



Universidad Nacional Autónoma de México



**Facultad de Medicina
División de estudios de postgrado**

**Ginecología y Obstetricia
Hospital General de México**

“Estudio preliminar. Asociación de los polimorfismos
rs7903146/TCF7L2 y *rs7756992/CDKAL1* en pacientes mexicanas
con Diabetes Gestacional del Hospital General de México”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

Dra. Mariella Granillo Álvarez

Tutor de tesis

Dr. Fausto Moisés Coronel Cruz
Asesor Teórico



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

Dr. Antonio Guerrero Hernández

Jefe de servicio de Ginecología y Obstetricia Hospital General de México
Prof. Titular al curso de posgrado de la especialidad de Ginecología y Obstetricia

Dra. Rocío Guerrero Bustos

Jefe de enseñanza e investigación de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México
Prof. adjunto al curso de posgrado de la especialidad de Ginecología y Obstetricia

Dr. Fausto Moisés Coronel Cruz

Tutor de tesis

Jefe de Unidad de Obstetricia de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México
Prof. adjunto al curso de posgrado de la especialidad de Ginecología y Obstetricia

Dra. Mariella Granillo Álvarez

Residente de 4to año de Ginecología y Obstetricia
Autor de tesis

AGRADECIMIENTOS

- A mis maravillosos padres, Jorge y María Elena, pues a ellos les debo todo lo que he logrado y a ellos esta dedicado este trabajo; muchas gracias por su eterno amor, comprensión y ayuda. Sin su formación, motivación y ejemplo jamás habría llegado tan lejos. Los amo.
- A mis hermanos, Jorge y Mariana, por estar siempre cerca de mi, por ayudarme y darme fuerzas en los momentos difíciles, cada uno con su muy particular forma de ser haciéndome mas llevadera esta larga carrera.
- A mi abuela, María Elena, por ser no solo la mejor abuela, sin una gran madre, mujer, hermana e hija y para mi el ejemplo claro de la mujer perfecta. Te adoro abue, muchas gracias por quererme tanto.
- A mi amado esposo quien hizo posible que se lograra este sueño de realizar una buena tesis; gracias Oscar por enseñarme a amar y a respetar mi profesión, te agradezco que hayas estado siempre detrás de mí impulsándome a crecer y a buscar ser siempre la mejor y no permitiendo que me rindiera. Gracias por tu amor y comprensión y por integrarte a mi guardia. Te amo “Coco”.
- A mis queridos suegros quienes a pesar de la distancia me han mostrado en todo momento su apoyo, confianza, cariño y respeto.

- A mis cuñados Ligi y Robert y a mis sobrinos Cinthi y Adrián por hacerme sentir siempre parte de su familia, por el apoyo, preocupación y cariño que me mostraron y por estar siempre pendientes de mi felicidad. Los quiero y respeto mucho.

- A mis amigos y hermanos de la guardia “B” quienes formaron mi familia durante estos 3 años, con quienes compartí muchísimas alegrías, retos pero también derrotas. Siempre juntos apoyándonos unos con otros, siempre demostrando que fuimos, somos y seremos la mejor guardia. Gracias por todo, se quedan en mi corazón por siempre.

- A todos los que laboran en el Servicio de Genética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana por todo su apoyo para la realización de éste trabajo de investigación. Un agradecimiento especial al Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz, a quien quiero como amigo y admiro por sus logros profesionales y por ser un gran ser humano, por permitirme trabajar en su laboratorio y por ayudarme a terminar la tesis pese a tantos obstáculos, manteniéndose siempre optimista y brindándome todo el apoyo necesario para que esta se lograra satisfactoriamente.

- A todos los médicos de base así como al personal de enfermería del Hospital General de México por sus enseñanzas, por su tolerancia y amistad.

- Al Dr. Antonio Guerrero Hernández por abrirme las puertas de su servicio, por su ejemplo de entrega total al trabajo y amor a la Ginecología y principalmente por todas sus enseñanzas.

- A todas las pacientes que tuve la fortuna de atender en el Hospital General de México, por permitirme aprender de ellas y por toda la confianza y cariño que me mostraron estos 4 años.

- Al magnífico y único Hospital General de México, por ser mi escuela, hospital y casa por muchos años.

- Al personal médico y de enfermería del Hospital General de Cuernavaca, Jose G. Parres, por sus enseñanzas durante mi primer año de residencia, gracias por permitirnos tanta práctica quirúrgica, por su amistad y por su entrega.

- Por último a ti Señor, Dios por hacer posible mi existencia, gracias por los dones otorgados y por ayudarme a explotarlos al máximo, por caminar juntito a mi todos estos años, siempre bendiciéndome y protegiéndome. Gracias, Padre mío.

“Valor es lo que se necesita para levantarse y hablar; pero también es lo que se requiere para sentarse y escuchar”.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. Introducción

1.1 Marco teórico y antecedentes

1.1.1 Antecedentes históricos

1.1.2 Epidemiología

1.1.3 Fisiopatología

1.1.4 Diagnóstico

1.1.5 Genética

1.2 Justificación y planteamiento del problema

1.3 Objetivos

1.4 Hipótesis

2. Material y métodos

2.1 Tipo de estudio

2.2 Población en estudio y tamaño de la muestra

2.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

2.4 Variables y escalas de medición

2.5 Procedimientos. Recolección de datos y análisis de los resultados

2.6 Implicaciones éticas del estudio

3. Resultados

4. Discusión

5. Conclusiones

6. Anexos

5.1 Cronograma de actividades

5.2 Consentimiento informado

7. Referencias

ABREVIATURAS

DG: Diabetes Gestacional

IMC: Índice de masa corporal

TNF: Factor de necrosis tumoral

CEMACH: (*Confidential Equiry into Maternal and Child Health*: Equidad Confidencial en la salud maternal e infantil)

DM: Diabetes Mellitus

SNPs: Polimorfismos de nucleótidos simples

HGM: Hospital General de México

CTOG: Curva tolerancia oral glucosa

OR: Odds Ratio (razón de momios)

p: Valor p

IC: Intervalo de confianza

pb: Pares de base

n: Tamaño de muestra

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome clínico caracterizado por deficiencia o insensibilidad a la insulina y exposición de los órganos a hiperglucemia crónica; es el principal problema metabólico que padece la población mundial y la enfermedad que con mayor frecuencia complica el embarazo. La diabetes gestacional (DG) es una alteración en el metabolismo de los carbohidratos que se manifiesta por hiperglucemia que se presenta por primera vez durante el embarazo y que suele desaparecer después del parto y por ello se considera un periodo de anormalidad condicionado por la gestación. La interacción entre los factores ambientales y genéticos son los causantes del desarrollo de ésta enfermedad. En América el número de personas con diabetes mellitus fue de 35 millones en el año 2000 y se espera que se incremente a 64 millones en el año 2025. En México, se desconoce la asociación de diabetes preestablecida y el embarazo, aunque se sabe que tiene una relación directa con la frecuencia de diabetes mellitus tipo 2 en población general que es de alrededor del 10%, del total de estos pacientes una décima parte corresponde a diabetes mellitus tipo 1. La incidencia de DG es de 0.4 a 0.5% en menores de 25 años y de 4.3 a 5.55% en mayores a esa edad. Hasta un 8% de las mujeres que presentan DG en México desarrollará DM2 en los siguientes 10 años.

Recientemente se han hecho varios estudios en los que se han identificados diversas variantes genéticas implicadas en el desarrollo de DM2 por su efecto diabetógeno. Dentro de la fisiopatología, los genes implicados actúan a través de diversas vías de señalización que involucran la embriogénesis del páncreas, la función celular, el desarrollo de resistencia

a la insulina y la obesidad. Dentro de los genes más estudiados se encuentran *CDKALI*, *TCF2*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *CDKN2A/B*, *HHEX*, *FTO*, *KCNQ1* y *WSF1*.

En este estudio se decide analizar 2 polimorfismos de los genes *CDKALI* y el *TCF7L2* dado que en varios artículos encontraron una asociación entre estos SNPs y la presencia de Diabetes Gestacional, principalmente en población China y Danesa. Debido a que en Latinoamérica no se ha llevado a cabo ningún estudio relacionado, decidimos realizar un estudio piloto involucrando estos mismos polimorfismos pero ahora en población mexicana.

1. INTRODUCCIÓN

MARCO TEORÍCO Y ANTECEDENTES

La diabetes mellitus es un síndrome clínico caracterizado por deficiencia o insensibilidad a la insulina y exposición de los órganos a hiperglucemia crónica; es el principal problema metabólico que padece la población mundial y la enfermedad que con mayor frecuencia complica el embarazo. En América el número de personas con diabetes mellitus fue de 35 millones en el año de 2000 y se espera que se incremente a 64 millones en el año 2025. Para dicho año el número de latinos afectados incrementará al 62%, que representa 40 millones de personas. Este incremento se debe a múltiples cambios en el estilo de la vida moderna, tales como una disminución en la actividad física y el predominio de dietas hipercalóricas que llevan a la obesidad. (1)

La diabetes puede clasificarse como tipo 1 (insulino dependiente) con una incidencia 0.5%, la tipo 2 (no insulino dependiente) 5%, más común en afrocaribeños e inmigrantes asiáticos, y la gestacional con una incidencia de 3-6%, más común en caucásicos. La DG se subclasifica con la finalidad de valorar el riesgo posterior al embarazo, existen 2 clasificaciones de las cuales una se basa en los valores de glucosa en ayuno (Freinkel) y la otra que es pronóstica (Priscilla White). (2) (tablas 1 y 2).

TABLA 1

CLASIFICACIÓN FREINKEL		
Clase A1	Ayuno	< 105 mg/dl
Clase A2	Ayuno	105-130 mg/dl
Clase B	Ayuno	≥ 130 mg/dl

TABLA 2

CLASIFICACIÓN PRONÓSTICA PRISCILLA WHITE	
CLASE	DURACIÓN Y COMPLICACIONES
A	Tratamiento con dieta únicamente
B	Inicio a los 20 años o más, duración de menos de 10 años
C	Inicio a los 10-19 años y duración de 10 a 19 años
D	Inicio a los 10 años o menos, duración mayor a 20 años
R	Retinopatía proliferativa o hemorragia en vítreo
F	Neuropatía con proteinuria diaria >500 mg
RF	Criterio empleado en ambas clases r y f
H	Evidencias clínicas de enfermedad cardiovascular arteriosclerótica
T	Trasplante renal previo

Más de 8 millones de mujeres en Estados Unidos tienen diabetes mellitus previa al embarazo y esta afecta al 1.5% de todos los embarazos. En México, se desconoce la asociación de diabetes preestablecida y el embarazo, aunque se sabe que tiene una relación directa con la frecuencia de diabetes mellitus tipo 2 en población general que es de alrededor del 10% ; del total de estos pacientes una décima parte corresponde a diabetes mellitus tipo 1 y la frecuencia de DG varía de 8 a 12%. (1,4)

La diabetes gestacional es una alteración en el metabolismo de los carbohidratos que se manifiesta por hiperglucemia que se presenta por primera vez durante el embarazo. Por lo regular este trastorno desaparece después del parto y por ello se considera un periodo

de anormalidad condicionado por la gestación. El uso de la palabra gestacional indica que la diabetes es inducida por el embarazo, quizá por cambios fisiológicos exagerados del metabolismo de la glucosa. (4) (tabla 3)

Se ha encontrado que la prevalencia de intolerancia a la glucosa no diagnosticada en mujeres sin embarazo entre los 20 y 40 años de edad fue casi idéntica a la prevalencia de diabetes gestacional; esto se debe a que en el embarazo aumenta la secreción de insulina y otras hormonas diabetógenas para aumentar el metabolismo materno necesario para favorecer la disposición de los nutrientes que requiere el feto para su desarrollo. Por todo esto es que se establece un estado de resistencia a la insulina que genera mayor producción de esta hormona para compensar dicha resistencia, siempre que exista suficiente reserva funcional pancreática. La alteración en la tolerancia a la glucosa durante el embarazo es la mejor prueba disponible como factor predictivo para el desarrollo de diabetes, sobre todo en pacientes genéticamente propensas. (4,5)

TABLA 3

CARACTERÍSTICAS DE LA DIABETES GESTACIONAL
Afecta cerca del 7% del total de embarazos
Se inicia por primera vez durante la gestación
Es un término epidemiológico
Puede repetirse en el siguiente embarazo
Entre 30 y 50 % de los casos experimentan diabetes tipo 2

ANTECEDENTES HISTORICOS

La primera descripción reconocida de la Diabetes Gestacional apareció en 1882, aunque el primer caso se había descrito en 1824 y se definió como cualquier grado de intolerancia a los hidratos de carbono que se inicie o se detecte por primera vez durante el embarazo (6). Los primeros criterios diagnósticos reconocidos o aceptados mundialmente fueron los de Sullivan y Mahan de 1964 donde proponen una serie de pasos a seguir para llegar al diagnóstico de diabetes gestacional; en esta misma época se descubre que una de las complicaciones o consecuencias de padecer esta enfermedad son las defunciones perinatales, las cuales se presentan en su mayoría después de las 28 semanas de gestación. Previo al descubrimiento de la insulina era muy raro que un embarazo llegara a término exitosamente en una mujer con diabetes gestacional. La mortalidad perinatal ha disminuido abruptamente desde el uso de la insulina, sin embargo aún con el uso de ésta los abortos y óbitos se siguen presentando pero se ha observado una disminución en la incidencia de los mismos. Con el adecuado control prenatal, con las técnicas para medir bienestar fetal, el control estricto de la glicemia, el ultrasonido, un parto inducido a tiempo y los avances en los cuidados intensivos neonatales la morbimortalidad perinatal ha disminuido notablemente. (7,8) (figura 1)

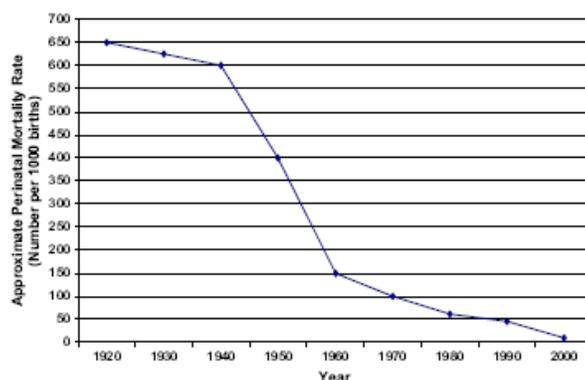


Figura 1. Tasa estimada de aborto en mujeres diabéticas entre 1920-2000.

EPIDEMIOLOGIA

La prevalencia de la DG varía en proporción directa con la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en cualquier población o grupo étnico. La DG representa cerca del 95% de todos los embarazos complicados con diabetes. En los Estados Unidos la DG afecta 6 a 8 % de todos los embarazos, lo que representa 135,000 a 200,000 casos al año. En México la frecuencia varía desde 8 hasta 12%. (2)

Los estudios de diversos grupos étnicos han informado las siguientes cifras de frecuencias: 0.4% en raza caucásica, 1.5% en raza negra, 3.5 a 7.3% en asiáticas y hasta 16% en nativas americanas. En nuestro medio se ha mencionado una frecuencia que varía entre 4 y 11% de la población obstétrica. Respecto a la edad de la madre se ha señalado que la incidencia es de 0.4 a 0.5% en menores de 25 años y de 4.3 a 5.55% en mayores a esa edad. Lo cierto es que la frecuencia de este trastorno se ha duplicado en la última década, en forma paralela a la llamada pandemia metabólica que afecta a las sociedades modernas. (6)

El grupo WHO Ad Hoc Diabetes desde 1992 hizo un estudio poblacional para mostrar que existen diferencias marcadas en las tasas de diabetes e intolerancia a la glucosa en las diferentes poblaciones, que varían desde niveles tan bajos como del 1% hasta mayores del 10% (9).

King *et al.* (10), realiza una recopilación de varias investigaciones donde encuentra que existe una prevalencia especialmente alta de DG en las mujeres Zuni de la India (14.3%), las mujeres chinas, las que viven en Melbourne pero nacieron en la India (13.8 % y 15%, respectivamente), y las mujeres asiáticas en Illawara, Australia (11.9%). Hasta el momento no podemos saber si estas etnias o si la situación geográfica realmente representan verdaderas diferencias en cuanto a la prevalencia de DG, ya que la manera de

hacer el diagnóstico, el tamizaje, incluso las cargas de glucosa orales e IV que se utilizan son distintas en cada región. Por ejemplo, Dooley *et al* (11), demostró que la etnicidad así como la edad materna y el grado de obesidad se deben tomar en cuenta cuando se comparen las prevalencias de DG en las distintas poblaciones; estudió el riesgo relativo para DG y observó que esta era mayor en negros (1.81 con un IC del 95% 1.13, 2.89) y en hispanos (2.45 con un IC del 95% 1.48,4.04) que en mujeres blancas. Con este estudio trató de demostrar que la etnicidad y la situación geográfica también deben considerarse como un factor de riesgo importante para esta enfermedad. Apoyando a todo esto en el 2002 Gunton (12) realiza nuevamente un estudio en que encuentra que las mujeres asiáticas tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad que las blancas (31.7% y 14%, respectivamente $P=0.02$) sin importar que las asiáticas mostraron en su mayoría índices de masa corporal por bajos.

La *National Health and Nutrition Examination Surveys* (NHANES) hizo un seguimiento de 16 años (1984 al 2000) en estados unidos para obtener la prevalencia de diabetes en general. Concluyeron su estudio reportando que el riesgo para padecer diabetes al nacimiento es de 31.2 % para mujeres blancas no hispanas vs un 52.5% en las hispanas comparado contra un 26.7% para hombres no hispanos blancos contra 45.5% hispanos (13). La prevalencia global (mundial) en el año 2000 es de 2.8 % lo que equivaldría a 171 millones y se proyecta que en el 2030 la prevalencia aumente a 4.4% o sea 366 millones de personas; dicho incremento se debe principalmente a la nueva epidemia de obesidad que se esta esparciendo por todo el mundo de manera exponencial, a la inactividad física, a la urbanización y a la edad poblacional que cada ves tiende a la inversión piramidal (14-15).

Existen múltiples factores de riesgo para la diabetes en general dentro de las cuales destacan el sobre peso, la raza o etnia, así como la historia familiar; para DG se encuentran como principales factores de riesgo a la edad materna avanzada, el peso, intolerancia a la insulina, la paridad, el antecedente de macrosomía en embarazo previo e historia familiar de diabetes. (16) (tabla 4)

TABLA 4

FACTORES DE RIESGO PARA DIABETES GESTACIONAL
<p>Factores maternos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edad avanzada • Multiparidad • Peso antes del embarazo • Peso ganado durante el embarazo • IMC mayor de 27 • Estatura baja • Alfa talasemia • Síndrome ovario poliquístico • Ingesta alta de grasa saturada
<p>Historia familiar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Historia familiar de diabetes • Madre con diabetes gestacional
<p>Antecedentes obstetricos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Malformaciones congénitas • Abortos y/0 óbitos • Macrosomias • Cesarea • DG previa
<p>Factores del embarazo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión asociada al embarazo • Multigravidez • Reservas altas de hierro

FISIOPATOLOGIA

El embarazo normal se considera un estado diabetógeno o de resistencia progresiva al efecto de la insulina, dado los cambios en el patrón de secreción de ésta y a las modificaciones en la sensibilidad a la acción de la misma. Durante el primer trimestre y las etapas iniciales del segundo se eleva la sensibilidad a la insulina, lo que se atribuye a las mayores concentraciones de estrógenos circulantes. Este fenómeno incrementa el depósito de energía, sobre todo en el tejido adiposo, con expansión del mismo. A partir de las 24 a 28 semanas de gestación aumenta paulatinamente la resistencia a la insulina, alcanzando los niveles que se observan en paciente diabéticas tipo 2. Esta resistencia hormonal de la mujer embarazada parece deberse a una combinación de adiposidad materna y a los efectos desensibilizadores de varias sustancias producidas por la placenta, lo que se evidencia por el rápido abatimiento de la resistencia casi a las 24 horas posteriores al parto. (6)

Además de los cambios en la distribución y volumen del tejido adiposo, aumenta gradualmente la concentración de nutrientes conforme progresa el embarazo, lo cual contribuye al desarrollo del feto; en consecuencia, aumentan la glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos, los triglicéridos y los oligoelementos. Las células β del páncreas elevan la secreción de insulina en un intento de compensar la resistencia a la insulina del embarazo, lo que origina pequeños cambios en la concentración de insulina en el curso de la gestación, comparados con los grandes cambios en la sensibilidad a la misma. El músculo esquelético es el sitio principal para utilizar la glucosa corporal, y junto con el tejido adiposo, empiezan a ser resistentes al efecto de la insulina, lo que es más evidente durante la segunda mitad del embarazo. Un embarazo normal se caracteriza por aproximadamente un 50% de disminución en la disponibilidad de glucosa mediada por

insulina. Barbour señalan un incremento en la secreción de insulina hasta de 200% para tatar de mantener euglicémica a la madre. (6)

Una gran cantidad de sustancias producidas por la placenta y por los adipocitos (son las que reprograman la fisiología materna y causan este estado de resistencia a la insulina para dirigir los nutrientes hacia el feto en desarrollo, sobre todo en la segunda mitad del embarazo. (6) (tabla 5)

TABLA 5

SUSTANCIAS IMPLICADAS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA
• Lactógeno placentario
• Hormona placentaria de crecimiento
• Prolactina
• Hormona liberadora de corticotropina-cortisol
• Insulinasa
• Factor de necrosis tumoral α
• Adipocitocinas (lectinas, resistina, visfatina, adiponectina)

A) Hormonas con acción diabetógena leve:

- Estrógeno → Cortisol libre
- Progesterona → Glicemia
- Prolactina → Insulinemia
- Cortisol → Insulinemia

B) Hormonas con acción diabética mayor, con acción post-receptor

- Lactógeno placentario
 - ↑ Lipólisis materna
 - ↑ Acción de resistencia periférica por alteración transportador Glut 4 (17)

El lactógeno placentario se eleva hasta 30 veces durante la gestación. Esta hormona pertenece al grupo de la hormona de crecimiento, e incluso se la considera una hormona contra insulínica. Otra hormona es la placentaria de crecimiento, que difiere de la hormona hipofisiaria en solo 13 aminoácidos; esta hormona se eleva entre 6 y 8 veces durante la gestación y parece que reemplaza la hormona de crecimiento hipofisiaria en la circulación materna alrededor de la semana 20 de gestación y contribuye a aumentar el grado de resistencia a la insulina. Evidencias recientes han mostrado que esta última hormona incrementa la formación de la subunidad P85 a la subunidad PI-3K (fosfatidil inositol 3 cinasa). Las adiponectinas y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) producidas por la placenta y por los adipocitos son sustancias activas que también contribuyen a la resistencia a la insulina en la embarazada. En los obesos hay una correlación positiva entre el TNF- α y el índice de masa corporal (IMC) con la hiperinsulinemia. El TNF- α impide la señal de la insulina al aumentar la fosforilación de residuos de serina-treonina del IRS-1 (sustrato del receptor de insulina-1) e impedir la fosforilación de tirosina tanto en la subunidad β del mismo receptor de insulina, como del IRS-1. Una de las primeras sustancias implicadas en las modificaciones en la fisiología de la insulina en el embarazo, fue la enzima placentaria que aumenta la degradación de la hormona a este nivel. (6)

Existen otras enzimas que degradan a otras hormonas, como la vasopresinasa que en algunas mujeres tiene actividad más intensa en degradar a la vasopresina, lo que podría inducir diabetes insípida gestacional, o bien la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I, que degrada a algunos esteroides naturales e impide su paso hacia el feto. Por estos motivos debemos considerar que la insulinasas debe participar en la mayor degradación de la insulina materna. (18)

En el embarazo normal se reduce hasta 40% el transporte de glucosa mediada por insulina en los tejidos periféricos y aun mas en la diabetes mellitus gestacional (65%), en comparación con mujeres obesas no embarazadas. Normalmente, al fijarse a su receptor la insulina activa a la subunidad b del mismo, la que adquiere actividad de tirosincinasa. Posteriormente se activa el IRS-1, lo cual causa la activación de la PIP-3K, lo que al final permite la movilización de los transportadores de glucosa (GLUT-4) hacia la membrana celular, permitiendo la entrada de la glucosa a la célula para su metabolismo. (6,18)

Al igual que en el músculo esquelético, el GLUT-4 está disminuido en el tejido adiposo de las mujeres embarazadas, y es aún menor en la diabetes gestacional; además, esta alterada la translocación de estos transportadores. Los cambios moleculares en el adipocito durante el embarazo muestran reducción en la transcripción del PPAR γ , receptor nuclear que regular la transcripción de varios genes centrales en el metabolismo del adipocito (adiponectina, lipoprotein lipasa, la proteína P-2 fijadora de ácidos grasos intracelulares y la proteína no acoplada a mitocondria). La adiponectina plasmática se encuentra disminuida en mujeres con DG; se considera un sensibilizador de insulina, al

actuar sobre una enzima clave en la regulación energética celular, la AMP cinasa, por lo que estimula la captación de glucosa en el músculo esquelético y disminuye la neoglucogénesis hepática. (6) (figura 2)

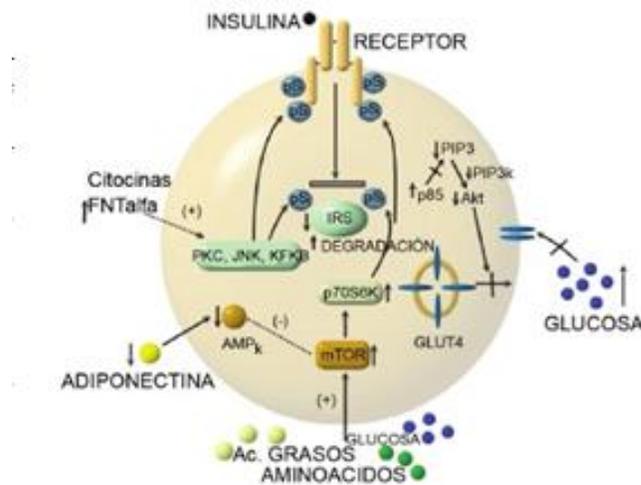


Figura 2. Cambios celulares que contribuyen a la resistencia a la insulina. El exceso de citosinas y de nutrientes, así como la baja de adiponectina modifican la formación de factores de transcripción y alteran la fosforilación del receptor de insulina y del IRS-1, que son rápidamente degradados; al final disminuye la movilización de GLUT-4 a la membrana.

DIAGNOSTICO

Sería ideal que las pacientes fueran examinadas antes de la concepción, ya que algunas podrían no estar enteradas que padecen diabetes mellitus. La mayoría de los autores realiza una prueba de escrutinio con 50 g de glucosa oral entre las semanas 24 y 28 de la gestación. Una cifra de 140 mg/dl a la hora de la toma identifica al 80% de las mujeres con DG o bien 130 mg/dl a la hora, identifican al 90%. Sin embargo, a pesar de tener la mayor sensibilidad (79%) y especificidad (87%) de todas las pruebas de escrutinio disponibles, ésta se reserva para pacientes con alto riesgo para padecer la enfermedad, más que para la población general. Anteriormente se consideraba como prueba ideal de diagnóstico a la curva de tolerancia oral a la glucosa con ingesta de 100 g y toma a las 3 horas; sin embargo, con esta prueba se obtiene una reproducibilidad sólo en 78% de los casos. Jovanovic ha demostrado en un estudio piloto que la monitorización continua de glucosa es mejor que las determinaciones al azar. Con este método se mide la glucosa cada 5', y se realizan 288 determinaciones por día. En total, se realizan un promedio de 750 muestras en 72 horas y de esta manera se trata de establecer la cifra de glucosa durante la segunda mitad de la gestación. (6,8) (tabla 6)

TABLA 6

ESTUDIO JOVANOVIC: GLUCOSA NORMAL CON MONITORIZACIÓN CONTINUA	
Glucosa promedio	83±18 mg/dl
Ayuno	75±12
Preprandial	78±11
Postprandial	110±16
1 hr	105±13
2 hr	97±11
3 hr	84±14
Glucosa nocturna	68±10

En mujeres no diabéticas el máximo valor postprandial se obtiene aproximadamente a los 70±13', con cifras de glucemia de 110±6 mg/dl, a diferencia de las mujeres con DG, en quienes la cifra máxima de glucosa postprandial ocurre aproximadamente a los 90' sin variaciones en las 3 comidas habituales. Asimismo, con esta técnica se ha demostrado hipoglucemias, la cual es asintomática hasta en 60% de las mujeres tratadas con insulina y en 28% de las tratadas con glibenclamida. (6)

La asesoría prenatal es uno de los aspectos más importantes que debemos considerar en el manejo de mujeres con diabetes pregestacional. Un adecuado control glucémico y niveles bajos de hemoglobina glucosilada A1c (HbA1c) disminuyen los riesgos de anomalías congénitas en los fetos, así como el riesgo de preeclampsia. CEMACH (Confidential Enquiry into Maternal and Child Health) recomiendan que toda mujer con diabetes debería tener acceso a servicio médico capacitado previo a la concepción

independientemente de la clase social y escolaridad. Como mínimo la asesoría debería incluir:

1. Consejería sobre dieta y estilo de vida
2. Suspender tabaquismo
3. Suplementación con ácido fólico a dosis altas
4. Asesoría y manejo de las complicaciones propias de la diabetes
5. Establecer metas en los niveles de glucosa e instruir sobre el auto monitoreo con glucómetro, para asegurar un mejor control
6. Discusión de los riesgos y estrategias planteadas durante el embarazo (3)

El *gold standard* para diagnóstico de DG es la curva de tolerancia a la glucosa de 3 horas con 100 gr glucosa. Esta prueba fue creada originalmente para diagnosticar la Diabetes tipo 2. Cuando fue utilizada por primera vez en mujeres embarazadas se esperaba que pudiera distinguir aquellas susceptibles de contraer DM2 en la vida adulta y poder así iniciar tratamiento oportunamente. No fue creada para prevenir complicaciones durante el embarazo. Las condiciones de esta prueba son muy estrictas: los 3 días previos a la prueba se debe tener una ingesta máxima de 150 gr de carbohidratos por día y entre 8 y 14 horas de ayuno, sólo se permite la ingesta de agua. El tabaquismo está prohibido las 12 hrs previas al examen. Antes de la primera medición de glucosa en ayuno la paciente tendrá que reposar 30 minutos. Después de la primera toma, se le da a beber 100 gr glucosa, la cual debe ingerirse máximo en 5 minutos. Las mediciones séricas de glucosa se tomarán a la hora, 2 y

3 horas posteriores a la toma. Durante la prueba está prohibido caminar y fumar. Después de la última muestra de sangre, la paciente tendrá que comer algo para prevenir la hipoglucemia de rebote. Los valores de corte originales fueron los propuestos por O'Sullivan y Mahan en sangre venosa. Hoy en días las mediciones se hacen preferentemente en el plasma. Existen actualmente varios autores que han propuesto distintos puntos de corte, "Carpenter y Coustan" (C&C), "National Diabetes Data Group" (NDDG), "American Diabetes Association" (ADA) y los de "American College of Obstetricians and Gynecologists" (ACOG). En México actualmente los más utilizados son los de la ADA y ACOG modificados en 1997 y los de C&C en 1982. (19,20) (tabla 7)

TABLA 7

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA DIABETES GESTACIONAL					
	Carga glucosa	Ayuno	1 hora	2 horas	3 horas
C&C	100 g	95 mg/dl	180 mg/dl	155 mg/dl	140 mg/dl
NDDG	100 g	105 mg/dl	190 mg/dl	165 mg/dl	145 mg/dl
O'SULLIVAN Y MAHAN	100 g	90 mg/dl	165 mg/dl	145 mg/dl	125 mg/dl
OMS	75 g	126 mg/dl		140 mg/dl	
ADA Y ACOG	100 g	95 mg/dl	180 mg/dl	160 mg/dl	

GENÉTICA

La diabetes mellitus tipo I, tipo II y la gestacional son consideradas enfermedades multifactoriales; se han asociado polimorfismos, deleciones, inserciones y microsatélites (short tandem repeats) con la diabetes gestacional. Existe evidencia suficiente de la DG se hereda, ya que mujeres con historia familiar de diabetes tiene un riesgo alto para diabetes gestacional independientemente si es de origen materno o paterno. Además tanto la deficiencia de insulina como la resistencia a la misma, lo cual es el principal desencadenante de la Diabetes, también se hereda con una sensibilidad de 0.53 -0.55 (16). La recurrencia en embarazos posteriores pese a las modificaciones en la dieta apoya el concepto de componentes genéticos en la enfermedad. (21)

La figura 3 muestra las representaciones esquemáticas de una estrategia para buscar genes predisponentes para DG.

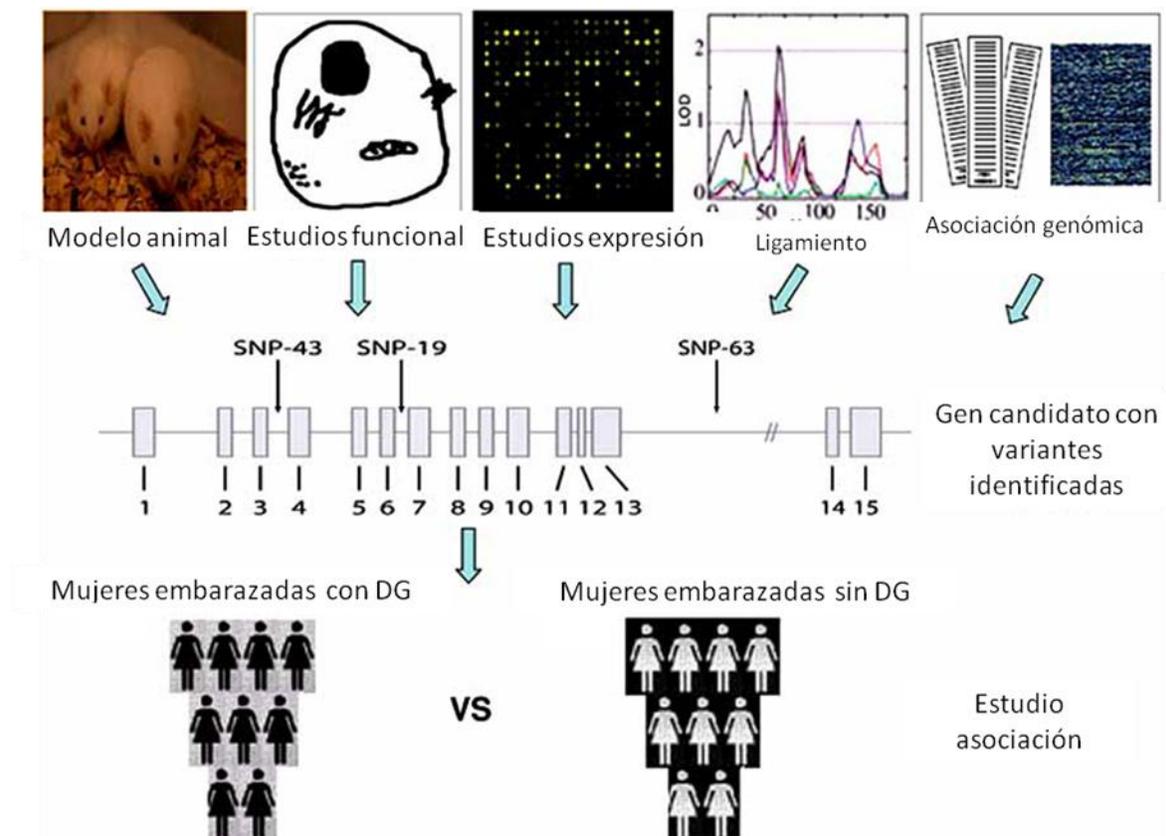


Figura 3. Representación esquemática para encontrar la predisposición genética para diabetes gestacional. Los genes candidatos se seleccionan de estudios de ligamiento (ej, genome-wide scans), estudios de asociación genómica (ej, SNPs), estudios funcionales (ej, la vía de secreción y señalización de insulina), perfil de expresión (Microarreglos de cDNA) y modelos animales (ej, *Leprdb/+* mice). Los estudios de asociación se realizan mediante variantes (en su mayoría SNPs) en los genes candidatos. La frecuencia alélica de estos SNPs se compara entre mujeres con diabetes gestacional y controles de embarazos sanas para conocer si la variante está asociada a diabetes gestacional. (Modificada de Shaat N, Groop L. Genetics of Gestational Diabetes Mellitus. *Cur Med Chem* 2007;14:569-583).

Diversidad genética humana

La mayoría de las tasas mutacionales estimadas describen la detección de mutaciones deletéreas con efecto obvio sobre el fenotipo. Muchas mutaciones, sin embargo no son deletéreas si no se piensa son selectivamente neutrales; incluso algunas pueden ser benéficas. Durante el curso de la evolución la adquisición de nuevas variantes nucleotídicas han asegurado un alto grado de diversidad individual y genética. (22)

Concepto de polimorfismo genético

La secuencia de DNA de la misma región de un cromosoma son muy similares entre los cromosomas de los diferentes individuos de todo el mundo. De hecho un segmento escogido al azar del DNA humana de cerca de 1000 pares de bases en longitud contiene en promedio sólo una base que varía entre los dos cromosomas homólogos heredado de ambos padres. Cuando una variante es tan común que es encontrada en más del 1% de los cromosomas en la población general, la variante constituye algo que se conoce como un

polimorfismo genético. En contraste alelos con frecuencias de menos del 1% son por convención llamados variantes raras. Muchas variantes pueden no tener un efecto deletéreo, mientras otras variantes como los polimorfismos pueden predisponer a enfermedades. (22)

Hay muchos tipos de polimorfismos. Algunos son debidos a variantes que consisten de deleciones, duplicaciones, triplicaciones y así de cientos a millones de pares de bases. Un polimorfismo puede también cambiar en una o pocas bases en el DNA localizado entre genes o dentro de intrones. Los cambios de secuencias también pueden ser localizados dentro de las regiones codificantes de los genes, resultando en diferentes variantes proteicas. Otros se localizan en regiones regulatorias y también pueden ser importantes en la determinación del fenotipo al afectar la transcripción o estabilidad del RNAm. (22)

Los polimorfismos son elementos claves en la investigación y práctica de la genética. Por ejemplo marcadores genéticos son de enorme importancia como herramienta para el mapeo de un gen en una región particular de un cromosoma por un estudio que se conoce como análisis de ligamiento. Otra utilidad de los polimorfismos esta basado en un esfuerzo para proveer la medicina personalizada basada en genómica en la cual se trata de ver si individuos portadores de una variante polimórfica incrementan o disminuyen el riesgo para enfermedades comunes en el adulto. Tales como enfermedades cardiacas, cáncer y diabetes. (22)

Polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs)

El más común y simple de todos los polimorfismos es el polimorfismo de un nucleótido simple. Los SNPs usualmente tienen solo dos alelos que corresponden a las dos diferentes bases que ocupan una localización particular en el genoma. Los SNPs son

comunes y ocurren en promedio una vez cada mil pares de bases, lo cual significa que hay en promedio 3 millones de diferencias entre 2 genomas humanos. (21,22)

Identificar la causa genética de la DG nos dará eventualmente una mejor visión de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, además de que incrementará las opciones para prevenir la aparición de complicaciones tanto en la madre como en el feto. A continuación se enlistan algunos de los genes que ya se han estudiado implicados a la diabetes gestacional. (22)

- *HLA-DQ* (DQ2(DQA1*0501-DQB1*0201) y DQ8(DQA1*0301-DQB1*0302)) o combinación von alelos de HLA-DR (23,24)
- *INS* (insulina) (25-27)
- *KCNJ11* (canal de potasio, subfamilia J, miembro 11) (28)
- *SUR1* o *ABCC8* (receptor de sulfonilurea 1) (29,30)
- *CAPN10* (calpaina-10) (31,32)
- *ADRB3* (receptor B3-adrenérgico) (33)
- *ENPP1* (Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1) (34, 35)
- *INSR* (receptor de insulina) (36-38)
- *IGF2* (factor de crecimiento similar a la insulina 2) (39)
- *IRS1* (receptor de insulina substrato 1) (39)
- *SLC2A4* (Familia cargador de solutos 2 (transportador facilitado por glucosa, miembro 4) (40)
- *ADIPOQ* (adiponectina) (41)
- *LEP* (leptina) (42)
- *PBEF1* (Factor 1 de la colonica pre B celular) (43)

- *MBL2* (lectina 2 de unión a la manosa) (44)
- *IL* (interleucina) (45)
- *HFE* (hemocromatosis) (46)
- *MODY* (maturity onset diabetes of the Young) (47)
- *HNF1A* (factor 1 alfa hepatocito nuclear) (48)
- *TCF7L2* (factor de transcripción 7 como 2) (49)
- *IPF1* (factor 1 promotor insulina) (50)
- mtDNA (mitochondrial DNA) (49)
- *CDKALI* (kinasa dependiente de cinasa 5 asociado a la subunidad de la proteína 1 como 1) (50)

SNPs asociados a diabetes gestacional en nuestro estudio

La mayor parte de los estudios en búsqueda de polimorfismos como factores de riesgo para DG se han llevado a cabo en Dinamarca y China donde la incidencia de dicha enfermedad es muy baja en comparación con México. Varios estudios proveen evidencia de que la DG es una enfermedad poligénica. En Dinamarca se hizo un estudio en el 2007 a 283 mujeres embarazadas con DG a las cuales les estudiaron 11 polimorfismos distintos asociados en estudios previos a DM2 y se observó que de éstos 10 presentaron una asociación estadísticamente significativa como factores de riesgo para DG, todos con una OR por arriba de 1, con un IC 95%; los polimorfismos *rs7903146/TCF7L2* y el *rs7756992/CDKALI* presentaron el mayor riesgo con una OR 1.45, P=0.00013 y OR 1.22 con P=0.04 respectivamente con un IC 95%. Se concluyó que mientras más polimorfismos de los estudiados en el estudio presente una paciente mayor será el riesgo de padecer diabetes gestacional. (51)

En otro estudio realizado en China se estudiaron 2029 mujeres embarazadas con diabetes gestacional, se analizaron 9 SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) y se encontró 8 polimorfismos asociados a la enfermedad y de éstos nuevamente el gen *CDKALI* estuvo implicado y con el OR más significativo de 1.27 con una $P=0.0006$ pero ahora con un polimorfismo distinto *rs10946398*. (52)

JUSTIFICACION

Estudios genéticos y epidemiológicos sugieren que existe una asociación entre la diabetes gestacional y la diabetes mellitus tipo 2. Ambas son enfermedades multifactoriales que se caracterizan por disfunción de las células beta y resistencia a la insulina. Recientemente, algunos estudios han evidenciado que algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en algunos genes podrían ser factores de riesgo en las poblaciones estudiadas. En México y en Latinoamérica no se han realizado estudios similares a éstos; por lo tanto, éste sería el primer estudio que incluya a los polimorfismos como factores de riesgo directos para diabetes gestacional en nuestra población. México al igual que otros países latinoamericanos tienen una gran incidencia de diabetes gestacional, esto debido a los malos hábitos higiénico-dietéticos de la población, el alto índice de obesidad, la incidencia de síndrome metabólico, la multiparidad y la edad mayor de 35 años, por lo que no sería inapropiado pensar que deba existir un componente genético poblacional o racial que pueda estar influyendo también en la susceptibilidad para contraer la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las frecuencias alélicas en pacientes embarazadas con diabetes gestacional y pacientes embarazadas sin diabetes gestacional para los SNPs rs7903146 y rs7756992 de los genes TCF7L2 y CDKAL1 respectivamente, en pacientes del Servicio de Perinatología del Hospital General de México entre el 1° de noviembre de 2010 y el 30 de junio de 2011?

¿Cuál es la asociación de cada uno de los SNPs rs7903146 y rs7756992 de los genes TCF7L2 y CDKAL1 respectivamente, en pacientes con Diabetes Gestacional comparado con embarazadas sin Diabetes Gestacional del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General de México entre el 1° de noviembre de 2010 y el 30 de junio de 2011?

OBJETIVOS

- Identificar las frecuencias alélicas de los SNPs rs7903146 y rs7756992 de los genes TCF7L2 y CDKAL1 respectivamente, en pacientes embarazadas con diabetes gestacional y pacientes embarazadas sin diabetes gestacional del Servicio de Embarazo de Alto Riesgo del Hospital General de México.
- Determinar los SNPs rs7903146/rs7756992 de los genes TCF7L2 y CDKAL1 como factores de riesgo asociados a diabetes gestacional en el Servicio de Embarazo de Alto Riesgo del Hospital General de México.

HIPÓTESIS

Las frecuencias alélicas para los SNPs rs7903146 y rs7756992 de los genes TCF7L2 y CDKAL1 respectivamente, serán mayores en pacientes embarazadas con diabetes gestacional que en aquellas pacientes embarazadas sin diabetes gestacional en el Servicio de Embarazo de Alto Riesgo en el Hospital General de México.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo y diseño de estudio

- Se va a llevar a cabo un estudio piloto para determinar la presencia de los polimorfismos así como su posible asociación con la diabetes gestacional

Selección de la muestra

- **Muestreo**

Se realizará un muestreo aleatorio simple sobre los registros de la libreta de un año calendario a la fecha de inicio, éstas serán numeradas de acuerdo a su apellido y posteriormente sorteadas con un programa estadístico para la obtención aleatoria de 30 casos y 30 no casos.

- **Tamaño de muestra**

Con la finalidad de obtener representatividad se utilizará un muestreo aleatorio simple con 30 seleccionadas enfermas y 30 que no presentaron diabetes gestacional. Al ser un muestreo aleatorio esperamos que represente al universo de donde provienen, basándonos en el teorema de límite central.

Criterios inclusión

- **Pacientes con diabetes gestacional**

- Mujeres embarazadas con diagnóstico de diabetes gestacional, utilizando para el diagnóstico una prueba tamiz positiva (>180 mg/dl) o una CTOG utilizando los criterios de O'Sullivan (2 o + valores alterados).
 - Mujeres embarazadas de 20 a 35 años de edad.
 - Mujeres embarazadas que no hayan presentado diabetes gestacional en algún embarazo previo o que hayan tenido un producto macrosómico (> 4000 g).
 - Mujeres embarazadas que tengan un índice de masa corporal entre 20 y 30 previo al embarazo
- **Mujeres embarazadas controles**
 - Mujeres embarazadas con prueba de Tamiz negativa y/o CTOG normal
 - Mujeres embarazadas de 20 a 35 años de edad.
 - Mujeres embarazadas que no hayan presentado diabetes gestacional en algún embarazo previo o que hayan tenido un producto macrosómico (> 4000 g).
 - Mujeres embarazadas que tengan un índice de masa corporal entre 20 y 30 previo al embarazo

Criterios de exclusión

- Toda mujer embarazada que tenga alguna enfermedad crónica degenerativa previa al embarazo o que la haya desarrollado durante el mismo.
- Antecedente de preeclampsia
- Obesas (IMC >30)
- Padres o hermanos con Diabetes Mellitus tipo 1 o 2
- Presentar datos clínicos de resistencia a la insulina (acantosis nigricans)

Criterios de eliminación

- Pacientes y controles a los cuales se extravie, se termine o la calidad del DNA sea defectuoso y no sea posible tomar una muestra nuevamente.

Definición de las variables a evaluar y forma de medirlas

Variables de interés

- **Polimorfismo de nucleótido simple**

Definición conceptual: polimorfismo en la secuencia de DNA que consiste en la variación de una sola base.

Definición operacional: determinar los SNPs rs7903146/rs7756992 de los genes TCF7L2 y CDKAL1 mediante el uso de secuenciación nucleotídica directa.

Escala de la variable: cualitativa nominal

- a. Heterocigota
- b. Homocigota

METODOLOGÍA

EXTRACCION DE DNA GENOMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA

Previo consentimiento informado, se extraerán 2 ml de sangre por punción venosa en cada sujeto a partir de la cual se aislará el DNA genómico mediante el kit *QUICKGENE DNA WHOLE BLOOD (DB-S, FujiFilm Co.)* Se colocarán 30 µl de solución EDB (proteasa) en un microtubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se agregarán 250 µl de sangre total (se recomienda el uso de sangre total colectada en EDTA-2Na o EDTA-2K) y 250 µl de solución LDB (buffer de lisis). Inmediatamente se mezcla el tubo 5 veces invirtiéndolo de arriba hacia abajo, se agita con vórtex a máxima velocidad durante 15 segundos y se centrifuga durante unos segundos. La muestra se incubará a 56°C durante 2 minutos y posteriormente se agregarán 250µl de etanol al 99%. Se repite la agitación con vórtex durante 15 segundos y la muestra se centrifuga unos segundos.

Dentro de los siguientes 30 minutos se realiza el aislamiento de DNA. Se transferirá el lisado dentro del “cartucho” del sistema automático de aislamiento de ácidos nucleicos QuickGene-810 (se transfiere todo el contenido del microtubos en el cartucho) y se procede a la extracción automatizada. El DNA genómico obtenido se resuspenderá en un volumen aproximado de 200µl. Se almacenará la muestra a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION Y PUREZA DEL DNA OBTENIDO

Se determinará la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un

espectrofotómetro. La relación 260/280 permitirá evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se considerarán adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se realizarán electroforesis en geles de agarosa de cada muestra de DNA obtenida para verificar que no exista degradación de este ácido nucleico. La concentración de DNA obtenida se determinará por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/μl.

AMPLIFICACION POR PCR DE LOS GENES TCF7L2 Y CDKALI

Se realizará análisis molecular (amplificación por PCR y secuenciación nucleotídica automatizada) de los SNPs rs7903146/rs7756992 de los genes *TCF7L2* y *CDKALI*, respectivamente. Se efectuará la amplificación por PCR de cada una de las secuencias nucleotídicas colindantes a los SNPs a partir del DNA de las pacientes afectadas con la enfermedad y de las pacientes control, utilizando pares de oligonucleótidos derivados de la misma secuencia.

Cada reacción de amplificación de PCR tendrá un volumen final de 15 μl que contendrá 7.5 μl de HotStarTaq DNA polimerasa (compuesta por 10xPCR buffer que contiene 25mM MgCl₂, 10mM de cada dNTP y 2.5 unidades de HotStarTaq DNA polimerasa), de 50-100 ngs de DNA genómico (volumen variable), 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido) (tabla 8) y agua bidestilada c.b.p. (volumen variable). Se utilizará un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos y

1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizará 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final.

TABLA 8

PRIMEROS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO				
Polimorfismo	Dirección	Oligonucleótidos	Tm (Temperature Melting)	Pb (pares de base)
<i>rs7756992/CDKAL1</i>	Forward	GTGCATTGCTACAATGCATAGC	55.8	202
	Reverse	TCCATAATCCCCTCTTGAAG	52.5	
<i>rs7903146/TCF7L2</i>	Forward	GCAGATGTGATGAGATCTCTG	55.8	253
	Reverse	CCCCTCTAACCTTTTCCTAG	54.6	

Los productos obtenidos de la amplificación se separaròn mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb. Se reconocerán las bandas de interés y se escindirán del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Promega) o el método de unión a silica (Qiagen).

La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinará por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se realizarán nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de cada uno de los SNPs rs7903146/rs7756992 de los genes *TCF7L2* y *CDKALI*. Cada reacción de 10 µl contendrá 2 µl de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxynucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxynucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregará además 1 µl del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 µM, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 10 µl. Para esta reacción de PCR se utilizará un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificarán por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspenderá en 20 µl de formamida y posteriormente se desnaturalizará a 95°C por 5 min. Los productos se analizarán por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 y las secuencias de DNA obtenidas en pacientes enfermas se compararán con las secuencias silvestres de los SNPs ya mencionados de los genes *TCF7L2* y *CDKALI*, con el propósito de determinar las frecuencias alélicas de ambos SPNs.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis descriptivo se realizará con las frecuencias de las variables sociodemográficas de las pacientes y para el componente inferencial se realizará una determinación de proporciones en pacientes sin diabetes gestacional en donde se presentaran los polimorfismos y una proporción para las pacientes con diabetes gestacional. Se va a utilizar una prueba de X^2 y se obtendrá una razón de momios para determinar causalidad.

ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Este protocolo de estudio se apega a las normas establecidas por el Comité Científico y de Ética del Hospital General de México, así como las del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, nacionales e internacionales. Se realizará, registrará y reportará en cumplimiento de los principios de las buenas prácticas clínicas (BPC). El consentimiento informado y su proceso deberán cumplir con leyes y regulaciones aplicables en México, D.F. los pacientes deberán otorgar su consentimiento para los estudios de DNA mediante la firma de una Carta de Información y Consentimiento el cual cumple con lo establecido por la Ley General de Salud en sus capítulos 21 y 22. (anexo 2)

De acuerdo a la ley general de salud en su título segundo , capítulo 17 apartado segundo, nuestro estudio se considera una investigación con riesgo mínimo; estudios que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: Pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva, electrocardiograma, termografía, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 40 ml pro semana, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en lo que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este reglamento, entre otros.

RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS

El presente estudio aportará nuevo conocimiento en México sobre posibles factores de riesgo genéticos para la presentación de DG.

La determinación de nuevos posibles factores de riesgo permitirá al hospital dar una atención más integral así como una vigilancia más estrecha en las pacientes embarazadas de manera oportuna.

Y finalmente lo más importante es que permitirá ofrecer a la paciente una atención integral que considere datos objetivos de riesgo genético.

3. RESULTADOS

Todos los pacientes identificados desde noviembre de 2010 hasta junio de 2011 (32 pacientes con diabetes gestacional) que accedieron a ser estudiados en nuestro protocolo se les realizó una historia clínico-obstétrica completa. Posteriormente fueron examinadas en el Departamento de Embarazo de Alto Riesgo donde cumplieron con todos los criterios de inclusión establecidos en el protocolo (mujeres embarazadas con diagnóstico de diabetes gestacional, utilizando para el diagnóstico una prueba tamiz positiva >180 mg/dl o una CTOG utilizando los criterios de O'Sullivan [2 ó más valores alterados]; mujeres embarazadas de 20 a 35 años de edad; mujeres embarazadas que no hayan presentado diabetes gestacional en algún embarazo previo o que hayan tenido un producto macrosómico (> 4000 g) y; mujeres embarazadas que tengan un índice de masa corporal entre 20 y 30 previo al embarazo.

Se identificaron como controles (30 embarazadas sin DG) aquellas con un embarazo normal con las siguientes características: mujeres embarazadas con prueba de Tamiz negativa y/o CTOG normal; mujeres embarazadas de 20 a 35 años de edad, mujeres embarazadas que no hayan presentado diabetes gestacional en algún embarazo previo o que hayan tenido un producto macrosómico (> 4000 g) y; mujeres embarazadas que tengan un índice de masa corporal entre 20 y 30 previo al embarazo. Todos los controles fueron valorados y examinados en el Servicio de Obstetricia.

Después de haber firmado voluntariamente el consentimiento informado, a las pacientes y controles se les realizó una punción venosa para tomar una muestra de sangre. A partir de ésta se extrajo el DNA, el cual se cuantificó (utilizando un espectrofotómetro) y congeló a -80°C hasta su utilización en los estudios genético-moleculares.

Se eliminó del estudio, 1 control para cada polimorfismo dado que se coaguló la muestra de sangre periférica. De los SNPs *rs7756992/CDKAL1* y *rs7903146/TCF7L2* se incluyeron 29 y 32 pacientes, respectivamente; no fue posible completar la totalidad de las pacientes para el primer polimorfismo dado que hubo problemas con el procesamiento de las muestras posterior a la extracción del DNA (ver tabla 9).

NORMALIZACION DE LA METODOLOGIA

Se tomó muestra de sangre periférica, se extrajo y cuantificó DNA genómico a 32 pacientes con diagnóstico de diabetes gestacional y a 29 pacientes embarazadas sin criterios para diabetes gestacional (controles). Se realizó normalización de la metodología en dos pacientes (paciente 1 y 2). Inicialmente, se amplificaron cada uno de los polimorfismos (*rs7756992/CDKAL1* y *rs7903146/TCF7L2*) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. A continuación, cada producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 1.5% donde se corroboró la amplificación adecuada de los fragmentos génicos. Posteriormente, se purificaron los fragmentos de la PCR y se realizó una segunda PCR utilizando nucleótidos modificados (Big Dye terminator). Finalmente, los productos de esta nueva reacción fueron purificados y se procedió a la secuenciación nucleotídica automatizada.

Una vez que se logró la normalización de las técnicas, a las 30 restantes muestras de las pacientes con diabetes gestacional y a las 27 muestras de las controles se les realizó la misma metodología.

ESTUDIOS MOLECULARES

GELES DE AGAROSA

Por cuestiones de extensión de la tesis, se muestran únicamente los geles de agarosa realizados para los polimorfismos de *rs7756992/CDKALI* y *rs7903146/TCF7L2* en los pacientes con diabetes gestacional 1 y 2

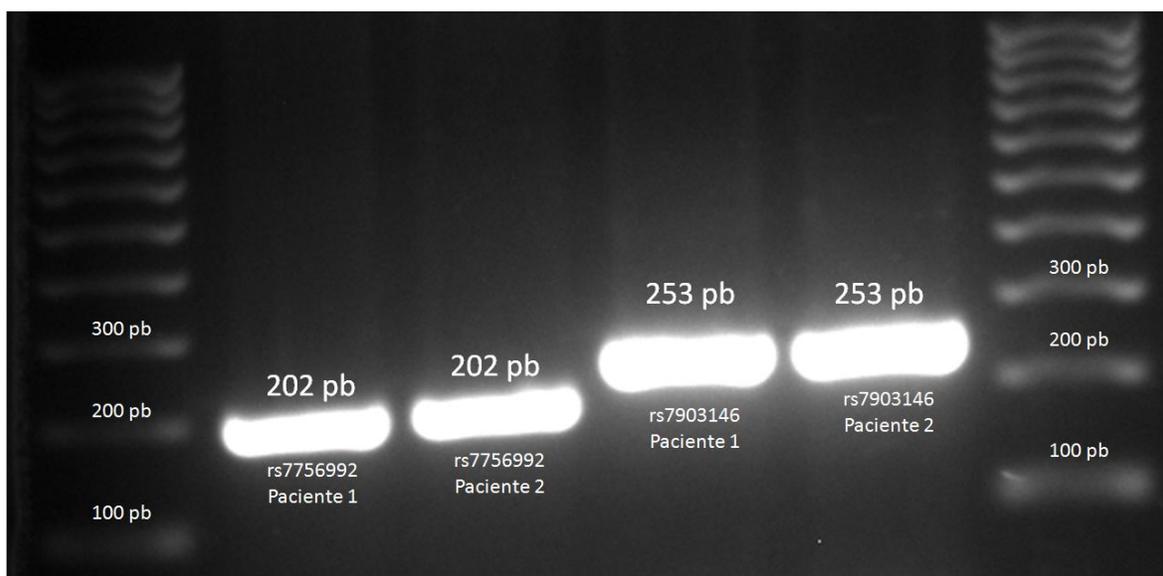


Figura 4. Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas de amplificación de los productos de PCR correspondientes a los polimorfismos *rs7756992/CDKALI* (columnas 2 y 3) y *rs7903146/TCF7L2* (columnas 4 y 5) en los pacientes 1 y 2 con diabetes gestacional. Los números arriba de cada banda representan la longitud en pares de bases de cada amplificado. La descripción debajo de las bandas de amplificación corresponde al polimorfismo y al paciente. La primera y última columna corresponden al marcador de longitud estándar (escala), donde cada amplificado corresponde a 100 pares de bases (pb).

ANALISIS DE SECUENCIACION NUCLEOTIDICA DE LOS POLIMORFISMOS
rs7756992/CDKAL1 y *rs7903146/TCF7L2* EN PACIENTES CON DIABETES
GESTACIONAL Y MUJERES EMBARAZADAS SIN DIABETES GESTACIONAL
(CONTROLES)

Por cuestiones de extensión del protocolo únicamente se muestran un ejemplo de cada uno de los polimorfismos de *rs7756992/CDKAL1* y *rs7903146/TCF7L2*.

***rs7756992/CDKAL1* (A/G)**

Polimorfismo en estado homocigoto A/A

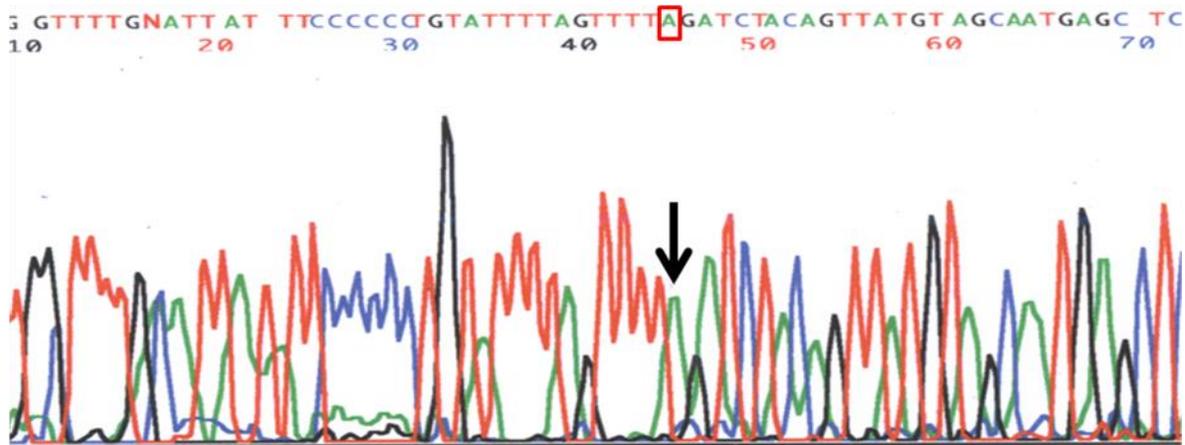


Figura 5. Secuencia nucleotídica parcial del amplificado donde se encuentra el polimorfismo *rs7756992/CDKAL1* en DNA de la paciente 3 con diabetes gestacional. La flecha negra indica en sitio donde se encuentra el polimorfismo. En cuadro rojo encierra un polimorfismo del nucleótido A en estado homocigoto.

Polimorfismo heterocigoto A/G

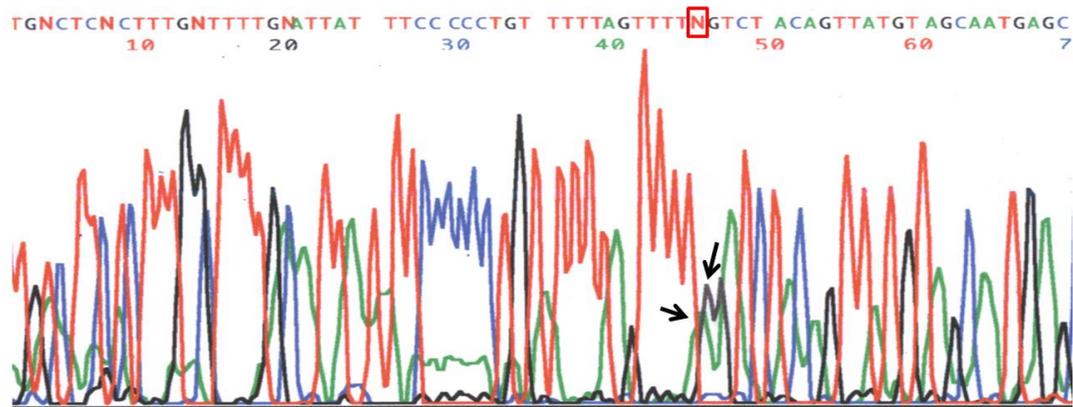


Figura 6. Secuencia nucleotídica parcial del amplificado donde se encuentra el polimorfismo *rs7756992/CDKALI* en DNA de la paciente 7 con diabetes gestacional. Las flechas negras indican los sitios donde se encuentran los polimorfismos heterocigotos (A y G). En cuadro rojo encierra un polimorfismo del nucleótido “N” en estado heterocigoto, lo que corresponde a que los alelos paterno y materno son distintos en la misma persona (para ese nucleótido).

Polimorfismo en estado homocigoto G/G

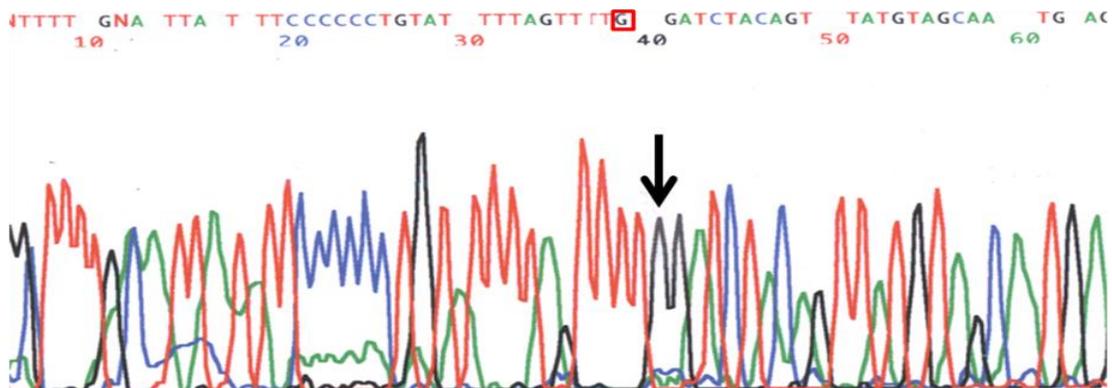


Figura 7. Secuencia nucleotídica parcial del amplificado donde se encuentra el polimorfismo *rs7756992/CDKALI* en DNA de la paciente 11 con diabetes gestacional. La flecha negra indica en sitio donde se encuentra el polimorfismo. El cuadro rojo encierra un polimorfismo del nucleótido G en estado homocigoto.

rs7903146 (C/T)

Polimorfismo en estado homocigoto C/C

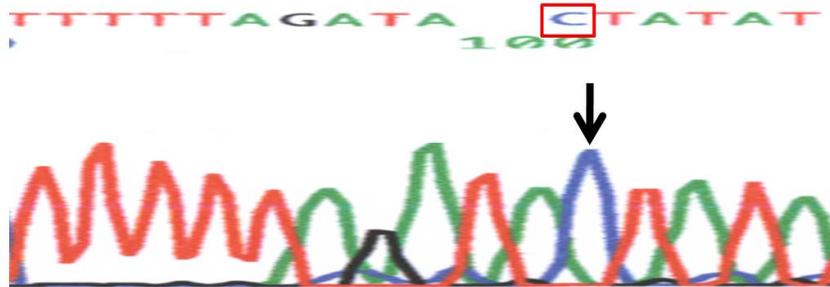


Figura 8. Secuencia nucleotídica parcial del amplificado donde se encuentra el polimorfismo *rs7903146/TCF7L2* en DNA de la paciente 1 con diabetes gestacional. La flecha negra indica el sitio donde se encuentra el polimorfismo. En cuadro rojo encierra un polimorfismo del nucleótido C en estado homocigoto.

Polimorfismo en estado heterocigoto C/T

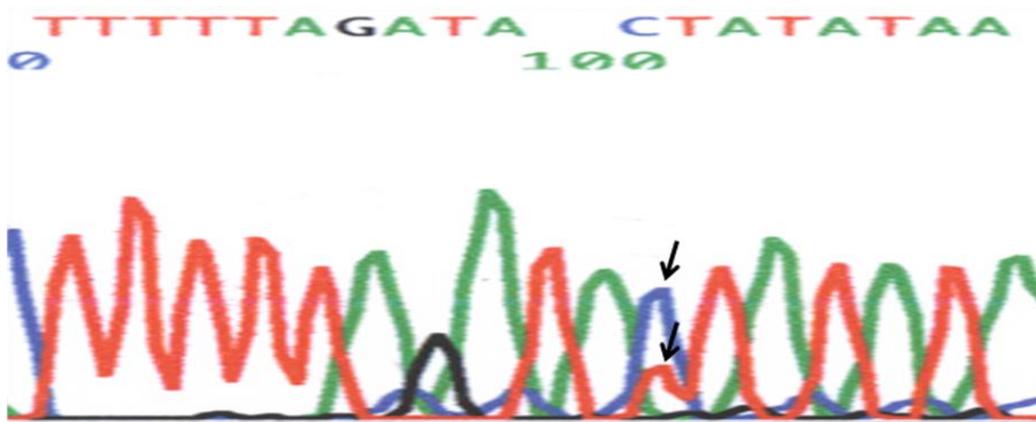


Figura 9. Secuencia nucleotídica parcial del amplificado donde se encuentra el polimorfismo *rs7903146/TCF7L2* en DNA de la paciente control 2 embarazada sin diabetes gestacional. Las flechas negras indican los sitios donde se encuentran los polimorfismos heterocigotos (C y T), lo que corresponde a un heterocigoto donde los alelos paterno y materno son distintos en la misma persona (para ese nucleótido).

TABLA 9

**DISTRIBUCIÓN DE ALELOS EN PACIENTES CON DG Y CONTROLES PARA
LOS POLIMORFISMOS *RS7903146/TCF7L2* Y *RS7756992/CDKAL1***

SNP	DG	Control	p	OR (95%CI)
<i>rs 7756992/</i>	N=29	N=29		
<i>CDKAL1</i>	n (%)	n (%)		
Alelo				
A	39 (67.24)	40 (68.96)	0.84	0.92 (0.42 – 2.02)
G	19 (33.76)	18 (31.04)	0.84	1.08 (0.50 -2.36)
Genotipo				
AA	12 (41.38)	13 (44.83)	0.79	0.87 (0.31 – 2.46)
AG	15 (51.72)	14 (48.28)	0.79	1.15 (0.41-3.22)
GG	2 (6.9)	2 (6.9)	0.99	1 (0.13-7.62)
 <i>rs 7903146/</i>				
<i>TCF7L2</i>	N=32	N=29		
Alelo	n(%)	n(%)		
C	53 (82.81)	51 (87.93)	0.5266	0.72 (0.25-2.0)
T	11 (17.18)	7 (12.06)	0.5266	1.39 (0.50-3.89)
Genotipo				
CC	23 (71.87)	22 (75.86)	0.89	0.89 (0.28-2.84)
CT	7 (21.87)	7 (24.13)	0.72	0.8 (0.24-2.66)
TT	2 (6.25)	0 (0.0)	0.19	3.53 (0.15-81.84)

Se analizaron un total de 29 pacientes y 29 controles para el polimorfismo *rs 7756992/CDKAL* ; 32 pacientes y 29 controles del SNP *rs 7903146/TCF7L2*.

Polimorfismo *rs 7756992/CDKAL*

Frecuencias alélicas

- Alelo A: Pacientes 39/58 (67.24%), controles 40/58 (68.96%), OR de 0.92 (IC 0.42-2.02) y p 0.84.

- Alelo G: Pacientes 19/58 (33.76%), controles 18/58 (31.04%), OR de 1.08 (IC 0.50-2.36) y p 0.84.

Genotipos

- Homocigoto AA: Pacientes 12/29 (41.38%), controles 13/29 (44.83%), OR de 0.79 (IC 0.31-2.46) y p 0.84.
- Heterocigoto AG: Pacientes 15/29 (51.72%), controles 14/29 (48.28%), OR de 1.15 (IC 0.41-3.22) y p 0.84.
- Homocigoto GG: Pacientes 2/29 (6.9%), controles 2/29 (6.9%), OR 1 (IC 0.13-7.62) y p 0.99.

Polimorfismo *rs 7903146/TCF7L2*

Frecuencias alélicas

- Alelo C: Pacientes 53/64 (82.81%), controles 51/58 (87.93%), OR de 0.72 (IC 0.25-2) y p 0.52.
- Alelo T: Pacientes 11/64 (17.18%), controles 7/58 (12.06%), OR de 1.39 (IC 0.50-3.89) y p 0.52.

Genotipos

- Homocigoto CC: Pacientes 23/32 (71.87%), controles 22/29 (75.86%), OR de 0.89 (IC 0.28-2.84) y p 0.89.
- Heterocigoto CT: Pacientes 7/32 (21.87%), controles 7/29 (24.13%), OR de 0.8 (IC 0.24-2.66) y p 0.72.
- Homocigoto TT: Pacientes 2/32 (6.25%), controles 0/29 (0%), OR 3.53 (IC 0.15-81.84) y p 0.19.

4. DISCUSION

La diabetes mellitus es un síndrome clínico caracterizado por deficiencia o insensibilidad a la insulina y exposición de los órganos a hiperglucemia crónica; es el principal problema metabólico que padece la población mundial y la enfermedad que con mayor frecuencia complica el embarazo. La interacción entre los factores ambientales y genéticos son los causantes del desarrollo de ésta enfermedad. En América el número de personas con diabetes mellitus fue de 35 millones en el año 2000 y se espera que se incremente a 64 millones en el año 2025. En México, se desconoce la asociación de diabetes preestablecida y el embarazo, aunque se sabe que tiene una relación directa con la frecuencia de diabetes mellitus tipo 2 en población general que es de alrededor del 10%, del total de estos pacientes una décima parte corresponde a diabetes mellitus tipo 1. La diabetes gestacional es una alteración en el metabolismo de los carbohidratos que se manifiesta por hiperglucemia que se presenta por primera vez durante el embarazo y que suele desaparecer después del parto y por ello se considera un periodo de anormalidad condicionado por la gestación. La incidencia de DG es de 0.4 a 0.5% en menores de 25 años y de 4.3 a 5.55% en mayores a esa edad. Hasta un 8% de las mujeres que presentan DG en México desarrollará DM2 en los siguientes 10 años. (16)

La diabetes mellitus tipo I, tipo II y la gestacional son consideradas enfermedades multifactoriales; se han asociado polimorfismos, deleciones, inserciones y microsatélites (short tandem repeats) con la diabetes gestacional. Existe evidencia suficiente de que la DG se hereda, ya que mujeres con historia familiar de diabetes tiene un riesgo alto para diabetes gestacional independientemente si es de origen materno o paterno. Además tanto la deficiencia de insulina como la resistencia a la misma, lo cual es el principal

desencadenante de la Diabetes, también se hereda con una sensibilidad de 0.53 -0.55 (16). La recurrencia en embarazos posteriores pese a las modificaciones en la dieta apoya el concepto de componentes genéticos en la enfermedad. (19)

El incremento en la incidencia de ésta enfermedad ha ocasionado que se realicen investigaciones más profundas sobre la patogénesis de la DG, explorando las vías de señalización involucradas en la misma. Recientemente varias regiones del genoma han sido identificadas exitosamente y se han asociado a DM2, obesidad y resistencia a la insulina. (53 y 54)

En diversos estudios sobre la disfunción de las células β pancreáticas algunos genes como *KCNJ11*, *WFS1*, *CDKAL1*, *SLC30A8*, *HHEX/IDE*, *CDKN2A/B* y *IGF2BP* han sido asociados como factores de riesgo en las vías de señalización de la patogénesis de la Diabetes Mellitus tipo 2. (55 y 56)

La asociación más fuerte que se ha encontrado con DM2 son las variantes del gen *TCF7L2* (rs7903146 y rs12255372), mismas que se asocian también con DG. (57 y 58)

En un estudio realizado en China se estudiaron 2029 mujeres embarazadas con diabetes gestacional, se analizaron 9 SNPs y se encontró 8 polimorfismos asociados a la enfermedad y de éstos nuevamente el gen *CDKAL1* estuvo implicado y con el OR de 1.27 con una $P=0.0006$ pero ahora con un polimorfismo distinto *rs10946398*. (52) Dentro de los estudios que se han hecho para buscar asociación génica con DG, la mayoría reporta una asociación estadísticamente significativa en los SNPs del gen *TCF7L2*. (59) En Dinamarca se hizo otro estudio en el 2007 a 283 ahora en mujeres embarazadas con DG a las cuales les estudiaron 11 polimorfismos distintos asociados en estudios previos a DM2 y se observó que de éstos 10 presentaron una asociación estadísticamente significativa como factores de

riesgo para DG, todos con una OR por arriba de 1 pero con IC₉₅ amplios superiores e inferiores a 1; solamente los polimorfismos *rs7903146/TCF7L2* y *rs7756992/CDKALI* presentaron el mayor riesgo con una OR 1.45, p=0.00013 y OR 1.22 con p=0.04, respectivamente (con IC₉₅ también superiores a 1). Se concluyó que estos dos polimorfismos eran factores de riesgo en esta población. Debido a que la Diabetes Gestacional suele progresar a DM2, la mayoría de los estudios que buscan la frecuencia de SNPS en pacientes con DG, utilizan los polimorfismos que se se asocian a DM2. Dentro de éstos, los más comúnmente encontrados (*PPARG*, *KCNJ11*, *TCF7L2*, *CDKALI*, *SLC30A8*, *CDKN2A/2B*, *HHEX/IDE*, *IGF2BP2*, *TCF2*, *WFS1*, and *FTO*) tanto en pacientes con DG como las que desarrollaron DM2 posteriormente. (59)

Nosotros en este estudio piloto analizamos 2 polimorfismos de los genes *CDKALI* y el *TCF7L2* dada su alta frecuencia en la DM2 y por lo reportado en los estudios realizados en China y Dinamarca previamente mencionados (51 y 52). Dado que en Latinoamérica no se ha llevado a cabo ningún estudio de este tipo, decidimos realizar este protocolo con estos mismos SNPs pero ahora en población mexicana, pensando en que por ser México una población con una incidencia tan alta de DM2, podría encontrarse también una asociación.

En el estudio del polimorfismo *rs7756992/CDKALI* se incluyeron 29 pacientes con DG y 29 embarazadas sin enfermedad. Para el alelo A se encontró una frecuencia de 0.6724 y 0.6896 en casos y controles respectivamente, con una OR de 0.92; aunque estas frecuencias son muy similares, la OR interpreta que las mujeres que presenten el alelo A tienen un 8% menos posibilidades de tener DG que aquellas que no lo tienen. En cuanto al alelo G se obtuvo una frecuencia de 0.3376 para casos y 0.3104 en controles en respectivamente, con una OR de 1.08, lo que significa que hay 0.08 más posibilidades de

que las mujeres presenten DG cuando tienen el alelo G. 12 casos y 13 controles fueron homocigotas AA, se obtuvo una OR de 0.87, por lo que este genotipo indica también menor posibilidad de adquirir la enfermedad también en un 8%. El genotipo AG lo presentaron 15 pacientes y 14 controles con una frecuencia de 0.4138 para el primer grupo y 0.4483 en el segundo, con una OR de 1.15; únicamente 4 pacientes, 2 casos y 2 controles fueron homocigotas para GG con frecuencias de 0.069 ambas, con un OR de 1, lo que significa que no existe ninguna diferencia entre ambos grupos para este genotipo.

Para el análisis del SNP *rs7903146/TCF7L2* se incluyeron 32 mujeres con DG y 29 embarazadas sin DG. El alelo C tuvo una frecuencia de 0.8281 en los casos y de 0.8704 en los controles con un OR de 0.72. El alelo T presentó una frecuencia de 0.1718 contra 0.1296 en los controles, con una OR de 1.39. 23 casos y 20 controles fueron homocigotos para CC con una frecuencia de 0.7187 y 0.7407 respectivamente, con una OR 0.89. Para el genotipo heterocigoto CT se obtuvieron frecuencias de 0.2187 en grupo DG y 0.2593 para el grupo sano con una OR 0.80. En el caso de los homocigotos TT se encontró una diferencia significativa con una frecuencia en el grupo de casos de 0.0625 y en los controles 0.0 con una OR 3.53, lo que nos sugiere que las mujeres con genotipo TT tienen 2.53 posibilidades más de desarrollar DG que las que no lo tienen.

Cabe mencionar que al tratarse de un estudio piloto donde la población de estudio es mínima, el valor de “p” y el intervalo de confianza (IC_{95%}) son elevados y amplios, respectivamente; lo que pareciera no ser significativo estadísticamente.

5. CONCLUSIONES

Un estudio que concluya que un efecto es “no significativo estadísticamente” puede haber cometido un error tipo 2 (especialmente si tiene poco tamaño de muestra y, por tanto, le falta potencia) y en realidad existiría el efecto a pesar de la rotundidad de la expresión “no significativo estadísticamente”. Aunque una asociación o una diferencia sean muy pequeñas en cuanto a su magnitud absoluta, siempre que se disponga de gran tamaño muestral, dicha asociación o diferencia podría ser estadísticamente significativa. Nuestro estudio preliminar muestra una aparente no significancia y podríamos atrevernos a decir que no se rechaza la hipótesis nula y no hay diferencias entre las pacientes embarazadas y no embarazadas; sin embargo, creemos que el polimorfismo *rs7903146/TCF7L2* en su variante TT al mostrar el OR ya descrito podría tener significancia estadística al aumentar la muestra y por lo tanto la potencia y precisión del estudio. Sugerimos y es conveniente continuar el estudio de este SNP.

6. ANEXOS

Anexo 1

Cronograma de actividades

	NOV 2010	DIC 2010	ENERO 2011	FEB 2011	MARZO 2011	ABRIL 2011	MAYO 2011	JUNIO 2011	JULIO 2011
Revisión literatura y corrección protocolo									
Selección de pacientes y controles									
Toma de muestras de sangre									
Extracción de DNA genómico									
Normalización de la amplificación por PCR del gen de interés									
Amplificación por PCR del gen de interés									
Secuenciación automatizada del producto del PCR del gen de interés									
Análisis y presentación de resultados									



Fecha en que se llevará a cabo la actividad

Anexo 2

Carta de consentimiento informado

Yo _____, declaro libremente que acepto participar de manera voluntaria en el estudio titulado **“Asociación de los polimorfismos rs7903146/TCF7L2 y rs 7756992/CDKAL1 en pacientes mexicanas con Diabetes Gestacional del Hospital General de México”**, que se llevará a cabo en el Hospital General de México y que estará bajo la responsabilidad del Dr. Fausto Coronel Cruz y la Dra. Mariella Granillo Álvarez. Se me ha explicado que se requiere de la toma de una muestra de 2 mililitros de sangre venosa y que esta toma no representa ningún riesgo para mi salud más que la posible formación de un pequeño moretón en el área de la punción. Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de sangre se utilizará exclusivamente para investigar las alteraciones genéticas que participaron en el desarrollo de mi enfermedad. También me ha sido señalado que en este trabajo de investigación intervendrán dos hospitales diferentes, siendo el Hospital General de México el responsable del estudio y el Instituto Oftalmológico Conde de Valenciana el responsable de brindar insumos, material y apoyo metodológico para la realización del estudio genético, y que puedo retirarme de este protocolo en el momento en que yo lo desee y que esta decisión no afectará la calidad de la atención que recibo por parte del personal del Hospital General de México. Finalmente manifiesto que se me han respondido satisfactoriamente todas mis dudas y que los médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar las que pudieran surgir eventualmente.

Atentamente, _____ Nombre y firma
México, D.F., a ____ de _____ de 201____.
Dirección y teléfono _____

Investigador responsable: Dr. Fausto Moisés Coronel Cruz _____
Teléfono: 5527892000 ext. 1080

Investigador principal: Dra. Mariella Granillo Álvarez _____
Teléfono: 044 5527154975

Presidente de la Comisión de Investigación: Dr. Luis Molina Fernández de Lara _____
Teléfono: 5527892000 ext. 1368

Servicio de Genética del Instituto O. Conde de Valenciana
Teléfono: 5554421700 ext. 3212

Testigo 1 _____ Nombre y firma

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Casey BM, Lucas MJ, McIntire DD, Leveno KJ. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. *Obstet Gynecol* 1997;90:869-73.
2. Instituto Nacional de Salud Pública. Diabetes y embarazo. *PME* 2007;1-6.
3. Kapoor N, Sankaran S, et al. Diabetes in pregnancy: a review of current evidence. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:586-90.
4. Hernández-Valencia M, Zárate A. Conceptos recientes en la etiopatogenia de la diabetes gestacional. *Ginecol Obstet Mex* 2005;73:371-7.
5. Sermer M, Naylor CD, Gare DJ, et al. Impact of increasing carbohydrate intolerance on maternal-fetal outcomes in 3637 women without gestational diabetes. The Toronto Tiro-Hospital Gestational Diabetes Project. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:146-56.
6. García C. Diabetes Mellitus Gestacional. *Med Int Mex* 2008;24(2):148-56.
7. Catalo PM, Drago NM, Amini SB. Maternal carbohydrate metabolism and its relationship to fetal growth and body composition. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1464-70.

8. Ramírez M, El embarazo complicado con diabetes. En: *Obstetricia y Medicina Perinatal, Temas selectos. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia* 2006.p.338-48.
9. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. Diabetes and impaired glucose tolerance in women aged 20–39 years. *World Health Stat* 1992; 45: 321–327.
10. King H. Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age. *Diabetes Care* 1998; 21: B9–B13.
11. Dooley SL, Metzger BE, Cho NH. Influence of race on disease prevalence and perinatal outcome in a U.S. population. *Diabetes* 1991; 40: 25–29.
12. Gunton JE, Hitchman R, McElduff A. Effects of ethnicity on glucose tolerance, insulin resistance and beta cell function in 223 women with an abnormal glucose challenge test during pregnancy. *Aust NZ Obstet Gynaecol* 2001; 41: 182–186.
13. Narayan KM, Boyle JP, Thompson TJ, et al. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *JAMA* 2003;290:1884–90.
14. Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047–53.

15. Kelly J. Hunt, PhD*, Kelly L. Schuller. The Increasing Prevalence of Diabetes in Pregnancy, PhD. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2007; 34: 173–199.
16. A. Ben-Haroush, Y. Yogeve and M. Hod. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 Diabetes. *Diabet. Med* 2004. 21, 103–113.
17. Araya R. Pregnancy and Diabetes. *Rev. Med.Clin. Condes* 2009;20(5):614-629.
18. Wollitzer A, Ovanovic L. 10 Years Later... Diabetes Mellitus and Pregnancy. *The Endocrinologist* 2007;17(1):30-34.
19. Hollander M, Paarlberg M, et al. Gestational Diabetes: A review of the Current Literature and Guidelines. *Obst and Gyne Surv* 2007; 62(2):125-136.
20. Hanna W, Peters R. Screening for gestational diabetes past, present and future. *Diabet Med* 2007; 19:351-8.
21. Shaat N, Groop L. Genetics of Gestational Diabetes Mellitus. *Cur Med Chem* 2007;14:569-583.
22. Nussbaum R, McInnes R et al. Thompson & Thompson. Genetics in Medicine. USA. Saunders Elsevier. 7th edition. 2007. pp 183-184.
23. Schranz, D.B.; Lernmark, A. *Diabetes Metab. Rev.*, 1998, 14, 3.

24. Pociot, F.; McDermott, M.F. *Genes Immun.*, 2002, 3, 235.
25. Bennett, S.T.; Todd, J.A. *Annu. Rev. Genet.*, 1996, 30, 343.
26. Bennett, S.T.; Lucassen, A.M.; Gough, S.C.; Powell, E.E.; Undlien, D.E.; Pritchard, L.E.; Merriman, M.E.; Kawaguchi, Y.; *Nat. Genet.*, 1995, 9, 284.
27. Bennett, S.T.; Wilson, A.J.; Cucca, F.; Nerup, J.; Pociot, F.; McKinney, P.A.; Barnett, A.H.; Bain, S.C.; Todd, J.A. *J. Autoimmun.*, 1996, 9, 415.
28. Inagaki, N.; Gono, T.; Clement, J.P.; Namba, N.; Inazawa, J.; Gonzalez, G.; Aguilar-Bryan, L.; Seino, S.; Bryan, J. *Science*, 1995, 270, 1166.
29. Thomas, P.M.; Cote, G.J.; Wohllk, N.; Haddad, B.; Mathew, P.M.; Rabl, W.; Aguilar-Bryan, L.; Gagel, R.F.; Bryan, J. *Science*, 1995, 268, 426.
30. Huopio, H.; Reimann, F.; Ashfield, R.; Komulainen, J.; Lenko .H.L.; Rahier, J.; Vauhkonen, I.; Kere, J.; Laakso, M.; Ashcroft, F.; Otonkoski, T. *J. Clin. Invest.*, 000, 106, 897.
31. Horikawa, Y.; Oda, N.; Cox, N.J.; Li, X.; Orho-Melander, M.; Hara, M.; Hinokio, Y.; Lindner, T.H.; Mashima, H.; Schwarz, P.E.; Del Bosque-Plata, L.; Horikawa, Y.; Oda, Y.; Yoshiuchi, I.; Colilla, S.; Polonsky, K.S.; Wei, S.; Concannon, P.; Iwasaki, N.; Schulze, J.;

Baier, L.J.; Bogardus, C.; Groop, L.; Boerwinkle, E.; Hanis, C.L.; Bell, G.I. *Nat. Genet.*, 2000, 26, 163.

32. Carlsson, E.; Fredriksson, J.; Groop, L.; Ridderstrale, M. *J. Clin. Endocrinol. metab.*, 2004, 89, 3601.

33. Strosberg, A.D.; Pietri-Rouxel, F. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1996, 17, 373.

34. Youngren, J.F.; Maddux, B.A.; Sasson, S.; Sbraccia, P.; Tapscott, E.B.; Swanson, M.S.; Dohm, G.L.; Goldfine, I.D. *Diabetes*, 1996, Pihlajamaki, J.; 45, 1324

35. Frittitta, L.; Youngren, J.F.; Sbraccia, P.; D'Adamo, M.; Buongiorno, A.; Vigneri, R.; Goldfine, I.D.; Trischitta, V. ; *Diabetologia*, 1997, 40, 282.

36. Ebina, Y.; Ellis, L.; Jarnagin, K.; Edery, M.; Graf, L.; Clauser, E.; Ou, J.H.; Masiarz, F.; Kan, Y.W.; Goldfine, I.D. *Cell*, 1985, 40, 747.

37. Ullrich, A.; Bell, J.R.; Chen, E.Y.; Herrera, R.; Petruzzelli, L.M.; Dull, T.J.; Gray, A.; Coussens, L.; Liao, Y.C.; Tsubokawa, M. ; *Nature*, 1985, 313, 756.

38. Denley, A.; Cosgrove, L.J.; Booker, G.W.; Wallace, J.C.; Forbes, B.E. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, 16, 421.

39. Hammarstedt, A.; Jansson, P.A.; Wesslau, C.; Yang, X.; Smith, U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, *301*, 578.
40. Stephens, J.M.; Pilch, P.F. *Endocr. Rev.*, 1995, *16*, 529.
41. Diez, J.J.; Iglesias, P. *Eur. J. Endocrinol.*, 2003, *148*, 293.
42. Muoio, D.M.; Lynis Dohm, G. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, *16*, 653.
43. Fukuhara, A.; Matsuda, M.; Nishizawa, M.; Segawa, K.; Tanaka, M.; Kishimoto, K.; Matsuki, Y.; Murakami, M.; Ichisaka, T.; Murakami, H.; Watanabe, E.; Takagi, T.; Akiyoshi, M.; Ohtsubo, T.; Kihara, S.; Yamashita, S.; Makishima, M.; Funahashi, T.; Yamanaka, S.; Hiramatsu, R.; Matsuzawa, Y.; Shimomura, I. *Science*, 2005, *307*, 426
44. Medzhitov, R.; Janeway, C.Jr. *N. Engl. J. Med.*, 2000, *343*, 338.
45. O'Neill, L.A.; Greene, C. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, *63*, 650
46. Phelps, G.; Chapman, I.; Hall, P.; Braund, W.; Mackinnon, M.. *Clin. Lancet*, 1989, *2*, 233.
47. Fajans, S.S.; Bell, G.I.; Polonsky, K.S. *N. Engl. J. Med.*, 2001, *345* .T.; Bonneau, O.; Hunter, L.; 971.

48. Yamagata, K.; Nanno, T.; Moriwaki, M.; Ihara, A.; Iizuka, K.; Yang, Q.; Satoh, T.; Li, M.; Uenaka, R.; Okita, K.; Iwahashi, H.; Zhu, Q.; Cao, Y.; Imagawa, A.; Tochino, Y.; Hanafusa, T.; Miyagawa, J.; Matsuzawa, Y. *Diabetes*, 2002, *51*, 114.
49. Van den Ouweland, J.M.; Lemkes, H.H.; Ruitenbeek, W.; Sandkuijl, L.A.; De Vijlder, M.F.; Struyvenberg, P.A.; Van Dde Kamp J.J.; Maassen, J.A. *Nat. Genet.*, 1992, *1*, 368.
50. Dehwah MA, Wang M, Huang QY. Hubei Key Lab of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan; Hubei, China.
51. Jeannet Lauenborg, Niels Grarup, Peter Damm, et al; Common Type 2 Diabetes Risk Gene Variants Associate with Gestational Diabetes; *J Clin Endocrinol Metab*, Enero 2009, 94(1); 145-50.
52. Han et al. Implication of genetic variants near SLC 30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, TCF2, KCNQ1 and WFS1 in Diabetes in a Chinese population. *BMC Medical Genetics* 2010, 11;81.
53. R, Rocheleau G, Rung J, Dina C et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007, 445:881–885.

54. Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Gene* 2007, 39:977–983.

55. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007, 39:770–775.

56. Sparso T, Andersen G, Albrechtsen A, Jorgensen T, et al. Impact of polymorphisms in WFS1 on prediabetic phenotypes in a population-based sample of middle-aged people with normal and abnormal glucose regulation. *Diabetologia* 2008, 51:1646–1652

57. Shaat N, Lernmark A, Karlsson E, et al. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2007, 50:972–979.

58. Watanabe RM, Allayee H, Xiang AH, et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. *Diabetes* 2007, 56:1481–1485

59. Lauenborg *et al.* GDM and Type 2 Diabetes Risk Variants. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(1):145–150.