

# Análisis de ligamiento genético de la diabetes mellitus tipo 1, a marcadores de los cromosomas 2 y 11 en familias antioqueñas

FEDERICO URIBE, NICOLÁS PINEDA, FABIOLA MONTOYA, GUILLERMO LATORRE, ALBERTO VILLEGAS, JAVIER CERÓN, ANDRÉS PÉREZ, DÉBORA CASTRILLÓN, BEATRÍZ VALENCIA, IVÁN DUQUE, CONSTANZA DUQUE, GABRIEL BEDOYA, ANDRÉS RUÍZ

## RESUMEN

**L**A **DIABETES MELLITUS (DM)** comprende un grupo heterogéneo de desórdenes hiperglucémicos clasificados en subgrupos de acuerdo a su fisiopatología y etiología, entre los cuales se destacan la Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La DM1 es de aparición temprana y una absoluta escasez de insulina hace que los pacientes sean insulino dependientes desde el inicio de los síntomas y la (DM2), de inicio en la edad adulta y no todos los pacientes que la sufren son insulino dependientes.

La DM1 se clasifica como DM1A si es el efecto de una respuesta autoinmune por parte de las células  $\beta$  del páncreas y DM1B si la causa es desconocida (idiopática). Los estudios sobre la etiología de DM1 han demostrado que ambos subtipos tienen un fuerte componente genético, pero el patrón de herencia es complejo, ya que su patogénesis puede ser el resultado de la interacción de variantes en múlti-

FEDERICO URIBE<sup>1</sup>, NICOLÁS PINEDA<sup>3</sup>, FABIOLA MONTOYA<sup>2</sup>, ALBERTO VILLEGAS<sup>1</sup>, JAVIER CERÓN<sup>1-3</sup>, ANDRÉS PÉREZ<sup>1-3</sup>, DÉBORA CASTRILLÓN<sup>1</sup>, BEATRÍZ VALENCIA<sup>1</sup>, IVÁN DUQUE<sup>1</sup>, CONSTANZA DUQUE<sup>3</sup>, GABRIEL BEDOYA<sup>3</sup>, ANDRÉS RUÍZ<sup>3-4</sup>.

<sup>1</sup> Medicina Interna, Endocrinología, Hospital San Vicente de Paúl, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad de Medicina, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Laboratorio de Genética, Molecular, GENMOL, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup> Galton Laboratory, University College of London, London, United Kingdom.

FEDERICO URIBE E-mail: bodidarma@yahoo.com

Fecha de recepción: 22 de febrero de 2004

Fecha de aceptación: 23 de marzo de 2004

ples genes con factores medioambientales. Los estudios genéticos sobre DM1 han permitido identificar loci de susceptibilidad que se denominan IDDM, así para DM1A se encontró el primer locus (IDDM1) en la región HLA-DR/DQ, situada en 6p21, que modula el efecto de otros genes implicados en la enfermedad, el segundo (IDDM2) se localiza en 11p15 donde se encuentra el gen de la Insulina. Es decir, DM1 presenta gran heterogeneidad genética, de tal manera, que se han identificado más de 18 loci implicados en susceptibilidad a ella, entre ellos 3 en el cromosoma 2 (IDDM 7,12 y 13) y uno en el cromosoma 14 (IDDM11), este último asociado a DM1B. El objetivo de este estudio consistió en la búsqueda de loci en los cromosomas 2 y 11 involucrados en la susceptibilidad a DM, en 3 familias antioqueñas, para lo cual se realizó análisis de ligamiento paramétrico a 23 marcadores microsatélites en el cromosoma 2 y a 18 en el cromosoma 11. A las familias, codificadas como DM1(11afectados), familia 1 (2 afectados) y familia10 (3 afectados), se les realizó simulación para determinar el poder para hacer análisis de ligamiento y los resultados mostraron que presentaban suficiente poder para realizarlo, puesto que en DM1 la razón de disparidad máxima (Lod score o Z máximo) fue de 3.57, sin recombinación ( $\theta = 0$ ), el cual es superior a 3, el valor aceptado para determinar ligamiento, y al tomar las tres familias en conjunto se obtuvo un Z máximo de 5.76. Con el análisis de ligamiento para el cromosoma 11, se halló que solo en la familia 10 se presentaba un valor positivo de Z; 1.18 al marcador D11S925 con  $\theta = 0$ , muy superior al de la simulación de esta familia (0.75), con respecto al cromosoma 2, se obtuvieron valores de Z positivos al marcador D2S319 en DM1 y familia 10, 2.08 y 0.88 respectivamente, con  $\theta = 0$ . Al tomar las tres familias como un todo y calcular Z para los marcadores D11S925 y D2S319, se obtuvo un valor de 2.5, con  $\theta = 0$ , lo cual está corroborando que en las familias analizadas están involucrados 2 loci, situados en las regiones de los cromosomas 11 y 2 señaladas por dichos marcadores. Si se tiene en cuenta que el

marcador D11S925 está situado en la región 11q23-3 y el D2S319 en la 2qter, se puede decir, que con este trabajo se han identificado 2 loci nuevos de susceptibilidad a DM1 en la población antioqueña, ya que estas regiones no concuerdan con las reportadas hasta el presente; además, como se hizo análisis de ligamiento a IDDM1, con resultados negativos (datos no mostrados), la DM1 estudiada podría clasificarse como DM1B.

## PALABRAS CLAVE

ANÁLISIS DE LIGAMIENTO GENÉTICO  
DESÓRDENES HIPERGLUCÉMICOS  
DIABETES MELLITUS

## INTRODUCCIÓN

LA DIABETES MELLITUS (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por la hiperglucemia resultante de los defectos de la secreción y/o de la acción de la insulina (1).

La DM es una de las enfermedades más comunes en el ámbito mundial, con una prevalencia aproximada del 3% (2). En Colombia se ha reportado en un 7% tanto en hombres como en mujeres; la prevalencia de intolerancia a la prueba oral de glucosa es del 5% en hombres y del 7% en mujeres (3).

Los procesos patogénicos en la DM van desde la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas que causa deficiencia de insulina, hasta defectos que producen resistencia a su acción. Las anomalías en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas en la DM se deben a una acción insulínica insuficiente en los tejidos blanco. Entre las causas de esta insuficiencia están

la secreción inadecuada de la hormona y la respuesta disminuida del tejido a la misma, en uno o más puntos de las complejas vías de su acción. La gran mayoría de los casos de diabetes se ubican en dos grandes grupos etiopatogénicos; uno de ellos es la diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1), cuya causa es la deficiencia absoluta de secreción de insulina; puede subdividirse en autoinmune (DM tipo 1A) e idiopática (DM tipo 1B). El segundo es la diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2), que es la forma más común; su causa es una combinación de inadecuada secreción de insulina y resistencia a su acción (1).

La DM tipo 1 es una enfermedad predominantemente de poblaciones blancas cuya prevalencia varía de un país a otro; es más alta en los del norte de Europa; en Estados Unidos se ha reportado una prevalencia de 0.4% (4). La tasa de concordancia del 50% o menos para la DM tipo 1 en los gemelos monocigotos contrasta con la agregación familiar y la concordancia casi del 100% en dichos gemelos de la DM tipo 2 (5).

Aproximadamente el 95% de los pacientes blancos con DM tipo 1 tienen antígenos DR3 o DR4 y 55-60% tienen ambos alelos (6). En otros grupos étnicos la susceptibilidad ligada al HLA (antígenos de leucocitos humanos) puede involucrar diferentes alelos (7). También se ha observado el efecto protector de DR2, por lo que es muy raro encontrar un paciente con DM tipo 1 cuyo genotipo incluya este alelo (6).

En 1996, Montoya et al. (8) verificaron en familias antioqueñas con DM tipo 1, la presencia de los alelos DRB y DQ que confieren susceptibilidad para sufrir la enfermedad y pudieron establecer otros haplotipos relacionados con la susceptibilidad o la resistencia a la enfermedad; concluyeron que los haplotipos de susceptibilidad en las familias antioqueñas son: DRB10301-DQA1 0501-DQB1 0201 con una frecuencia del 50% frente al 12.5% en los sujetos

sanos; y DRB1 04- DQA1 03-DQB1 0302 con una frecuencia del 53.8% frente al 28.6% en los sujetos sanos.

Recientemente se han investigado varios loci involucrados con DM tipo 1 diferentes al HLA, con resultados controvertidos. De estos loci, el más conocido es el polimorfismo 5' flanqueante del gen de la insulina (VNTR-INS), localizado en el cromosoma 11 y que en la actualidad se designa como IDDM2 (9), el cual consiste en un VNTR (número variable de repeticiones en tándem) que presenta tres alelos (S, M, L); dadas las dificultades técnicas para su genotipificación directa (mediante Southern blot), se prefiere el uso del polimorfismo Hph I, el cual se encuentra estrechamente ligado a aquél, y su presencia o ausencia ha permitido inferir el alelo VNTR en algunas poblaciones ya caracterizadas (10). En el brazo largo de este mismo cromosoma se ha identificado otra región de susceptibilidad para la enfermedad denominada IDDM4 (11).

También se han identificado otros loci de susceptibilidad para DM tipo 1 tomando como base, por ejemplo, la homología conocida entre los genomas humano y del ratón. De este modo, en estudios efectuados con la línea del ratón diabético no obeso (NOD), tras haber identificado un locus para diabetes en su cromosoma 1 (12) y considerando su alta homología o sintenia con el cromosoma 2 humano, se han llevado a cabo varios estudios en busca de loci para DM tipo 1 en este cromosoma; como resultado se han encontrado al menos tres de dichos loci en una región de 23 cM (IDDM7, IDDM12 e IDDM13) (13-15). Mediante estudios de casos y controles, se ha encontrado asociación a diferentes genes como NRAMP1 e IA-2 en el cluster (agrupamiento) del gen IL-1, pero los estudios basados en familias han descartado las anteriores asociaciones como artefactos debidos posiblemente a los efectos de la estratificación poblacional (16).

A pesar de que se desconoce el modo de herencia, se han identificado mediante clonaje posicional y otras técnicas, genes de susceptibilidad en loci candidatos en los cromosomas 2q (CTLA-4, HOXD8, IGF2, IGFBP2 e IGFBP5) (13,17-20) y 11q13.3 (FGF3,MDU1), los cuales codifican proteínas de superficie celular que regulan la concentración intracelular de calcio y ZMF1, una proteína nuclear (11). La susceptibilidad humana para DM tipo 1A, está bajo control del locus HLA en el cromosoma 6p21 llamado IDDM1 y por lo menos otros 15 loci en 10 cromosomas con un efecto modulador inferior; además, se sugiere la acción de factores ambientales no definidos claramente (21-23). Por otro lado, el mayor valor de ligamiento en DM tipo 1B ha sido identificado en el locus IDDM11 del cromosoma 14 (24).

Nuestro propósito en este estudio fue evaluar el ligamiento genético de la DM tipo 1 a marcadores a lo largo de los cromosomas 2 y 11 en familias del departamento de Antioquia, Colombia.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Pacientes

SE ESTUDIARON 12 PACIENTES DE 3 FAMILIAS (DM1, familia-1, familia-10, ver figura 1), una de ellas con una frecuencia inusualmente alta de afectados (DM1). Todos estos pacientes fueron clasificados como diabéticos tipo 1 de acuerdo con criterios internacionales (1).

### Extracción del ADN

EN LA FAMILIA DM1, de cada individuo vivo, luego de obtener el consentimiento informado, se obtuvieron dos muestras de sangre periférica antico-

agulada con EDTA, las cuales se conservaron a 4°C hasta el momento de extraer el ADN. La extracción se realizó mediante el método de fenol-cloroformo.

A cada muestra se le asignó un código único consistente en la sigla de la enfermedad DM1, seguida de un número arábigo de dos dígitos que la identifica. Por ejemplo, la primera muestra se identifica como DM101.

Los códigos previamente asignados a las muestras aportadas por Montoya et al. (8) se conservaron en este nuevo estudio.

### Análisis de simulación de poder para detectar ligamiento

CON EL FIN DE ESTIMAR EL PODER para detectar ligamiento, se realizó una simulación que incluyó los siguientes supuestos: herencia dominante con penetrancia del 98.5%, una frecuencia del alelo afectado de 0.003 con un locus marcador con cuatro alelos de frecuencias iguales y una clase de susceptibilidad. Además se asumió homogeneidad genética y se corrieron 100 réplicas de cada pedigrí con el programa SLINK; se las analizó con el programa MSIM (25,26).

### Tipificación de marcadores genéticos a lo largo de los cromosomas 2 y 11

SE EVALUARON LOS MARCADORES GENÉTICOS contenidos en los paneles de ligamiento de Perkin-Elmer versión 2 para los cromosomas 2 y 11. Para esto se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR multiplex) en los termocicladores PE9700 (Perkin-Elmer) y PTC200 (MJ Research). Posteriormente los amplicones (productos de las PCR) fueron resueltos en un analizador genético

ABI-310 (Perkin-Elmer). Se asignaron los alelos con ayuda de los software Genescan 3.1 y Genotyper 2 (Perkin-Elmer).

Se ingresaron los genotipos a cada árbol genealógico con ayuda del programa Cyrillic (Cherwell Scientific).

### Análisis de ligamiento genético

SE CALCULARON LOS LOD SCORE BIPUNTUALES utilizando el paquete Fastlink (27) asumiendo herencia dominante con penetrancia incompleta (0.985) y una frecuencia alélica de 0.003. Las frecuencias alélicas se asumieron como  $1/n$  ( $n$  = número de alelos). Con el fin de determinar la fracción de recombinación a la cual se obtiene el mayor lod score, se utilizó el programa ILINK del mismo paquete.

El lod score tetrapuntual se calculó con el paquete TLINKAGE (28) y se evaluaron los dos marcadores que dieron el mayor lod score en ambos cromosomas 2 y 11.

## RESULTADOS

DE 16 PACIENTES EN TRES FAMILIAS se pudieron estudiar 12. De estos, 2 habían fallecido pero se tenía muestra de ADN de uno de ellos (143 en la familia DM1) y al otro paciente, pudo reconstruirse su genotipo tras haber analizado a su esposa (DM101) y a la mayoría de sus hijos. La mayor densidad de afectados 9/15 (60%) se observó en la rama derecha de la familia DM1 (**Figura N° 1A**), seguida por la familia-10; 3/7 (42.9%) (**Figura N° 1B**) y finalmente la familia-1; con 2 de 7 (28.6%) en la familia-1 (**Figura N° 1C**).

En la rama derecha de DM1 se observa una alta frecuencia de hermanos (hermanas) afectados (61.5%) que contrasta con una menor frecuencia observada en las familias 1 y 10 (40%), la cual sigue siendo alta para lo esperado en la población general (0.4%) (14).

La simulación de poder para detectar ligamiento arrojó cifras que de ser obtenidas, tendrían significancia estadística y fueron aportadas en mayor proporción por DM1 (**Tabla N° 1**).

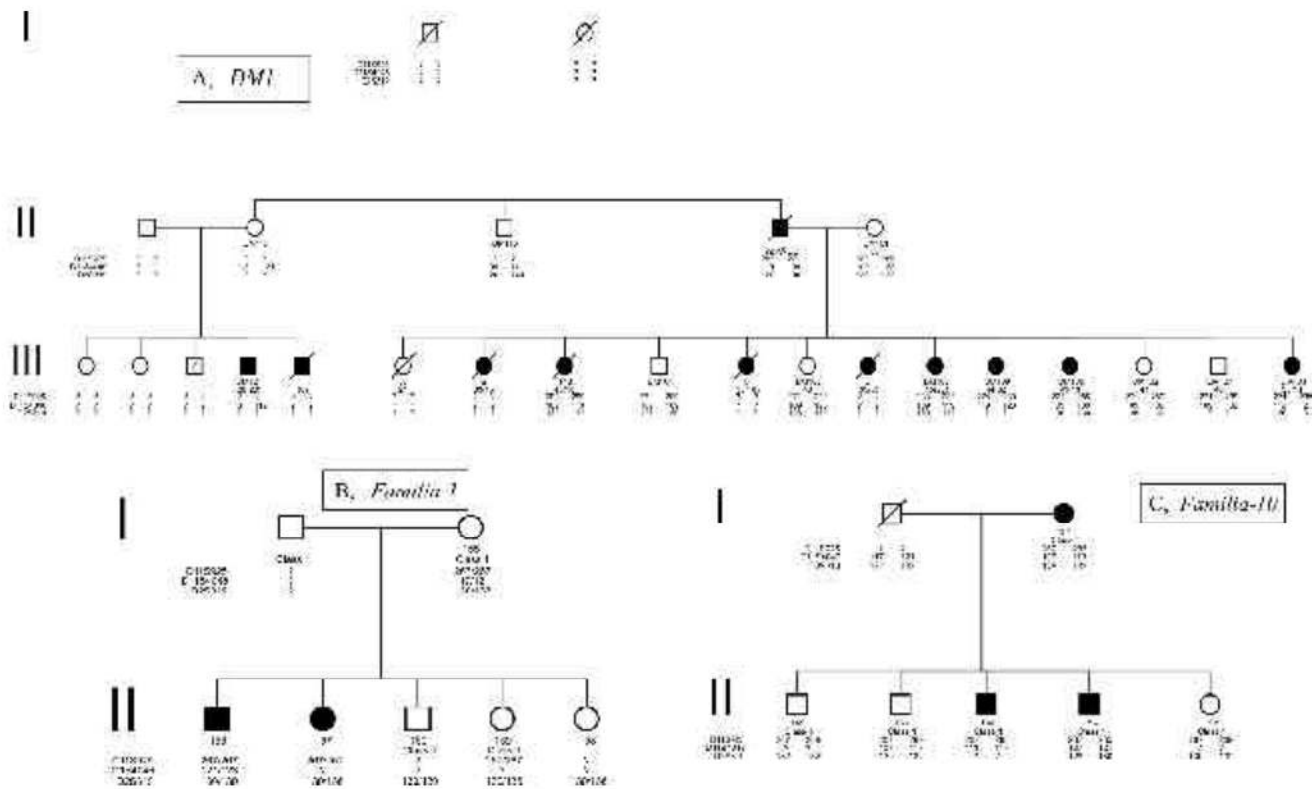
Tabla N° 1  
SIMULACIÓN DE PODER DE TRES FAMILIAS ANTIOQUEÑAS CON DM TIPO 1 EN THETA = 0

Pedigrí	Lod Score (Z)			Probabilidades Z ?		
	Promedio	Maximo	Theta = 0.5	1	2	3
DM1	2.44	3.57	0	79	70	41
Familia-10	0.75	1.18	0	56	0	0
Familia-1	0.56	1.18	0	2	0	0
<b>Total</b>	<b>3.66</b>	<b>5.76</b>	<b>0</b>	<b>95</b>	<b>87</b>	<b>68</b>

La familia DM1 sola presenta un 41% de probabilidad de obtener un lod score igual a 3 o mayor (valor elegido arbitrariamente como significativo estadísticamente en lod score) (29) pero en

promedio se podría obtener un lod score combinado de 3.66 en theta = 0, es decir sin la observación de eventos de recombinación.

Figura N° 1  
GENEALOGÍAS ANTIOQUEÑAS CON DM TIPO 1



En la figura 1A se muestra la familia DM1, debajo de cada símbolo aparece el código de su muestra (si la tiene), la edad actual (edad de inicio) y los genotipos correspondientes a los marcadores indicados a la izquierda. En la figura 1B se muestra la familia-1, en la figura 1C se muestra la familia-10.

En algunos individuos se observó la ausencia de amplicón en algunos marcadores de ambos cromosomas. Sin embargo, los datos obtenidos permitieron hacer los análisis que presentamos y las conclusiones que aparecen al final.

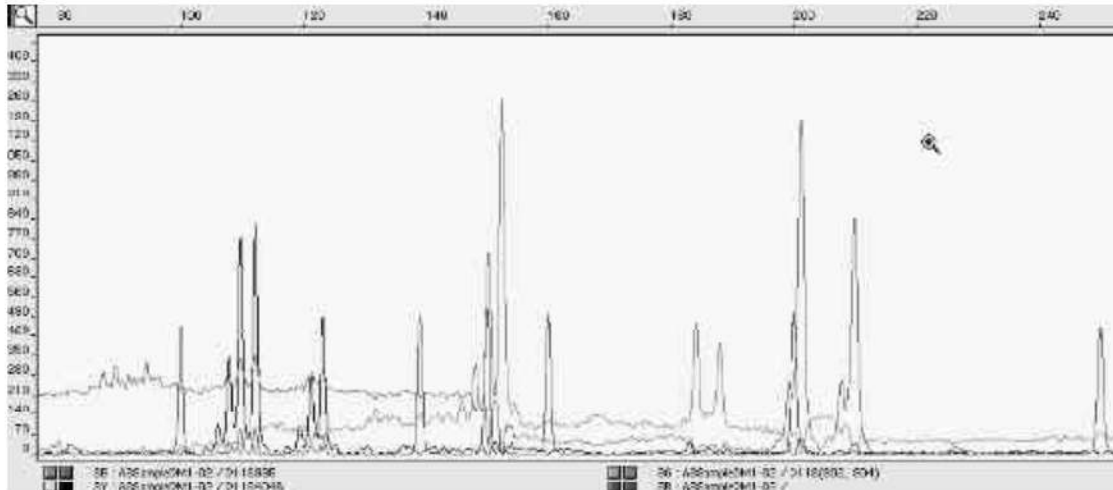
En la (Figura N° 2) se ilustra la obtención de los datos y se muestran los genotipos para un individuo.

El máximo lod score combinado obtenido para el cromosoma 11 fue en el marcador telomérico D11S4046, con un valor de 0.94 en  $\theta = 0.167$  (Figura N° 3). Sin embargo, el máximo lod score para este cromosoma se obtuvo en el marcador

D11S925 (familia-10) el cual fue equivalente al máximo esperado según la simulación de poder.

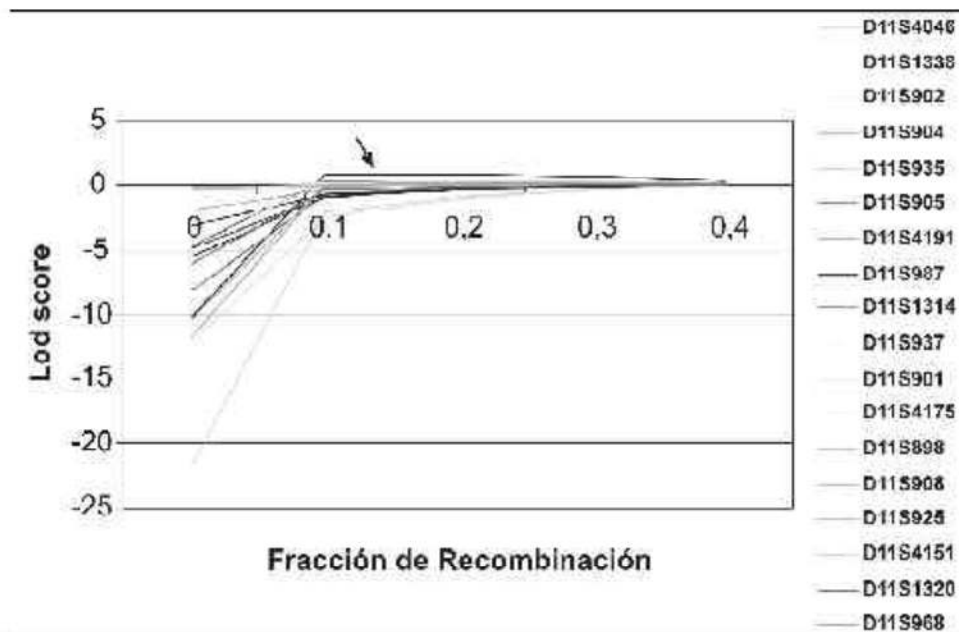
El máximo lod score ( $Z_{max}$ ) obtenido para el cromosoma 2, fue obtenido para el marcador D2S319 en una fracción de recombinación de cero ( $\theta = 0.0$ ) y alcanzó un valor de  $Z = 2.5$  (Figura N° 4). Considerando que la DM tipo 1 es una enfermedad multifactorial y por tanto poligénica (30), quisimos evaluar el grado de ligamiento de la enfermedad a los marcadores D11S4046 y D2S319 ( $\Theta = 0.167$  y  $0.00$  respectivamente), en la familia DM1; se obtuvo un máximo lod score de 5.5, lo cual estaría indicando que existen más de trescientas mil veces (300.000) a favor del ligamiento genético contra una (1) de que no lo haya.

**Figura N° 2**  
**ELECTROFOROGRAMA QUE ILUSTRA LA OBTENCIÓN DE VARIOS GENOTIPOS**  
**PARA UN INDIVIDUO EN UNA MISMA INYECCIÓN EN EL ANALIZADOR GENÉTICO ABI-310**



Diferentes colores (no mostrados aquí) son debidos a las emisiones de fluorescencia en las distintas longitudes de onda. En la base de la figura se observan las marcas fluorescentes para cada uno de los cuatro marcadores analizados en el corrido que se ilustra. En la parte superior se observa la escala en pares de bases que ayuda a asignar los tamaños de los alelos en cada marcador. El marcador de peso estándar interno se ve en rojo en el electrograma original.

**Figura N° 3**  
**LOD SCORE BIPUNTUAL PARA MARCADORES DEL CROMOSOMA 11,**  
**OBTENIDO PARA LAS TRES FAMILIAS**



Debajo de la abscisa se indica la fracción de recombinación (?) y en la ordenada se indica el valor de lod score. La flecha indica aproximadamente la posición (? = 0.167) en la cual se obtuvo el mayo lod score (094) en el marcador D11S4046.

Figura N° 4  
LOD STORE BIPUNTUAL PARA MARCADORES DEL CROMOSOMA 2

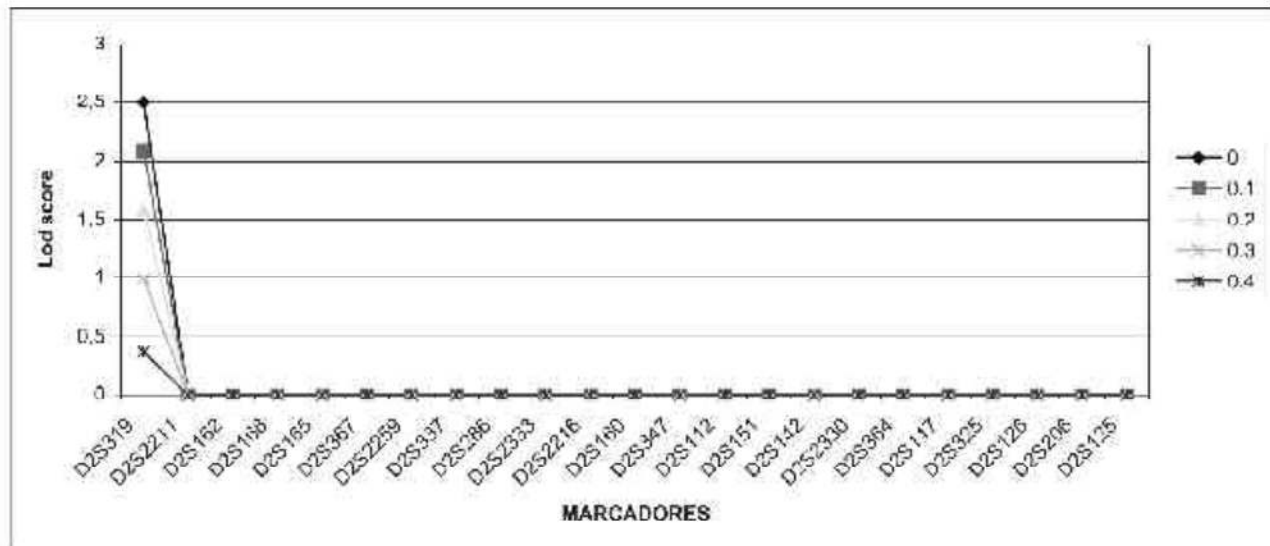


Tabla N° 2  
LOD SCORE BIPUNTUAL PARA LOS MARCADORES D11S925, D11S4046  
Y D2S319 EN CADA UNA DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

MARCADOR	FAMILIA	Fracción de recombinación (?)				
		0.00	0.1	0.2	0.3	0.4
<b>D11S925</b>	DM1	-11.65	-0.89	-0.28	-0.07	-0.01
	familia-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	familia-10	1.18	0.96	0.71	0.43	0.14
	<b>TOTAL</b>	<b>-10.47</b>	<b>0.07</b>	<b>0.43</b>		
<b>D11S4046</b>	DM1	-10.34	0.83	0.92	0.7	0.31
	familia-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	familia-10	-4.32	-0.44	-0.19	-0.08	-0.02
	<b>TOTAL</b>	<b>-14.66</b>	<b>0.39</b>	<b>0.73</b>	<b>0.62</b>	<b>0.29</b>
<b>D2S319</b>	DM1	2.08	1.68	1.24	0.77	0.29
	familia-1	-0.46	-0.29	-0.16	-0.07	-0.02
	familia-10	0.88	0.7	0.5	0.29	0.09
	<b>TOTAL</b>	<b>2.5</b>	<b>2.09</b>	<b>1.58</b>	<b>0.99</b>	<b>0.36</b>



## DISCUSIÓN

EN LA ACTUALIDAD SE HAN IDENTIFICADO al menos 15 loci genéticos distribuidos en 10 cromosomas relacionados con la susceptibilidad a sufrir DM tipo 1 (31) y se sabe que debe haber otros loci aún no identificados que también se relacionan con dicha enfermedad. Esta situación es un motivo de desaliento en la búsqueda de loci genéticos relacionados con la DM tipo 1, pero los experimentos de la naturaleza también proporcionan las herramientas para estudiar la herencia de estas características complejas. Es así como la existencia de poblaciones genéticamente aisladas, puede favorecer la identificación de loci de susceptibilidad a enfermedades de herencia compleja; esta aplicación se basa en que tales poblaciones, dado su número relativamente bajo, tendrán menos genes contribuyendo a la característica (enfermedad) y por ello el efecto de cada gen de susceptibilidad será más fácil de detectar (30); además, en estas poblaciones podrían identificarse efectos fundadores y niveles altos de desequilibrio de ligamiento (LD) originado por mezcla racial, características que son reunidas por la población antioqueña (32-35); tal situación brinda la posibilidad de hacer aportes a la elucidación genética de las enfermedades de herencia compleja. Un indicio de lo anterior son los resultados que se presentan, a la luz de los cuales, a pesar de la heterogeneidad de locus que se evidencia, logramos identificar al menos dos posibles regiones de susceptibilidad para DM tipo 1 en los cromosomas 2 y 11. Ambos cromosomas han sido bastante estudiados: el cromosoma 2 en su brazo largo, ya que en una región de sólo 23 cM presenta tres loci de susceptibilidad para DM tipo 1 (11-15); en cuanto al cromosoma 11, se le han estudiado ambos brazos pues cada uno contiene al menos una región de susceptibilidad identificada previamente (10-11). Sin embargo, las regiones identificadas por nosotros no corresponden a ninguna que haya sido reportada y se localizan en las regiones 2pter y 11q23-3.

El marcador D2S319 mapea en la región 2pter y presenta un lod score cercano al esperado según la simulación de poder. Si consideramos separadamente los lod score aportados por cada familia podríamos decir que las familias DM1 y familia-10 presentan homogeneidad en cuanto a este locus, pues DM1 arrojó un  $Z_{max}$  de 2.08 y familia-10 un  $Z_{max}$  de 0.88 lo que en total produciría un lod score de 2.96 entre estas dos familias (**Tabla N° 2**). Comparando con la simulación de poder, el valor de Z en DM1 está levemente por debajo del promedio esperado (2.44), pero en la familia-10 el valor promedio esperado (0.75) es superado por el Z obtenido. En ambas familias el  $Z_{max}$  fue obtenido en  $\theta = 0.00$ .

Inesperadamente, en la familia-10 se obtuvo un lod score de 1.18 para el marcador D11S925 (11q23-3) lo que corresponde al  $Z_{max}$  esperado (1.18), por lo que creemos haber identificado dos nuevos loci involucrados con la susceptibilidad para sufrir DM tipo 1 (uno en DM1 y otro en familia-10).

Dado que los valores de Z encontrados corresponden a lo supuesto para la simulación; que la DM tipo 1 es predominantemente una enfermedad autoinmune bajo el control del locus HLA (21-23); que tras haber evaluado la región HLA-clase II con STR's no se encontró ligamiento genético con la enfermedad en estas familias (36), proponemos la hipótesis de que en ellas, los casos de DM tipo 1 corresponderían al grupo DM tipo 1B (DM tipo 1 idiopática). Para apoyar esta hipótesis nos proponemos evaluar próximamente los anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (anti-GAD) en el suero de pacientes, ya que estos anticuerpos permanecen detectables aun después de varios años de evolución de la enfermedad (37,38).

En las regiones mencionadas pueden residir genes de susceptibilidad, pero antes de iniciar las aplicaciones de clonaje posicional debe emprenderse un nuevo estudio basado en casos y controles y/o la

evaluación de LD de estos loci con la enfermedad de modo que se puedan confirmar estos hallazgos en la población antioqueña, así como refinar el mapa de las regiones de susceptibilidad.

## SUMMARY

### GENETIC LINKAGE ANALYSIS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS TO MARKERS ON CHROMOSOMES 2 AND 11 IN FAMILIES FROM ANTIOQUIA, COLOMBIA

**DIABETES MELLITUS (DM)** comprises a heterogeneous group of hypoglycemic disorders, that are grouped according to their physiopathology and etiology; the most notorious ones are type 1 DM (DM1) and type 2 DM (DM2); DM1 is characterized by early onset and absolute lack of insulin; therefore, patients suffering from it depend on insulin since the beginning of their symptoms; in contrast, DM2 manifests during adult life and not all patients depend on insulin.

DM1 is classified as DM1A when it results from an autoimmune response of pancreatic  $\beta$  cells, and DM1B if it is of unknown origin (idiopathic). Studies on the etiology of DM1 have revealed that both types have a strong genetic component but their inheritance pattern is complex since its pathogenesis may result from the interaction with environmental factors of variants in multiple genes. By means of genetic studies on DM1, susceptibility loci known as IDDM have been identified, namely: for DM1A the first locus (IDDM1) was found in the HLA-DR/QD region, located in 6p21, that modulates the effect of other genes involved in the disease; the second one (IDDM2) is located in 11p15, the site of the insulin gene. That means, DM1 exhibits wide genetic heterogeneity so that more than 18 loci involved in susceptibility to this disease have

been identified, among them, 3 on chromosome 2 (IDDM 7, 12, and 13), and 1 on chromosome 14 (IDDM11), the latter being associated to DM1B.

The aim of this study was the search for loci on chromosomes 2 and 11 involved in the susceptibility to DM, in three families from Antioquia, Colombia; for that purpose, parametric linkage analysis was performed to 23 microsatellite markers on chromosome 2, and to 18 on chromosome 11. In order to determine the power for making linkage analysis, simulation was carried out on the families, coded as DM1 (11 affected members), family 1 (2 affected members), and family 10 (3 affected members); results demonstrated power enough for that purpose since in DM1 the maximum odds ratio (Lod score or Z maximum) was 3.57 without recombination ( $\theta=0$ ), above 3, the accepted value for determining linkage; when the three families were taken together, a maximum Z of 5.76 was obtained. With the linkage analysis for chromosome 11, it was found that only in family 10 there was a positive Z value, 1.18 to marker D11S925 with  $\theta=0$ , above the simulation value for this family (0.75); as regards chromosome 2, positive Z values were obtained to marker D2S319 in DM1 and family 10: 2.08 and 0.88, respectively, with  $\theta=0$ . When the three families were taken as a whole and Z values were calculated for markers D11S925 and D2S319, a value of 2.5 was obtained, with  $\theta=0$ , which confirms that in the analysed families 2 loci are involved, located in the regions of chromosomes 11 and 2 signaled by such markers. If it is taken into account that the D11S925 marker is located in the region 11q23-3, and the D2S319 marker, in the region 2qter, it may be said that in this work two new loci of susceptibility to DM1 have been identified in three families from Antioquia, Colombia, since these regions do not agree with those so far reported; besides, since results were negative in linkage analysis to IDDM1 (data not shown), the studied cases of DM1 could be classified as DM1B.

## KEY WORDS

DIABETES MELLITUS

GENETIC LINKAGE ANALYSIS

HYPERGLYCEMIC DISORDERS

## BIBLIOGRAFÍA

1. The Expert committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report. *Diabetes Care* 1997; 20: 1.183-1.197.
2. TODD J. Transcribing diabetes. *Nature* 1996; 384: 407-408.
3. ASCHNER P, KING H, TRIANA-DE-TORRADO M, RODRÍGUEZ BM. Glucose intolerance in Colombia. A population-based survey in an urban community. *Diabetes Care* 1993; 16: 90-93.
4. RISCH N, GHOSH S, TODD JA. Statistical evaluation of multiple locus linkage data in experimental species and relevance to human studies: application to murine and human IDDM. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 702-714.
5. BARNETT AH, EFF C, LESLIE RDG. Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* 1981; 20: 87-93.
6. NERUP J, MANDROUP-POULSEN T, MOLVIG J. The HLA-IDDM association: implications for aetiology and pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3: 779-802.
7. SAKURAMI T, UENO Y, NAGAOKA K, et al. HLA-DR specifications in Japanese with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1982; 31: 105-116.
8. MONTOYA F, BEDOYA CI, RESTREPO MC, VILLEGAS A, POSADA SC, GARCÍA HI, et al. Determinación de marcadores genéticos en pacientes con diabetes tipo 1 y población sana. *Acta Med Colom* 1996; 21:10-16.
9. SPIELMAN RS, BAUR MP, CLERGET-DARPOUX F. Genetic analysis of IDDM: Summary of GAW5 IDDD results. *Genet Epidemiol* 1989; 6:43-548.
10. JULIER C, HYER RN, DAVIS J, MERLIN F. Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature* 1991; 354: 155-159.
11. HASHIMOTO L, HABITA C, BERESSI JP, DELEPINE M, BESSE C, CAMBON-THOMSEN A, et al. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 1994; 371: 161-164.
12. CORNALL RJ, PRINS JB, TODD JA, PRESSEY A, DELARATO NH, WICKER LS, et al. Type 1 diabetes in mice is linked to the interleukin-1 receptor and Lsh/ltyBcg genes on chromosome 1. *Nature* 1996; 353: 262-265.
13. OWERBACH D, GABBAY KH. The HOXD8 locus (2q31) is linked to type 1 diabetes: interaction with chromosome 6 and 11 disease susceptibility genes. *Diabetes* 1995; 44:132-136.
14. MORAHAN G, HUANG D, TAIT BD, COLMAN PG, HARRISON LC. Markers on distal chromosome 2q linked to insulin-dependent diabetes mellitus. *Science* 1996; 272: 1.811-1.813.
15. ESPOSITO L, HILL NJ, PRITCHARD LE, CUCCA F, MUXWORTHY C, MERRIMAN ME, et al. Genetic analysis of chromosome 2 in type 1 diabetes; analysis of putative loci IDDM7, IDDM12, and IDDM13 and candidate genes NRAMP1 and IA-2 and the Interleukin-1 gene cluster. *Diabetes* 1998; 47: 1.797-1.799.
16. SPIELMAN R, MCGINNIS R, EWENS W. Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-516.
17. AWATA T, KURIHARA S, LITAKA M, TAKEI S-I, INOUE I, ISHII C, et al. Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 Locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Grave's disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. *Diabetes* 1998; 47: 128-129.
18. VEIJOLA R, VAHASALO P, TUOMILEHTO-WOLF E. Human leucocyte antigen identify and DQ risk alleles in antibody-positive siblings of children with IDDM are associated with reduced early insulin response. *Diabetes* 1995; 44: 1.021-1.028.
19. RICH SS. Positional cloning works! Identification of genes that cause IDDM. *Diabetes* 1995; 44: 139-140.

20. IKEGAMI H, MAKINO S, YAMATO E. Identification of a new susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus by ancestral haplotype congenic mapping. *J Clin Invest* 1995; 96: 1.936-1.942.
21. TODD JA. Genetic analysis of type I diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 93: 8.560-8.565.
22. ROWE RE, WAPELHORST B, BELL GI, et al. Linkage and association between insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) susceptibility and markers near the glucokinase gene on chromosome 7. *Nat Genet* 1995; 10: 240-242.
23. COPEMAN JB, CUCCA F, HEARNE CM, et al. Linkage disequilibrium mapping of a type I diabetes susceptibility gene (IDDM7) to chromosome 2q31-q33. *Nat Genet* 1995; 9: 80-85.
24. FIELD LL, TOBIAS R, THOMSON G, PLON S. Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus maps to a locus (IDDM11) in human chromosome 14q24.3-q31. *Genomics* 1996; 33:1-8.
25. OTT J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4.175-4.178.
26. WEEKS DE, OTT J, LATHROP GM. SLINK: A general simulation program for linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1990; 47 (Suppl.) A 204.
27. COTTINGHAM R, IDURY R, SCHAFFER A. Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 252-263.
28. SCHORK NJ, BOEHNKE M, TERWILLIGER JD, OTT J. Two trait locus linkage analysis: a powerful strategy for mapping complex genetics traits. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1.127-1.136.
29. OTT J. *Analysis of Human Genetic Linkage*. 3<sup>rd</sup> ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 1999: 38.
30. HAINES J, PERICAK-VANCE M. *Approaches to gene mapping in complex human diseases*. New York: Wiley-Liss; 1998: 103.
31. PUGLIESE A. Unraveling the genetics of insulin-dependent type 1 diabetes: The search must go on. *Diabetes Rev* 7: 77-93.
32. LENDON CL, MARTINEZ A, BEHRENS IM, KOSIK KS, MADRIGAL L, NORTON J, et al. E280A PS-1 mutation causes Alzheimer's disease but age of onset is not modified by ApoE alleles. *Hum Mutat* 1997; 10: 186-195.
33. LOPERA F, ARDILA A, MARTINEZ A, MADRIGAL L, ARANGO-VIANA JC, LEMERE CA, et al. Clinical features of early-onset Alzheimer's disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. *JAMA* 1997; 277: 793-799.
34. PINEDA N, CARVAJAL LG, BURITICÁ O, MORENO S, URIBE CS, PINEDA D, et al. A novel Cys212Tyr founder mutation in parkin and allelic heterogeneity of juvenile Parkinsonism in a population from North West Colombia. *Neurosc Lett* 2001; 298: 87-90.
35. CARVAJAL LG, SOTO ID, PINEDA N, ORTIZ D, DUQUE C, OSPINA J, et al. Strong Amerind/white sex bias and a possible sephardic contribution among the founders of a population in North West Colombia. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1.287-1.295.
36. PINEDA N, URIBE F, MONTOYA F, LATORRE G, VILLEGAS A, CERÓN C, et al. Genetic analysis of diabetes mellitus type 1 in pedigrees from an isolated province from Colombia. 2001. In preparation.
37. KAUFMAN D, ERLANDER M, CLARE-SALZLER M, ATKINSON M, MACLAREN N, TOBIN A. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 89: 283-292.
38. CHRISTIE MR, TUN RY, LO SSS, CASSIDY D, BROWN TJ, HOLLANDS J, et al. Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM: Studies with identical twins. *Diabetes* 1992; 41: 782-787.

