribuye al desarrollo y migración de las neuronas<sup>198,199</sup>, y su asociación con enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como AR y EC, es más dudosa.

En nuestro estudio seleccionamos el polimorfismo rs6920220 por su asociación a tres enfermedades autoinmunes (AR, EC y LES) y el polimorfismo rs10499194. Este último, localizado en el mismo desierto intergénico que el rs6920220, también se ha encontrado asociado a AR<sup>200</sup>.

En el caso del polimorfismo rs6920220 no encontramos diferencias significativas ni en el estudio caso-control ni en la estratificación por edad de debut (tabla 41). Sin embargo, en el análisis del polimorfismo rs10499194 (tabla 41, continuación) observamos una disminución del alelo minoritario en enfermos con respecto a controles, con una significación nominal ( $p=0.05$ ). En la estratificación por edad no encontramos diferencias significativas.

El estudio de los haplotipos formados por rs6920220 y rs10499194 no aporta información adicional (datos no mostrados).

Tabla 41.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs6920220 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs6920220 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|-----------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|-----|
|           | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | n           | %    |     |
|           | <b>358</b> |      | <b>646</b> |      |     |    | <b>176</b>  |      | <b>154</b>  |      |     |
| GG        | 240        | 67.0 | 422        | 65.3 | 0.6 | -- | 120         | 68.2 | 102         | 66.2 | 0.7 |
| GA        | 102        | 28.5 | 200        | 31.0 | 0.4 | -- | 46          | 26.1 | 47          | 30.5 | 0.4 |
| AA        | 16         | 4.5  | 24         | 3.7  | 0.6 | -- | 10          | 5.7  | 5           | 3.2  | 0.3 |
| G         | 582        | 81.3 | 1044       | 80.8 | 0.8 | -- | 286         | 81.3 | 251         | 81.5 | 0.9 |
| A         | 134        | 18.7 | 248        | 19.2 |     |    | 66          | 18.7 | 57          | 18.5 |     |

Tabla 41 (continuación).- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs10499194 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs10499194 | DT1        |      | Controles  |      | p    | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p   |
|------------|------------|------|------------|------|------|------------------|-------------|------|-------------|------|-----|
|            | n          | %    | n          | %    |      |                  | n           | %    | n           | %    |     |
|            | <b>399</b> |      | <b>776</b> |      |      |                  | <b>187</b>  |      | <b>181</b>  |      |     |
| CC         | 206        | 51.6 | 357        | 46.0 | 0.07 | 1.25 (0.98-1.61) | 92          | 49.2 | 96          | 53.0 | 0.5 |
| CT         | 161        | 40.4 | 340        | 43.8 | 0.3  | --               | 79          | 42.2 | 72          | 39.8 | 0.6 |
| TT         | 32         | 8.0  | 79         | 10.2 | 0.2  | --               | 16          | 8.6  | 13          | 7.2  | 0.6 |
| C          | 573        | 71.8 | 1054       | 67.9 | 0.05 | 0.83 (0.69-1.01) | 263         | 70.3 | 264         | 72.9 | 0.4 |
| T          | 225        | 28.2 | 498        | 32.1 |      |                  | 111         | 29.7 | 98          | 27.1 |     |

Dentro de esta región, el polimorfismo rs6920220 se ha incluido en dos de los principales GWAS realizados en DT1 y, aunque se han observado diferencias en el estudio caso-control, dichas diferencias no alcanzan el umbral de significación requerido para este tipo de estudios<sup>35,62</sup>. En 2009, Fung *et al*<sup>54</sup> ampliaron el estudio de la región incluyendo el polimorfismo rs10499194. Dicho polimorfismo se había estudiado previamente en AR y se había observado un pequeño efecto protector (OR=0.90). Fung *et al* encontraron un efecto protector en este polimorfismo también en DT1, y de una magnitud comparable a la que se observó previamente en AR. A pesar de que contamos con menos del 50% de potencia para replicar este efecto, observamos una disminución significativa del alelo minoritario del rs10499194 en enfermos con respecto a controles, en consonancia con el estudio de Fung *et al*<sup>54</sup>.

El polimorfismo rs6920220 fue incluido también en el estudio de Fung *et al*<sup>54</sup> y se encontró un débil efecto de susceptibilidad semejante al descrito para AR en población europea. No llegamos a observar ningún efecto del rs6920220, equivalente ( $r^2=1$ ) a otro polimorfismo citado en la bibliografía (rs2327832, relacionado co DT1<sup>32</sup> y EC<sup>97</sup>), probablemente por falta de potencia del estudio (menos del 50%).

## Región 17q21 (genes *STAT3-PTRF*)

Primer estudio en DT1: Fung *et al* (2009)<sup>54</sup>

Asociado previamente a enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple

**Estudio de gen candidato**

Al igual que *STAT4*, la molécula *STAT3* es un factor de transcripción citoplásmico que, al fosforilarse, dimeriza y se transloca al núcleo celular donde activa diversos genes. En el caso de *STAT3*, se ha visto que participa en varias rutas, desde la apoptosis hasta la activación de respuestas del sistema inmunitario o la diferenciación de linfocitos T a Th17<sup>133</sup>. Para explicar la patogenia de la DT1 se ha estudiado principalmente la contribución de las Tregs<sup>136,201</sup> y de la vía Th1<sup>132,135</sup>. La participación de los linfocitos Th17 en el desencadenamiento de ciertas enfermedades autoinmunes como EII<sup>133,202</sup> o EC<sup>203,204</sup>, está menos estudiada en DT1. Se han descrito alteraciones de este subgrupo de linfocitos T en DT1, pero aún no se entiende bien su implicación en la enfermedad<sup>205,206</sup>.

Estudios previos han encontrado polimorfismos en *STAT3* vinculados a ECh<sup>35,45</sup> y a EM<sup>99</sup>. En nuestro estudio, seleccionamos cuatro polimorfismos en la región 17q21, situados en los genes *STAT3* y *PTRF*, basándonos en las asociaciones previas de esta región con enfermedades autoinmunes con las que DT1 comparte otros genes de susceptibilidad (*PTPN235* y *PTPN22207* en ECh; *IL2RA65*, *IL289* e *IL7R68* en EM) y bajo la hipótesis de que la vía Th17 pudiera estar implicada en la patogénesis de la enfermedad del mismo modo que en ECh y EM. Para ello seleccionamos el polimorfismo que se ha asociado en estudios previos a ECh<sup>45</sup> y EM<sup>99</sup> (rs744166) y otros tres polimorfismos a lo largo de la región: rs1026916, un polimorfismo equivalente a una variante estudiada en EM<sup>99</sup> (rs957970,  $r^2=1$ ) y prácticamente equivalente a un polimorfismo débilmente asociado en DT1<sup>54</sup> (rs3816769,  $r^2=0.96$ ), y otros dos polimorfismos (rs3809758 y rs12948909) para ampliar la variabilidad del estudio.

En el análisis caso-control no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los cuatro polimorfismos analizados, aunque observamos una disminución del alelo minoritario del polimorfismo rs1026916 en enfermos con respecto a controles que muestra una tendencia a la significación ( $p=0.1$ , tabla 42). En la estratificación por edad encontramos grandes diferencias en la distribución de los genotipos en los polimorfismos rs744166 y rs1026916, unas diferencias que no se reflejan en la distribución alélica de ambos polimorfismos. Es posible que una influencia de los polimorfismos en la edad de debut no se vea en el análisis estratificado por grupos de edad por una incorrecta selección del punto de corte. Por ello, realizamos también el análisis de la edad de debut como variable continua en los distintos genotipos, alelos y portadores de cada alelo de ambos polimorfismos (tabla 43). No encontramos diferencias significativas en dicho análisis. Por tanto, las diferencias que observamos en

las frecuencias genotípicas en la estratificación por edad son probablemente fruto del azar.

El estudio de los haplotipos formados por los cuatro polimorfismos estudiados no aporta información adicional (datos no mostrados).

Tabla 42.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de los genes *STAT3* (rs3809758, rs744166 y rs1026916) y *PTRF* (rs12948909) en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs3809758         | DT1        |          | Controles  |          |          | OR               | DT1≤16 años |          | DT1>16 años |          | p        |
|-------------------|------------|----------|------------|----------|----------|------------------|-------------|----------|-------------|----------|----------|
|                   | n          | %        | n          | %        | p        |                  | n           | %        | n           | %        |          |
| <b>TT</b>         | <b>382</b> |          | <b>779</b> |          |          | --               | <b>184</b>  |          | <b>167</b>  |          |          |
| TT                | 237        | 62.0     | 487        | 62.5     | 0.9      | --               | 113         | 61.4     | 103         | 61.7     | 0.9      |
| CT                | 133        | 34.8     | 256        | 32.9     | 0.5      | --               | 66          | 35.9     | 59          | 35.3     | 0.9      |
| CC                | 12         | 3.1      | 36         | 4.6      | 0.2      | --               | 5           | 2.7      | 5           | 3.0      | 1        |
| T                 | 607        | 79.5     | 1230       | 78.9     | 0.8      | --               | 292         | 79.3     | 265         | 79.3     | 1        |
| C                 | 157        | 20.5     | 328        | 21.1     |          |                  | 76          | 20.7     | 69          | 20.7     |          |
| <b>rs744166</b>   | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>p</b> | <b>OR</b>        | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>p</b> |
|                   | <b>379</b> |          | <b>795</b> |          |          |                  | <b>181</b>  |          | <b>167</b>  |          |          |
| AA                | 133        | 35.1     | 274        | 34.5     | 0.8      | --               | 54          | 29.8     | 67          | 40.1     | 0.04     |
| AG                | 191        | 50.4     | 372        | 46.8     | 0.2      | --               | 105         | 58.0     | 70          | 41.9     | 0.003    |
| GG                | 55         | 14.5     | 149        | 18.7     | 0.07     | 0.74 (0.52-1.04) | 22          | 12.2     | 30          | 18.0     | 0.1      |
| A                 | 457        | 60.3     | 920        | 57.9     |          |                  | 213         | 58.8     | 204         | 61.1     |          |
| G                 | 301        | 39.7     | 670        | 42.1     | 0.3      | --               | 149         | 41.2     | 130         | 38.9     | 0.5      |
| <b>rs1026916</b>  | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>p</b> | <b>OR</b>        | <b>N</b>    | <b>%</b> | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>p</b> |
|                   | <b>373</b> |          | <b>790</b> |          |          |                  | <b>179</b>  |          | <b>164</b>  |          |          |
| GG                | 155        | 41.6     | 303        | 38.4     | 0.3      | --               | 64          | 35.8     | 77          | 47.0     | 0.04     |
| GA                | 180        | 48.3     | 382        | 48.4     | 1        | --               | 103         | 57.5     | 63          | 38.4     | 0.0004   |
| AA                | 38         | 10.2     | 105        | 13.3     | 0.1      | 0.74 (0.49-1.12) | 12          | 6.7      | 24          | 14.6     | 0.02     |
| G                 | 490        | 65.7     | 988        | 62.5     |          |                  | 231         | 64.5     | 217         | 66.2     |          |
| A                 | 256        | 34.3     | 592        | 37.5     | 0.1      | 0.87 (0.72-1.05) | 127         | 35.5     | 111         | 33.8     | 0.7      |
| <b>rs12948909</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>p</b> | <b>OR</b>        | <b>N</b>    | <b>%</b> | <b>n</b>    | <b>%</b> | <b>p</b> |
|                   | <b>382</b> |          | <b>786</b> |          |          |                  | <b>183</b>  |          | <b>168</b>  |          |          |
| AA                | 192        | 50.3     | 397        | 50.5     | 0.9      | --               | 88          | 48.1     | 91          | 54.2     | 0.3      |
| AC                | 154        | 40.3     | 324        | 41.2     | 0.8      | --               | 79          | 43.2     | 59          | 35.1     | 0.1      |
| CC                | 36         | 9.4      | 65         | 8.3      | 0.5      | --               | 16          | 8.7      | 18          | 10.7     | 0.5      |
| A                 | 538        | 70.4     | 1118       | 71.1     |          |                  | 255         | 69.7     | 241         | 71.7     |          |
| C                 | 226        | 29.6     | 454        | 28.9     | 0.7      | --               | 111         | 30.3     | 95          | 28.3     | 0.6      |

Tabla 43.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario de los polimorfismos rs744166 y rs1026916.

|                  |     | Edad de debut (años)        |                                 |       | p |
|------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|---|
| rs744166         | n   | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |   |
| AA               | 121 | 18.6 (9.8)                  | 18.0 (11.0, 24.5)               | 0.210 |   |
| AG               | 175 | 17.5 (11.8)                 | 14.0 (8.0, 24.0)                |       |   |
| GG               | 52  | 18.3 (9.5)                  | 18.0 (12.0, 25.0)               |       |   |
| A                | 417 | 18.1 (10.7)                 | 16.0 (10.0, 24.0)               | 0.570 |   |
| G                | 279 | 17.8 (11.0)                 | 15.0 (10.0, 25.0)               |       |   |
| Portador de A    | 457 | 17.9 (11.0)                 | 16.0 (10.0, 24.0)               | 0.492 |   |
| GG               | 52  | 18.3 (9.5)                  | 18.0 (12.0, 25.0)               |       |   |
| Portador de G    | 227 | 17.7 (11.3)                 | 15.0 (9.0, 25.0)                | 0.181 |   |
| AA               | 121 | 18.6 (9.8)                  | 18.0 (11.0, 24.5)               |       |   |
| <b>rs1026916</b> |     |                             |                                 |       |   |
| GG               | 141 | 18.7 (10.5)                 | 18.0 (11.0, 25.0)               | 0.097 |   |
| GA               | 166 | 17.1 (14.0)                 | 14.0 (8.8, 24.0)                |       |   |
| AA               | 36  | 18.8 (7.9)                  | 18.5 (13.3, 25.0)               |       |   |
| G                | 448 | 18.1 (10.9)                 | 16.0 (10.0, 24.0)               | 0.628 |   |
| A                | 238 | 17.6 (10.6)                 | 15.0 (10.0, 25.0)               |       |   |
| Portador de A    | 202 | 17.4 (11.0)                 | 15.0 (9.0, 24.3)                | 0.162 |   |
| GG               | 141 | 18.7 (10.5)                 | 18.0 (11.0, 25.0)               |       |   |
| Portador de G    | 307 | 17.9 (11.1)                 | 15.0 (10.0, 24.0)               | 0.239 |   |
| AA               | 36  | 18.8 (7.9)                  | 18.5 (13.3, 25.0)               |       |   |

En este estudio tenemos un 80% de potencia para detectar ORs superiores a 1.29. Por tanto, podemos descartar un efecto mayor de cada polimorfismo. La asociación del polimorfismo rs744166 encontrada previamente en EM es pequeña (OR=0.87), un efecto para el que nuestro estudio tiene una potencia estadística inferior al 50%. Con nuestro análisis no podemos descartar efectos de esta magnitud en la región.

Salvo el polimorfismo rs3809758, los demás polimorfismos se han incluido al menos en el estudio del WTCCC y en el trabajo de Cooper *et al*<sup>62</sup> en población americana. En el estudio del WTCCC los polimorfismos rs744166, rs1026916 y rs12948909 presentan diferencias entre enfermos y controles ( $p=10^{-3}$ ), pero dichas diferencias no alcanzan el límite de significación exigido al estudio y por tanto, probablemente se trata de falsos positivos.

Recientemente, el estudio de Fung *et al*<sup>54</sup>, en el que analizaban 17 polimorfismos en DT1 seleccionados por su asociación con varias enfermedades autoinmunes, encontró evidencias de asociación del rs3816769 ( $r^2=0.96$  con rs1026916) con la enfermedad, con un débil efecto protector (OR=0.93). En nuestro estudio, encontramos una OR=0.87. Aunque la comparación no es estadísticamente significativa, observamos una ligera tendencia a la significación ( $p=0.1$ ). Probablemente no detectamos una asociación estadísticamente significativa por falta de potencia, ya que tenemos menos del 50% para replicar el estudio previo de Fung *et al*<sup>54</sup>. Este estudio apuntaría a una implicación de STAT3 en la patogenia de la DT1. De confirmarse los datos observados por Fung *et al*, la asociación de este gen a DT1 es más débil (OR=0.93) que la observada para otro polimorfismo en ECh (rs744166, OR=1.18<sup>45</sup>) y en EM (rs744166, OR=0.87<sup>99</sup>).



## Región 9q33 (genes *TRAF1-C5*)

Primer estudio en DT1: Kurreeman *et al* (2010)<sup>56</sup>

### Estudio de gen candidato

La región 9q33, que comprende los genes *TRAF1* y *C5*, se ha estudiado principalmente en AR. Mediante GWAS y estudios de mapeo fino de la región se acotó la asociación a un marcador, rs10818488<sup>100</sup>. Nuestro grupo ha participado, en colaboración con el grupo del doctor Javier Martín del Instituto de Biomedicina López-Neyra (Granada), en un estudio multicéntrico que analiza la asociación de dicho polimorfismo con varias enfermedades autoinmunes, entre ellas DT1<sup>56</sup>. En dicho estudio, el análisis conjunto de los datos de dos poblaciones (holandesa y nuestra población española) mostraba una asociación moderada a DT1 (OR=1.16 [1.03-1.30]; p=0.013). La población holandesa estaba compuesta por pacientes con debut pediátrico (16 años o menos), mientras que nuestra población incluía 303 pacientes con debut pediátrico y adulto.

Un análisis más detallado de los resultados del marcador rs10818488 en nuestra población aportó datos que hacían interesante ampliar el estudio en esta región. Encontramos un aumento del alelo de susceptibilidad A en enfermos con respecto a controles. Dicha asociación no es estadísticamente significativa (OR=1.14 [0.93-1.41]; p=0.2), pero detectamos una OR similar a la observada en la población holandesa, donde la asociación presenta una significación nominal (OR=1.16 [1.00-1.34]; p=0.05). Con nuestros datos del estudio del rs10818488 tenemos menos del 50% de potencia para detectar la OR que se observa en población holandesa.

En el estudio estratificado por edad (tabla 44) observamos una tendencia a la significación en la comparación entre pacientes pediátricos y adultos (p=0.06), y si enfrentamos ambas poblaciones al grupo control, la población pediátrica no presenta diferencias (p=0.9), mientras que sí lo hace la población adulta (OR=1.37 [1.03-1.82]; p=0.02, análisis de homogeneidad en la figura 14). Por los resultados de este análisis, parece que el aumento del alelo de susceptibilidad A en nuestra población solo ocurre en los pacientes con debut adulto. Si analizamos la edad de debut como variable continua (tabla 45), observamos que los individuos que son homocigotos para el alelo de riesgo A debutan entre cinco y ocho años más tarde que los que portan el alelo G, según se tome como referencia la media o la mediana de la distribución, y que dicha diferencia es claramente significativa. Por tanto, el análisis más detallado de los datos del rs10818488 en nuestra población sugiere que el alelo minoritario está asociado únicamente a la DT1 de debut adulto.

Tabla 44.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs10818488 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs10818488 | DT1 |      | Controles |      | p   | OR               | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|------------|-----|------|-----------|------|-----|------------------|-------------|------|-------------|------|------|
|            | n   | %    | n         | %    |     |                  | n           | %    | n           | %    |      |
| <b>GG</b>  | 303 |      | 547       |      | 0.1 | 0.80 (0.59-1.07) | 147         |      | 131         |      | 0.4  |
| <b>GA</b>  | 111 | 36.6 | 230       | 42.0 |     |                  | 57          | 38.8 | 44          | 33.6 |      |
| <b>AA</b>  | 147 | 48.5 | 240       | 43.9 | 0.2 | --               | 75          | 51.0 | 60          | 45.8 | 0.4  |
| <b>A</b>   | 45  | 14.9 | 77        | 14.1 | 0.8 | --               | 15          | 10.2 | 27          | 20.6 | 0.02 |
| <b>G</b>   | 369 | 60.9 | 700       | 64.0 | 0.2 | --               | 189         | 64.3 | 148         | 56.5 | 0.06 |
| <b>A</b>   | 237 | 39.1 | 394       | 36.0 |     |                  | 105         | 35.7 | 114         | 43.5 |      |

Figura 15.- Forest Plot correspondiente al meta-análisis de las frecuencias alélicas del rs10818488 en nuestras poblaciones pediátrica y adulta, y en población holandesa (pediátrica).

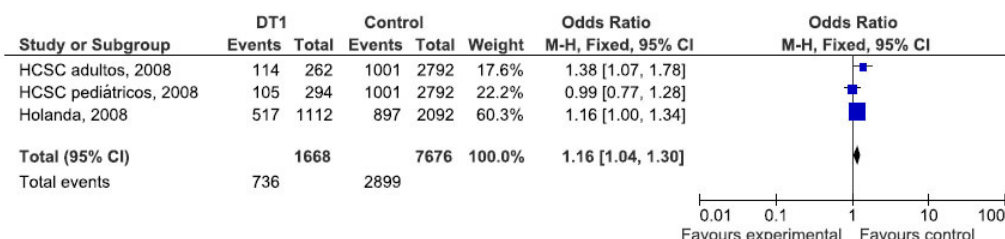


Tabla 45.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs10818488.

| rs10818488           | N   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|----------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|                      |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| <b>GG</b>            | 101 | 16.9 (10.7)                 | 14.0 (8.0, 24.5)                | 0.033 |
| <b>GA</b>            | 135 | 16.6 (10.1)                 | 15.0 (10.0, 22.0)               |       |
| <b>AA</b>            | 42  | 21.0 (10.6)                 | 23.5 (12.8, 27.3)               |       |
| <b>Alelo G</b>       | 337 | 16.8 (10.4)                 | 15.0 (9.0, 23.0)                | 0.063 |
| <b>Alelo A</b>       | 219 | 18.3 (10.4)                 | 17.0 (11.0, 25.0)               |       |
| <b>Portador de G</b> | 236 | 16.7 (10.3)                 | 15.0 (9.0, 23.0)                | 0.009 |
| <b>AA</b>            | 42  | 21.0 (10.6)                 | 23.5 (12.8, 27.3)               |       |

Para estudiar la asociación en 9q33 con más profundidad, seleccionamos un grupo de cuatro polimorfismos que cubren la variabilidad del gen *TRAF1* y los estudiamos en una muestra de DT1 aumentada en 140 pacientes con respecto al estudio original. Dentro de los marcadores seleccionados, estudiamos un polimorfismo prácticamente equivalente al rs10818488, (rs3761847,  $r^2=0.95$ ), que se ha utilizado en algunos estudios para analizar la asociación de esta región a AR<sup>208</sup>, y otros tres marcadores (rs13440146, rs2269059 y rs2416806) que tienen una equivalencia baja o moderada ( $r^2<0.66$ ) con el marcador previamente estudiado.

→ Reanálisis de la asociación encontrada en rs10818488 a través de rs3761847:

Analizamos de nuevo la asociación que habíamos observado en el polimorfismo rs10818488 con la DT1 de debut adulto, en este caso con 123 pacientes nuevos en el estudio. En el análisis de las frecuencias alélicas del rs3761847 (tabla 46), se mantienen los resultados que habíamos observado en el análisis del rs10818488, tanto en el estudio caso-control como en la estratificación por edad: no observamos asociación estadísticamente significativa en el estudio caso-control, mientras que en la estratificación por edad vemos que el alelo minoritario está elevado únicamente en los pacientes con debut adulto, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa ( $p=0.07$ ). Si comparamos las poblaciones de debut pediátrico y adulto, solo la población adulta mantiene la tendencia a la significación al compararla con la población control (frecuencias alélicas, debut pediátrico vs controles:  $p=0.7$ ; debut adulto vs controles OR= 1.24 [0.98-1.59];  $p=0.07$ ).

Tabla 46.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs3761847 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs3761847 | DT1        |      | Controles  |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|-----------|------------|------|------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|------|
|           | n          | %    | n          | %    |     |    | n           | %    | N           | %    |      |
| <b>AA</b> | <b>428</b> |      | <b>526</b> |      |     | -- | <b>198</b>  |      | <b>198</b>  |      |      |
|           | 165        | 38.6 | 219        | 41.6 | 0.3 | -- | 82          | 41.4 | 72          | 36.4 | 0.3  |
| <b>AG</b> | 196        | 45.8 | 233        | 44.3 | 0.6 | -- | 93          | 47.0 | 88          | 44.4 | 0.6  |
| <b>GG</b> | 67         | 15.7 | 74         | 14.1 | 0.5 | -- | 23          | 11.6 | 38          | 19.2 | 0.04 |
| <b>A</b>  | 526        | 61.4 | 671        | 63.8 | 0.3 | -- | 257         | 64.9 | 232         | 58.6 |      |
| <b>G</b>  | 330        | 38.6 | 381        | 36.2 |     |    | 139         | 35.1 | 164         | 41.4 | 0.07 |

Al analizar la edad de debut como variable continua (tabla 47), observamos que las diferencias que veíamos en el estudio del rs10818488 se han reducido con el aumento del número de pacientes. Solo el análisis de portadores del alelo A bordea la significación, mostrando unas diferencias en la edad de debut de dos a seis años, según se utilice la media o la mediana de la distribución.

Tabla 47.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs3761847.

| rs3761847         | N   | Edad de debut (años)        |                                 | p     |
|-------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|                   |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| <b>AA</b>         | 154 | 18.5 (11.2)                 | 15.5 (10.0, 28.0)               | 0.149 |
| <b>AG</b>         | 181 | 18.3 (11.3)                 | 16.0 (11.0, 24.5)               |       |
| <b>GG</b>         | 61  | 20.6 (9.9)                  | 22.0 (13.5, 26.5)               |       |
| <b>A</b>          | 489 | 18.4 (11.2)                 | 16.0 (10.0, 25.0)               | 0.140 |
| <b>G</b>          | 303 | 19.2 (10.8)                 | 18.0 (12.0, 26.0)               |       |
| <b>Portador A</b> | 335 | 18.4 (11.2)                 | 16.0 (11.0, 25.0)               | 0.051 |
| <b>GG</b>         | 61  | 20.6 (9.9)                  | 22.0 (13.5, 26.5)               |       |

→ *Análisis de nuevos marcadores en la región 9q33:*

Dentro de los tres marcadores adicionales estudiados, encontramos indicios de asociación del rs2269059 con los pacientes de DT1 de debut adulto (tabla 48). Al igual que en los polimorfismos rs3761847 y rs10818488, el estudio caso-control no revela diferencias estadísticamente significativas entre el grupo total de pacientes DT1 y controles. Sin embargo, en la estratificación por edad observamos un aumento del alelo minoritario A estadísticamente significativo en los pacientes con debut adulto de la enfermedad. Al comparar ambas poblaciones con controles, la población pediátrica no se diferencia de la población sana general ( $p=0.6$ ) mientras que sí lo hace la población adulta ( $OR=1.52$  [ $1.00-2.31$ ];  $p=0.04$ ). En el análisis de la edad de debut como variable continua (tabla 49), encontramos diferencias significativas tanto en los genotipos como en los alelos y portadores del alelo minoritario, de forma que los individuos que portan el alelo A tienen una edad de debut entre tres y cinco años mayor que aquéllos que portan el alelo común.

Tabla 48.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs2269059 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs2269059 | DT1        |      | Controles   |      | p   | OR | DT1≤16 años |      | DT1>16 años |      | p    |
|-----------|------------|------|-------------|------|-----|----|-------------|------|-------------|------|------|
|           | n          | %    | N           | %    |     |    | n           | %    | N           | %    |      |
| <b>AA</b> | <b>3</b>   | 0.7  | <b>2</b>    | 0.4  | 0.5 | -- | <b>2</b>    | 1.0  | <b>1</b>    | 0.5  | 0.6  |
| <b>AT</b> | <b>67</b>  | 15.7 | <b>73</b>   | 13.4 | 0.3 | -- | <b>21</b>   | 10.6 | <b>39</b>   | 19.8 | 0.01 |
| <b>TT</b> | <b>358</b> | 83.6 | <b>469</b>  | 86.2 | 0.3 | -- | <b>176</b>  | 88.4 | <b>157</b>  | 79.7 | 0.02 |
| <b>A</b>  | <b>73</b>  | 8.5  | <b>77</b>   | 7.1  |     |    | <b>25</b>   | 6.3  | <b>41</b>   | 10.4 |      |
| <b>T</b>  | <b>783</b> | 91.5 | <b>1011</b> | 92.9 | 0.2 | -- | <b>373</b>  | 93.7 | <b>353</b>  | 89.6 | 0.04 |

Tabla 49.- Diferencias en la edad de debut de DT1 entre genotipos, alelos y homocigotos para el alelo minoritario del polimorfismo rs2269059.

| rs2269059            | N   | Edad de debut (años)        |                                 | P     |
|----------------------|-----|-----------------------------|---------------------------------|-------|
|                      |     | Media y desviación estándar | Mediana y rango intercuartílico |       |
| <b>AA</b>            | 3   | 15.0 (7.6)                  | 16.0 (7.0, 22.0)                | 0.021 |
| <b>AT</b>            | 60  | 21.9 (10.6)                 | 22.0 (14.3, 28.0)               |       |
| <b>TT</b>            | 333 | 18.1 (11.1)                 | 16.0 (10.0, 25.0)               |       |
| <b>A</b>             | 66  | 21.2 (10.5)                 | 21.0 (14.0, 27.3)               | 0.020 |
| <b>T</b>             | 726 | 18.4 (11.1)                 | 16.0 (11.0, 25.0)               |       |
| <b>Portador de A</b> | 63  | 21.5 (10.5)                 | 21.0 (14.0, 28.0)               | 0.010 |
| <b>TT</b>            | 333 | 18.1 (11.1)                 | 16.0 (10.0, 25.0)               |       |

Cabe resaltar que, dado que la asociación descrita en rs2269059 supone una nueva descripción en DT1 y no una replicación de una asociación previa, se debería aplicar algún tipo de corrección estadística por múltiples comparaciones. Los datos que obtenemos no soportan la corrección estadística requerida. Sin embargo, nos parece interesante resaltar este resultado, con la precaución de que pueda ser un falso positivo, debido a que podría tratarse de la primera asociación de un gen a la DT1 de debut adulto. Además, vemos este indicio de asociación con dos polimorfismos

distintos (rs3761847 y rs2269059) que tienen una equivalencia baja ( $r^2=0.12$ ). Por tanto, nos parece interesante tratar de replicar estos datos en una nueva población con debut adulto de la enfermedad para verificar que las diferencias que observamos constituyen una asociación verídica y no un falso positivo.

En el estudio de los otros dos marcadores seleccionados (rs13440146 y rs2416806, tabla 50) no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes de DT1 y controles. Tampoco encontramos diferencias significativas en la estratificación por edad.

El análisis de los haplotipos formados por los cuatro marcadores no aporta información adicional (datos no mostrados).

Tabla 50.- Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs13440146 y rs2416806 en pacientes de DT1, controles y pacientes estratificados por edad de debut.

| rs13440146       | DT1        |          | Controles  |          |          | p         | OR         | DT1≤16 años |            | DT1>16 años |          | p |
|------------------|------------|----------|------------|----------|----------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|----------|---|
|                  | n          | %        | n          | %        | n        |           |            | %           | n          | %           |          |   |
|                  | <b>430</b> |          | <b>544</b> |          |          |           | <b>200</b> |             | <b>198</b> |             |          |   |
| GG               | 388        | 90.2     | 476        | 87.5     | 0.2      | --        | 183        | 91.5        | 176        | 88.9        | 0.4      |   |
| GT               | 42         | 9.8      | 66         | 12.1     | 0.2      | --        | 17         | 8.5         | 22         | 11.1        | 0.4      |   |
| TT               | 0          | 0.0      | 2          | 0.4      | 0.2      | --        | 0          | 0.0         | 0          | 0.0         | --       |   |
| G                | 818        | 95.1     | 1018       | 93.6     | 0.1      | --        | 383        | 95.8        | 374        | 94.4        | 0.4      |   |
| T                | 42         | 4.9      | 70         | 6.4      |          |           | 17         | 4.2         | 22         | 5.6         |          |   |
| <b>rs2416806</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>n</b>   | <b>%</b> | <b>p</b> | <b>OR</b> | <b>n</b>   | <b>%</b>    | <b>n</b>   | <b>%</b>    | <b>p</b> |   |
|                  | <b>431</b> |          | <b>543</b> |          |          |           | <b>202</b> |             | <b>197</b> |             |          |   |
| CC               | 206        | 47.8     | 272        | 50.1     | 0.5      | --        | 99         | 49.0        | 92         | 46.7        | 0.6      |   |
| CG               | 188        | 43.6     | 217        | 40.0     | 0.3      | --        | 88         | 43.6        | 86         | 43.7        | 0.9      |   |
| GG               | 37         | 8.6      | 54         | 9.9      | 0.5      | --        | 15         | 7.4         | 19         | 9.6         | 0.4      |   |
| C                | 600        | 69.6     | 761        | 70.1     | 0.8      | --        | 286        | 70.8        | 270        | 68.5        | 0.5      |   |
| G                | 262        | 30.4     | 325        | 29.9     |          |           | 118        | 29.2        | 124        | 31.5        |          |   |

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna región que esté asociada exclusivamente al debut adulto de DT1, principalmente porque los grandes estudios genéticos apenas han incorporado en sus muestras a pacientes que tuvieran una edad de debut superior a la edad pediátrica<sup>13,35,79</sup>. Con esta restricción, es comprensible que situaciones como la que observamos en los marcadores rs10818488, rs3761847 y rs2269059 en nuestra población no se lleguen a detectar en dichos estudios. Además, en una de las pocas grandes poblaciones de DT1 que admite pacientes con debut adulto<sup>62</sup> (hasta 30 años de edad) no se realizaron análisis para detectar las posibles diferencias por edad que pudieran presentar los marcadores estudiados.

Aunque los cinco marcadores que hemos incluido en nuestro estudio no se han analizado en los tres estudios de barrido genómico realizados hasta la fecha en DT1<sup>35,49,62</sup>, se han incluido marcadores que tienen una equivalencia total con ellos ( $r^2=1$ ) y no se ha detectado asociación con la enfermedad. Sin embargo, esta falta de asociación no implica necesariamente que nuestros resultados sean un falso positivo. En primer lugar, todos los estudios menos uno<sup>62</sup> han estudiado a pacientes con una edad de debut inferior a los 17 años. En nuestro estudio, nosotros tampoco encontramos asociación de los marcadores estudiados con la DT1 de debut pediátrico (diagnóstico a edad inferior a 17 años). En segundo lugar, el estudio en la

única población con individuos con debut adulto en la que se han genotipado algunos de estos marcadores (GoKind, Cooper *et al*, 2008<sup>62</sup>) no realiza un análisis de la asociación de dichos marcadores con la edad de debut de la enfermedad, sino un análisis en bloque de todos los pacientes frente a los controles. En nuestro estudio no observamos indicios de asociación hasta que realizamos la estratificación por edad. Según nuestro análisis, estos marcadores no están asociados a la DT1 en general, sino solo a la DT1 de debut adulto. Con un análisis general se está infraestimando esta posible asociación.

En esta región se encuentran dos genes de interés inmunológico: *TRAF1* y *C5*. El primero codifica un miembro de la familia de factores asociados al receptor del TNF (TRAFs) que forma parte de la ruta del factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>209</sup>. El segundo codifica la proteína C5 de la cascada del complemento. Estudios recientes apuntan hacia *TRAF1* como el candidato más probable a participar en la patología de la DT1, puesto que se ha observado que tiene un papel antiapoptótico en células beta pancreáticas expuestas a citoquinas proinflamatorias<sup>116,210</sup>. En uno de estos estudios se ha observado que, cuando la exposición a citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) es continua, llega un punto en que la actividad antiapoptótica de *TRAF1* y otros genes como *TNFAIP3* no puede contrarrestar el estímulo pro-apoptótico inducido por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>116</sup>. Por tanto y según dicho estudio, *TRAF1* actuaría prolongando la supervivencia de las células beta del páncreas en un ambiente inflamatorio. Podría ocurrir que el marcador etiológico en desequilibrio de ligamiento con las tres señales estudiadas produzca un efecto antiapoptótico de *TRAF1* más eficiente y, por tanto, una pérdida más lenta de células  $\beta$  que conllevaría un retraso en el debut clínico de la enfermedad y la asociación de dicho genotipo a un debut más tardío de DT1.

## Discusión general y nuevas perspectivas

---

Los estudios de asociación de genes candidatos y el actual abordaje mediante GWAS han desvelado la mayor parte de las variantes comunes asociadas con la DT1 con un efecto moderado o fuerte ( $OR > 1.2$ )<sup>32</sup>. En este estudio abordamos la replicación de trece regiones asociadas previamente con la enfermedad, un trabajo necesario para comprobar que las asociaciones descritas se mantienen con la misma magnitud en poblaciones diferentes.

A pesar del gran avance experimentado gracias a los GWAS y de la cantidad de asociaciones descubiertas hasta la fecha, aún no se ha conseguido desvelar el 100% del componente genético de la DT1<sup>32</sup>. Los grandes estudios genéticos buscan ahora la forma de abordar dos tipos de asociaciones que los GWAS y los estudios de asociación clásicos tienen dificultad en cubrir:

→ Variantes comunes con bajo efecto en la enfermedad: los GWAS realizados hasta la fecha tienen una potencia suficiente para detectar asociaciones moderadas ( $OR > 1.20$ ) en variantes comunes en la población, pero tienen en general baja potencia para detectar efectos débiles ( $OR = 1.05-1.20$ )<sup>42,49</sup>, algo que se intenta solventar mediante el reclutamiento de grandes grupos de pacientes. En estos casos, el meta-análisis de GWAS es una herramienta útil para detectar asociaciones con efecto débil. El estudio de Barrett *et al*<sup>49</sup>, que realizaba un barrido genómico en una población de 3983 pacientes y 3999 controles sanos, incluía además un meta-análisis con los datos de dos GWAS previos<sup>35,62</sup>, incrementando así la población de estudio hasta 7514 casos y 9045 controles. Esta estrategia permitió a los autores describir hasta cuarenta regiones asociadas a DT1, varias de ellas con efectos pequeños sobre la enfermedad.

→ Variantes raras con gran efecto en la enfermedad: los GWAS no tienen potencia suficiente para detectar asociaciones en variantes con baja frecuencia en la población (inferior al 3-5%)<sup>42</sup>. Algunos estudios están abordando estos análisis mediante una primera fase de secuenciación en pocos pacientes, con el objetivo de caracterizar las variantes raras, y el posterior análisis de dichas variantes en un grupo amplio de enfermos y controles. Un ejemplo de este tipo de estudios es el descubrimiento de nuevos polimorfismos en el gen *IFIH1*, publicado en 2009<sup>211</sup>, en el cual los autores partían de una primera fase en la que secuenciaban éste y otros genes en 480 pacientes y 480 controles en busca de variantes con una frecuencia alélica menor del 3%. Posteriormente, los polimorfismos encontrados se analizaban en un estudio caso-control con 8379 pacientes DT1 y 10575 controles. Los autores identificaron cuatro variantes en el gen con frecuencias del alelo minoritario de entre 1.3 y 4.2% que conferían un efecto protector al desarrollo de DT1 ( $ORs = 0.51-0.74$ ) más fuerte que el conferido por la variante común clásicamente asociada a la enfermedad ( $OR = 0.86$ )<sup>90</sup>. Estrategias de este tipo permitirán descubrir variantes raras que tengan un gran efecto en la susceptibilidad a la DT1.

En este trabajo encontramos diferencias interesantes en las asociaciones descritas en el HLA. No observamos efecto del heterocigoto *DRB1\*03 / DRB1\*04-DQB1\*03:02* en el adelanto de la edad de debut de la DT1, algo que se ha descrito en otras poblaciones<sup>31,83,152</sup>. Además, esta combinación haplotípica está considerada como la de mayor riesgo<sup>25,31,147</sup>, pero en nuestro estudio es la tercera en riesgo conferido por detrás de los homocigotos *DRB1\*04-DQB1\*03:02* y *DRB1\*03*. En nuestra población también encontramos un efecto de susceptibilidad conferido por el haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02* que no se ha descrito en otras poblaciones. Estas discrepancias que observamos podrían deberse a diferencias poblacionales como la que afecta a los diferentes haplotipos que incluyen *DRB1\*03*. Dentro del HLA existen una serie de haplotipos altamente conservados que se denominan haplotipos ancestrales (AH). El alelo *DRB1\*03* se encuentra en dos AH: *B\*8-DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* (AH8.1) y *B\*18-DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* (AH18.2). Nuestro grupo describió en un estudio previo<sup>30</sup> que el AH18.2 confiere un riesgo mayor a DT1 que el AH8.1, probablemente por la presencia de una variante genética en el AH18.2 que no está presente en el AH8.1. Ambos haplotipos se distribuyen en Europa según un gradiente de frecuencia Norte-Sur, de modo que el AH8.1 es más frecuente en las poblaciones nórdicas y el AH18.2 presenta mayor frecuencia en poblaciones mediterráneas. Por tanto, esta mayor susceptibilidad conferida por el AH18.2 se ve más claramente en poblaciones mediterráneas que en poblaciones nórdicas, y genera diferencias en la susceptibilidad conferida por el HLA en estas poblaciones. Esta mayor abundancia del AH18.2 en población española podría estar detrás del mayor riesgo que describimos en el homocigoto *DRB1\*03*. Por ello, el análisis de estas diferencias geográficas es interesante, especialmente de cara a establecer el riesgo genético de un individuo en una población concreta.

El estudio de la influencia de la genética en la edad de debut de la DT1 es un campo que debe cobrar importancia dentro del estudio general de la genética de la enfermedad, puesto que puede ayudar a conocer algunos de los factores que determinan el ritmo al que ocurre la destrucción autoinmune de las células beta. Éste es un conocimiento que ayudaría a elaborar estrategias de conservación de las células productoras de insulina en los islotes de Langerhans y, por tanto, a retrasar el desarrollo de la DT1. En este trabajo describimos la asociación con la edad de debut de la enfermedad en tres de las diecisiete regiones estudiadas (5p13, 12q13 y 18p11) y encontramos indicios de asociación de un gen exclusivamente con la DT1 de debut adulto (9q33, *TRAF1*). En la literatura se han descrito otras asociaciones con la edad de debut de la enfermedad<sup>81,83,152</sup>. Sin embargo, pocos de estos estudios se han replicado en poblaciones independientes, y existe una heterogeneidad en la metodología empleada para abordar el estudio de estas asociaciones que podría ser en parte responsable de esta falta de replicación. Algunos estudios analizan la asociación con la edad de debut únicamente en poblaciones con comienzo pediátrico de la enfermedad<sup>212,213</sup>. Si una asociación alcanza su máximo en edad pediátrica y

disminuye con la edad, un estudio exclusivamente en población pediátrica podría infraestimar dicha asociación. Del mismo modo, un estudio centrado únicamente en población pediátrica no podría detectar asociaciones que se den con más fuerza o de forma exclusiva en la DT1 de debut adulto, como sería el caso del gen *TRAF1* que describimos en este trabajo. Por otro lado, falta unidad en la metodología empleada para analizar dichas asociaciones entre los distintos trabajos publicados. Algunos estudios emplean métodos de análisis que consideran la edad como variable continua<sup>81,82</sup>, mientras que otros optan por la estratificación del grupo de estudio en subgrupos según la edad de debut (pediátrica o adulta) y analizan la presencia de asociaciones individualmente en cada estrato<sup>84,186</sup>. Esta última estrategia define grupos artificiales con límites que carecen de sentido biológico y aumenta la probabilidad de obtener falsos positivos. En este trabajo hemos realizado los dos tipos de análisis (estratificado y continuo) y en algunas ocasiones observamos indicios de asociación en los análisis estratificados que no se replican en los análisis continuos (el gen *STAT4* en 2q32 o el gen *STAT3* en 17q21), y asociaciones que se detectan débilmente en el análisis estratificado y se ven claramente en el análisis continuo (el polimorfismo rs2292239 en el gen *ERBB3*, 12q13). Presentamos el análisis estratificado en todas las regiones estudiadas con el objetivo de ilustrar la homogeneidad (o falta de ella) entre una población seleccionada en base a los criterios de los grandes estudios genéticos (debut en edad pediátrica) y otra población que recogería a todos aquellos individuos que quedan excluidos de dichos estudios (debut adulto). Sin embargo, consideramos que el análisis continuo es un abordaje más fiable a la hora de determinar diferencias, puesto que estudia únicamente la variante genética de interés y la edad de debut de todos los pacientes que la portan, evitando la excesiva fragmentación de la población. Además, es una estrategia con mayor sentido biológico, ya que evita la separación en grupos distintos de pacientes con características muy parecidas, como serían aquellos individuos inmediatamente por encima o por debajo de la edad de corte escogida.

Por último, dentro de las 17 regiones genéticas incluidas en este trabajo estudiamos el gen *G6PC2*, relacionado con el metabolismo de la glucosa, y no encontramos evidencias claras de asociación con la enfermedad. Este resultado está en consonancia con los estudios previos sobre esta región en DT1 y con todos los estudios de asociación que descartan la implicación de genes relacionados con el funcionamiento de la célula  $\beta$  y el metabolismo de la glucosa<sup>32</sup>. Además, refuerza la idea de que la DT1 es una enfermedad con una base genética relacionada principalmente con el sistema inmunitario y con poca o nula participación de alteraciones en la célula beta o en el metabolismo de la glucosa.



# Conclusiones



## 1. Estudio de genes asociados a la DT1 en la era pre-GWAS:

En el estudio de la susceptibilidad o protección a DT1 conferida por los genes y haplotipos del HLA de clase II diferentes a los clásicamente asociados a la enfermedad:

- Replicamos las asociaciones previamente descritas en los haplotipos: *DQA1\*01:01-DQB1\*05:01*, *DR6-DQA1\*01:03-DQB1\*06:03* y *DQA1\*05:01-DQB1\*03:01*.
- Encontramos un efecto de susceptibilidad conferido por el haplotipo *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02*, que se había observado previamente en nuestra población y no se ha descrito en otras poblaciones.

En el estudio de genes clásicos y edad de debut no encontramos diferencias significativas. Las variantes estudiadas en el HLA de clase II y los genes *INS*, *CTLA4* e *IL2RA* contribuyen de igual manera a la DT1 de debut pediátrico y adulto en nuestra población.

## 2. Asociaciones genéticas descubiertas en la era GWAS:

En el estudio de replicación de regiones asociadas a DT1 mediante GWAS:

- Encontramos una tendencia a la asociación en polimorfismos de las regiones 4q27 (*IL2*) y 12p13 (*KLRB1-CLEC2D*), en consonancia con las asociaciones previamente descritas.
- Replicamos las asociaciones encontradas previamente en las regiones 12q13 (*ERBB3*) y 16p13 (*CLEC16A*).
- No encontramos asociación con DT1 en la región 22q13 (*IL2RB*).

En el estudio de genes candidatos seleccionados por su funcionalidad o a partir de estudios en otras enfermedades autoinmunes:

- Describimos por primera vez la asociación con DT1 del gen *STAT4*.
- Replicamos una de las asociaciones descritas en el gen *TNFAIP3*.
- No encontramos asociación de los genes *IRF5*, *G6PC2* y *STAT3*.

En el análisis de la influencia de las regiones cromosómicas seleccionadas en la edad de debut de la DT1:

- Describimos por primera vez un efecto sobre la edad de debut de la DT1 en las regiones 5p13 (*CAPSL-IL7R*) y 18p11 (*PTPN2*), y replicamos un efecto previamente observado en 12q13 (*ERBB3*).
- Describimos la asociación de polimorfismos en *TRAF1* con la DT1 de debut adulto.



## Publicaciones derivadas de este trabajo

---

Santiago, J.L., Alizadeh, B.Z., Martinez, A., Espino, L., de la Calle, H., Fernandez-Arquero, M., Figueredo, M.A., de la Concha, E.G., Roep, B.O., Koeleman, B.P. and Urcelay, E.: **Study of the association between the CAPSL-IL7R locus and type 1 diabetes.** *Diabetologia* 51 (2008) 1653-8.

Martinez, A., Varade, J., Marquez, A., Cenit, M.C., Espino, L., Perdigonés, N., Santiago, J.L., Fernandez-Arquero, M., de la Calle, H., Arroyo, R., Mendoza, J.L., Fernandez-Gutierrez, B., de la Concha, E.G. and Urcelay, E.: **Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases.** *Arthritis Rheum* 58 (2008) 2598-602.

Martinez, A., Perdigonés, N., Cenit, M.C., Espino, L., Varade, J., Lamas, J.R., Santiago, J.L., Fernandez-Arquero, M., de la Calle, H., Arroyo, R., de la Concha, E.G., Fernandez-Gutierrez, B. and Urcelay, E.: **Chromosomal region 16p13: further evidence of increased predisposition to immune diseases.** *Ann Rheum Dis* 69 (2010) 309-11.

Kurreeman, F.A., Goulielmos, G.N., Alizadeh, B.Z., Rueda, B., Houwing-Duistermaat, J., Sanchez, E., Bevova, M., Radstake, T.R., Vonk, M.C., Galanakis, E., Ortego, N., Verduyn, W., Zervou, M.I., Roep, B.O., Dema, B., Espino, L., Urcelay, E., Boumpas, D.T., van den Berg, L.H., Wijmenga, C., Koeleman, B.P., Huizinga, T.W., Toes, R.E. and Martin, J.: **The TRAF1-C5 region on chromosome 9q33 is associated with multiple autoimmune diseases.** *Ann Rheum Dis* 69 (2010) 696-9.

Espino-Paisan, L., de la Calle, H., Fernandez-Arquero, M., Figueredo, M.A., de la Concha, E.G., Urcelay, E. and Santiago, J.L.: **A polymorphism in PTPN2 gene is associated with an earlier onset of type 1 diabetes.** *Immunogenetics* 63 (2011) 255-8.

Espino-Paisan, L., de la Calle, H., Fernandez-Arquero, M., Figueredo, M.A., de la Concha, E.G., Urcelay, E. and Santiago, J.L.: **Polymorphisms in chromosome region 12q13 and their influence on age at onset of type 1 diabetes.** *Diabetologia* (2011).

Espino-Paisan L., Urcelay E, de la Concha EG, Santiago JL. **Early and late onset type 1 diabetes: one and the same or two distinct genetic entities?** En: David Wagner (editor). *Type 1 Diabetes. Book 2.* InTech Open Access Publisher (2011) (en prensa).

Espino-Paisan, L., de la Calle, H., Fernandez-Arquero, M., Figueredo, M.A., de la Concha, E.G., Urcelay, E. and Santiago, J.L.: **Study of polymorphisms in 4q27, 10p15 and 22q13 regions in autoantibodies stratified type 1 diabetes patients.** *Autoimmunity* (2011) (en prensa).



## **Comunicaciones a congresos relacionadas con este trabajo**

---

Santiago JL, Martínez A, Espino L, de la Calle H, Fernández-Arquero M, Figueredo MA, de la Concha EG, Urcelay E. **Asociación de dos polimorfismos de los genes CAPSL e IL7R con diabetes tipo 1 en población española.** XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca 21-24 Mayo 2008. Poster.

Santiago JL, Martínez A, Espino L, de la Calle H, Fernández-Arquero M, Figueredo MA, de la Concha EG, Urcelay. **Contribución de un polimorfismo en el gen STAT4 a la susceptibilidad a diabetes tipo 1.** XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca 21-24 Mayo 2008. Poster.

Espino-Paisán L, Figueredo MA, de la Calle H, Santiago JL. **Association of 4q27, 10p15, 22q13 chromosomal regions with type 1 diabetes in Spanish population.** 2º European Congress of Immunology. Berlin 13-16 Septiembre 2009. Poster.

Espino-Paisán L, Figueredo MA, de la Calle H, Santiago JL. **KIAA0350 as a susceptibility gene in Spanish type 1 diabetes patients.** 2º European Congress of Immunology. Berlin 13-16 Septiembre 2009. Poster.

Espino-Paisán L, de la Calle H, Nuñez C, Figueredo MA, Urcelay E, Santiago JL. **A polymorphism in PTPN2 gene is associated with early-onset but not with late-onset Type 1 Diabetes.** 7º International Congress on Autoimmunity. Ljubljana, 5-9 Mayo 2010. Poster.

Espino-Paisán L, Figueredo MA, de la Calle H, Santiago JL. **Estudio del HLA y la insulina, genes clásicos de susceptibilidad a diabetes tipo 1, en una población con debut pediátrico y adulto de la enfermedad.** XXXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. San Sebastian 23-26 Junio 2010. Poster.

Espino-Paisán L, Figueredo MA, de la Calle H, Santiago JL. **Polimorfismos en la región 12q13 y su influencia en la edad de debut de la diabetes tipo 1.** XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Pamplona 8-11 Junio 2011. Comunicación oral.

Espino-Paisán L, de la Calle H, Nuñez C, Figueredo MA, Urcelay E, Santiago JL. **Association of TRAF1 gene with adult-onset type 1 diabetes.** FOCIS 2011. Washington DC. 23-26 Junio 2011. Poster.



# Bibliografía



## Bibliografía

---

1. Rich, R., Fleisher, T., Shearer, W., Kotzin, B. & Shroeder, H. *Clinical Immunology. Principles and practice.*, (Mosby International Limited, 2001).
2. Association, A.D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **33 Suppl 1**, S62-9 (2010).
3. Roche, E.F., Menon, A., Gill, D. & Hoey, H. Clinical presentation of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* **6**, 75-8 (2005).
4. Bonifacio, E. & Ziegler, A.G. Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**, 513-25 (2010).
5. Wenzlau, J.M. et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17040-5 (2007).
6. Yang, Z. et al. Childhood diabetes in China. Enormous variation by place and ethnic group. *Diabetes Care* **21**, 525-9 (1998).
7. Silink, M. Childhood diabetes: a global perspective. *Horm Res* **57 Suppl 1**, 1-5 (2002).
8. Patterson, C.C., Dahlquist, G.G., Gyurus, E., Green, A. & Soltesz, G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* **373**, 2027-33 (2009).
9. Felner, E.I. et al. Genetic interaction among three genomic regions creates distinct contributions to early- and late-onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* **6**, 213-20 (2005).
10. Karjalainen, J., Salmela, P., Ilonen, J., Surcel, H.M. & Knip, M. A comparison of childhood and adult type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* **320**, 881-6 (1989).
11. Dabelea, D. et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *Jama* **297**, 2716-24 (2007).
12. Huber, A., Menconi, F., Corathers, S., Jacobson, E.M. & Tomer, Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev* **29**, 697-725 (2008).
13. Smyth, D.J. et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med* **359**, 2767-77 (2008).
14. Dube, C. et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* **128**, S57-67 (2005).
15. Forrest, J.M., Menser, M.A. & Burgess, J.A. High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. *Lancet* **2**, 332-4 (1971).
16. Ou, D., Jonsen, L.A., Metzger, D.L. & Tingle, A.J. CD4+ and CD8+ T-cell clones from congenital rubella syndrome patients with IDDM recognize overlapping

- GAD65 protein epitopes. Implications for HLA class I and II allelic linkage to disease susceptibility. *Hum Immunol* **60**, 652-64 (1999).
17. Peng, H. & Hagopian, W. Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 149-62 (2006).
  18. Hober, D. & Sauter, P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol* **6**, 279-89 (2010).
  19. Klemetti, P., Savilahti, E., Ilonen, J., Akerblom, H.K. & Vaarala, O. T-cell reactivity to wheat gluten in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Immunol* **47**, 48-53 (1998).
  20. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia* **42**, 51-4 (1999).
  21. Visalli, N. et al. Environmental risk factors for type 1 diabetes in Rome and province. *Arch Dis Child* **88**, 695-8 (2003).
  22. Steck, A.K. & Rewers, M.J. Genetics of Type 1 Diabetes. *Clin Chem* (2011).
  23. Hemminki, K., Li, X., Sundquist, J. & Sundquist, K. Familial association between type 1 diabetes and other autoimmune and related diseases. *Diabetologia* **52**, 1820-8 (2009).
  24. Koczwara, K., Bonifacio, E. & Ziegler, A.G. Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes. *Diabetes* **53**, 1-4 (2004).
  25. Erlich, H. et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* **57**, 1084-92 (2008).
  26. Butty, V., Campbell, C., Mathis, D. & Benoist, C. Impact of diabetes susceptibility loci on progression from pre-diabetes to diabetes in at-risk individuals of the diabetes prevention trial-type 1 (DPT-1). *Diabetes* **57**, 2348-59 (2008).
  27. Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. *Cellular and molecular immunology*, (Elsevier, 2007).
  28. Nerup, J. et al. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* **2**, 864-6 (1974).
  29. Thomson, G. HLA DR antigens and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* **36**, 1309-17 (1984).
  30. Urcelay, E. et al. Type 1 diabetes in the Spanish population: additional factors to class II HLA-DR3 and -DR4. *BMC Genomics* **6**, 56 (2005).
  31. Redondo, M.J., Fain, P.R. & Eisenbarth, G.S. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res* **56**, 69-89 (2001).
  32. Pociot, F. et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes* **59**, 1561-71 (2010).

33. Valdes, A.M., Erlich, H.A. & Noble, J.A. Human leukocyte antigen class I B and C loci contribute to Type 1 Diabetes (T1D) susceptibility and age at T1D onset. *Hum Immunol* **66**, 301-13 (2005).
34. Nejentsev, S. et al. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* **450**, 887-92 (2007).
35. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661-78 (2007).
36. Bell, G.I., Horita, S. & Karam, J.H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* **33**, 176-83 (1984).
37. Nistico, L. et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* **5**, 1075-80 (1996).
38. Bottini, N. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* **36**, 337-8 (2004).
39. Vella, A. et al. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* **76**, 773-9 (2005).
40. Concannon, P. et al. Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diabetes* **54**, 2995-3001 (2005).
41. Lander, E. & Kruglyak, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* **11**, 241-7 (1995).
42. McCarthy, M.I. et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* **9**, 356-69 (2008).
43. Begovich, A.B. et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* **75**, 330-7 (2004).
44. Smyth, D. et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* **53**, 3020-3 (2004).
45. Barrett, J.C. et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* **40**, 955-62 (2008).
46. Gateva, V. et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **41**, 1228-33 (2009).
47. Jin, Y. et al. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *N Engl J Med* **362**, 1686-97 (2010).
48. IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Genes Immun* **11**, 397-405 (2010).

49. Barrett, J.C. et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* **41**, 703-7 (2009).
50. Franke, A. et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* **40**, 1319-23 (2008).
51. Franke, A. et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* **42**, 1118-25 (2010).
52. Barton, A. et al. Identification of AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes. *Hum Mol Genet* **18**, 2518-22 (2009).
53. Sutherland, A. et al. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 3338-41 (2007).
54. Fung, E.Y. et al. Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes Immun* **10**, 188-91 (2009).
55. Remmers, E.F. et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **357**, 977-86 (2007).
56. Kurreeman, F.A. et al. The TRAF1-C5 region on chromosome 9q33 is associated with multiple autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* **69**, 696-9 (2010).
57. Stahl, E.A. et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* **42**, 508-14 (2010).
58. Ueda, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506-11 (2003).
59. Anderson, C.A. et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* **43**, 246-52 (2011).
60. Ounissi-Benkhalha, H. & Polychronakos, C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol Med* **14**, 268-75 (2008).
61. Tsuji, K., Aizawa, M. & Sasazuki, T. *HLA 1991: Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference*, (Oxford Science Publications, 1991).
62. Cooper, J.D. et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* **40**, 1399-401 (2008).
63. Barton, A. et al. Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet* **40**, 1156-9 (2008).
64. Dubois, P.C. et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* **42**, 295-302 (2010).

65. Maier, L.M. et al. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet* **5**, e1000322 (2009).
66. Lowe, C.E. et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* **39**, 1074-82 (2007).
67. Imielinski, M. et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* **41**, 1335-40 (2009).
68. Hafler, D.A. et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* **357**, 851-62 (2007).
69. Bailey, R. et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* **56**, 2616-21 (2007).
70. Sundqvist, E. et al. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *Eur J Hum Genet* **18**, 1349-52 (2010).
71. Zhernakova, A. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies in celiac disease and rheumatoid arthritis identifies fourteen non-HLA shared loci. *PLoS Genet* **7**, e1002004 (2011).
72. The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes. *Genes Immun* **10**, 11-4 (2009).
73. Heinig, M. et al. A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk. *Nature* **467**, 460-4 (2010).
74. Wallace, C. et al. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Genet* **42**, 68-71 (2010).
75. Qu, H.Q. et al. Association of RASGRP1 with type 1 diabetes is revealed by combined follow-up of two genome-wide studies. *J Med Genet* **46**, 553-4 (2009).
76. McGovern, D.P. et al. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* **19**, 3468-76 (2010).
77. Redondo, M.J. et al. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* **44**, 354-62 (2001).
78. Mueller, P.W. et al. Genetics of Kidneys in Diabetes (GoKinD) study: a genetics collection available for identifying genetic susceptibility factors for diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1782-90 (2006).
79. Todd, J.A. et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* **39**, 857-64 (2007).
80. Hakonarson, H. et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* **448**, 591-4 (2007).
81. Hakonarson, H. et al. A novel susceptibility locus for type 1 diabetes on Chr12q13 identified by a genome-wide association study. *Diabetes* **57**, 1143-6 (2008).

82. Howson, J.M., Walker, N.M., Smyth, D.J. & Todd, J.A. Analysis of 19 genes for association with type 1 diabetes in the Type 1 Diabetes Genetics Consortium families. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S74-84 (2009).
83. Klinker, M.W. et al. Single-nucleotide polymorphisms in the IL2RA gene are associated with age at diagnosis in late-onset Finnish type 1 diabetes subjects. *Immunogenetics* **62**, 101-7 (2010).
84. Wang, H. et al. Genetically dependent ERBB3 expression modulates antigen presenting cell function and type 1 diabetes risk. *PLoS One* **5**, e11789 (2010).
85. Lehuen, A., Diana, J., Zaccane, P. & Cooke, A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* **10**, 501-13 (2010).
86. Bouatia-Naji, N. et al. A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science* **320**, 1085-8 (2008).
87. Chen, W.M. et al. Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels. *J Clin Invest* **118**, 2620-8 (2008).
88. Zhernakova, A. et al. Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am J Hum Genet* **81**, 1284-8 (2007).
89. Cavanillas, M.L. et al. Polymorphisms in the IL2, IL2RA and IL2RB genes in multiple sclerosis risk. *Eur J Hum Genet* **18**, 794-9 (2010).
90. Smyth, D.J. et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet* **38**, 617-9 (2006).
91. Vandebroek, K. et al. Validation of IRF5 as multiple sclerosis risk gene: putative role in interferon beta therapy and human herpes virus-6 infection. *Genes Immun* **12**, 40-5 (2011).
92. Sigurdsson, S. et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* **76**, 528-37 (2005).
93. Dideberg, V. et al. An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet* **16**, 3008-16 (2007).
94. Qu, H.Q., Marchand, L., Grabs, R. & Polychronakos, C. The IRF5 polymorphism in type 1 diabetes. *J Med Genet* **44**, 670-2 (2007).
95. Martinez, A. et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis Rheum* **58**, 2598-602 (2008).
96. Thomson, W. et al. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* **39**, 1431-3 (2007).
97. Trynka, G. et al. Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut* **58**, 1078-83 (2009).
98. Graham, R.R. et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **40**, 1059-61 (2008).

99. Jakkula, E. et al. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *Am J Hum Genet* **86**, 285-91 (2010).
100. Kurreeman, F.A. et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* **4**, e278 (2007).
101. Santiago, J.L. et al. Study of the association between the CAPSL-IL7R locus and type 1 diabetes. *Diabetologia* **51**, 1653-8 (2008).
102. Espino-Paisan, L. et al. A polymorphism in PTPN2 gene is associated with an earlier onset of type 1 diabetes. *Immunogenetics* **63**, 255-8 (2011).
103. Pugliese, A. et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* **15**, 293-7 (1997).
104. Vafiadis, P. et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* **15**, 289-92 (1997).
105. Hermann, R. et al. The effect of HLA class II, insulin and CTLA4 gene regions on the development of humoral beta cell autoimmunity. *Diabetologia* **48**, 1766-75 (2005).
106. Bayer, A.L., Lee, J.Y., de la Barrera, A., Surh, C.D. & Malek, T.R. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* **181**, 225-34 (2008).
107. Eizirik, D.L., Colli, M.L. & Ortis, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* **5**, 219-26 (2009).
108. Stewart, T.A. et al. Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science* **260**, 1942-6 (1993).
109. Dogusan, Z. et al. Double-stranded RNA induces pancreatic beta-cell apoptosis by activation of the toll-like receptor 3 and interferon regulatory factor 3 pathways. *Diabetes* **57**, 1236-45 (2008).
110. Schoenemeyer, A. et al. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem* **280**, 17005-12 (2005).
111. Takaoka, A. et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243-9 (2005).
112. Doody, K.M., Bourdeau, A. & Tremblay, M.L. T-cell protein tyrosine phosphatase is a key regulator in immune cell signaling: lessons from the knockout mouse model and implications in human disease. *Immunol Rev* **228**, 325-41 (2009).
113. Moore, F. et al. PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* **58**, 1283-91 (2009).
114. Vereecke, L., Beyaert, R. & van Loo, G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* **30**, 383-91 (2009).

115. Liuwantara, D. et al. Nuclear factor-kappaB regulates beta-cell death: a critical role for A20 in beta-cell protection. *Diabetes* **55**, 2491-501 (2006).
116. Sarkar, S.A. et al. Cytokine-mediated induction of anti-apoptotic genes that are linked to nuclear factor kappa-B (NF-kappaB) signalling in human islets and in a mouse beta cell line. *Diabetologia* **52**, 1092-101 (2009).
117. Alleva, D.G., Pavlovich, R.P., Grant, C., Kaser, S.B. & Beller, D.I. Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* **49**, 1106-15 (2000).
118. Uno, S. et al. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* **50**, 596-601 (2007).
119. Cantor, J. & Haskins, K. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1. *J Immunol* **179**, 5760-7 (2007).
120. Martin, A.P. et al. Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes. *Diabetes* **57**, 3025-33 (2008).
121. Jun, H.S., Yoon, C.S., Zbytniuk, L., van Rooijen, N. & Yoon, J.W. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* **189**, 347-58 (1999).
122. Brauner, H. et al. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J Immunol* **184**, 2272-80 (2010).
123. Gur, C. et al. The activating receptor Nkp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* **11**, 121-8 (2010).
124. Poirot, L., Benoist, C. & Mathis, D. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8102-7 (2004).
125. Alba, A. et al. Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon-beta. *Clin Exp Immunol* **151**, 467-75 (2008).
126. Rosen, D.B. et al. Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol* **180**, 6508-17 (2008).
127. Lande, R. & Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1183**, 89-103 (2010).
128. Kared, H. et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells. *Diabetes* **54**, 78-84 (2005).
129. Li, Q. et al. Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12439-44 (2008).

130. Sibley, R.K., Sutherland, D.E., Goetz, F. & Michael, A.F. Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab Invest* **53**, 132-44 (1985).
131. Phillips, J.M. et al. Type 1 Diabetes Development Requires Both CD4+ and CD8+ T cells and Can Be Reversed by Non-Depleting Antibodies Targeting Both T Cell Populations. *Rev Diabet Stud* **6**, 97-103 (2009).
132. Boyton, R.J. et al. Stat4-null non-obese diabetic mice: protection from diabetes and experimental allergic encephalomyelitis, but with concomitant epitope spread. *Int Immunol* **17**, 1157-65 (2005).
133. Egwuagu, C.E. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* **47**, 149-56 (2009).
134. Kleinschek, M.A. et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* **206**, 525-34 (2009).
135. Raz, I., Eldor, R. & Naparstek, Y. Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends Biotechnol* **23**, 128-34 (2005).
136. Bettini, M. & Vignali, D.A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **21**, 612-8 (2009).
137. van der Vliet, H.J. & Nieuwenhuis, E.E. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol* **2007**, 89017 (2007).
138. Malek, T.R. & Bayer, A.L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* **4**, 665-74 (2004).
139. Wong, F.S., Hu, C., Xiang, Y. & Wen, L. To B or not to B-pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* **22**, 723-31 (2010).
140. Serreze, D.V. et al. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **161**, 3912-8 (1998).
141. Martin, S. et al. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N Engl J Med* **345**, 1036-40 (2001).
142. Verge, C.F. et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* **45**, 926-33 (1996).
143. Orban, T. et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care* **32**, 2269-74 (2009).
144. Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215 (1988).
145. [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org).
146. Rich, S.S., Weitkamp, L.R. & Barbosa, J. Genetic heterogeneity of insulin-dependent (type I) diabetes mellitus: evidence from a study of extended haplotypes. *Am J Hum Genet* **36**, 1015-23 (1984).

147. Hermann, R. et al. HLA DR-DQ-encoded genetic determinants of childhood-onset type 1 diabetes in Finland: an analysis of 622 nuclear families. *Tissue Antigens* **62**, 162-9 (2003).
148. Noble, J.A. et al. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet* **59**, 1134-48 (1996).
149. [www.allelefrequencias.net](http://www.allelefrequencias.net).
150. Dubois-Laforgue, D., Timsit, J., Djilali-Saiah, I., Boitard, C. & Caillat-Zucman, S. Insulin-dependent diabetes mellitus in non-DR3/non-DR4 subjects. *Hum Immunol* **57**, 104-9 (1997).
151. Maclaren, N. et al. Inherited susceptibility to insulin-dependent diabetes is associated with HLA-DR1, while DR5 is protective. *Autoimmunity* **1**, 197-205 (1988).
152. Leslie, R.D., Williams, R. & Pozzilli, P. Clinical review: Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: one end of the rainbow. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1654-9 (2006).
153. Ramos-Lopez, E. et al. Insulin gene polymorphisms in type 1 diabetes, Addison's disease and the polyglandular autoimmune syndrome type II. *BMC Med Genet* **9**, 65 (2008).
154. Kawaguchi, Y. et al. Insulin gene region contributes to genetic susceptibility to, but may not to low incidence of, insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 283-7 (1997).
155. Awata, T. et al. Insulin gene/IDDM2 locus in Japanese type 1 diabetes: contribution of class I alleles and influence of class I subdivision in susceptibility to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1791-5 (2007).
156. Hansen, S.K. et al. Large-scale studies of the HphI insulin gene variable-number-of-tandem-repeats polymorphism in relation to Type 2 diabetes mellitus and insulin release. *Diabetologia* **47**, 1079-87 (2004).
157. Haller, K. et al. Insulin gene VNTR, CTLA-4 +49A/G and HLA-DQB1 alleles distinguish latent autoimmune diabetes in adults from type 1 diabetes and from type 2 diabetes group. *Tissue Antigens* **69**, 121-7 (2007).
158. Meigs, J.B. et al. The insulin gene variable number tandem repeat and risk of type 2 diabetes in a population-based sample of families and unrelated men and women. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 1137-43 (2005).
159. Le Fur, S. et al. Heterogeneity of class I INS VNTR allele association with insulin secretion in obese children. *Physiol Genomics* **25**, 480-4 (2006).
160. Wang, X.B., Zhao, X., Giscombe, R. & Lefvert, A.K. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun* **3**, 233-4 (2002).
161. Anjos, S.M., Tessier, M.C. & Polychronakos, C. Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for

- independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 6257-65 (2004).
162. Anjos, S., Nguyen, A., Ounissi-Benkhalha, H., Tessier, M.C. & Polychronakos, C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* **277**, 46478-86 (2002).
163. Cunninghame Graham, D.S., Wong, A.K., McHugh, N.J., Whittaker, J.C. & Vyse, T.J. Evidence for unique association signals in SLE at the CD28-CTLA4-ICOS locus in a family-based study. *Hum Mol Genet* **15**, 3195-205 (2006).
164. Budarf, M.L. et al. A targeted association study in systemic lupus erythematosus identifies multiple susceptibility alleles. *Genes Immun* **12**, 51-8 (2011).
165. Daha, N.A. et al. Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 1255-60 (2009).
166. Kouki, T. et al. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* **165**, 6606-11 (2000).
167. Julier, C. et al. The Type I Diabetes Genetics Consortium 'Rapid Response' family-based candidate gene study: strategy, genes selection, and main outcome. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S121-7 (2009).
168. Qu, H.Q., Bradfield, J.P., Grant, S.F., Hakonarson, H. & Polychronakos, C. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S27-32 (2009).
169. van Heel, D.A. et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* **39**, 827-9 (2007).
170. Yamanouchi, J. et al. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet* **39**, 329-37 (2007).
171. Tang, Q. et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* **28**, 687-97 (2008).
172. Sarra, M. & Monteleone, G. Interleukin-21: a new mediator of inflammation in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 294582 (2010).
173. De Nitto, D., Monteleone, I., Franze, E., Pallone, F. & Monteleone, G. Involvement of interleukin-15 and interleukin-21, two gamma-chain-related cytokines, in celiac disease. *World J Gastroenterol* **15**, 4609-14 (2009).
174. De Nitto, D., Sarra, M., Pallone, F. & Monteleone, G. Interleukin-21 triggers effector cell responses in the gut. *World J Gastroenterol* **16**, 3638-41 (2010).
175. Giliani, S. et al. Interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunol Rev* **203**, 110-26 (2005).

176. Zhang, Z. et al. Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis. *Genes Immun* **6**, 145-52 (2005).
177. Graham, R.R. et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **38**, 550-5 (2006).
178. Dotta, F. et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5115-20 (2007).
179. Kristjansdottir, G. et al. Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations. *J Med Genet* **45**, 362-9 (2008).
180. Dieguez-Gonzalez, R. et al. Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **58**, 1264-74 (2008).
181. Miceli-Richard, C. et al. The CGGGG insertion/deletion polymorphism of the IRF5 promoter is a strong risk factor for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **60**, 1991-7 (2009).
182. Lien, C. et al. Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4664-8 (2010).
183. Jacob, N. & Stohl, W. Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity* **43**, 84-97 (2010).
184. Racke, M.K. The role of B cells in multiple sclerosis: rationale for B-cell-targeted therapies. *Curr Opin Neurol* **21 Suppl 1**, S9-S18 (2008).
185. Qin, H. et al. Natural Killer Cells From Children With Type 1 Diabetes Have Defects in NKG2D-Dependent Function and Signaling. *Diabetes* (2011).
186. Awata, T. et al. Association of type 1 diabetes with two Loci on 12q13 and 16p13 and the influence coexisting thyroid autoimmunity in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 231-5 (2009).
187. Kawabata, Y. et al. Asian-specific HLA haplotypes reveal heterogeneity of the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* **51**, 545-51 (2002).
188. Ikegami, H., Kawabata, Y., Noso, S., Fujisawa, T. & Ogihara, T. Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract* **77 Suppl 1**, S116-21 (2007).
189. Pan, F. et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* **325**, 1142-6 (2009).
190. Rubio, J.P. et al. Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians. *Genes Immun* **9**, 624-30 (2008).

191. Hoppenbrouwers, I.A. et al. Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis. *J Hum Genet* **54**, 676-80 (2009).
192. Mero, I.L. et al. Exploring the CLEC16A gene reveals a MS-associated variant with correlation to the relative expression of CLEC16A isoforms in thymus. *Genes Immun* (2010).
193. Scharl, M. et al. Protection of epithelial barrier function by the Crohn's disease associated gene protein tyrosine phosphatase n2. *Gastroenterology* **137**, 2030-2040 e5 (2009).
194. Vaarala, O., Atkinson, M.A. & Neu, J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* **57**, 2555-62 (2008).
195. Heni, M. et al. The impact of genetic variation in the G6PC2 gene on insulin secretion depends on glycemia. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, E479-84 (2010).
196. Eyre, S. et al. Overlapping genetic susceptibility variants between three autoimmune disorders: rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and coeliac disease. *Arthritis Res Ther* **12**, R175 (2010).
197. Lee, E.G. et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**, 2350-4 (2000).
198. Liu, Z. et al. Control of precerebellar neuron development by Olig3 bHLH transcription factor. *J Neurosci* **28**, 10124-33 (2008).
199. Storm, R. et al. The bHLH transcription factor Olig3 marks the dorsal neuroepithelium of the hindbrain and is essential for the development of brainstem nuclei. *Development* **136**, 295-305 (2009).
200. Plenge, R.M. et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* **39**, 1477-82 (2007).
201. Grinberg-Bleyer, Y. et al. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* **120**, 4558-68 (2010).
202. Shen, W. & Durum, S.K. Synergy of IL-23 and Th17 cytokines: new light on inflammatory bowel disease. *Neurochem Res* **35**, 940-6 (2010).
203. Castellanos-Rubio, A. et al. TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity* **42**, 69-73 (2009).
204. Fernandez, S. et al. Characterization of Gliadin-Specific Th17 Cells from the Mucosa of Celiac Disease Patients. *Am J Gastroenterol* (2011).
205. Honkanen, J. et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol* **185**, 1959-67 (2010).
206. Nikoopour, E. et al. Th17 polarized cells from nonobese diabetic mice following mycobacterial adjuvant immunotherapy delay type 1 diabetes. *J Immunol* **184**, 4779-88 (2010).

207. Wang, K. et al. Comparative genetic analysis of inflammatory bowel disease and type 1 diabetes implicates multiple loci with opposite effects. *Hum Mol Genet* **19**, 2059-67 (2010).
208. Plenge, R.M. et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med* **357**, 1199-209 (2007).
209. Sughra, K., Birbach, A., de Martin, R. & Schmid, J.A. Interaction of the TNFR-receptor associated factor TRAF1 with I-kappa B kinase-2 and TRAF2 indicates a regulatory function for NF-kappa B signaling. *PLoS One* **5**, e12683 (2010).
210. Lindqvist, A.K. et al. Backcross and partial advanced intercross analysis of nonobese diabetic gene-mediated effects on collagen-induced arthritis reveals an interactive effect by two major loci. *J Immunol* **177**, 3952-9 (2006).
211. Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M. & Todd, J.A. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* **324**, 387-9 (2009).
212. Lee, H.S., Park, H., Yang, S., Kim, D. & Park, Y. STAT4 polymorphism is associated with early-onset type 1 diabetes, but not with late-onset type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* **1150**, 93-8 (2008).
213. Kordonouri, O., Hartmann, R., Badenhop, K., Kahles, H. & Ilonen, J. PTPN22 1858T allele is associated with younger age at onset of type 1 diabetes and is not related to subsequent thyroid autoimmunity. *Hum Immunol* **71**, 731-2 (2010).

