



**Alelos HLA-II clásicos en niños con Diabetes Mellitus Tipo 1
del noroccidente de Colombia**

**Investigador principal:
LUISA MARIA PARRA RODAS**

**Director:
Nicolas Pineda Trujillo**

**Coautores: Natalia Gómez Lopera, Diana M. Cornejo Sanchez, Maria
Victoria Lopera Cañaveral**

**Trabajo de Investigación para obtener el título de:
Especialista en Pediatría**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE MEDICINA
MEDELLIN
2020**

Alelos HLA-II clásicos en niños con Diabetes Mellitus Tipo 1 del noroccidente de Colombia

Luisa María Parra-Rodas¹, Natalia Gómez-Lopera¹, Diana M Cornejo-Sanchez¹, María Victoria Lopera-Cañaveral², Nicolas Pineda-Trujillo¹.

1. Grupo de Mapeo Genético, Departamento de Pediatría y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. 050010470, Medellín, Colombia.

2. Sección de Endocrinología Pediátrica, Departamento de Pediatría y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. 050010470, Medellín, Colombia.

Resumen

Antecedentes: La diabetes mellitus tipo 1 (T1D) es una enfermedad crónica frecuente en la infancia. Esta enfermedad tiene mayor incidencia en los europeos que otras poblaciones. La fisiopatología se explica por la interacción de factores genéticos, inmunológicos y ambientales. Los principales determinantes genéticos son los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1, la mayoría descritos en la población europea. Sin embargo, esto no se ha estudiado adecuadamente en la población colombiana.

Objetivo: nuestro objetivo fue describir los alelos HLA clase II más comunes en pacientes colombianos con T1D.

Metodología: A noventa y seis pacientes con T1D del noroccidente de Colombia les fueron secuenciados los exones 2 de los genes HLA-DRB1 y HLA-DQB1 por tipificación basada en secuencias. La asignación de alelos fue realizada por el software SBTengine. El estado inmunitario se clasificó de acuerdo al resultado de autoanticuerpos anti-GAD-65 y anti-IA-2.

Resultados: La edad promedio de inicio fue de 8,06 años, 8,6% tenía un padre con T1D y 7,29% tenía al menos un hermano enfermo. La edad de inicio del 25% fue antes de los cinco años. Los alelos más frecuentes fueron DRB1 * 03: 01 (0,225), DRB1 * 14: 141 (0,10), DQB1 * 06: 123 (0,22) y DQB1 * 02: 01 (0,18). Los alelos de riesgo descritos en la población europea que se encontraron en nuestros pacientes fueron DQB1 * 02: 01 (0,18) y DRB1 *

03: 01 (0,225). El 65,63% tenía anti-IA-2, anti-GAD65 o ambos positivos, es decir, tenían diabetes autoinmune, mientras que en el 29,17% no se identificó ningún anticuerpo.

Conclusiones: Encontramos que los alelos más frecuentes en individuos con T1D en la región noroccidental de Colombia fueron DRB1 * 03: 01, DRB1 * 14: 141, DQB1 * 06: 123 y DQB1 * 02: 01. Se describieron dos alelos de riesgo HLA de población europea en nuestros pacientes (DQB1*02:01 y DRB1*03:01) y un alelo de riesgo descrito en Latinoamérica (DRB1*14).

Palabras clave: Diabetes tipo 1, Colombia, alelos de riesgo, DRB1, DQB1, HLA

Abstract

Background: Type 1 Diabetes Mellitus is a frequent chronic disease in childhood. This disease has a higher incidence in Europeans than other populations. The pathophysiology is explained by the interaction of genetic, immunological and environmental factors. The major genetic determinants are HLA-DRB1 and DQB1 alleles, most are described in European population. However, this has not been adequately studied in Colombian population.

Aim: Our aim was to describe most common HLA alleles in colombian patients with T1D.

Methodology: Ninety-six patients with T1D from northwest Colombia were typed for the DRB1 and DQB1 genes by sequence-based typing, the allele assignment was performed by SBTengine software. Immune status was classified according to testing for anti-GAD-65 and anti-IA-2.

Results: The mean age at onset was 8.06 years, 8.6% had a parent with T1D and 7.29% had a brother. The onset age of 25% was before five years. The most frequent alleles were DRB1 * 03: 01 (0.225), DRB1 * 14: 141 (0.10), DQB1 * 06: 123 (0.22) y DQB1 * 02: 01 (0.18). The risk alleles described in European population that were found in our patients were fueron DQB1 * 02: 01 (0.18) y DRB1 * 03: 01 (0.225). The 65.63% had IA-2, GAD65 or both positive, that is, they were autoimmune diabetes, while in 29.17% no antibody was identified.

Conclusions: We found that the most frequent alleles in individuals with T1D in the northwestern region of Colombia were DRB1 * 03: 01, DRB1 * 14: 141, DQB1 * 06: 123 and DQB1 * 02: 01. Two HLA risk alleles from the European population were described in our patients DQB1 * 02: 01 and DRB1 * 03: 01 and one risk allele described in Latin America (DRB1*14).

Key words: Type 1 diabetes, Colombia, risk alleles, DRB1, DQB1, HLA

Introducción

La Diabetes Mellitus tipo 1 (T1D, por sus siglas en inglés) constituye una de las enfermedades crónicas más frecuentes en la infancia. Es de aparición temprana y su fisiopatología está principalmente explicada por la interacción de factores genéticos, inmunológicos y ambientales(1,2). Su comportamiento ha sido dinámico en las últimas décadas. Aunque la mayor incidencia es entre los 10 y los 14 años(3), cada vez es más frecuente la presentación en menores de 5 años, con un incremento en su incidencia de 4,7% por año en este grupo de edad(4,5).

Llamativamente, el patrón de distribución de la incidencia global es irregular geográficamente, con grandes diferencias entre poblaciones geográficamente cercanas. Las regiones con mayor prevalencia son aquellas con descendencia europea(6). Se conoce que Finlandia y Sardinia son los países con mayor incidencia en el mundo, de hasta 42,2 casos por 100.000 en menores de 14 años cada año(7), seguido por otros países del territorio Europeo y otros con descendencia europea conocida, como Canadá, Nueva Zelanda y Estados Unidos. Mientras que en países asiáticos la incidencia es tan baja como en China de tan solo 0.1 casos por 100.000/año(3,7). En Latinoamérica, según la Federación Internacional de Diabetes, se calcula que 45.100 niños menores de 15 años tienen T1D(6,8). En Colombia, se estima una incidencia de T1D de 3 – 4 por 100.000 en menores de 15 años y una prevalencia de 0,07%(9). La diferencia epidemiológica de la T1D entre diferentes regiones del mundo es explicada en parte por la etnia(10).

Los factores genéticos descritos que se asocian con susceptibilidad para T1D son la región del genoma HLA, principalmente HLA clase II, que confiere más del 50% del riesgo genético(11) y otro grupo de genes No-HLA. De estos últimos se han reportado más de 60 genes que aportan un porcentaje menor del riesgo(12). Los principales alelos HLA clase II descritos que confieren riesgo para T1D en población europea son DRB1*03:01, DRB1*04:05, DRB1*04:01, DRB1*04:02; DQA1*05:01, DQA1*03:01; DQB1*02:01, DQB1*03:02(12). Con menor proporción, alelos DPB1 también incrementan el riesgo como DPB1*03:01 y DPB1*02:02(13). Así mismo, HLA clase II tiene los principales alelos de protección en población europea DRB1*15:01, DRB1*14:01, DRB1*07:01, DRB1*04:03; DQA1*01:02, DQA1*02:01, DQA1*03:01; DQB1*06:02, DQB1*05:03, DQB1*03:03, DQB1*02:01. Lo anterior, muestra que algunos alelos se comportan tanto de riesgo como de protección según el contexto haplotípico(14). Los haplotipos de riesgo conocidos son DR3 (DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01), DR4 (DRB1*04:05-DQA1*03:01-DQB1*03:02), DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02, DRB1*04:02-DQA1*03:01-

DQB1*03:02)(13).

En Latinoamérica están descritos los alelos de riesgo DRB1*03:01, DRB1*12:01, DQB1*03:02, DQA1*03:01 y DQB1*06:02, DRB1*14 y DQB1*05:01. Los haplotipos DRB1*0301-DQA1*0501- DQB1*0201 y DRB1*1301-DQB1*0603 fueron asociados a riesgo y protección, respectivamente(15). En Colombia, solo se encontró un estudio realizado en 1996 por F. Montoya y cols donde determinaron las frecuencias de antígenos HLA de un grupo de pacientes con T1D y población sana, encontrando que los antígenos HLA clase I B18 y HLA clase II DRB1*04:05 y DRB1*03:01 fueron más frecuentes en los pacientes enfermos que en la población sana(16).

Actualmente, existen modelos de predicción genética basados en loci HLA y otros genes que confieren susceptibilidad, estos modelos son efectivos para identificar individuos de alto riesgo en poblaciones con descendencia europea. Sin embargo, la gran variedad genética entre grupos étnicos reduce el valor predictivo de estos modelos(14,17).

La población colombiana, es considerada como un grupo étnico mixto, formado por la mezcla entre individuos caucásicos, afrodescendientes y amerindios, cuyas proporciones varían en diferentes regiones del país(18,19). Un estudio que caracterizó los aspectos demográficos de niños con T1D provenientes del noroccidente colombiano, encontró que esta población presenta un componente ancestral europeo principalmente. Lo que correlaciona que se hayan encontrado características demográficas similares en los pacientes con T1D a las reportadas por estudios europeos(20).

Más recientemente, en nuestra población T1D se analizaron 45 tagSNPs de alelos HLA descritos para población europea. En ese estudio se encontró que varios de los tagSNPs para alelos HLA-II de riesgo se asocian con T1D(21). Sin embargo, dicha asociación no permite inferir el alelo clásico correspondiente ya que la caracterización existente es para población europea. Por tanto, es necesario caracterizar si los tagSNPs para alelos HLA-II clásicos reportados para población europea corresponden a los mismos alelos en nuestra población mestiza.

El Objetivo de este estudio fue identificar alelos de predisposición para Diabetes Mellitus Tipo 1 en los genes HLA-DRB1 y HLA-DQB1 en niños enfermos del noroccidente de Colombia. Los sujetos incluidos acá ya presentan la información para los tagSNPs mencionados arriba. De este modo se espera identificar cuales tagSNPs corresponden a los alelos clásicos identificados acá, mediante tipificación basada en secuencia (SBT).

Materiales y métodos

Es un estudio de tipo descriptivo y transversal.

Población

Se utilizaron muestras de 96 pacientes con T1D previamente diagnosticados por los criterios de la American Diabetes Association (ADA), antes de los 15 años. Las muestras fueron previamente obtenidas en un estudio de 200 tríos familiares, de pacientes provenientes de un área geográfica específica, denominados como la población “Paisa”. Estos pacientes tenían definido género, edad de diagnóstico y antecedentes familiares de diabetes. Además, contaban con la caracterización autoinmune de anti- IA-2 (antígeno-2 tipo proteína tirosina) y anti-GAD65 (descarboxilasa del ácido glutámico), y tenían análisis de mezcla(10,20). Además, tenían la evaluación de 45 tagSNPs reportados para HLA clase II en población europea(21). Fueron obtenidos de varios hospitales de alta complejidad en Medellín, Colombia.

Este estudio tiene aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y cuenta con consentimiento informado de sus padres.

Genotipificación

El ADN fue previamente aislado de acuerdo a protocolo estándar en estudio previo. Se amplificó el exón 2 de los genes HLA-DRB1 y HLA-DQB1 mediante PCR (Polymerase chain reaction) convencional. Los primers utilizados en el presente estudio para la amplificación de los genes mencionados anteriormente se documentan en la Tabla 1(22). Para cada PCR se utilizó volumen total de 25 µl que contenía 30 ng de ADN purificado, 2.5 µl de buffer 10X (Tris – Hcl), 0.5 mM de cada dNTP, 0.5 nM de cada mezcla de primer, 0.2 U de Taq Polimerasa y 1.5 mM de MgCl₂. Las condiciones estandarizadas para la PCR fueron las siguientes: en un termociclador de doble bahía (DNA Engine Dyad). Las muestras se sometieron a 94°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial del ADN genómico, seguidos de 35 ciclos a 94° por 30 segundos, 58°C (para DQ-B1) y 60°C (para DR-B1) por 30 segundos para el alineamiento de los primers con el molde y 72°C por 30 segundos para la amplificación. Finalmente, se dejaron a 72°C por 10 minutos, para la amplificación todas las cadenas. Los amplicones fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% y teñidos con bromuro de etidio 5 mg/ml.

La purificación de los fragmentos de la PCR y la secuenciación con método Sanger fueron realizados en la empresa Macrogen. Los electroferogramas se editaron usando el software 4Peaks. Las secuencias se alienaron usando el programa Aliview. Finalmente, los alelos HLA clásicos se asignaron mediante SBTengine(23,24). Adicionalmente, se hizo una comparación de la frecuencia de los alelos de la población de referencia CLM (Colombian Living Medellín)(25) y los encontrados en este estudio.

Análisis estadístico

El análisis estadístico y la elaboración de gráficos se llevaron a cabo con Excel. Los resultados son presentados en medias, +/- desviación estándar (DE) y porcentajes. Se realizó una prueba exacta de Fisher usando el programa R para los cálculos de los alelos de riesgo.

Resultados

Descripción de la muestra

Este estudio incluyó 96 pacientes del noroccidente de Colombia. Las principales características demográficas se muestran en la tabla 2. 49 sujetos (51,04%) fueron hombres y 47 (48,96%) mujeres. La edad promedio de inicio fue de 8,06 años (DE= 4,19). 24 pacientes fueron diagnosticados antes de los 5 años (25%), con una edad promedio para esta categoría de 2,43 años, mientras que la edad promedio de los niños diagnosticados a los 5 años o más fue de 9,86 años. Del total de pacientes, 8 tenían uno de los padres afectados por T1D (8,6%) y 7 tenían un hermano con la enfermedad (7,29%) (Tabla 2).

Anticuerpos

El 65,63% tuvo anticuerpos IA-2, GAD65 o ambos positivos, es decir que cumplieron criterios para T1D autoinmune (T1AD), mientras que el 29,17% fueron negativos para todos los anticuerpos, lo que significa que tuvieron **T1D idiopática (T1BD)**. El 5,2% no tuvieron datos. Del grupo de pacientes menores de 5 años, 8 tuvieron IA-2 positivo (34,78%), solo 2 tuvieron GAD65 positivo (1%) y 7 tuvieron ambos anticuerpos positivos (30,43%). Para los pacientes con edad de inicio ≥ 5 años, 13 pacientes tuvieron IA-2 positivo (17,8%), 17 tuvieron solo GAD65 positivo (23,28%) y 16 fueron positivos tanto para IA-2 como GAD65 (21,97%) (Tabla 1). La media de edad al momento del diagnóstico para los pacientes con T1AD fue de 7,96 años (DE= 4,14) y para los pacientes con T1BD fue de 8,06 años (DE= 4,18).

Asignación de alelos HLA clásicos (Tabla 3)

Durante la edición de las muestras se encontraron electroferogramas de baja calidad en 32 muestras de DQB1 y 71 muestras de DRB1, por tanto, no pudieron ser editadas. Se logró asignación de alelos para 20 muestras de DRB1 y 11 muestras de DQB1, al resto de muestras no fue posible realizar asignación ya que SBTengine no consideraba secuencias cortas(24).

Los alelos encontrados con su respectiva frecuencia (Tabla 3) fueron DQB1*06:123 (0,22), DQB1*02:01 (0,18), DQB1*03:199 (0,045), DQB1*06:66 (0,045), DRB1* 14:141 (0,10), DRB1*03:01 (0,225), DRB1*03:02 (0,05), DRB1*03:21 (0,025), DRB1*03:90 (0,025), DRB1*08:04 (0,025), DRB1*13:11 (0,025), DRB1*13:146 (0,025). Los alelos más frecuentes fueron DRB1*03:01 (0,225), DRB1*14:141 (0,10), DQB1*06:123 (0,22) y DQB1*02:01 (0,18). Los alelos de riesgo descritos en población europea encontrados en nuestros pacientes fueron DQB1*02:01 (0,18) y DRB1*03:01 (0,225).

T1D versus población de referencia CLM(25)

Los alelos HLA clase II más comunes en la población de referencia CLM fueron DQB1*05:01 (0,157142857) y DRB1*07:01 (0,128571429). De los alelos asignados a los pacientes T1D, los siguientes fueron encontrados en CLM: DQB1*02:01 (0,043), DRB1*03:01 (0,038), DRB1*03:02 (0,014), DRB1*08:04 (0,005) (Tabla 3).

Las frecuencias alélicas en la población CLM de los principales alelos de protección descritos en población europea para T1D son DQB1*06:02 (0,076), DQB1* 03:03 (0,033), DQB1*02:01 (0,043), DRB1*15:01 (0,071), DRB1*14:01 (0,005), DRB1*07:01, DRB1*04:03 (0,033).

En el análisis de asociación de los alelos HLA de riesgo descritos en europeos con la población de referencia y la muestra T1D, con el alelo DQB1*02:01 (OR= 5 IC= 0,34-2,88. p= 0,026.) no se logró significancia estadística para asociación con riesgo. Mientras que con el alelo DRB1*03:01 (OR 5,55 IC= 1,6-19.2 p= 0,002358) si se obtuvo una asociación de riesgo significativa.

Discusión

El propósito de este estudio fue identificar alelos de predisposición para T1D en los genes HLA-DRB1 y HLA-DQB1 en niños enfermos del noroccidente de Colombia. Según lo reportado en la literatura, este es el primer estudio que se realiza en Colombia que identifica estos alelos de riesgo para T1D, mediante SBT. Solo hay un estudio relacionado en el que intentaron validar tagSNP reportados en europeos pero no se encontró suficiente desequilibrio de ligamiento entre los SNP y los alelos clásicos evaluados, para inferir los alelos clásicos del HLA(26). Además, el estudio de Montoya y cols (1996)(16) no permite ni reporta la identificación de los tagSNPs (o haplotype-tag- SNPs) para los alelos reportados por ellos en nuestra población.

Las diferencias en la incidencia y en los alelos de riesgo de T1D reportados entre regiones del mundo, además de la ausencia de estos datos en población colombiana fue el principal motivo por el que se desarrolló este estudio. Se encontró que los alelos más frecuentes en los niños con T1D fueron DRB1*03:01, DRB1*14:141, DQB1*06:123 y DQB1*02:01. Mientras que en la población de referencia CLM fueron DQB1*05:01 y DRB1*07:01, sin

embargo, algunos de los alelos descritos en nuestro grupo de pacientes también se encontraron, aunque en menor frecuencia en la población de referencia. Llamativamente, los alelos de riesgo descritos en población europea que fueron encontrados en nuestros pacientes fueron DQB1*02:01 y DRB1*03:01(13), mientras que de los alelos de riesgo descritos en Latinoamérica se encontró DRB1*14(15). Uno de los alelos más frecuentes en la población de referencia, DRB1*07:01 está descrito como un alelo HLA de protección en población europea(14). Con la prueba exacta de Fisher se encontró que existe asociación de riesgo estadísticamente significativa para el alelo DRB1*03:01 (OR 5,55 IC= 1,6-19.2 p= 0,002358), mientras que con el alelo DQB1*0201 (OR= 5 IC= 0,34-2,88. p= 0,026) no hubo significancia estadística para asociación con riesgo, probablemente debido al tamaño de muestra tan pequeño (para T1D), aunque se aprecia una tendencia hacia el riesgo.

Dado que HLA es la región más polimórfica del genoma humano, los estudios realizados en otras poblaciones como Asiáticos y Afroamericanos han encontrado resultados opuestos a estudios de población europea(27–29). Tal vez por esta razón, no todos los alelos descritos en nuestros pacientes corresponden a alelos de riesgo de la población europea que es la más estudiada por la mayor incidencia que tienen de T1D. Esto quedó evidenciado en el estudio SEARCH(30), que encontró una marcada variación entre la población blanca no hispana con una incidencia de 23.6/100.000(31) versus poblaciones afroamericana (15.7/100.000)(32), hispana (15 – 16.2/100.000)(33) y asiática (6.4/100.000)(34).

Otra hipótesis que intenta explicar esta variación entre grupos étnicos es la diferencia en las mezclas genéticas o la exposición a diferentes factores medioambientales(3). En Latinoamérica hay cuatro estudios que evalúan la influencia de la mezcla étnica en T1D. Dos de Brasil y uno de Cuba coinciden en que los pacientes con la enfermedad tienen mayor descendencia europea(35–37); esto es similar a lo encontrado en un estudio colombiano en donde compararon la ancestría europea de individuos de CLM, población sana, versus la encontrada en pacientes T1D de una región en el noroccidente de Colombia, cuya proporción de descendencia fue del 62.02% y 61.58% respectivamente(10). En este mismo estudio, estratificaron los pacientes por autoinmunidad y reportaron que aquellos pacientes con anticuerpos positivos tuvieron en mayor proporción ancestría europea y menor Africana, respecto a aquellos con anticuerpos negativos en quienes se encontró lo opuesto(10).

Adicionalmente, en nuestros pacientes, el 65.63% cumplieron criterio para T1AD, es decir, que tuvieron al menos un anticuerpo positivo, mientras que solo el 29.17% tuvieron T1BD, ningún anticuerpo positivo.

En Colombia estos resultados son variables, un estudio realizado en Colombia reportó que el 78% de los pacientes con T1D tuvieron al menos un anticuerpo positivo(38). Sin embargo, otro reportó una tasa de autoinmunidad mucho mayor, del 93.5%, en una población similar(19). Lo que concuerda con que T1AD se ha relacionado más con ancestría europea, mientras que T1BD ha sido correlacionada con ancestría africana o amerindia (12). Adicionalmente, en Colombia, está reportado que los pacientes con T1AD debutan a edades

más tempranas(10), como también se observó en nuestro estudio, donde la media de edad al momento del diagnóstico para los pacientes con T1AD fue de 7,96 años (DE= 4.14) y para los pacientes con T1BD fue de 8.06 años (DE= 4.18).

Este estudio, tiene ciertas limitaciones, por cuestiones económicas solo se realizó la secuenciación de la cadena 'Forward' para cada exón, durante la edición de las secuencias en algunos de los electroferogramas se observó un patrón mixto por el que fue imposible interpretar los resultados de esas muestras. Esto pudo deberse a una baja calidad en las secuencias por errores en la PCR, durante la purificación o la secuenciación, por tanto, se dieron como pérdidas. Además, solo fue posible realizar la asignación con SBTengine en un número reducido de muestras ya que en la mayoría se obtuvieron secuencias muy cortas y el software no pudo analizarlas.

Las implicaciones para la práctica clínica y la investigación que tienen este tipo de estudios son fundamentales ya que contribuyen con la delineación de la arquitectura genética de T1D y otras enfermedades autoinmunes, particularmente para nuestra población.

Conclusión

Encontramos que los alelos más frecuentes en individuos con T1D en la región noroccidental de Colombia fueron DRB1 * 03: 01, DRB1 * 14: 141, DQB1 * 06: 123 y DQB1 * 02: 01. Se describieron dos alelos de riesgo HLA de población europea en nuestros pacientes (DQB1*02:01 y DRB1*03:01) y un alelo de riesgo descrito en Latinoamérica (DRB1*14).

Perspectivas

Se debe continuar la búsqueda sobre el papel de HLA en T1D en nuestra población. Nuestros resultados sugieren que hay cierta asociación entre alelos de riesgo descritos en población europea y población colombiana seleccionada. Los alelos HLA encontrados en nuestros pacientes deberán estudiarse en la población general para definir si corresponden a alelos de riesgo para T1D. Las secuencias parciales obtenidas en este proyecto conjunto con los 45 tagSNPs ya genotificados previamente ayudaran a identificar los alelos HLA-II clásicos en los sujetos en quienes no funcionó bien las secuencias de Sanger, lo que contribuiría a ampliar el conocimiento sobre la arquitectura genética de la T1D y a futuro poder desarrollar modelos propios de predicción de individuos de alto riesgo.

Referencias

1. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet*. enero de 2014;383(9911):69-82.
2. Jerram S, Leslie RD. The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes. *Genes*. 22 de agosto de 2017;8(8):209.
3. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. septiembre de 2010;39(3):481-97.
4. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet Lond Engl*. 11 de marzo de 2000;355(9207):873-6.
5. Harjutsalo V, Sjöberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *The Lancet*. mayo de 2008;371(9626):1777-82.
6. Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Soltész G, Ogle G, Silink M. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. febrero de 2014;103(2):161-75.
7. The DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabet Med*. agosto de 2006;23(8):857-66.
8. International Diabetes Federation. *IDF DIABETES ATLAS*. 6th ed. 2013.
9. Aschner P. Epidemiología de la diabetes en Colombia. *Av En Diabetol*. 1 de abril de 2010;26(2):95-100.
10. Gomez-Lopera N, Alfaro JM, Leal SM, Pineda-Trujillo N. Type 1 diabetes loci display a variety of native American and African ancestries in diseased individuals from Northwest Colombia. *World J Diabetes*. 15 de noviembre de 2019;10(11):534-45.
11. Cudworth AG, Woodrow JC. HL-A system and diabetes mellitus. *Diabetes*. abril de 1975;24(4):345-9.
12. Noble JA, Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. enero de 2012;2(1):a007732.
13. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk: Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families. *Diabetes*. 1 de abril de 2008;57(4):1084-92.
14. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. *J Autoimmun*. noviembre de 2015;64:101-12.
15. Rojas-Villarraga A, Botello-Corzo D, Anaya J-M. HLA-Class II in Latin American patients with type 1 diabetes. *Autoimmun Rev*. agosto de 2010;9(10):666-73.
16. Fabiola Montoya, Claudia Isabel Bedoya, Martha Cecilia Restrepo, Alberto Villegas, Sonia C. Posada, Héctor Iván García, et al. Determinación de marcadores genéticos en pacientes con diabetes tipo I y población sana. *Acta Med Colomb*. 1996;21(1):10-6.
17. Simmons KM. Type 1 diabetes: A predictable disease. *World J Diabetes*. 2015;6(3):380.
18. Carvajal-Carmona LG, Soto ID, Pineda N, Ortíz-Barrientos D, Duque C, Ospina-Duque J, et al. Strong Amerind/White Sex Bias and a Possible Sephardic Contribution among the Founders of a Population in Northwest Colombia. *Am J Hum Genet*. noviembre de 2000;67(5):1287-95.
19. Gj T, A A, V A, J G, H C, A V, et al. Clinical and Immunological Characteristics of Type 1 Diabetes Mellitus in a Northwestern Colombian Population [Internet]. Vol. 72,

Diabetes research and clinical practice. *Diabetes Res Clin Pract*; 2006 [citado 15 de abril de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16325957/>

20. Yepes DCS, Gómez-Lopera N, García J, Lopera MV, Toro M, Vélez A, et al. Aspectos demográficos de una muestra de pacientes colombianos con diabetes mellitus tipo. 2017;5.

21. Natalia GOMEZ-LOPERA, Juan-Manuel ALFARO, Alejandra-Marcela RODRIGUEZ, Alex RAMIREZ, Suzanne M. LEAL, Nicolas PINEDA-TRUJILLO. A non-coding RNASEH1 gene variant associates with Type 1 diabetes and interacts with HLA tagSNPs in families from Colombia. *Pediatric Diabetes*. 2020;In press.

22. Raha O, Sarkar B, Lakkakula BV, Pasumarthy V, Godi S, Chowdhury S, et al. HLA class II SNP interactions and the association with type 1 diabetes mellitus in Bengali speaking patients of Eastern India. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):12.

23. Carapito R, Radosavljevic M, Bahram S. Next-Generation Sequencing of the HLA locus: Methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. *Hum Immunol*. noviembre de 2016;77(11):1016-23.

24. SBTengine® – GenDx [Internet]. [citado 18 de abril de 2020]. Disponible en: https://www.gendx.com/product_line/sbtengine/

25. 1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation [Internet]. [citado 19 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.internationalgenome.org/>

26. Sarrazola DC, Rodríguez AM, Toro M, Vélez A, García-Ramírez J, Lopera MV, et al. Polimorfismos de un solo nucleótido representativos para los alelos clásicos del antígeno leucocitario humano en familias antioqueñas con diabetes mellitus tipo 1. *Biomédica*. 1 de septiembre de 2018;38(3):329-37.

27. Noble JA, Johnson J, Lane JA, Valdes AM. HLA Class II Genotyping of African American Type 1 Diabetic Patients Reveals Associations Unique to African Haplotypes. *Diabetes*. septiembre de 2013;62(9):3292-9.

28. Noble JA, Johnson J, Lane JA, Valdes AM. Race-specific type 1 diabetes risk of HLA-DR7 haplotypes. *Tissue Antigens*. noviembre de 2011;78(5):348-51.

29. Howson JMM, Roy MS, Zeitels L, Stevens H, Todd JA. HLA class II gene associations in African American Type 1 diabetes reveal a protective HLA-DRB1*03 haplotype. *Diabet Med*. junio de 2013;30(6):710-6.

30. Hamman RF, Bell RA, Dabelea D, D'Agostino RB, Dolan L, Imperatore G, et al. The SEARCH for Diabetes in Youth Study: Rationale, Findings, and Future Directions. *Diabetes Care*. diciembre de 2014;37(12):3336-44.

31. Bell RA, Mayer-Davis EJ, Beyer JW, D'Agostino RB, Lawrence JM, Linder B, et al. Diabetes in non-Hispanic white youth: prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. marzo de 2009;32 Suppl 2:S102-111.

32. Mayer-Davis EJ, Beyer J, Bell RA, Dabelea D, D'Agostino R, Imperatore G, et al. Diabetes in African American youth: prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. marzo de 2009;32 Suppl 2:S112-122.

33. Lawrence JM, Mayer-Davis EJ, Reynolds K, Beyer J, Pettitt DJ, D'Agostino RB, et al. Diabetes in Hispanic American youth: prevalence, incidence, demographics, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. marzo de 2009;32 Suppl 2:S123-132.

34. Liu LL, Yi JP, Beyer J, Mayer-Davis EJ, Dolan LM, Dabelea DM, et al. Type 1 and Type 2 diabetes in Asian and Pacific Islander U.S. youth: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. marzo de 2009;32 Suppl 2:S133-140.

35. Gomes MB, Gabrielli AB, Santos DC, Pizarro MH, Barros BSV, Negrato CA, et al. Self-reported color-race and genomic ancestry in an admixed population: A contribution of a nationwide survey in patients with type 1 diabetes in Brazil. *Diabetes Res Clin Pract.* junio de 2018;140:245-52.
36. Gomes KFB, Santos AS, Semzezem C, Correia MR, Brito LA, Ruiz MO, et al. The influence of population stratification on genetic markers associated with type 1 diabetes. *Sci Rep* [Internet]. abril de 2017 [citado 25 de marzo de 2020];7(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/srep43513>
37. Diaz-Horta O, Cintado A, Fernandez-De-Cossio ME, Nazabal M, Ferrer A, Roca J, et al. Relationship of type 1 diabetes to ancestral proportions and HLA DR/DQ alleles in a sample of the admixed Cuban population. *Ann Hum Biol.* noviembre de 2010;37(6):778-88.
38. Trujillo NP. VDR Gene Haplotypes Associate with Type 1 Diabetes and Suggest Interaction with HLA, IL2RA and CTLA4 loci in Colombian Families. *Curr Res Diabetes Obes J* [Internet]. 14 de marzo de 2018 [citado 26 de marzo de 2020];6(3). Disponible en: <https://juniperpublishers.com/crdoj/CRDOJ.MS.ID.555688.php>

Tablas

Tabla 1. Lista de primers usados para amplificar genes

Denominación	Posición cromosómica	Secuencia	Temperatura	Tamaño producto(bp)
HLA-DQB1	6p21.3 (Exon 2)	F-5' CATGTGCTACTTCACCAACGG 3'	58°C	211
HLA-DRB1	6p21.3 (Exon 2)	R-5' CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC 3' F-5' CCCACAGCACGTTTCTTG 3' R-5' CCGCTGCACTGTGAAGCTCT 3'	60°C	274

Tabla 2. Características clínicas y demográficas

Características	Valores
Hombres, n (%)	49 (51,04)
Mujeres, n (%)	47 (48,96)
Edad al diagnóstico en años, media (DE)	8,06 (4,19)
Edad aparición < 5 años, n (%)	24 (25)
Edad aparición > ó = 5 años, n (%)	72 (75)
Padres con Diabetes, n (%)	8 (8,3)
Hermanos con T1D, n (%)	5 (5,2)
Familiar cercano T1D, n (%)	23 (23,95)
Anti-IA-2 positivo, n (%)	21 (21,87)
Anti-GAD65 positivo, n (%)	19 (19,8)
IA-2 + GAD65 positivo, n (%)	23 (23,96)
Anticuerpos negativos, n (%)	28 (29,17)
Sin dato para anticuerpos, n (%)	5 (5,2)
T1DA, n (%)	63 (65,62)
T1DB, n (%)	28 (29,17)

Anti- IA-2: antígeno-2 tipo proteína tirosina; Anti-GAD65: descarboxilasa del ácido glutámico

T1DA: Diabetes Mellitus tipo 1 Autoimmune; T1DB: Diabetes Mellitus tipo 1 Idiopática

Tabla 3. Frecuencias alélicas HLA en pacientes T1D y CLM

T1D		CLM	
Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
DQB1*06:123	0,22	DQB1*02:01	0,042857143
DQB1*02:01:19	0,18	DRB1*14:01	0,004761905
DQB1*03:199	0,045	DRB1*14:02	0,028571429
DQB1*06:66	0,045	DRB1*14:54	0,00952381
DRB1*14:141	0,1	DRB1*03:01	0,038095238
DRB1*03:01	0,225	DRB1*03:02	0,014285714
DRB1*03:02	0,05	DRB1*08:04	0,004761905
DRB1*03:21	0,025		
DRB1*03:90	0,025		
DRB1*08:04:03	0,025		
DRB1*13:11:01	0,025		
DRB1*13:146	0,025		

T1D: Diabetes Mellitus Tipo 1; CLM: Colombian Living
Medellín