



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

FACULTAD DE CIENCIAS

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización Genética & Evolución.

**“Estudio de frecuencias génicas del
SNP -23HphI como segundo loci de
susceptibilidad en la población
diabética del Uruguay.”**

Matías Fabregat

Tutora: Dra. Adriana Mimbacas

Laboratorio del Grupo de Investigación en Genética Humana.
Departamento de Genética, División Biología Molecular y Genética del
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Índice

<i>Temario</i>	<i>Pág.</i>
1. Prólogo	3
2. Resumen	4
3. Introducción	5
i. La Diabetes Mellitus	5
ii. Antecedentes	6
iii. La Diabetes Híbrida	7
iv. Minisatélite en el gen de la insulina (INS-VNTR)	7
v. INS-VNTR y el SNP -23HphI	10
vi. Mecanismos de acción del INS-VNTR en la DMT1	10
4. Hipótesis y Objetivos	14
5. Materiales y Métodos	15
6. Resultados	18
7. Discusión	24
8. Agradecimientos	28
9. Anexos	29
i. Anexo 1	29
ii. Anexo 2	30
iii. Anexo 3	31
10. Bibliografía	32

Prologo

“Una nueva teoría no se impone porque los científicos se convengan de ella, sino porque los que siguen abrazando las ideas antiguas van muriendo poco a poco y son sustituidos por una nueva generación que asimila las nuevas desde el principio.”

Max Planck

Resumen

Varios estudios dan pruebas contundentes de la existencia de un nuevo tipo de diabetes: la diabetes híbrida (DH). Esta se caracteriza por un fenotipo clínico de diabetes tipo 2 y perfil genético autoinmune (HLA positivo).

Se ha visto que el segundo loci de susceptibilidad para autoinmunidad (luego del HLA) corresponde a un minisatélite en el gen de la insulina (INS-VNTR). En poblaciones caucásicas este VNTR está en desequilibrio de ligamiento con el SNP -23HphI. Así, el alelo T se hereda junto con el alelo de clase I del VNTR (susceptibilidad); y el alelo A con el alelo de clase III del VNTR (protección).

Nuestro objetivo fue estudiar más en profundidad el perfil genético para inmunidad en pacientes con DH, DMT1 y DMT2, a los efectos de ver si los alelos de susceptibilidad del SNP se distribuyen de la misma manera que lo hacen los de HLA. La genotipificación del SNP se realizó mediante la técnica de PCR-RFLPs utilizando la enzima BsmA1.

Las frecuencias alélicas y genotípicas para una muestra de 202 pacientes fueron: en pacientes con DMT1: frecuencia del alelo A 0,86 y alelo T 0,14, con frecuencias genotípicas de 0,78 para el genotipo A/A, 0,16 para el A/T y 0,06 para el T/T. Para pacientes con DMT2 las frecuencias alélicas son 0,68 (alelo A) y 0,32 (alelo T), mientras que las frecuencias genotípicas son 0,49 (A/A), 0,38 (A/T) y 0,13 (T/T). Finalmente para los pacientes con DH la frecuencia del alelo A es de 0,71 y la del alelo T 0,29. Mientras que las genotípicas son 0,59 (A/A), 0,23 (A/T) y 0,18 (T/T). Como conclusión primaria destacamos que pese a haber diferencias significativas en las frecuencias alélicas solo para la población con DMT1, el locus está en equilibrio de Hardy-Weinberg solo para las poblaciones con DMT1 y DMT2, mientras que para la población de pacientes con DH no lo está. Esto podría ser una señal sobre la existencia de una nueva población en proceso de evolución.

Como perspectiva agregamos el verificar el desequilibrio de ligamiento entre el VNTR y el -23HphI, debido a que este rasgo no ha sido confirmado para esta población, sabiendo que la población de Montevideo es una población interesante por ser de origen trihíbrido.

Introducción

La Diabetes Mellitus:

La Diabetes Mellitus (DM), por ser una patogenia tan común como compleja, es en la actualidad uno de los problemas más importantes sobre la salud mundial. Es una enfermedad multifactorial, en la cual interactúan tanto factores genéticos como factores ambientales, que dificultan de sobremanera su clasificación así como la búsqueda de métodos de prevención (Pozzilli et al. 2001; Pozzilli et al. 2011). En una gran proporción los problemas existentes en cuanto a la clasificación, consisten en que un importante porcentaje de pacientes, no se ajustan completamente a ninguno de los grupos establecidos, y por lo tanto a la hora de diseñar su tratamiento, este no se realiza de manera precisa y la respuesta del paciente es deficiente (Pozzilli et al. 2007; Mimbacas et al. 2009).

En la actualidad el criterio de clasificación de la American Diabetes Association (ADA), subdivide a la DM en 4 tipos distintos: -Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1); -Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2); -Diabetes Mellitus Gestacional (DMG); -Otros tipos de Diabetes Mellitus (Anonymous,2003).

La DMT1 se caracteriza por la generación de respuesta inmune frente a las proteínas de las células β del páncreas y por lo tanto su destrucción, lo que origina insulinodeficiencia. Tiene como origen además de diversos factores ambientales aun no identificados (Tisch et al. 1996), una importante base genética, cuyo principal exponente es el complejo HLA en el cromosoma 6(p21). Este complejo es el responsable del 50% de la base genética de la enfermedad (Noble et al. 1996) y los alelos de susceptibilidad dentro de este complejo son los alelos DQB1*0,201; *0,302; *0,604 y los alelos DR3 y DR4.

Mientras que la DMT2 por otro lado, es la forma predominante de la enfermedad (90% de los diabéticos) y se caracteriza fundamentalmente por la resistencia a la insulina (RI). La RI se puede presentar de diversas formas involucrando diferentes procesos, muchos de los cuales no se conocen. Al igual que la DMT1, la DMT2 es una patogenia multifactorial, donde también participan factores ambientales, pero el componente genético es muy importante y a diferencia de la DMT1 no se ha encontrado al día de hoy un loci

con un efecto suficiente para realizar un aporte importante en el manejo clínico de la enfermedad. Más bien es todo lo contrario, día a día se encuentran más variantes que aportan a la enfermedad, pero todas con un efecto pequeño (McCarthy 2010).

Antecedentes:

En el año 2009 (Mimbacas et al. 2009), se realizó un análisis de correlación entre genotipo y fenotipo para la población diabética en el Uruguay. El objetivo de dicho trabajo fue analizar el perfil genético de la población diabética del Uruguay para ver si este podía facilitar de alguna forma a la clasificación de la patogenia.

Para este trabajo se analizó una cohorte dinámica, correspondiente al periodo 2004-2008. Esta cohorte está formada por 304 pacientes (N estadísticamente significativo, teniendo en cuenta el 8% de prevalencia de la enfermedad) diagnosticados como diabéticos según los criterios de la ADA.

Como primera etapa del análisis, se separó a los pacientes en diabéticos tipo 1 y diabéticos tipo 2, siempre siguiendo los criterios de la ADA. Luego que se establecieron los dos grupos, se realizó una sub clasificación, de acuerdo a su genotipo para los alelos HLA.

Una vez obtenidos los resultados de esta clasificación genotípica se encontraron algunas sorpresas (Fig. 1). Por el lado de los pacientes diagnosticados como diabéticos tipo 1, las sorpresas no fueron grandes, ya que apenas se encontraron 14 pacientes de 142 que no estaban asociados a los

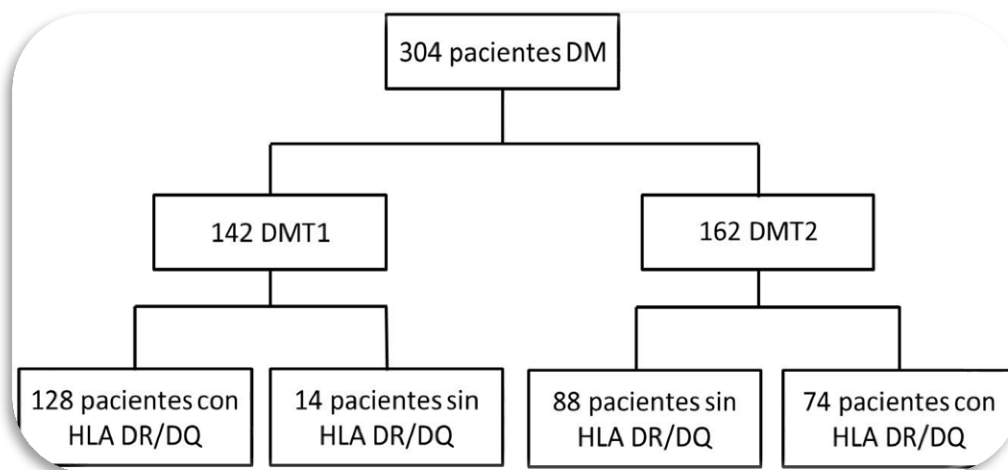


Figura 1 Resultado final de la clasificación de la cohorte. En primer lugar, clínicamente en DMT1 y DMT2, y en segundo lugar genotípicamente según sus alelos HLA.

alelos HLA de susceptibilidad. Esto puede deberse a que dichos pacientes estén asociados a otros genes de susceptibilidad para DMT1 de menor incidencia. La sorpresa mayor se encontró en los pacientes clasificados como diabéticos tipo 2, donde el 46% de los pacientes presentaban un perfil genético asociado a enfermedad autoinmune (DMT1). Este porcentaje es mucho mayor al 10-15% esperado. Todos estos pacientes también presentaban anticuerpos anti-células β pancreáticas.

A partir de aquí, se decidió centrar nuestra atención en estos pacientes “raros”, que aparte de tener tanto características de diabéticos tipo 1 como de tipo 2, son pacientes que tienen una respuesta peculiar a los tratamientos, en muchos casos deficiente.

La Diabetes Híbrida:

Luego de los análisis realizados en nuestro laboratorio, y para la mejor identificación y diferenciación de los pacientes, comenzamos a hablar de un tipo distinto de diabetes considerado intermedio con respecto a los otros dos tipos más conocidos, la Diabetes Híbrida (DH).

Las características de los pacientes con este tipo de diabetes, son las mencionadas anteriormente, es decir: un diagnóstico clínico de DMT2 según la Asociación Americana de Diabetes (ADA), un fenotipo que no refleja la presencia de enfermedad autoinmune, pero un genotipo que si nos muestra la presencia del alelo HLA DQB1*-DR y presencia de anticuerpos anti células β pancreáticas. Cabe destacar que todos nuestros pacientes tienen, además un índice de masa corporal (BMI) $>25\text{Kg/m}^2$.

Minisatélite del gen de la insulina (INS-VNTR):

Para avanzar un paso más en cuanto al perfil autoinmune enmascarado de estos pacientes particulares, analizamos el VNTR (minisatélite) en el gen de la insulina. Como dijimos anteriormente la DMT1 está asociada a los genes de susceptibilidad en la región HLA en el cromosoma 6p21 y aporta el 50% del riesgo genético para desarrollar la enfermedad en la población caucásica (Noble et al. 1996). Igualmente se han identificado genes candidatos fuera de

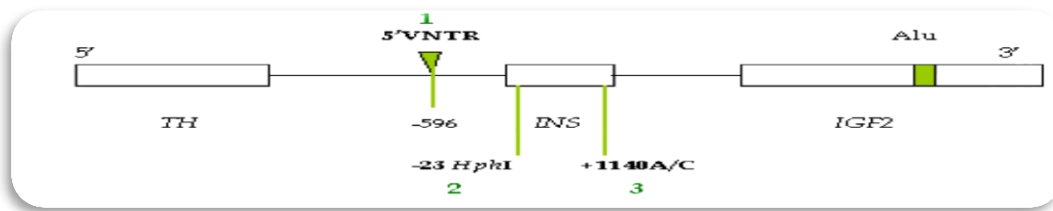


Figura 2 Representación de la región TH-INS-IGF2 en el cromosoma 11p15.5 con los tres polimorfismos asociados a susceptibilidad a DMT1 (tomado de la Tesis de Maestría de C. Gascue, 2007)

la región HLA, por ejemplo el gen de la insulina en el locus 11(p15), que confiere aproximadamente el 10% de la susceptibilidad genética a la DMT1 (Bell et al. 1984). Aparte de éste, se han encontrado por lo menos otros 10 loci que aportan susceptibilidad para la enfermedad y que están bajo investigación (Davies et al. 1994; Cox et al. 2001; Steck et al. 2005).

Este minisatélite (INS-VNTR), como dijimos anteriormente está ubicado en la región del gen de la insulina en el cromosoma 11p15.5, entre el gen de la tirosina hidroxilasa (TH) y el factor de crecimiento de tipo insulina tipo 2 (IGF-2) (Fig. 2).

El VNTR es el segundo loci de susceptibilidad para autoinmunidad (Bennett et al. 1996). Modelos matemáticos estiman que sumando el aporte del HLA y el aporte del VNTR se obtiene hasta el 60% del componente genético total para desarrollar DMT1, dependiendo de la población estudiada (Bennett et al. 1996). Este minisatélite está compuesto por la repetición en tándem de una secuencia de 14-15pb, cuya secuencia consenso (repetido más común) es ACAGGGGTGTGGGG. Igualmente, estudios de secuenciación han identificado hasta ahora 13 variantes, las cuales fueron nombradas con letras de la "a" a la "m" (Bell et al. 1982); aunque actualmente dicha nomenclatura fue cambiada a

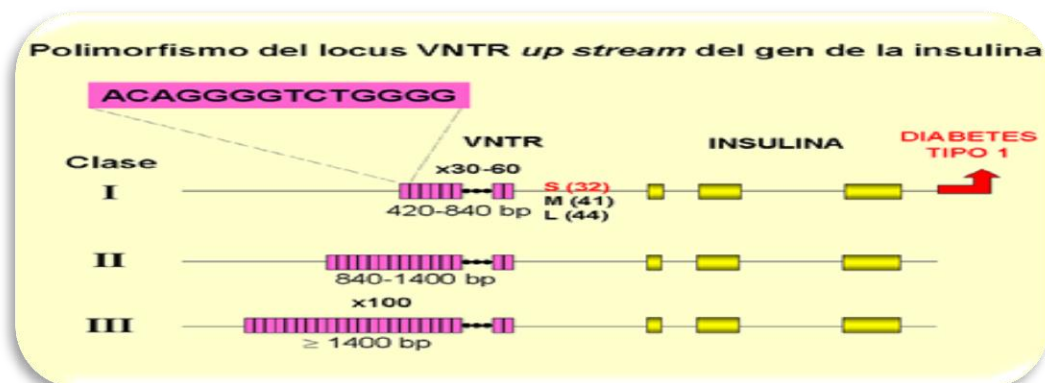


Figura 2 Representación del polimorfismo en el VNTR del gen de la insulina. Cada clase de alelos con su respectiva cantidad de repetidos. <http://www.montpellier.com.ar/vntr.asp> 28/08/2011

letras mayúsculas de la A a la M, ya que algunas de las categorías definidas anteriormente fueron sustituidas por otras gracias al análisis de los mecanismos por los cuales surgieron algunas de las variantes alélicas (Stead et al. 2000).

El VNTR de acuerdo a su cantidad de repetidos tiene 3 clases de alelos (Fig. 3): los alelos de clase I o cortos que van de 30 a 60 repetidos (420 a 840 pb), los alelos clase III o largos, que van de 140 a 210 repetidos (1960 a 2940 pb), y finalmente los alelos clase II o intermedios, de alrededor de 80 repetidos (1120 pb) (Bell et al. 1982; Bennett et al. 1996).

En poblaciones caucásicas se ha demostrado que la distribución de los alelos se da de forma bimodal, con una frecuencia del alelo I de 80% y una frecuencia del alelo III de 20%. Los alelos intermedios son una clase muy poco frecuente en las poblaciones caucásicas, siendo su frecuencia casi nula (Bell et al. 1982).

A su vez dentro de cada clase de alelos se han determinado algunas diferencias. Si asumimos que cada alelo puede diferir en un solo repetido, entonces tenemos que hay 30 y 70 alelos potenciales dentro de las clases I y III respectivamente (Bell et al. 1982). Los alelos de clase III se han diferenciado en dos clases: los alelos PH (protective haplotype) y los VPH (very protective haplotype) (Bennett et al. 1995). Esta clasificación fue realizada luego de estudios que diferencian estas 2 clases en distintos niveles de protección asociados a la DMT1 teniendo en cuenta otros polimorfismos asociados.

A diferencia de los alelos de clase III, los alelos de clase I pueden ser más fácilmente estudiados por PCR. En un principio, se diferenciaron 21 alelos de clase I teniendo en cuenta su tamaño (Le Fur et al. 2006). Pero distintas publicaciones han llegado a la conclusión de que aquí también se pueden distinguir distintos grupos, 3 en particular: los alelos Is (small), que tienen 31 repetidos; los alelos Im (medium), que tienen 40 repetidos; y los alelos Il (large), que tienen 42 repetidos (Bennett et al. 1995; McGinnis et al. 1995).

INS-VNTR y el SNP -23HphI:

En poblaciones caucásicas se ha comprobado el desequilibrio de ligamiento entre el VNTR y el SNP -23HphI (Bennett et al. 1996). Este SNP se encuentra 23 pb por delante del sitio de inicio del gen de la insulina y posee dos variantes alélicas, la A y la T.

El desequilibrio de ligamiento entre ambos loci está definido de la siguiente forma: los alelos clase I del VNTR, son los asociados a autoinmunidad y se heredan ligados a los alelos A del SNP. Por otro lado los alelos clase III del VNTR, son los asociados a protección frente a autoinmunidad y se heredan ligado a los alelos T del SNP (Figura 4). Solamente el 0,23% de los haplotipos rompen el desequilibrio y corresponden al alelo T del SNP y el alelo de clase I del VNTR (Bennett et al. 1996). Precisamente por esto es que en la gran mayoría de los estudios se utiliza, para estudiar el VNTR, el -23 HphI como marcador asociado.

Mecanismos de acción del INS-VNTR en la DMT1:

Desde el punto de vista de su estructura, el VNTR tiene como función principal favorecer la expresión de *INS*. Esto se da debido a la existencia, dentro del VNTR, de sitios de unión de alta afinidad para el factor de transcripción Pur-1, que tiene la capacidad de favorecer la traducción de *INS* en células que normalmente no lo hacen (Kennedy et al. 1995). Por otro lado, la traducción de *INS* también se ve favorecida debido a que la proteína MAZ, sinónima de Pur-1 y asociada a la terminación de la transcripción, cumple una función de protección contra la interferencia de transcripción en genes muy cercanos como el *INS* y el *TH* (ver figura 2) (Ashfield et al. 1994). Por lo tanto, podemos decir que la eficiencia en la terminación de la transcripción de *TH* debido a la

VNTR	-23HphI	Efecto
Clase I	A	Susceptibilidad
Clase III	T	Protección

Figura 4 Cuadro representativo del desequilibrio de ligamiento entre el INS-VNTR y el -23HphI. Se representa tanto la asociación generada por el desequilibrio como el efecto de cada haplotipo frente a la autoinmunidad.

proteína MAZ, podría resultar en una regulación positiva de la expresión de INS.

Estudios poblacionales muestran que los alelos clase III del VNTR tienen un efecto protector dominante y están asociados con una reducción de entre el 60% y 70% en el riesgo de desarrollar DMT1 (Bennett et al. 1995; Bennett et al. 1996; Bennett et al. 1996).

Al analizar el mecanismo de acción del VNTR frente a la autoinmunidad, es mucho más consistente con la realidad hablar del mecanismo de acción en términos de ausencia de protección en lugar de ganancia de susceptibilidad (Bennett et al. 1996). Incluso en presencia de auto-anticuerpos y de genotipos HLA de alto riesgo, los individuos portadores de alelos clase III del VNTR pueden ver seriamente disminuidas sus chances de desarrollar la enfermedad (Pugliese et al. 1995).

Diversos trabajos han demostrado que contrariamente a lo que se esperaría de antemano, tanto en adultos como en fetos, los alelos clase III del VNTR están asociados con un menor nivel de mensajero de INS en el páncreas (Bennett et al. 1995; Lucassen et al. 1995; Bennett et al. 1996; Vafiadis et al. 1996). Si bien algunos autores se apoyaron en estos resultados para buscar una asociación entre esta deficiencia en la secreción de insulina en el páncreas (dada por el alelo de clase III) y una posible susceptibilidad a la Diabetes Tipo 2 (Hitman et al. 1984; Ong et al. 1999; Huxtable et al. 2000; Meigs et al. 2005); otros autores, por el contrario, descartaron dicha asociación ya que la diferencia en la cantidad de mensajero asociada a cada alelo no era significativa (Kennedy et al. 1995; Hansen et al. 2004).

Ahora bien, aun siendo significativa, la diferencia es pequeña, y no permite explicar con certeza el efecto dominante y protector del alelo clase III para con la Diabetes Tipo 1. Esto se da, precisamente, porque el páncreas no es el sitio de acción primario de la susceptibilidad a Diabetes Tipo 1 dada por el VNTR.

La expresión de INS en el timo, tanto en el feto como hasta los 13 años, ya fue demostrada hace tiempo (Bennett et al. 1996). A diferencia de cómo lo hace en el páncreas, el efecto del VNTR en el timo se cree que es el opuesto. Es decir, el alelo clase III estaría elevando la cantidad de mensajero INS, generando así

un aumento en la tolerancia del cuerpo a la insulina y explicando de esta manera el efecto dominante y protector de dicho alelo (Bennett et al. 1996). Resultados de distintos estudios han apoyado esto y se ha demostrado que sujetos con el alelo III del VNTR tienen una menor frecuencia de anticuerpos anti-insulina y tienen de 3 a 4 veces mayor protección contra la Diabetes Tipo 1 (Chentoufi et al. 2002; Walter et al. 2003; Durinovic-Bello et al. 2010).

También se ha tomado como un posible mecanismo de acción el efecto del VNTR en la expresión de otros genes (además del INS) de la región, como ser el IGF2. El IGF2 (Insulin-like growth factor 2) está a una distancia del VNTR que es compatible con posibles funciones de control transcripcional. Además, se han encontrado efectos del VNTR en la transcripción del IGF2 en placenta humana (Vafiadis et al. 1998), indicando que podría haber un efecto similar en otros tejidos.

Por otro lado, hay ciertos aspectos funcionales del IGF2 que también nos permiten pensar en efectos asociados al VNTR. Por ejemplo, en la mayoría de los tejidos, IGF2 se expresa únicamente desde la copia heredada del padre mientras que la copia heredada de la madre está silenciada, por lo que solo los alelos paternos del VNTR podrían actuar en la expresión del IGF2. Esto explicaría el efecto de origen parental que se ha visto en algunas poblaciones en la transmisión de los alelos VNTR (Bennett et al. 1995; Bennett et al. 1996; Vafiadis et al. 1998).

En cuanto al rol biológico del IGF2 y la DMT1, el péptido IGF2 tiene funciones importantes en cuanto a la señalización, tanto autocrina como paracrina. La regulación de los niveles de IGF2 podrían, de esta forma modular aspectos del proceso que desencadena la DMT1. En el páncreas, los alelos asociados con una mayor producción de IGF2 deberían potenciar la señalización paracrina de los linfocitos T y por lo tanto promover la destrucción de las células β (Vafiadis et al. 1998).

Pese a todo esto, el rol del IGF2 en la susceptibilidad para DMT1 y en su interacción con el VNTR no está del todo claro y hay más de una opinión al respecto. Mientras algunos autores defienden dicha asociación (Vafiadis et al. 1998), otros han encontrado datos que la refutan (Paquette et al. 1998).

Finalmente, algunos autores han buscado una posible función propia al SNP - 23 HphI, la cual sería independiente del VNTR (Hansen et al. 2004; Kralovicova et al. 2006). Esta estaría conectada con una posible alteración en el splicing del pre-ARN de la insulina, según esté un alelo o el otro. Esta idea se apoya fundamentalmente en la posición del SNP, ya que el mismo está ubicado en una zona poli-pirimidínica, de gran importancia para el splicing del mensajero. Si bien, también parece razonable esta teoría, hay muy pocos autores que se adhieren a la misma (Kralovicova et al. 2006).

Hipótesis

H0) Dado las características genéticas de la población con DH, la distribución de las frecuencias de los alelos y genotipos del SNP -23HphI, será diferente a la distribución que se da en otras poblaciones. Permitiendo así la diferenciación de la subpoblación de pacientes con DH como tal.

H1) La distribución de las frecuencias del SNP en la población con DH, no será significativamente distinta a la distribución en las otras poblaciones, no permitiendo su diferenciación.

Objetivos

Objetivo general:

Estudiar en mayor profundidad el perfil genético para autoinmunidad, a un segundo nivel, más allá del HLA, en pacientes con DH, DMT1 y DMT2, a los efectos de ver si los alelos de susceptibilidad del SNP se distribuyen de la misma forma que lo hacen los alelos de HLA y así apoyar la diferenciación de esta nueva subpoblación.

Objetivos específicos:

- 1- Amplificar el fragmento del gen de la insulina donde se encuentra el SNP -23HphI.
- 2- Análisis poblacional de las frecuencias del SNP.
- 3- Comparación de los resultados con los obtenidos previamente para el HLA.

Materiales y Métodos

Para la realización de este estudio, se utilizó una muestra (N=215) de la cohorte dinámica de pacientes diabéticos ya existente. Todos los pacientes cumplían en su totalidad los criterios diagnósticos para diabetes de la American Diabetes Association (Anonymous, 2003). Todos los ADN utilizados fueron obtenidos de personas que participaron de este estudio brindando su consentimiento firmado de acuerdo al protocolo aprobado por el Ministerio de Salud Pública (Ref. 1081/96) y a los comité de ética de las respectivas instituciones participantes. Dicha muestra fue subdividida en 3 grupos en base al marcador genético HLA DQ/DR (Mimbacas et al. 2009).

- A) Pacientes con DMT1 (n= 49),
- B) Pacientes con DMT2 con HLA negativo (n=92),
- C) Pacientes con DMT2 con HLA positivo (n=74) (para una mejor comprensión llamaremos a estos pacientes con Diabetes Híbrida -DH-).

La extracción de ADN y el análisis posterior de dichas muestras se realizó tanto para los pacientes con DMT2 como para los pacientes con DH. Para los pacientes con DMT1 las muestras ya estaban analizadas con anterioridad en el laboratorio del Centre National de Genotypage (CNG), Evry, Francia; y dichos resultados se compararon con los obtenidos para los pacientes con DMT2 y DH una vez obtenidos los mismos.

Para el análisis de dichos pacientes se procedió de la siguiente forma:

- 1) Se realizó la extracción de ADN de cada uno de los pacientes.

La extracción del ADN genómico de los pacientes se realizó por el método de fenol-cloroformo, cuyo protocolo se adjunta en el Anexo 1. A partir del ADN extraído, se realizaron alícuotas de trabajo de 50 y 100 ng/μl utilizando el Nanodrop™ 2000.

- 2) Finalmente se realizó el estudio de prevalencia del SNP -23HphI mediante la técnica de PCR-RFLP.

Para realizar la reacción de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), en primer lugar se diseñaron los cebadores que flanquean la región de interés utilizando el programa Primer3Plus. Los cebadores que se diseñaron fueron los

siguientes: Forward- 5'AGCAGGTCTGTTCCAAGG 3' y Reverse- 5'CTTGGGTGTGTAGAAGAAGC 3'.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Biometra. Los detalles de la técnica se describen en el Anexo 2. En el Anexo 3 a su vez, se detallan tanto las concentraciones iniciales de cada uno de los productos como las concentraciones finales, luego de formado el Mix.

Para visualizar los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio a una concentración de 5mg/ml, los cuales se corrieron en una cuba horizontal utilizando buffer TBE 1X. Se tomaron fotografías digitales de los geles con una cámara Digital Kodak DC 290 EDAS utilizando el programa Kodak 1D V3.5.4.

La identificación de los genotipos se realizó mediante la digestión enzimática de los fragmentos de ADN utilizando la enzima de restricción BsmAI (Fermentas, para la reacción se siguió el protocolo correspondiente y adjunto a la enzima que se detalla en el Anexo 3). El sitio de restricción de dicha enzima es la secuencia GTCTC, lo que origina en nuestra secuencia de interés, que en los individuos que posean el alelo T del SNP -23HphI, la enzima de restricción corte casi a la mitad la secuencia, originando 2 fragmentos de 181 y 179pb. Mientras que para los individuos que poseen el alelo A, la enzima no reconoce su sitio de restricción en toda la secuencia y por lo tanto no actúa, dejando el fragmento intacto de 360pb. La visualización de los productos de digestión se realizó en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio (5mg/ml) corridos en la misma cuba que los geles de PCR. También se tomó registro fotográfico de todos los geles con el mismo equipamiento que se menciona anteriormente.

Cabe destacar que para realizar el estudio de prevalencia del SNP, también se utilizó la técnica de PCR-RT con la cual no se obtuvieron resultados satisfactorios por lo cual se culminó el estudio mediante la técnica anterior. Para realizar esta técnica se utilizó un protocolo similar al que se utilizó en la PCR a tiempo final con el agregado del fluoróforo (Cyto9 en nuestro caso) y a partir de allí se hicieron las modificaciones que se creyeron pertinentes. Pese a esto, no se logró poner a punto la técnica.

3) Análisis estadísticos de los datos.

En el estudio se calcularon tanto las frecuencias génicas como las genotípicas. También se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para el loci correspondiente al SNP en cada una de las poblaciones, el cual fue verificado a través del test de Chi Cuadrado. Se tomó como nivel de significancia estadística un p valor menor a 0,05.

Para el análisis de los datos se utilizaron el paquete estadístico EpiInfo 3.5.2 y para la realización de graficas en el tratamiento de los datos se utilizó el Excel 2007.

4) Análisis de secuenciación del ADN.

Para confirmar que el fragmento amplificado era el correcto se mandó a amplificar una muestra tomada al azar.

Resultados

Para la realización de este estudio, se utilizó una muestra de 215 pacientes. De los cuales 49 son diabéticos de tipo 1, 92 son diabéticos de tipo 2 y 74 entrarían en la nueva categoría de diabéticos híbridos.

El análisis de genotipo se realizó únicamente para los pacientes híbridos y tipo 2, y luego se compararon los resultados con los ya obtenidos para los pacientes de tipo 1.

En la tabla 1 se detallan las características clínicas de las 3 subpoblaciones en cuestión.

DMT1		DMT2	
Variabes	X ± DS	Variabes	X ± DS
Edad	34,49 ± 11,01	Edad	65,80 ± 6,57
Edad de Diag.	16,03 ± 4,08	Edad de Diag.	48,83 ± 7,49
BMI	21,84 ± 1,75	BMI	31,12 ± 4,04
HbA1c	10,34 ± 2,13	HbA1c	8,12 ± 1,35
Colesterol	189,15 ± 45,49	Colesterol	214,72 ± 34,58
HDL	63,8 ± 15,00	HDL	50,31 ± 8,73
LDL	108,89 ± 35,14	LDL	135,89 ± 42,41
Trigliceridos	96,06 ± 39,77	Trigliceridos	191,28 ± 78,57

DH	
Variabes	X ± DS
Edad	63,54 ± 8,71
Edad de Diag.	46,20 ± 10,53
BMI	32,05 ± 3,73
HbA1c	8,34 ± 1,48
Colesterol	203,66 ± 33,40
HDL	48,07 ± 9,86
LDL	114,00 ± 29,54
Trigliceridos	183,72 ± 79,15

Tabla 1 Características clínicas de cada grupo analizado. Se detalla tanto la media (X) como el desvío estándar (DS).

Luego de extraído el ADN de la sangre de los pacientes mediante el protocolo adjunto en el Anexo 1 y de controlar su cantidad y calidad (pureza), se procedió a la amplificación por PCR del fragmento de interés, que contiene el SNP - 23HphI.

Con los primers diseñados para este propósito y en base a una simulación hecha previamente, esperamos que en la reacción de PCR se amplifique un fragmento de 360 pares de bases. En la figura 5a y 5b se muestra el resultado obtenido luego de la corrida electroforética en un gel de agarosa 1x el producto de PCR. En ambas fotografías está indicada con una flecha roja la banda de 360 pb correspondiente a lo esperado. En la figura 5b se observa que en dos de los carriles del gel (señalados con un círculo en la foto) no hubo amplificación en la reacción de PCR (se discutirá más adelante). Estas muestras luego fueron realizadas nuevamente y si se obtuvo producto de amplificación. En ambas figuras se puede observar además el control negativo (señalado con una flecha verde) que se realizó en cada una de las reacciones de PCR sin molde de ADN.

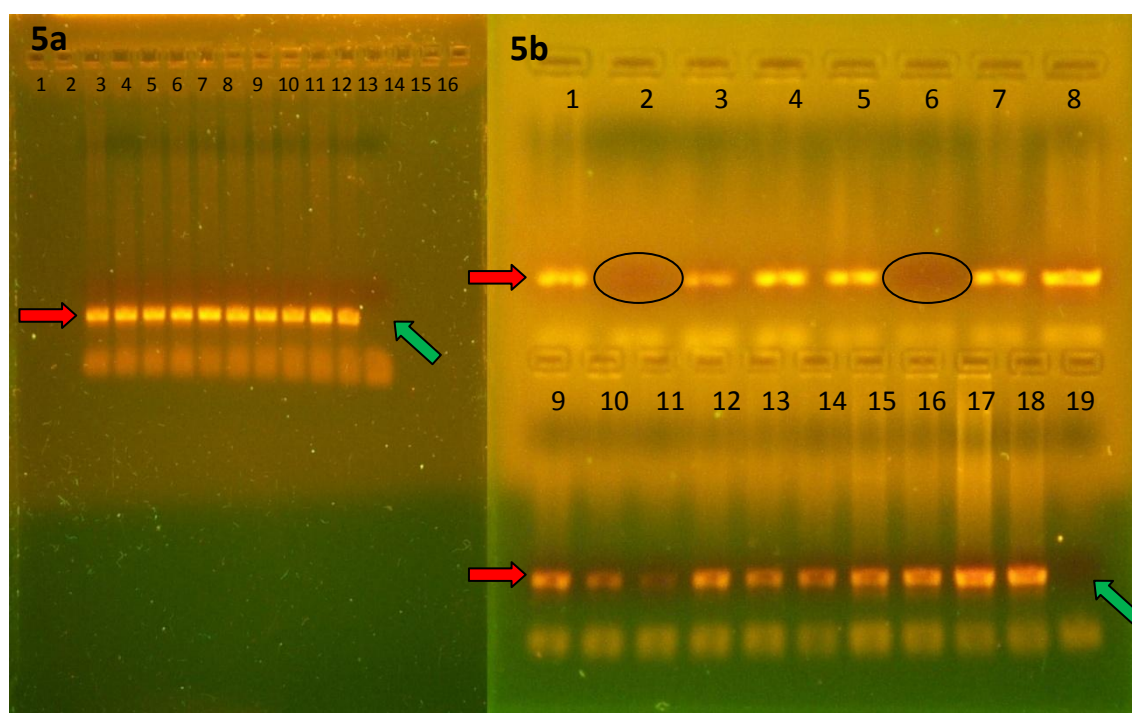


Figura 5 Resultados de la corrida electroforética de los productos de PCR. Fig.4a: Carriles 1, 2, 14, 15 y 16 Vacíos. Carriles 3 al 12 fragmento de 360pb correspondiente al producto de PCR (marcado por la flecha roja). Carril 13 control negativo (flecha verde). Fig.4b: Carriles 2 y 6 reacciones de PCR sin obtener resultados (señaladas con círculo). Carriles 1, 3 al 5, 7 al 18 fragmento de 360pb, reacción de PCR efectiva (flecha roja). Carril 19 control negativo (flecha verde)

Luego de obtenido el fragmento de interés amplificado por PCR, se procedió a realizar la digestión del mismo con la enzima de restricción BsmAI. La enzima corta en presencia del alelo T del SNP, mientras que cuando está el alelo A, la enzima no corta, por lo tanto el patrón de bandeo que se puede generar por el corte con la enzima es el siguiente: En presencia de un individuo homocigota AA, se observa una sola banda de 360pb (igual que en el producto de PCR). En los individuos heterocigotas AT, se observa un patrón de 2 bandas, una correspondiente al alelo A (360pb), en el cual la enzima no corta, y otra correspondiente al alelo T, en el cual la enzima corta aproximadamente por la mitad el fragmento, generando 2 fragmentos más pequeños de la mitad del largo (uno de 181pb y otro de 179pb). Finalmente, en los individuos TT, el patrón de bandeo es únicamente de una banda correspondiente al alelo T (180pb). En la figura 6 se observan 2 geles correspondientes a digestiones hechas con la enzima BsmAI. Allí se observan patrones correspondientes tanto a individuos AA, TT como AT.

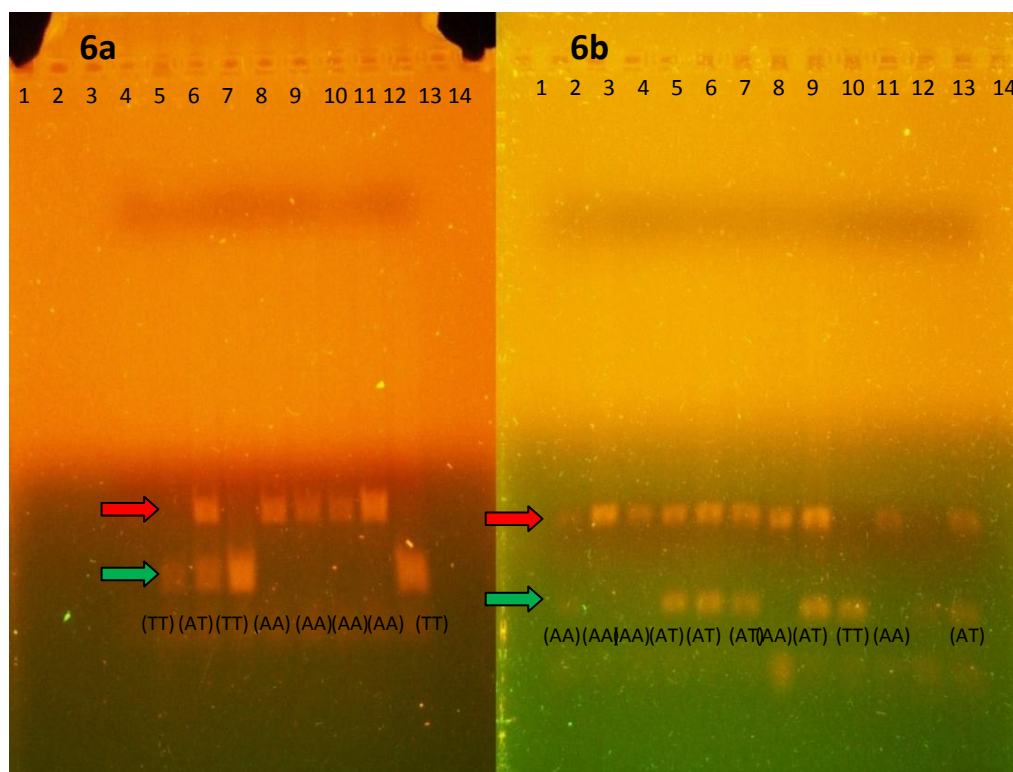


Figura 6 Resultados de la corrida electroforética de los productos de digestión con la enzima BsmAI. Fig.5a: Carriles 1 al 4, 13 y 14 Vacíos. Carriles 5,7 y 12 genotipo TT (una banda correspondiente a los dos fragmentos de 180pb -flecha verde-). Carril 6 genotipo AT (dos bandas, una correspondiente al fragmento de 360pb -flecha roja- y otra al de 180pb). Carriles 8 al 11 genotipo AA (una banda correspondiente al fragmento de 360pb). Fig.4b: Carriles 1 y 14 vacíos. Carriles 2 al 4, 8 y 11 genotipo AA. Carriles 5 al 7, 9 y 13 genotipo AT. Carril 10 genotipo TT. Carril 12 sin resultados.

En total, luego de analizar a toda la población de estudio los resultados finales fueron los siguientes: Para la población con DMT2, de un total de 92 individuos se encontraron 45 con el genotipo AA, 35 con el genotipo AT, y 12 TT; mientras que para la población con DH, de un total de 74 individuos se encontraron 44 con el genotipo AA, 17 con el genotipo AT y 13 TT. En la tabla 2 se muestran los resultados finales de la genotipificación, con las respectivas frecuencias genotípicas y alélicas. Cabe destacar los resultados que ya se habían obtenido para la población con DMT1, de un total de 49 individuos se encontraron 38 con el genotipo AA, 8 con el genotipo AT y 3 con el TT.

En la figura 7 se ve una representación gráfica de estos resultados, allí se muestra la comparación entre las tres subpoblaciones, tanto de las frecuencias alélicas como de las genotípicas.

Finalmente, y luego de haber obtenido las frecuencias alélicas y genotípicas se procedió a analizar si las mismas correspondían con las esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg y se observó que tanto en la población con DMT1 como en la población con DMT2, el locus efectivamente está en equilibrio H-W, mientras que en la población con DH, el locus no se encuentra en equilibrio ($p < 0,001$). Estos resultados también se muestran en la tabla 2.

	Pob. DMT1	Pob. DH	Pob. DMT2
Alelo A	0,86	0,71	0,68
Alelo T	0,14	0,29	0,32

	Pob. DMT1	Pob. DH	Pob. DMT2
Genot. AA	0,78	0,59	0,49
Genot. AT	0,16	0,23	0,38
Genot. TT	0,06	0,18	0,13

	Eq. H-W ($p < 0,001$)
Pob. DMT1	SI
Pob. DH	NO
Pob. DMT2	SI

Tabla 2 Frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP -23 HphI de las poblaciones en estudio. En las tablas superiores se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas para las distintas poblaciones. La columna en gris muestra la misma información para la población con DMT1 (dicha información no fue recabada en este trabajo sino que ya se contaba con la misma). En la tabla inferior se muestra si dichas frecuencias se corresponden a las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

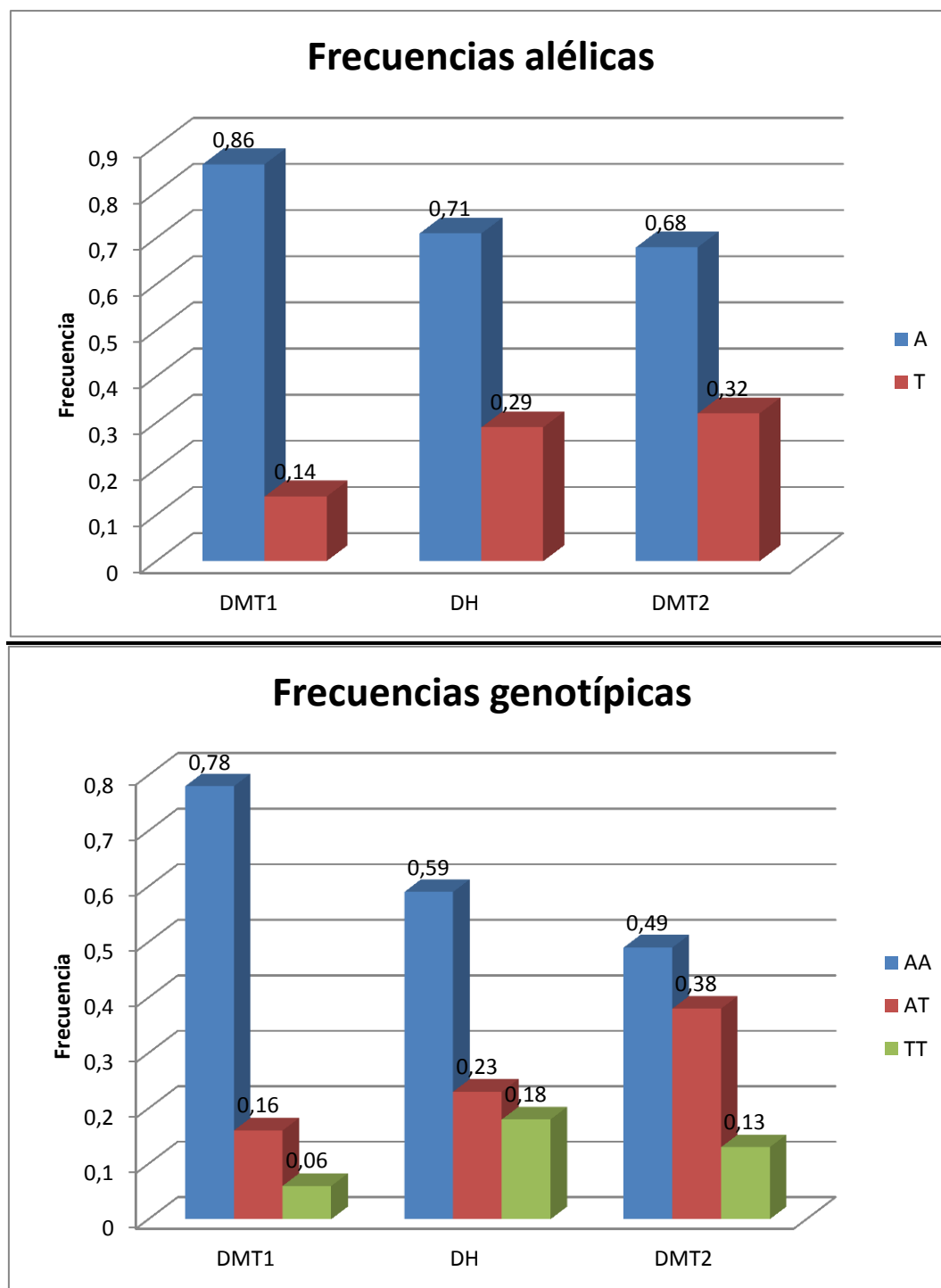


Figura 7 [Análisis de resultados de la genotipificación para el SNP -23HphI de las poblaciones con DMT1, DH y DMT2.](#)

Para corroborar que las secuencias amplificadas eran las correctas se envió una muestra seleccionada al azar, a secuenciar al laboratorio de Macrogen en Corea. Como muestra la figura 8b, la secuencia efectivamente es la correcta, se alinea perfectamente con la secuencia descargada del GenBank, salvo en una base, la correspondiente al SNP. La secuencia descargada del GenBank corresponde a un alelo A, mientras la secuencia amplificada corresponde a un alelo T.



Figura 8 Resultados de la secuenciación y alineación de la secuencia enviada a Corea. Fig. 5a: Cromatograma de secuencia obtenido de la secuenciación automática de la muestra en Macrogen, Corea. Fig. 5b: Alineamiento de la secuencia obtenida en Corea con la secuencia de referencia descargada del GenBank. Se marca con un círculo el sitio del SNP.

Discusión

La Diabetes Mellitus, es en la actualidad uno de los problemas más importantes sobre la salud mundial ya que se está viviendo una explosión demográfica de la misma, con un aumento muy significativo de su incidencia.

Por ser una enfermedad multifactorial, en la que interactúan tanto factores genéticos como factores ambientales, se dificulta sobremanera la clasificación de los pacientes así como la búsqueda de métodos de prevención. Gran parte de los problemas existentes en cuanto a la clasificación se deben a pacientes que no se ajustan a ninguno de los criterios de clasificación establecidos por la ADA y la ALAD (Asociación Latinoamericana de Diabetes). Como consecuencia de esto, no reciben un tratamiento que se adecue completamente a sus necesidades y su respuesta al mismo es por lo tanto deficiente.

Como contrapartida, en la actualidad hay varios estudios que dan pruebas contundentes de la existencia de un nuevo tipo de DM (Libman et al. 2003; Pozzilli et al. 2007; Mimbacas et al. 2009). Estos pacientes estarían caracterizados por un fenotipo clínico de DMT2, pero un perfil genético de susceptibilidad para enfermedad autoinmune (característico de la DMT1). Esto provoca que debido a su fenotipo clínico de tipo 2, los pacientes sean clasificados y medicados como DMT2, cuando en realidad no lo son y por lo tanto no responden (o lo hacen de forma deficiente) al tratamiento que se les da.

Con la finalidad de estudiar más en profundidad esta población “diferente” y caracterizarla de mejor manera, se profundizo el análisis sobre el perfil genético de otro marcador asociado a autoinmunidad en estos pacientes. Esto se hizo a través de un estudio de prevalencia del SNP -23HphI, que está en desequilibrio de ligamiento con el segundo loci de susceptibilidad para autoinmunidad, el VNTR del gen de la insulina. Este análisis de prevalencia se realizó para las poblaciones con DMT2 y con DH, y los resultados se anexaron a los obtenidos previamente para la población con DMT1.

Los resultados del estudio de prevalencia para el SNP -23HphI nos muestra que, como es de esperarse, en los pacientes con DMT1, se encuentra con una

frecuencia mucho mayor el alelo A, 0,86 contra 0,14 del alelo T (recordar que el alelo A es el asociado a la presencia de autoinmunidad, característico de la DMT1). Mientras que en los pacientes con DT2 vemos que también hay una mayor presencia del alelo A de susceptibilidad, 0,68 contra 0,32 del alelo T. Esto también es esperado ya que, como se dijo anteriormente, esta descrito para este SNP una incidencia mucho mayor del alelo A que del alelo T. Pese a esto, se ve que la frecuencia es bastante menor a la que se ve en los pacientes con DMT1. Ahora bien, si analizamos las frecuencias de la población con DH, 0,71 del alelo A contra 0,29 del alelo T, vemos que éstas no se alejan mucho de las frecuencias encontradas para los pacientes con DMT2. Pero si pasamos a analizar las frecuencias genotípicas, vemos que pese a que las frecuencias alélicas son muy parecidas, las genotípicas son bastante diferentes. Mientras que para los pacientes con DMT2 hay una frecuencia del genotipo A/A de 0,49, para los pacientes con DH la frecuencia de ese mismo genotipo es de 0,59 (siendo la frecuencia en los pacientes con DMT1 0,78). Este dato no es menor, ya que nos muestra que en el grupo con DH hay un 10% más de pacientes con el genotipo característico que refleja la presencia de enfermedad autoinmune. Por otro lado, al analizar las frecuencias de los genotipos de protección (T/T y A/T), vemos que éstas difieren. Las frecuencias de los heterocigotos fueron las siguientes: 0,16 para los pacientes con DMT1, 0,23 para el grupo con DH y 0,38 para los DMT2. Por otro lado, para los homocigotas T/T, mientras en la población con DMT2 hay una frecuencia de 0,13, la misma en los pacientes con DH es de 0,18. Llama poderosamente la atención, que las frecuencias del genotipo T/T, siendo este el asociado a protección también sean mayores en la población con DH que en la población con DMT2 sabiendo que los pacientes con DMT2 carecen de enfermedad autoinmune. Una probable respuesta a esto puede ser que algunos de los individuos con genotipo T/T incluidos aquí, no se correspondan con homocigotas III/III para el VNTR (verdadero locus de susceptibilidad para autoinmunidad). Esto puede deberse a que en la población uruguaya, se rompa el desequilibrio de ligamiento establecido entre estos loci para otras poblaciones.

Ahora bien, al encontrar estas diferencias en las frecuencias genotípicas, se analizó dichas frecuencias para saber si respetan el equilibrio de Hardy-

Weinberg. Se encontró que tanto en la población con DMT1 como en la población con DMT2, el SNP si esta en equilibrio. Mientras que en la población con DH, el SNP no está en equilibrio. Para confirmar esto último se realizó el test de Chi Cuadrado en la población hibrida y se comprobó de manera significativa (p valor $< 0,001$) que se rompe el equilibrio.

A la hora de analizar en conjunto los resultados, observamos entonces que sólo la muestra de DH no está en equilibrio para este SNP. Si analizamos el por qué, lo primero que surge (se desprende de la definición del equilibrio de Hardy-Weinberg) es que hay una nueva población que está en proceso de evolución de acuerdo con este locus. Es decir, si partimos de la información que nos da este locus, para la población con DH no se cumple alguno de los supuestos del equilibrio y por lo tanto podemos afirmar que dicha población está evolucionando.

Por definición, como se mostró en los antecedentes de este trabajo, vimos que la población hibrida ya está diferenciada por la presencia del alelo HLA de susceptibilidad (se partió de una población diagnosticada como DMT2 y se dividió en dos grupos según la presencia o no de las alelos HLA de susceptibilidad). Por lo tanto vemos como se apoya con mucho más fuerza la idea que esta nueva población se está diferenciando como tal.

Hay que destacar además, que si esta población se acepta como una población separada y diferente a las otras, la única forma de diferenciarla seria genéticamente. Ya que por los datos obtenidos hasta ahora si tuviéramos que definir esta población lo haríamos como: pacientes diagnosticados clínicamente como DMT2 según los criterios ADA y ALAD, pero que presentan un genotipo de susceptibilidad para el desarrollo de autoinmunidad en los dos locus más representativos, HLA e INS-VNTR.

Citando el trabajo de Rotimi (Rotimi et al. 2010), vemos que este estudio es un ejemplo donde para percibir las diferencias entre las poblaciones, éstas deben estar tipificadas genéticamente y donde la categorización fenotípica de las poblaciones no es adecuada para describir los patrones de variación de los individuos que la componen. Esto es muy importante y para tener en cuenta, ya que lamentablemente en la gran mayoría de los países latinoamericanos, la

genética y la medicina clínica no están tan integrados como deberían, provocando muchas veces que los estudios se basen en observaciones clínicas o estudios paraclínicos, dejando de lado las variables que son inherentes a cada paciente.

En conclusión, el análisis de la prevalencia del SNP -23HphI en la población de pacientes diabéticos en la ciudad de Montevideo, Uruguay, nos deja como resultado un principio de diferenciación de los pacientes diabéticos en 3 subpoblaciones: por un lado los pacientes con DMT1, por otro lado los pacientes con DMT2 (estos 2 grupos claramente diferenciados por las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP) y finalmente los denominados pacientes híbridos, cuyas frecuencias si bien no se diferencian mucho de los pacientes con DMT2, las mismas no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (como si lo están las otras 2 poblaciones). Esto puede ser un claro indicio de que esta nueva población (muy reciente en el tiempo) aun no se ha logrado diferenciar completamente, pero está en pleno proceso de evolución.

Perspectivas:

Para finalizar y como perspectivas a futuro, se pretende realizar un análisis más individual y caso a caso de los resultados, de manera de comenzar a integrar más la genética con la medicina clínica. Esto se realizará como forma de buscar si existe una relación entre las frecuencias del SNP (en conjunto con otras variantes génicas que hayan sido analizadas para cada paciente) y la respuesta diferencial a los tratamientos de los pacientes frente a la enfermedad.

También se pretende realizar un estudio más detallado de las características de la población general de Montevideo para estos locus, ya que es una población interesante por ser de origen trihíbrido. Como dijimos anteriormente todos los macroanálisis existentes al día de hoy, corresponden tanto a poblaciones europeas, norteamericanas o asiáticas, pero no latinoamericanas, y esto es muy importante ya que la población latina se caracteriza por una fuerte mezcla de los distintos grupos étnicos. Como parte de esto se pretende

verificar el desequilibrio de ligamiento entre el VNTR y el 23 HphI, ya que éste no ha sido confirmado para esta población.

Agradecimientos

- ◆ A la Dra. Adriana Mimbacas, por aceptarme dentro de su grupo de trabajo, brindarme todo su apoyo y colaborar de manera muy significativa en mi formación tanto dentro del laboratorio como fuera de él.
- ◆ A mis compañeros de trabajo, Mariana Fernandez, Joaquina Farias, Ana Laura Reyes, Jorge Souto y Carolina Beloso, por haber formado un muy buen grupo de trabajo y haber compartido tanto trabajo dentro del laboratorio y tantos lindos momentos fuera de él.
- ◆ A mis amigos, que por distintos motivos a medida que pasa el tiempo cada vez podemos compartir menos tiempo juntos, pero que cada uno de esos momentos hacen que todo lo demás valga la pena.
- ◆ A mis padres, por apoyarme desde siempre en cada uno de los proyectos que seguí durante todos estos años y en los que aún están por venir. Nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo.

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN de sangre periférica a través de la técnica adaptada de fenol-cloroformo.

Día 1

- I. Extracción de 10ml. de sangre periférica con EDTA como anticoagulante.
- II. Lisis celular: agregar 3 volúmenes de buffer de lisis (155mM de NH₄Cl; 10mM de KHCO₃ con un pH de 7,4; 1mM de EDTA).
- III. Dejar 15 minutos en hielo, agitando ocasionalmente para favorecer la reacción de lisis.
- IV. Centrifugar 10 minutos a 1000rpm.
- V. Eliminar el sobrenadante.
- VI. Lavar el pellet con SSC 1x (solución madre de 20x: 88,2g de citrato de sodio y 175,3g de NaCl).
- VII. A) Resuspender el pellet en 5ml de SE (75mM de NaCl y 24 mM de EDTA).
B) Agregar 100µl de proteinasa k (10mg/ml) y 500µl de SDS 10%.
- VIII. Incubar a 50°C durante toda la noche en baño con agitación.

Día 2

- I. Agregar 1 volumen de fenol: Agitar 15 minutos.
- II. Centrifugar a 2000rpm durante 5 minutos.
- III. Extraer la fase acuosa.
- IV. Precipitar el ADN con: 0,3 volúmenes de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto.
- V. Lavar el ADN con alcohol 70%
- VI. Disolver el ADN en 1ml T.E. (10mM de Tris y 1mM de EDTA).

Anexo 2

Protocolo de la reacción de PCR a tiempo final para el SNP -23HphI.

Protocolo de PCR para una volumen final de 25 μ l.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen inicial
Primers	10 pmol/ μ l	0,2 pmol/ μ l	1 μ l
Buffer KCl	10 X	1 X	2,5 μ l
Buffer MgCl ₂	50 mM o 25 mM	3 mM	1,5 μ l o 3 μ l
dNTPs	25mM	0,5 mM	0,5 μ l
Taq polimerasa	5U/ μ l	1 U/ μ l	0,2 μ l
ADN	100ng/ μ l	100ng/ μ l	1 μ l
H ₂ O mQ	Cantidad necesaria para completar los 25 μ l		

Para cada reacción se utilizó un volumen final de 25 μ l que contenía, el Master Mix formado por: Juego de Primers a una concentración inicial de 10pmol/ μ l, dNTPs a una concentración de 25mM, enzima Taq polimerasa (*Thermus Aquaticus*) termoestable a una concentración de 5U/ μ l con sus buffers correspondientes KCl a una concentración de 10X y MgCl₂ a una concentración de 25mM; y el ADN genómico de cada paciente a una concentración de 100ng/ μ l.

El programa de ciclado que se utilizó para la amplificación de nuestro segmento de interés fue el siguiente: 3 minutos a 95°C como desnaturalización inicial y luego 30 ciclos de 1minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C y 2 minutos a 72°C (desnaturalización, unión de los cebadores y elongación, respectivamente), para finalizar con 3 minutos a 72°C como extensión final.

Anexo 3

Protocolo de la reacción de digestión con la enzima de restricción BsmAI.

Reactivos	Volumen
Producto de PCR	10 μ l
H ₂ O mQ	18 μ l
Buffer de la enzima	2 μ l
Enzima BsmAI	1 - 2 μ l

Luego de completar con todos los reactivos, incubar a 37°C entre 1 y 16 horas.

Bibliografía

- Anonymous (2003). "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **26 Suppl 1**: S5-20.
- Ashfield, R., A. J. Patel, S. A. Bossone, H. Brown, R. D. Campbell, K. B. Marcu and N. J. Proudfoot (1994). "MAZ-dependent termination between closely spaced human complement genes." EMBO J **13**(23): 5656-5667.
- Bell, G. I., S. Horita and J. H. Karam (1984). "A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus." Diabetes **33**(2): 176-183.
- Bell, G. I., M. J. Selby and W. J. Rutter (1982). "The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences." Nature **295**(5844): 31-35.
- Bennett, S. T., A. M. Lucassen, S. C. Gough, E. E. Powell, D. E. Undlien, L. E. Pritchard, M. E. Merriman, Y. Kawaguchi, M. J. Dronsfield, F. Pociot and et al. (1995). "Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus." Nat Genet **9**(3): 284-292.
- Bennett, S. T. and J. A. Todd (1996). "Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes." Annu Rev Genet **30**: 343-370.
- Bennett, S. T., A. J. Wilson, F. Cucca, J. Nerup, F. Pociot, P. A. McKinney, A. H. Barnett, S. C. Bain and J. A. Todd (1996). "IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus." J Autoimmun **9**(3): 415-421.
- Cox, N. J., B. Wapelhorst, V. A. Morrison, L. Johnson, L. Pinchuk, R. S. Spielman, J. A. Todd and P. Concannon (2001). "Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families." Am J Hum Genet **69**(4): 820-830.
- Chentoufi, A. A. and C. Polychronakos (2002). "Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes." Diabetes **51**(5): 1383-1390.
- Davies, J. L., Y. Kawaguchi, S. T. Bennett, J. B. Copeman, H. J. Cordell, L. E. Pritchard, P. W. Reed, S. C. Gough, S. C. Jenkins, S. M. Palmer and et al. (1994). "A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes." Nature **371**(6493): 130-136.
- Durinovic-Bello, I., R. P. Wu, V. H. Gersuk, S. Sanda, H. G. Shilling and G. T. Nepom (2010). "Insulin gene VNTR genotype associates with frequency and phenotype of the autoimmune response to proinsulin." Genes Immun **11**(2): 188-193.

- Hansen, S. K., A. P. Gjesing, S. K. Rasmussen, C. Glumer, S. A. Urhammer, G. Andersen, C. S. Rose, T. Drivsholm, S. K. Torekov, D. P. Jensen, C. T. Ekstrom, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, M. I. McCarthy, T. Hansen and O. Pedersen (2004). "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**(6): 1079-1087.
- Hitman, G. A., N. I. Jowett, L. G. Williams, S. Humphries, R. M. Winter and D. J. Galton (1984). "Polymorphisms in the 5'-flanking region of the insulin gene and non-insulin-dependent diabetes." *Clin Sci (Lond)* **66**(4): 383-388.
- Huxtable, S. J., P. J. Saker, L. Haddad, M. Walker, T. M. Frayling, J. C. Levy, G. A. Hitman, S. O'Rahilly, A. T. Hattersley and M. I. McCarthy (2000). "Analysis of parent-offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III variable number tandem repeat alleles." *Diabetes* **49**(1): 126-130.
- Kennedy, G. C., M. S. German and W. J. Rutter (1995). "The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription." *Nat Genet* **9**(3): 293-298.
- Kralovicova, J., T. R. Gaunt, S. Rodriguez, P. J. Wood, I. N. Day and I. Vorechovsky (2006). "Variants in the human insulin gene that affect pre-mRNA splicing: is -23HphI a functional single nucleotide polymorphism at IDDM2?" *Diabetes* **55**(1): 260-264.
- Le Fur, S., C. Auffray, F. Letourneur, C. Cruaud, C. Le Stunff and P. Bougneres (2006). "Heterogeneity of class I INS VNTR allele association with insulin secretion in obese children." *Physiol Genomics* **25**(3): 480-484.
- Libman, I. M. and D. J. Becker (2003). "Coexistence of type 1 and type 2 diabetes mellitus: "double" diabetes?" *Pediatr Diabetes* **4**(2): 110-113.
- Lucassen, A. M., G. R. Sreaton, C. Julier, T. J. Elliott, M. Lathrop and J. I. Bell (1995). "Regulation of insulin gene expression by the IDDM associated, insulin locus haplotype." *Hum Mol Genet* **4**(4): 501-506.
- McCarthy, M. I. (2010). "Genomics, type 2 diabetes, and obesity." *N Engl J Med* **363**(24): 2339-2350.
- McGinnis, R. E. and R. S. Spielman (1995). "Insulin gene 5' flanking polymorphism. Length of class 1 alleles in number of repeat units." *Diabetes* **44**(11): 1296-1302.
- Meigs, J. B., J. Dupuis, A. G. Herbert, C. Liu, P. W. Wilson and L. A. Cupples (2005). "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**(2): 1137-1143.
- Mimbacas, A., L. Garcia, P. Zorrilla, M. Acosta, C. Airaudo, R. Ferrero, A. Pena, B. Simonelli, E. Soto, G. Vitarella, J. Fernandez and G. Javiel (2009). "Genotype and phenotype correlations in diabetic patients in Uruguay." *Genet Mol Res* **8**(4): 1352-1358.

- Noble, J. A., A. M. Valdes, M. Cook, W. Klitz, G. Thomson and H. A. Erlich (1996). "The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families." Am J Hum Genet **59**(5): 1134-1148.
- Ong, K. K., D. I. Phillips, C. Fall, J. Poulton, S. T. Bennett, J. Golding, J. A. Todd and D. B. Dunger (1999). "The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight." Nat Genet **21**(3): 262-263.
- Paquette, J., N. Giannoukakis, C. Polychronakos, P. Vafiadis and C. Deal (1998). "The INS 5' variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans." J Biol Chem **273**(23): 14158-14164.
- Pozzilli, P. and R. Buzzetti (2007). "A new expression of diabetes: double diabetes." Trends Endocrinol Metab **18**(2): 52-57.
- Pozzilli, P. and U. Di Mario (2001). "Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention." Diabetes Care **24**(8): 1460-1467.
- Pozzilli, P., C. Guglielmi, S. Caprio and R. Buzzetti (2011). "Obesity, autoimmunity, and double diabetes in youth." Diabetes Care **34 Suppl 2**: S166-170.
- Pugliese, A., Z. L. Awdeh, C. A. Alper, R. A. Jackson and G. S. Eisenbarth (1995). "The INS B allele (1,428 Fok I) is associated with reduced IDDM incidence in autoantibody-positive first degree relatives despite the presence of autoantibodies and high-risk HLA alleles." Transplant Proc **27**(6): 3392.
- Rotimi, C. N. and L. B. Jorde (2010). "Ancestry and disease in the age of genomic medicine." N Engl J Med **363**(16): 1551-1558.
- Stead, J. D. and A. J. Jeffreys (2000). "Allele diversity and germline mutation at the insulin minisatellite." Hum Mol Genet **9**(5): 713-723.
- Steck, A. K., T. L. Bugawan, A. M. Valdes, L. M. Emery, A. Blair, J. M. Norris, M. J. Redondo, S. R. Babu, H. A. Erlich, G. S. Eisenbarth and M. J. Rewers (2005). "Association of non-HLA genes with type 1 diabetes autoimmunity." Diabetes **54**(8): 2482-2486.
- Tisch, R. and H. McDevitt (1996). "Insulin-dependent diabetes mellitus." Cell **85**(3): 291-297.
- Vafiadis, P., S. T. Bennett, E. Colle, R. Grabs, C. G. Goodyer and C. Polychronakos (1996). "Imprinted and genotype-specific expression of genes at the IDDM2 locus in pancreas and leucocytes." J Autoimmun **9**(3): 397-403.
- Vafiadis, P., R. Grabs, C. G. Goodyer, E. Colle and C. Polychronakos (1998). "A functional analysis of the role of IGF2 in IDDM2-encoded susceptibility to type 1 diabetes." Diabetes **47**(5): 831-836.

Walter, M., E. Albert, M. Conrad, E. Keller, M. Hummel, K. Ferber, B. J. Barratt, J. A. Todd, A. G. Ziegler and E. Bonifacio (2003). "IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity." Diabetologia **46**(5): 712-720.