



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

ISSSTE

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD PARA EL
DESARROLLO DE DIABETES GESTACIONAL EN LA POBLACIÓN
MEXICANA**

NUMERO DE REGISTRO: 142-2010

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE:

MEDICINA MATERNO FETAL

PRESENTA:

DR JUAN MANUEL MARZUCA HOYOS

ASESOR DE TESIS:

DR FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE



MÉXICO,D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

NUMERO DE REGISTRO: 142-2010

DR MAURICIO DI SILVIO LOPEZ
Subdirector de Enseñanza e Investigación

DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE
Profesor Titular de Medicina Materno Fetal
Asesor de Tesis

DR. ARNOLDO RAUL ESPARZA AVILA
Coordinador de Enseñanza

Dedicatoria

A Dios, por haber permitido este momento.

A mi abuelo, “Califa”, por ser el hombre como todos debiéramos ser, un gran ejemplo de vida, luchando, deseando y disfrutando la vida hasta el último aliento.
En el reino estés, te extrañamos, te amamos.

A mi hija Aitana, que me ha bendecido con su existir.

Agradecimientos

A mi esposa Cindia, por su gran sacrificio y paciencia al haberme acompañado estos tantos años.

A mis Padres por estar siempre a mi lado y su apoyo incondicional.

A mis hermanos por el gran amor que nos une.

A mis grandes amigas, Madaí y Verónica, por haber estado unidos y no permitir que nadie afecte nuestra amistad.

Al Dr. Mendoza, Dra. Camacho, Dra. Mendoza, Dra. Cantú, por sus enseñanzas.
En especial al Maestro, Dr. Fernando Escobedo Aguirre, por lo mucho que nos enseña, y el cariño que nos demuestra.

A todas las pacientes que confiaron en mí.

Esta investigación se realiza en conjunto con la Dra. Maria Teresa Tusie Luna, INCMNSZ y agradezco a Q.F.B. Alicia Huerta Chagoya por el apoyo tan importante e indispensable en la realización de esta tesis.

INDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCION	7
ANTECEDENTES	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
RESULTADOS	21
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

RESUMEN

OBJETIVO: En este trabajo analizamos la contribución de 5 variantes alélicas en la susceptibilidad a la Diabetes Gestacional (DG) en población mestiza mexicana.

MATERIAL Y MÉTODOS: La muestra total estuvo conformada por 356 mujeres, 243 casos y 113 controles. En la hoja de recolección de datos del estudio se recabaron múltiples variables, entre las principales consideramos la edad, índice de masa corporal, historia perinatal, características y complicaciones del embarazo, tratamiento y resultado perinatal seguido de curva de reclasificación a las 6 semanas postparto.

En la muestra de DG se genotificaron 5 de los Polimorfismos de Nucleótidos Simples (Single Nucleotide Polymorphism SNP) que en pruebas previas mostraron asociación a la Diabetes Tipo 2 (DT2): rs5219 (*KCNJ11*); rs13266634 (*SLC30A8*); rs1111875 (*HHEX/IDE*); rs10811661 (*CDKN2A/2B*) y rs7578507 (*THADA*). Los genotipos se realizaron a través del ensayo KASpar.

RESULTADOS: De acuerdo a los criterios de severidad propuestos por Freinkel, el 82.2% fue tipo A1; el 16.5% tipo A2 y el 1.3% corresponde al tipo B1.

En población mestiza mexicana, las variantes alélicas de riesgo para DT2 (*KCNJ11*, rs5219; *SLC30A8*, rs13266634; *HHEX/IDE*, rs1111875; *CDKN2A/2B*, rs10811661) no lo son para DG.

CONCLUSION: En la población mestiza mexicana, la contribución de las variantes alélicas comunes en el riesgo a la DT2 fue modesta y llama la atención que el efecto de que algunas de ellas, sean evidentes sólo en algunos subgrupos de diabéticos. La carga alélica resultó de gran importancia en el riesgo a padecer DT2; sin embargo, no confirió ningún efecto en el desarrollo de la DG. Queda claro que se debe continuar la búsqueda de variantes genéticas que contribuyan a la

predisposición de la DT2 y la DG presentes en el componente amerindio de la población mestiza mexicana, mediante el uso de otras estrategias.

INTRODUCCION

La diabetes gestacional se define como una intolerancia a los carbohidratos de severidad variable que se presenta o se diagnostica por primera vez durante el embarazo (Buchanan *et al.*, 2007).

La prevalencia mundial de la diabetes gestacional varía entre 1 y 14% de acuerdo a los reportes formales a los que se incorporan más de 200,000 casos reportados anualmente (ADA, 2004). En México la prevalencia varía de acuerdo a las diferentes instituciones que tienen protocolos vigentes. En 1992 se reportó en la ciudad de México una prevalencia del 7% (Grupo de estudio sobre Diabetes Mellitus). En la ciudad de Monterrey en 1998 se reportó una cifra del 4.3% en 693 mujeres embarazadas estudiadas (Forsbach *et al* 1998). En el “Centro Médico Nacional 20 de Noviembre” del ISSSTE, por ser hospital de concentración, la prevalencia llega a ser de 51%. (Y. Hernandez 2009)

Se ha documentado que un 61% de mujeres con DG desarrollaron intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2 (DT2) una década después del parto. En este 61% de mujeres se observó que 36% de ellas no tenían antecedentes de DT2 o DG en los padres (McLellan *et al*, 1995).

La DG es de herencia poligénica y en su etiología participan distintos genes de susceptibilidad además de factores ambientales. Los antecedentes familiares de DT2 son factores de riesgo importantes para el desarrollo de la DG (Rodríguez *et al*, 1999; Savona *et al*, 2000).

ANTECEDENTES

Durante la gestación, se producen cambios drásticos en el metabolismo materno que son necesarios para asegurar las demandas de nutrimentos del feto en crecimiento, aún cuando estos sigan incorporándose a la madre (Torgersen *et al.*, 2006). Uno de los cambios es un aumento en la resistencia a la insulina (cuyo mayor pico se da al final del segundo trimestre), a lo que el cuerpo compensa aumentando la secreción de la hormona, sin embargo, en las mujeres con DG no es suficiente y se genera hiperglucemia (Buchanan *et al.*, 2005; Vambergue *et al.*, 2002).

Este protocolo se lleva a cabo de acuerdo a los criterios de Carpenter y Coustan con valores límites de 95, 180, 155 y 140 mg/dl y se llega al diagnóstico de DG cuando hay dos o más valores alterados. La curva deberá realizarse a todas las mujeres embarazadas cuyo Tamiz de 50 g de Glucosa realizado previamente muestre alteración en cualquiera de sus dos determinaciones; permite identificar a las mujeres con mayor probabilidad de padecer DG (*Endocrinología Clínica*, 2004). Recientemente se han propuesto múltiples métodos con el fin de acortar los tiempos y costos, disminuyendo la carga de glucosa y el número de las determinaciones séricas.

La DG puede desaparecer horas después del parto; sin embargo, un porcentaje alto de las pacientes pueden desarrollar DT2 en un periodo de 5-16 años después de resuelto el embarazo entre 17a 63%, principalmente si: 1) son obesas; 2) el diagnóstico se estableció en etapas tempranas del embarazo y; 3) la hiperglucemia fue muy elevada (*Endocrinología Clínica*, 2004). Adicionalmente, la recurrencia de DG puede alcanzar del 35 al 80% dependiendo del índice de masa corporal (IMC), la paridad, características del embarazo afectado, etapa de la gestación en que se diagnosticó la primera vez, requerimientos de insulina, ganancia de peso y el intervalo entre los cada embarazo (Ben-Haroush *et al.*, 2004).

La prevalencia de la DG también ha aumentado en los últimos años y varía entre las diferentes poblaciones étnicas; por ejemplo en las mujeres asiáticas es de 5-10%, en mexicoamericanas de 5-7%, en árabes de 5-7%, mientras que en europeas es de 2-4% (Shaath *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que las diferencias en los métodos de diagnóstico impiden la comparación de las prevalencias entre poblaciones ya que a diferencia de la DT2 aún no hay un consenso mundial. Si se suma el hecho de que algunas mujeres pueden tener diabetes preexistente no diagnosticada, las cifras de prevalencia son aún menos confiables primordialmente en aquellas poblaciones con alto riesgo de DT2 de inicio temprano, como lo es la población mestiza mexicana, haciendo muy complejo el estudio de la DG.

Podemos distinguir varias características comunes por las que se han propuesto a la DT2 y a la DG como entidades relacionadas, e incluso a esta última como un estado prediabético: 1) ambos grupos presentan resistencia a la insulina y disfunción de la célula β pancreática, 2) comparten factores de riesgo y 3) la prevalencia de la DG varía proporcionalmente con la de DT2.

Con respecto a su relación con la DT1, algunas pacientes con DG presentan anticuerpos contra la insulina y los islotes pancreáticos; sin embargo, son muy poco frecuentes (<10%) (Ben-Haroush *et al.*, 2004).

Se han realizado diversos estudios con el fin de identificar los genes y las variantes alélicas particulares que se relacionan con el desarrollo de esta entidad. Algunos de los genes que se han estudiado están vinculados con la manifestación de DT2. Entre ellos se encuentran el gen de la calpaína-10, el que codifica para el receptor 1 de sulfonilurea (SUR1) (Gloyn *et al.*, 2003) y los genes MODY que codifican para la enzima glucocinasa (GCK) y los factores de transcripción HNF1- α , e IPF-1.

En un estudio que incluyó 40 pacientes con DG de la ciudad de Viena, el 20% de ellas presentaban el haplotipo 112/121 en el gen de la calpaína-10, mientras que en los controles éste no se encontró (Leipold et al., 2004). En mujeres inglesas con diabetes gestacional recurrente, hiperglucemia en el ayuno posparto e historia familiar de diabetes tipo 2, se presentó una alta prevalencia de mutaciones en el gen de la GCK (Ellard et al, 2000).

La evidencia de que existe una base genética para la DT2 se ha derivado a partir de estudios de familias y gemelos en poblaciones de distinto origen étnico. La identificación de genes asociados con la patogénesis de las DT2 se ha realizado por medio de estudios de asociación caso-control para el análisis sistemático de genes candidatos (Hitman y Sudagani, 2004), estrategias de ligamiento genético para la exploración del genoma completo y más recientemente estudios de asociación genómica (Frayling, 2007). El escaneo del genoma en diferentes grupos étnicos ha permitido identificar regiones cromosómicas que contienen genes de susceptibilidad para el desarrollo de DT2 tales como el gen de Calpaína 10 (CAPN10), el gen del factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (HNF-4 α), el gen del factor de transcripción USF-1 factor (Hitman y Sudagani, 2004), o el gen que codifica para el factor transcripcional TCF7L2 (Grant et al, 2006).

El factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF-4 α) es miembro de la superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligando, juega un papel importante en el desarrollo, la diferenciación celular y el metabolismo del páncreas endocrino y es requerido también para el funcionamiento normal del intestino, el hígado y el riñón (Yamagata et al, 1996). El gen *HNF-4 α* se ha relacionado a una forma monogénica de la diabetes denominada MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) caracterizada por una disminución en la secreción de la insulina.

Mutaciones en este gen y otros genes MODY (*IPF-1*, *HNF1 α*) además de asociarse a la diabetes de este tipo, se han relacionado con la susceptibilidad al desarrollo de la DT2 de inicio tardío (Hani et al, 1999, MacFarlane et al, 1999). Por

otro lado se ha demostrado que mujeres con mutaciones en genes MODY tienen mayor riesgo para desarrollar DG (Shaaf et al, 2006).

Actualmente existen numerosos estudios de ligamiento a la DT2 que muestran esta evidencia en la región cromosómica 20q12-13.1 donde se localiza el gen *HNF4 α* , por lo que se ha evaluado la asociación de diferentes polimorfismos (SNP's) que se encuentran en la región promotora y codificante de *HNF-4 α* con la presencia de DT2 en diferentes poblaciones. En poblaciones finlandesa y judía se demostró una fuerte asociación entre SNP, del gen y la DT2 (Muller et al., 2005) mientras que en Indios Pima se observó que estas mismas variantes se asocian a un riesgo disminuido para el desarrollo de la DT2. Sin embargo, en algunas poblaciones caucásicas europeas y americanas como la Sueca y Canadienses así como en población polaca no ha sido posible demostrar asociación de este gen con el riesgo a manifestar DT2 (Weedon et al, 2004; Vaxillaire et al, 2005; Winckler et al, 2005).

Debido a los distintos resultados obtenidos en los estudios previos es necesario evaluar el papel del gen *HNF-4 α* en cuanto a su posible papel como alelo de riesgo para el desarrollo de la DT2 y DG en pacientes mexicanas.

Con respecto a las variantes en el gen *HNF-4 α* en nuestra población, se publicó recientemente un estudio de asociación de dichas variantes con niveles de lípidos séricos y el síndrome metabólico (Weissglas-Volkov et al, 2006). Los SNP's rs6031558, rs745975, rs3212198, rs2425640 se asociaron al riesgo de presentar síndrome metabólico por lo que resulta interesante estudiar su papel como gen de susceptibilidad para la DT2 y la DG en la población mexicana.

En población Caucásica Americana y Danesa se demostró asociación de las variantes rs7903146 y rs12255372) con el riesgo a DT2 [OR= 1.5] ($p= 4.7 \times 10^{-18}$) (Jukka et al, 2007). Estas mismas variantes se asociaron a la DT2 en población Inglesa, Amish, Finlandesa, Alemana e indú (Groves et al, 2006; Damcott et al, 2006; Scout et al, 2006; van Vliet-Ostaptchouk et al, 2007).

Sin embargo, a pesar de que este gen parece contribuir en el desarrollo de la DT2 en distintos grupos, su papel sobre el riesgo parece ser variable entre poblaciones de distinto origen étnico siendo más importante su papel como alelo de susceptibilidad para DT2 en poblaciones caucásicas (Weedon et al, 2004).

En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas de la Nutrición Salvador Zubirán se llevó a cabo un estudio en más de 800 sujetos de población mestiza mexicana con DT2 en el que se demostró que la variante rs7903146 se asocia significativamente al riesgo de DT2, particularmente en los sujetos que con diagnóstico antes de los 45 años (OR= 2.14 p= 0.001 CI 1.43-3.2) , aún después del ajuste por mezcla étnica, realizado a través del análisis de marcadores de ancestría validados previamente para estudios de asociación caso-control en población mestiza mexicana (Villarreal-Molina et al, 2007). De acuerdo a estos antecedentes nos parece importante valorar su papel como gen de susceptibilidad en pacientes con diagnóstico de DG de la población mexicana.

El gen que codifica para el transportador de colesterol ABCA1 se identificó recientemente relacionado al riesgo para la DT2, la obesidad y el Síndrome Metabólico en sujetos de la población mexicana (Villarreal-Molina et al, 2007, Villarreal-Molina et al, 2008). Este gen se localiza en el locus 9q31 y codifica para una proteína transmembranal que regula el reflujo de lípidos de las células periféricas a las lipoproteínas de alta densidad o HDL (Attie et al, 2001). Aunque la función más conocida de ABCA1 se relaciona a la formación de partículas HDL y el eflujo del colesterol, esta proteína se expresa en distintos tejidos incluyendo el lumen intestinal, la vesícula biliar, la célula β pancreática y el adiposito (Brunham et al, 2007).

La variante R230C del gen ABCA1 asociada al riesgo de DT2 se identificó en sujetos de la población mexicana, particularmente en casos en que el diagnóstico se hizo antes de los 45 años (OR=3.77, p= 3.3×10^{-6}), con determinaciones de HDL bajo (p=0.005), obesidad (p=0.004) y el síndrome metabólico (OR=1.83 p=0.001) (Villarreal- Molina et al, 2007).

Debido a que esta variante se identificó como la única responsable de la asociación para los distintos rasgos analizados y que aparentemente es exclusiva de poblaciones de origen amerindio. Resulta de gran relevancia estudiar su papel como gen de susceptibilidad para el desarrollo de DG en mujeres con y sin obesidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los avances en la identificación de los genes implicados en la DT2 han sido muy lentos y, aunque los reportes más recientes (GWAS) han arrojado mucha información, la mayoría se han enfocado en el estudio de poblaciones con ancestría europea de modo que sólo permiten detectar las variantes que están presentes en dichas poblaciones. La población mestiza mexicana se originó a partir de la mezcla de herencia europea, amerindia y africana (50%, 45% y 5% respectivamente) de modo que es importante saber cuáles de las variantes alélicas que se han reportado en poblaciones europeas y que han replicado en asiáticas, son también de riesgo en la población mestiza mexicana. Debido a lo anterior, este estudio servirá para reconocer si la contribución de las variantes comunes en el riesgo poblacional es alta y la conveniencia de identificar variantes con mayor efecto, o bien, específicas de nuestra población mediante estrategias alternas (A. Hurtado, 2010)

Finalmente, la dificultad para distinguir entre mujeres con intolerancia a los carbohidratos y DT2 no diagnosticada, dificulta el análisis genético de la DG sobre todo en poblaciones con alta prevalencia de DT2 como lo es la población mestiza mexicana. Es por ello que nos interesa saber si para ambas patologías existen regiones genéticas de susceptibilidad compartidas, así como valorar la pertinencia de buscar variantes específicas de la DG.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las 5 variantes alélicas comunes, identificadas por medio de Genome Wide Association Studies (GWAS) en la susceptibilidad al desarrollo de DG, así como fenotipos relacionados en pacientes de la población mestiza mexicana, mediante un análisis de asociación de diseño caso-control.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Calcular las frecuencias alélicas de las variantes en mujeres embarazadas que cursan o no con DG.
- Calcular el riesgo que confieren individualmente las variantes alélicas en la susceptibilidad a la DG en la población mestiza mexicana.
- Analizar si las variantes que resulten asociadas, presentan interacción génica que pueda modular su efecto.
- Analizar si poseer carga alélica alta tiene algún efecto en la susceptibilidad a desarrollar DG.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Se estudiaron mujeres embarazadas atendidas en el C.M.N. 20 de Noviembre del ISSSTE con diagnóstico de diabetes gestacional, reuniendo la información protocolizada así como la de sus recién nacidos.

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

Pacientes con DG, en todos los casos se siguió el mismo protocolo de diagnóstico: Curva de Tolerancia a la glucosa oral. 100 g (*CTOG) y el diagnóstico se llevó a cabo siguiendo los criterios de Carpenter y Coustan, 1982. Tabla 1. Dos de los valores están alterados.

Tabla 1.

Tiempo	Concentraciones de glucosa en plasma	
	mg/dL	mmol/L
En ayuno	95	5.3
1 hora	180	10.0
2 horas	155	8.6
3 horas	140	7.8

Los casos se clasificaron según la severidad de la DG, de acuerdo a la clasificación propuesta por Freinkel, 1980: se consideró:

- *DG tipo A1*, cuando la concentración de glucosa sérica en ayuno fue menor a 105 mg/dL;
- *DG tipo A2*, cuando los niveles se encontraron entre 105-129 mg/dL y;
- *DG tipo B1*, glucosa \geq 130 mg/dL.

Después de 6 a 8 semanas de concluido el embarazo, se realiza una CTGO de 2 horas con 75 g de glucosa anhidra para la reclasificación de acuerdo criterios de la American Diabetes Association (ADA)

Las semanas de gestación en que fue realizado el diagnóstico se amplió con respecto al propuesto por Carpenter y Coustan considerando las características de la población a estudiar en un hospital de concentración de patología obstétrica dado que es durante el segundo trimestre del embarazo cuando se establece el mayor pico de resistencia a la insulina; decidimos ampliar el intervalo.

1) Cuando la paciente fue captada cursando embarazo mayor a 28 semanas, con CTGO normal, se incluyó en el grupo control.

2) Cuando la paciente fue captada cursando embarazo menor a 24 semanas, con CTGO anormal, se incluyó en el grupo problema.

Por otra parte, se excluyeron mujeres con otros padecimientos que modifican *per se* el metabolismo de carbohidratos. (Tabla 2)

Tabla 2.

Criterios de inclusión y exclusión para la muestra de DG.		
Grupo	Inclusión	Exclusión
Controles	Diagnóstico negativo a DG	No mestizas mexicanas Edad <18 años
	CTOG realizada en semanas de gestación 22-35	DT1, DT2 Hipotiroidismo Hipertiroidismo
Casos	Diagnóstico positivo a DG	Síndrome de ovario poliquístico
	CTOG realizada en semanas de gestación 16-30	

Mediciones bioquímicas y cálculos

Todas las determinaciones fueron realizadas en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ, se utilizaron procedimientos comerciales estandarizados (Boehringer, Mannheim). Glucosa; colesterol total, HDL y triglicéridos fueron medidos por métodos enzimáticos. La

insulina se midió por radioinmunoensayo; mientras que los niveles de LDL se calcularon usando la fórmula de Friedewald (1972).

El estado nutricional de los participantes se evaluó mediante el cálculo del índice de masa corporal (IMC), el cual fue calculado siguiendo la fórmula $IMC: \text{Peso} / (\text{Talla})^2$.

Se usaron como puntos de corte, los valores propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ("Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a Who Consultation," 2000): obesidad cuando el $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ y, no obesidad cuando el $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$. (A. Hurtado, 2010)

Genotipificación

El DNA genómico fue extraído de sangre total usando un kit comercial (Qiagen Cat.51162) y, fue resuspendido en agua miliQ. Se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y, se hicieron diluciones a una concentración de $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$. La genotipificación fue realizada usando ensayos KASPar (Kbiosciences Allele Specific PcR) de la compañía KBiosciences (Hoddesdon, UK). Dicha tecnología es un sistema de detección de SNP, cuya técnica se basa en la extensión de oligonucleótidos alelo-específicos y en la generación de la señal mediante fluorescencia. Emplea dos oligonucleótidos forward (uno por cada alelo) diseñados para cada variante, a los cuales se les acopla una cola no complementaria al DNA en su extremo 5' y; un oligonucleótido reverse común. Adicionalmente, utiliza cassetes FRET comunes (Fluorescence Resonance Energy Transfer), los cuales son dos oligonucleótidos complementarios a las colas de los alelo-específicos. Estos oligonucleótidos están marcados con fluoróforos (VIC ó FAM, cada uno reportero de un alelo). (A. Hurtado, 2010)

El proceso de amplificación que emplea esta técnica es el siguiente:

- 1) Desnaturalización del DNA,*
- 2) Alineación de los oligonucleótidos no marcados (dos forward alelo-específicos y un reverse común) y extensión,*

- 3) *Desnaturalización de productos y nueva unión de oligonucleótidos,*
- 4) *Extensión e incorporación de colas complementarias de forma alelo-específica,*
- 5) *Desnaturalización de productos y de los cassetes FRET,*
- 6) *Alineamiento e incorporación de los oligonucleótidos marcados a las colas complementarias,*
- 7) *Extensión del oligonucleótido marcado y emisión de fluorescencia y*
- 8) *Repeticiones de los ciclos.* (A. Hurtado, 2010)

Es posible saber el genotipo de las muestras con base en la cuantificación diferencial de la fluorescencia emitida para cada alelo. Este método es el más eficiente y barato disponible hasta el momento ya que implica únicamente la síntesis de tres oligonucleótidos no marcados y, la discriminación no depende de la unión estable de estos al DNA.

En la muestra de DG se genotipificaron 5 de los SNP que en pruebas previas mostraron asociación a la DT2:

- rs5219 (*KCNJ11*);
- rs13266634 (*SLC30A8*);
- rs1111875 (*HHEX/IDE*);
- rs10811661 (*CDKN2A/2B*) y;
- rs7578507 (*THADA*).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los cálculos se realizaron usando los paquetes estadísticos STATA/SE v9.0 (StataCorp LP, USA) y SPSS v15.0. Se hicieron comparaciones entre parejas de grupos analizando entre medias, medianas o frecuencias, utilizando las pruebas de t de Student (variables con distribución normal), U de Mann-Whitney (variables con distribución no normal) ó, χ^2 (variables categóricas), respectivamente. Para comparar los genotipos entre grupos, se utilizaron las pruebas de χ^2 o exacta de Fisher. El equilibrio de Hardy-Weinberg (casos y controles por separado) y el desequilibrio de ligamiento entre SNP (muestra total) fueron calculados con el paquete estadístico R v2.7.1 (<http://www.r-project.org>).

Las asociaciones entre genotipos y enfermedad se probaron calculando la razón de momios (OR), a partir del ajuste de un modelo de regresión logística bajo diferentes modelos genéticos codificados de la siguiente forma: 1) aditivo, el efecto es dependiente del número de alelos de riesgo (0 homocigoto para el alelo de no riesgo, 1 heterocigoto, 2 homocigoto para el alelo de riesgo); 2) dominante, una sola copia del alelo de riesgo es suficiente para dar el efecto (0 homocigoto para el alelo de no riesgo, 1 heterocigoto y homocigoto para el alelo de riesgo) y 3) recesivo, se necesitan dos copias del alelo de riesgo para dar el efecto (0 homocigoto para el alelo de no riesgo y heterocigoto, 1 homocigoto para el alelo de riesgo). (A. Hurtado, 2010)

RESULTADOS

La muestra total estuvo conformada por 356 mujeres, 113 controles y 243 casos. De acuerdo a los criterios de severidad propuestos por Freinkel: el 82.2% fue de tipo A1; el 16.5% fue de tipo A2 y el 1.3% fue de tipo B1. Sólo el 48% de los casos, regresaron a realizarse la CTOG de 75 g postparto, de ellas 56.4% permanecieron normoglucémicas; el 31.6% desarrollaron intolerancia a los carbohidratos; mientras que el 12% desarrollaron DT2.

Características de la muestra de DG

En las comparaciones de todas las variables se usaron pruebas paramétricas. Los casos presentaron diferencias significativas en todos los factores de riesgo ya reportados para la DG; excepto en el porcentaje de antecedentes familiares de DT2. Ambos grupos tuvieron valores altos en esta variable. Los valores de glucosa diagnósticos y postparto fueron mayores en las mujeres con DG. Además, la resolución obstétrica fue en semanas más tempranas, presentando las complicaciones de un recién nacido pretérmino con una menor severidad considerando que en el hospital hay una Unidad de Cuidados Intensivos y se cuenta con protocolos para utilización de inductores de madurez pulmonar.

Genotipificación de las variantes alélicas analizadas en la muestra de DG

La tasa de la genotipificación fue del 92%. Sólo se analizaron 5 SNP a excepción de *KCNJ11* (rs5219) y *SLC30A8* (rs13266634) en el grupo de casos ($p=0.05$, 0.015), el resto de las variantes estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p<0.05$). Se utilizaron datos de mujeres de muestra de DT2 para comparar sus frecuencias alélicas con las de la muestra de DG, únicamente se incluyeron a aquellas mujeres diabéticas cuya edad correspondía al intervalo de las pacientes con DG. (A. Hurtado, 2010)

Para todas las variantes, las frecuencias del alelo de riesgo fueron mayores en los controles que en los casos. Por su parte, las frecuencias alélicas de los casos de DG fueron muy similares a las de los casos de DT2.

En relación a lo anterior, es importante hacer referencia al alto porcentaje de participantes con antecedentes familiares de DT2. Es por ello que decidimos recalcular las frecuencias tomando en cuenta dicha variable. Aunque el número de mujeres sin antecedentes familiares de DT2 fue bajo, pudimos observar que en este grupo y para la mayoría de las variantes, las frecuencias de los alelos de riesgo son menores tanto en casos como en controles. No obstante, las frecuencias alélicas en ambos grupos de controles siguieron siendo mayores o iguales en comparación con sus grupos de casos aún en las mujeres sin antecedentes familiares de DT2.

Tabla 3.

Asociación a DG en población mestiza mexicana.								
Gen	SNP	Alelo riesgo	Controles de DG y casos de DG totales.		Controles de DG y casos de DG con AHDM		Controles DT2 y casos de DG totales	
			OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
KCNJ11	rs5219	<i>T</i>	0.50 (0.24-1.02)	0.056	0.43 (0.20-0.90)	0.024	1.91 (1.003-3.64)	0.049
SLC30A8	rs13266634	<i>C</i>	1.03 (0.24-4.40)	0.968	0.61 (0.12-3.14)	0.550	2.19 (0.85-5.69)	0.106
HHEX/IDE	rs1111875	<i>T</i>	0.70 (0.48-1.02)	0.062	0.67 (0.45-1.01)	0.056	1.03 (0.77-1.38)	0.847
CDKN2A/2B	rs10811661	<i>T</i>	0.84 (0.62-11.5)	0.897	0.84 (0.06-10.5)	0.891	2.46 (0.45-13.6)	0.301
THADA	rs7578597	<i>T</i>	n.a.		n.a.		n.a.	

Los primeros dos análisis fueron ajustados por edad, obesidad y antecedentes familiares de DT2 cuando p Wald < 0.05. n.a., no aplicable. AHDM, Antecedentes heredofamiliares de DM.

Análisis de asociación a DG

Poseer antecedentes familiares de DT2 fue una variable importante en la DG, por lo que decidimos comparar a las mujeres que reportaron poseer antecedentes familiares de DT2 contra las que no. Encontramos diferencias significativas en prácticamente las mismas variables entre casos y controles de cada grupo. Dado que el número de mujeres sin antecedentes es muy reducido, no fue posible hacer comparaciones estadísticas contra las que sí tenían; sin embargo, destaca que los casos con antecedentes tienen mayor presión arterial sistólica, mayores niveles de glucosa postparto en ayuno y, un mayor porcentaje de desarrolla DT2 después del parto.

Las comparaciones anteriores demostraron que la carga genética para DT2 tiene un efecto en la fisiopatología de la DG; sin embargo, con las variantes alélicas estudiadas no fue posible explicar dichos cambios. Se analizó la asociación de los genotipos a la enfermedad tanto en la muestra total de DG como en el grupo con antecedentes familiares de DT2, pero no en el grupo sin antecedentes por tener un tamaño de muestra insuficiente. En contraste con los resultados de DT2, encontramos que la variante del gen *KCNJ11* (rs5219) disminuye el riesgo a desarrollar DG en el grupo con antecedentes familiares de DT2, bajo un modelo genético recesivo. Las mujeres con DG tuvieron menor frecuencia del genotipo de riesgo que los controles ($p=0.022$).

La frecuencia del alelo de riesgo del SNP rs7578597 (*THADA*) fue tan alta que no se pudieron ajustar los modelos de regresión. Ninguna otra variante resultó asociada; aunque la región *HHEX/IDE* (rs1111875) casi alcanzó la significancia estadística para un efecto de protección a DG, al igual que rs5219 ($p=0.056$).

Finalmente, se probó la asociación de los SNP utilizando los datos de las mujeres controles de la muestra de DT2. En estas condiciones, encontramos que la variante del gen *KCNJ11* (rs5219) confiere riesgo a desarrollar DG, bajo un

modelo genético recesivo (tabla 3.19). En contraste con lo observado anteriormente, las mujeres con DG tuvieron mayor frecuencia del genotipo de riesgo que las mujeres controles de DT2 ($p=0.046$).

Tabla 5.

Características de la muestra de DG según los antecedentes familiares de DT2.					
	Con ant. heredo fam. De DM		Sin ant. heredo fam. De DM		
	Controles n = 20	Casos n=37	Controles n=74	Casos n=184	
Factores maternos	Edad (años)	30.1±7.5	35.6±5.3 *	29.9±7.3	34.7±5.4 *
	Obesidad (%)	10	35.1 *	12.2	30.3 *
	Presión sistólica (mmHg)	108±9.5	108.4±11	105.4±9.4	113.2±12.3 *
	Presión diastólica (mmHg)	68±8.3	71.1±8.8	67±8.3	72.8±8.6 *
	Edad materna avanzada (>35 años) (%)	30	67.6 *	29.7	55.5 *
	Alta paridad (>3 gestas) (%)	40	56.8	43.2	54.4
	Antecedentes de DG (%)	0	7.7	0	6.7
	DG previa (%)	0	10.8 *	0	10.9 *
Datos diagnósticos	Semana de gestación	28±4.1	24.1±4 *	28.3±3.9	23.8±4.08 *
	Glucosa en ayuno (mg/dL)	81.2±7.7	93.8±10.8 *	80.2±6.8	95.1±13.1 *
	Glucosa a 60' (mg/dL)	117.9±20.9	191.7±24.7 *	128.4±25.7	196.2±27.9 *
	Glucosa a 120' (mg/dL)	108.8±16.4	172.2±22.1 *	114.7±17.9	177.7±28.5 *
	Glucosa a 180' (mg/dL)	95.4±17.1	135.9±26.9 *	98.4±17	142.9±27 *
	Área bajo la curva	18894±2452.7	28247.8±3044 *	19948±2675.8	28954.5±3746.7 *
Datos	Glucosa en	n.d.	93.1±14.5	96.3±7.4	105.9±35.1 *

postparto	ayuno (mg/dL)				
	Glucosa a 120' (mg/dL)	n.d.	130.1±38.5	111.2±13.3	144±71.1 *
	DT2 postparto (%)	0	4.8 *	0	10.6 *
Factores producto	Semana de parto	38±2.9	36.9±22.6	38.2±1.9	37.2±2 *
	Peso (g)	2919.7±644.5	2997.9±590.5	2881.4±462.9	2872.3±619.7
	Talla (cm)	48.6±3.7	49±3.7	48.7±2.5	48.5±4.2
	Capurro	38.3±2.7	37.5±2	38.6±1.5	37.4±2.6 *
	Pretérmino, prematuridad, MNT (%)	17.6	23.1	6.8	23.4 *
Se muestra la media ± DS. *p<0.05 con respecto al grupo control. n.d., no disponible. AHDM, Antecedentes heredofamiliares de DM.					

Análisis de alelos múltiples en DG

Se consideraron los 4 SNP que resultaron asociados en la muestra de DT2 en nuestra población; y se incluyeron únicamente los individuos que tuvieron los datos completos de genotipificación para estos (n=318 para DG). No hubo individuos con menos de 2, ni con más de 8 alelos de riesgo.

De acuerdo con los resultados mencionados, encontramos que:

- 1) El grupo de mujeres con más variantes alélicas es menor en los casos y mayor en el grupo de controles
- 2) El porcentaje de mujeres con DT2 comienza a aumentar a partir de una carga de 7 alelos de riesgo, como ya se había observado anteriormente.
- 3) La mayor proporción de los casos de DG sin antecedentes familiares de DT2 tienen 5 ó 6 variantes alélicas (82.35%).
- 4) No se observan diferencias entre casos y controles en el grupo con antecedentes familiares de DT2, salvo que la proporción de mujeres con DG es menor con respecto a los controles al considerar 7 o más alelos de riesgo.

DISCUSION

Siendo el componente genético un factor tan importante en la predisposición a la DT2, es posible que existan muchas personas en riesgo latente de que existan elementos que se empiezan a estudiar en lo referente a “programación” durante los primeros días de vida intrauterina, reto ambiental lo suficientemente fuerte como para causar cambios adversos y finalmente la aparición de la enfermedad.

En función a esto, se ha propuesto que la DG podría ser un estado pre-diabético y que la resistencia a la insulina (característica normal del embarazo) se suma a las alteraciones que ya de por sí habían desarrollado y a la predisposición genética que posean, siendo la gestación el factor decisivo en el desarrollo de la hiperglucemia. La predisposición genética determina la capacidad que tiene un individuo de mantener la normoglucemia aún cuando los retos ambientales sean fuertes; así que el componente genético de estas mujeres debería ser alto (como en los diabéticos de inicio temprano) para perder la capacidad de compensación aún cuando son jóvenes y mantendrá esta tendencia desfavorable durante varias generaciones, aún cuando los elementos negativos no persistan.

El problema radica en distinguir si ese componente genético es el mismo que para la DT2 o si los mecanismos biológicos que confieren la susceptibilidad son diferentes. Por ello, una de las mayores complicaciones en el estudio de la DG es la dificultad para discriminar entre la DT2 y la DG. Pocas mujeres llevan un control glucémico previo al embarazo, así que es muy probable que muchas ya sean resistentes a la insulina, prediabéticas o incluso ya sean diabéticas. Si el componente genético fuera el mismo, ¿qué determina que haya mujeres con carga alélica alta y recuperen la normoglucemia al terminar el embarazo? Esto ha sugerido que los mecanismos por los que se genera la hiperglucemia en la DG no son los mismos a los de la DT2, sino que podrían estar relacionados con cambios y adaptaciones maternas al embarazo, p.ej.: producción de hormonas.

La muestra analizada presentó diferencias claras entre las mujeres con y sin DG, de acuerdo con lo ya reportado (Buchanan *et al.*, 2007; Vambergue *et al.*, 2002) no obstante, en la exploración de las variantes alélicas que resultaron asociadas en la muestra de DT2 (excepto *THADA*, rs7578597) observamos que las mujeres no diabéticas, normoglucémicas, tenían frecuencias del alelo de riesgo similares o con tendencia a ser mayor con respecto a las de las mujeres con DG (sólo la variante del gen *HHEX/IDE*, rs1111875 alcanzó significancia estadística). Al comparar la muestra de DG con mujeres de la muestra de DT2 encontramos que las frecuencias alélicas entre las mujeres con DT2 y DG son similares.

Esto último, apoyaba la idea de que ambas enfermedades podían compartir el mismo fondo genético, sin embargo las mujeres sin DG tenían las frecuencias más altas.

Vale la pena mencionar que dado que la edad es un factor de riesgo para desarrollar DT2 y, encontramos que el componente genético no es el mismo en casos jóvenes, utilizamos sólo mujeres con el mismo rango de edad que la muestra de DG en las comparaciones.

Si es que el componente genético era el mismo en DT2 y DG, cabía la posibilidad de que el grupo de controles de DG tuviera más antecedentes familiares de DT2 que los casos; pero una de las observaciones interesantes fue que no hubo diferencias en esta variable entre ambos grupos, de modo que la existencia de un sesgo en la población quedó descartada. Esto no significa que la carga genética heredada no influyera en las frecuencias alélicas, puesto que para la mayoría de las variables sí disminuyeron en las mujeres sin antecedentes tanto en casos como en controles. El número de mujeres sin antecedentes de DT2 es muy bajo, lo que complica la comparación adecuada con el grupo contrario sobre todo en las variantes cuya frecuencia del alelo de riesgo es muy alta (rs10811661 y rs7578597).

Pese a lo anterior, las frecuencias de los alelos de riesgo se mantuvieron más altas o iguales en el grupo de controles, especialmente en los que tienen antecedentes de DT2. Esto sugiere que la carga genética para la DT2, sí puede influir en el desarrollo de la DG; pero adicionalmente, la DG debe tener su propio componente genético. Otro punto a favor de esta idea es que aún estratificando la muestra por antecedentes familiares de DT2, ambos grupos siguen manteniendo diferencias en las mismas variables y son de la misma magnitud. Sólo destaca en el grupo con antecedentes, que los casos terminan el embarazo con un peor estado glucémico, atribuible a la carga genética adicional de DT2.

La evidencia publicada indicaba que las variantes alélicas que confieren riesgo a DT2 podían estar asociadas también con la DG (Cho *et al.*, 2009;Lauenborg *et al.*, 2009;Shaath *et al.*, 2005). Al respecto encontramos que ninguna de las cuatro variantes estudiadas que se asociaron a la DT2 en nuestra población confiere riesgo a DG, por el contrario una de ellas (*KCNJ11*, rs5219) parece conferir protección, alcanzando únicamente la significancia si se consideran casos y controles con antecedentes familiares de DT2. No tenemos explicación biológica para estos resultados, pero es posible que exista interacción con algún otro gen que participe en la DG, que en interacción con el ambiente impuesto por el embarazo sea benéfico, o incluso, que haya variantes alélicas que confieran protección.

Finalmente, pensamos que aunque no se hubieran obtenido resultados significativos en las asociaciones, la distribución de las cargas alélicas nos podían informar sobre la relevancia del componente genético de la DT2 en la DG.

Tal parece que la carga alélica de la DT2 no es relevante en el desarrollo de la DG, al menos tomando en cuenta las 4 variantes que si se asociaron a la DT2 en nuestra población.

Este estudio se realizó en condiciones estrictas a diferencia de otros similares en que los reportes de DG son difícilmente comparables, debido a que:

- 1) Los métodos de diagnóstico de la DG son diferentes;
- 2) Las semanas de gestación en que se hizo el diagnóstico son diferentes y
- 3) Los grupos controles no corresponden a un diseño caso-control

Como puede observarse el estudio genético de la DG hace que sus resultados actuales no puedan llegar a conclusiones contundentes, la estructura genética de nuestra población lo hace aún más complicado. Estudiar sólo a mujeres con DG sin antecedentes familiares de DT2 no reflejaría el panorama real de nuestra población, donde la prevalencia de esta última es tan alta que encontrar mujeres embarazadas sin antecedentes de DT2 y que además se tenga la certeza de que mantendrán la normoglucemia el resto de su vida, es metodológicamente complicado. (A. Hurtado, 2010)

CONCLUSIONES

La realización de esta investigación permitió derivar las siguientes conclusiones:

En población mestiza mexicana, las variantes alélicas de riesgo para DT2 (KCNJ11, rs5219; SLC30A8, rs13266634; HHEX/IDE, rs1111875; CDKN2A/2B, rs10811661) no lo son para DG.

Tener carga alélica para la DT2 no confiere riesgo a desarrollar DG, pero sí puede tener un efecto adicional adverso en el estado glucémico postparto.

Una de las variantes (*KCNJ11*, rs5219) parece conferir protección, alcanzando únicamente la significancia si se consideran casos y controles con antecedentes familiares de DT2. (A. Hurtado, 2010)

BIBLIOGRAFIA

1. Tusie- Luna, M.T. Association of the Atp-Biding Cassete transporter A1 R230c Variant with Early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes* 57: 509-13
2. Alicia H.C. Tusie- Luna, M.T. Análisis de distintos genes como candidatos para el desarrollo de la diabetes tipo 2 y la diabetes gestacional en la población mestiza mexicana. Abril 2010.
3. Yahir H.R; F. Escobedo A. Estudio de genes KCNJII, HHEX, SLC30AB, como genes de susceptibilidad para el desarrollo de DG. Noviembre. 2009.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004;27 (Suppl. 1): S5-10.
5. Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2001; 42:1717-1726
6. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Tissue-Specific Induction of Intestinal ABCA1 Expression With a Liver X Receptor Agonist Raises Plasma HDL Cholesterol Levels *Circulation Research*. 2006;99:672
7. Carpenter M W, Coustan D R. Criteria for screening test for gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1982; 144: 763-73.
8. Dammcott CM, Pollin TI, Reinhard LJ, Ott SH, Shen H, et al. Polymorphisms in the Transcription Factor 7-Like 2 (TCF7L2) Gener are Associated with type 2 Diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. *Diabetes* 2006; 55: 2654-2659

9. Ellard S, Beards F, Allen L I S, Shepherd M, Ballantyne E, *et al.* A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria *Diabetologia* 2000 43: 250-3.
10. Forsbach G, Contreras J J, Fong G, Flores G, Moreno O. Prevalence of gestational diabetes and macrosomic newborns in a Mexican population. *Diabetes Care* 1988; 11: 235-8.
11. Frayling TM. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. 2007 *Nature Reviews* 8: 657-662
12. Gloyn AI, Weedon MN, Owen KR *et al.* Large scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta cell K-ATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR 1 (ABCC8) confirm that the KCJNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:568-572.
13. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benedtsson R, Manolescu A, Sainz J *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2006; 38: 320-323.
14. Groves CJ, Zeggini E, Minton J, Frayling TM, Weedon MN, *et al.* Association Analysis of 6736 U.K. Subjects provides replication and confirms TCFT7L2 as a Type 2 Diabetes Susceptibility Gene with Substantial Effect on Individual Risk. *Diabetes* 2006; 55: 2640-2644.
15. Grupo de estudio sobre Diabetes Mellitus. Diabetes y Embarazo. Importancia Diagnóstica. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS* 1992; 30: 35-9.

16. Hani EH, Stoffers DA, Chevre JC, Durand E, Froguel P Defective mutations in the insulin promoter factor (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J.Clin. Invest.* 1999, 104: R41-R48
17. Hansen L, Urioste S, Petersen HV, Jensen JN, Pedersen O. Missense mutations in the human insulin promoter factor-1 gene and their relation to maturity-onset diabetes of the young and late-onset type 2 diabetes mellitus in Caucasians. *J.Clin.Endo.Metab.* 2000, 85: 1323-1326,.
18. Hitman GA, Sudagani J. Searching for genes in diabetes and the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract Suppl.* 2004 143:3-8.
19. Jukka T. Salonen, Pekka Uimari, Juha-Matti Aalto, Mia Pirskanen, Jari Kaikkonen, Boryana Todorova, Jelena Hyppönen, Veli-Pekka Korhonen, Janne Asikainen, Christopher Devine, Tomi-Pekka Tuomainen, Jan Luedemann, Matthias Nauck, Wolfgang Kerner, Richard H. Stephens, John P. New, William E. Ollier, J. Martin Gibson, Antony Payton, Michael A. Horan, Neil Pendleton, Walt Mahoney, David Meyre, Jérôme Delplanque, Philippe Froguel, Oren Luzzatto, Benjamin Yakir, and Ariel Darvasi. Type 2 Diabetes Whole-Genome Association Study in Four Populations: The DiaGen Consortium *Am J Hum Genet.* 2007 81: 338–345
20. Jovanovic L, Pettitt D J. Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of American Medical Association* 2001; 286:2516-18.
21. Leipold H, Knöfler M, Gruber C, Haslinger P, Bancher-Todesca D, *et al.* Calpain-10 Haplotype Combination and Association With Gestational Diabetes Mellitus. *Obstetrics and Gynecology* 2004; 103: 1235 –1240.

22. McLellan JA, Barrow B A, Levy J C, Hammersley M S, Hattersley A T, *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in parents of women with gestational diabetes. *Diabetologia* 1995; 38: 693-698.
23. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B161-167.
24. Muller YL, Infante AM, Hanson RL, Love-Gregory L, Knowler W, *et al.* Variants in hepatocyte nuclear factor 4alpha are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes*. 2005, 54:3035-3039.
25. Rodrigues S, Robinson E J, Ghezzi H, Gray-Donald K. Interaction of body weight and ethnicity on risk of gestational diabetes mellitus¹⁻³. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 70: 1083-1089.
26. Savona-Ventura C, Azzopardi J, Sant R. Risk Factors for Gestational Diabetes Mellitus in the Maltese Population: a population based study *International Journal of Risk and Safety in Medicine* 2000;13: 1-7.
27. Scott LJ, Bonnycastle C, Willer CJ, Sprau AG, Jacjson AU, Narisu N, *et al.* Association of Transcription Factor 7-Like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish Sample. *Diabetes* 2006; 55: 2649-2653.
28. Shaat N, Karlsson E, Lernmark A, Ivarsson S, Lynch K, *et al.* Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2006, 49:1545-51
29. Van Vliet-Ostaptchouk JV, Shiri-Sversdlov R, Zhernakova A Strengman e, *et al.* Association of variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) with susceptibility to type 2 diabetes in the dutch Breda cohort. *Diabetologia* 2007; 50: 59-62.

30. Vaxillaire M, Dina C, Lobbens S, Dechaume A, Vasseur-Delannoy V, *et al.* Effect of common polymorphisms in the HNF4alpha promoter on susceptibility to type 2 diabetes in the French Caucasian population. *Diabetología*. 2005 48:440-4.
31. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparán M, Coral-Vázquez R *et al.*, The ABCA1 R230 variant affects HDL-cholesterol levels and body mass index in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 2007 56:1881-1887
32. Villarreal-Molina MT, Arellano-Campos O, Dorantes-Flores MT, Villalobos-Comparan M, Riaño D, Rodríguez-Cruz M, Campuzano R, Huertas-Vazquez A, Menjivar M, M. Tusié-Luna MT, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S and The Metabolic Study Group Association of the ABCA1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes and its interaction with obesity in the Mexican population. *Diabetes* 2008, 57:509-513
33. Weedon MN, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, *et al.* Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the U.K. population. *Diabetes*. 2004 53:3002-6.
34. Weissglas-Volkov D, Huertas-Vazquez A, Suviolahti E, Lee J, Pajukanta P, *et al.* Common hepatic nuclear factor-4alpha variants are associated with high serum lipid levels and the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2006, 55:1970-1977.
35. Winckler W, Graham RR, de Bakker PI, Sun M, Almgren P, *et al.* Association testing of variants in the hepatocyte nuclear factor 4alpha gene with risk of type 2 diabetes in 7,883 people. *Diabetes*. 2005, 54:886-92.

36. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384:458-60, 1996.