



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

I.S.S.S.T.E.



**EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL EN PLACENTA Y TEJIDO
ADIPOSO PARA BÚSQUEDA DE GENES DE
SUSCEPTIBILIDAD EN EL DESARROLLO DE LA
DIABETES GESTACIONAL
EN MUJERES MESTIZAS-MEXICANAS.**

T E S I S

Que para obtener el diploma de:

ESPECIALIDAD EN MEDICINA MATERNO FETAL

P R E S E N T A:

HECTOR RUBEN MEZA BARRERA

ASESOR: DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE

MEXICO D.F.

FEBRERO DEL 2012



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS.

DRA. AURA ARGENTINA ERAZO VALLE SOLIS

Subdirector de enseñanza e investigación

DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE

Profesor Titular del Curso Universitario de Posgrado de Medicina Materno Fetal

DR. ARNOLDO RAUL ESPARZA AVILA

Coordinador de enseñanza

EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL EN PLACENTA Y TEJIDO ADIPOSO PARA BÚSQUEDA DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD EN EL DESARROLLO DE LA DIABETES GESTACIONAL EN MUJERES MESTIZAS-MEXICANAS

RECONOCIMIENTO

Esta tesis de especialidad se desarrollo bajo la dirección del **Dr. Fernando Escobedo Aguirre** Jefe del servicio de Medicina Materno Fetal del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del I.S.S.S.T.E. Sede del curso de postgrado en medicina Materno Fetal de la UNAM.

Este trabajo se realizo gracias a la valiosa intervención de la **Dra. María Teresa Tusié Luna** jefa de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), sede externa del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se re conoce su invaluable interés y estricta supervisión.

Se reconoce la importante colaboración y asesoría de la **M.C Alicia Huerta Chagoya** en los experimentos y análisis de los datos, así como del **Q.F.B Leonardo David Tapia Maruri** por su cumplida e incansable colaboración.

AGRADECIMIENTOS

A Dios principio y fin de todas las cosas.

A mi esposa Adriana Estrada De León por tu amor, paciencia y apoyo incondicionales soy muy afortunado de tenerte en mi vida.

A mi hijo José Miguel por ser el motor de mi vida

A mis padres Eduviges Barrera Loza y Héctor Rubén Meza Navarrete por su amor y ejemplo de vida.

A mi tía la Sra. Norma Acosta Barrera y a mi prima Normita por su compañía, apoyo, por permitirme entrar en sus vidas y ser familia.

A mis maestros: Dr. Fernando Escobedo Aguirre, Dra. Margarita Camacho Díaz, Dra. Maritza Mendoza Martínez, Dr. Tomas de Jesús Mendoza Martínez, Dr. Martin Hilton Cáceres y Dra. Emma Karina Cantú Segovia por sus enseñanzas pero sobre todo por haberme dado la oportunidad de tenerlos como amigos y ahora colegas siempre les estaré agradecido.

A Lucy, Néstor y Toño por ser unos amigos increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION..... | 6 |
| HISTORIA DE LA DIABETES..... | 7 |
| EPIDEMIOLOGIA DE LA DIABETES EN MEXICO..... | 9 |
| METABOLISMO EN EL EMBARAZO..... | 11 |
| DEFINICION Y CLASIFICACION DE LA DIABETES..... | 15 |
| GENETICA Y ESTRATAEGIAS DE ESTUDIO..... | 22 |
| GENES ASOCIADOS Y MECANISMOS DE ACCION..... | 25 |
| JUSTIFICACION..... | 34 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 37 |
| HIPOTESIS..... | 38 |
| METODOS..... | 39 |
| MEDICIONES BIOQUIMICAS Y CALCULOS..... | 40 |
| GENOTIPIFICACION..... | 42 |
| ANALISIS ESTADISTICO..... | 42 |
| CONSIDERACIONES ETICAS..... | 45 |
| RESULTADOS..... | 46 |
| CONCLUSIONES..... | 50 |
| REFERENCIAS..... | 52 |

INTRODUCCIÓN

La diabetes gestacional (DG) es considerada un problema de salud pública por su alta prevalencia, complica el embarazo comprometiendo la salud materna y fetal, siendo la principal causa de óbito, macrosomía, distocia, trabajo de parto pretérmino y trastornos hipertensivos asociados al embarazo.

La DG se define como intolerancia a los carbohidratos de severidad variable, diagnosticada durante el embarazo.

A demás de resultados obstétricos adversos, la DG tiene un valor predictivo positivo para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DT2) en la madre y en su producto. Aparece después de 5 a 16 años entre 17 y 63% de la población que la padeció, se reconocen otros factores de riesgo como son el grupo étnico y la obesidad. Por otro lado los hijos de mujeres que cursaron DG, tienen mayor propensión a desarrollar obesidad infantil e intolerancia a la glucosa durante la adolescencia en comparación con hijos de mujeres que no la tuvieron. La DG ofrece una ventana para buscar genes de predisposición para el desarrollo subsecuente de DT2.

La DG y la diabetes tipo 2 comparten diversos factores de riesgo como son el índice de masa corporal elevada, antecedente de intolerancia a la glucosa, antecedente familiar de diabetes en familiares de primer grado, y el pertenecer a un grupo étnico de alta prevalencia. Además comparten aspectos fisiopatológicos comunes:

1.- **Resistencia a la insulina.**- Cambio endócrino normal durante la gestación, sin embargo cuando la reserva pancreática de células beta está comprometida, se desarrolla DG por resistencia a la acción periférica de la insulina.

2.- **Secreción deficiente** de insulina.

En los últimos años se ha acumulado evidencia de que dicha susceptibilidad a la diabetes tipo 2 tiene un componente genético fuerte. Si bien los estudios sobre la herencia de la DG no son contundentes, existen reportes que demuestran una mayor agregación familiar entre DG y DT2.

El riesgo para diabetes aumenta en 8.4 veces cuando un hermano es diabético y 2.3 veces si uno de los progenitores la padece.

La herencia de la DG es complicada, sin embargo existe evidencia acumulada de que la exposición a factores epigenéticos relacionados con un ambiente diabetógeno y el desarrollo posterior de diabetes.

Los estudios genéticos sobre la DT2 sugieren que es una enfermedad multigénica con variantes de genes comunes que unidos a factores ambientales propician la enfermedad. Debido al paralelismo entre la DT2y la DG se piensa que esta última es también una entidad multigénica.

El presente trabajo se orienta a la búsqueda de genes de predisposición para diabetes tipo 2 en mujeres mestizas mexicanas, esto permitirá detectar aquellas mujeres embarazadas que desarrollarán diabetes tipo 2 y contribuir al desarrollo de estrategias que permitan prevenir o retrasar la aparición de la DT2.

HISTORIA DE LA DIABETES

Hace cien años la literatura era muy escasa respecto a embarazo y diabetes, esta condición era poco frecuente debido principalmente a condiciones demográficas como la edad de inicio reproductivo y desconocimiento de la entidad nosológica como tal para tener un tratamiento efectivo para prolongar la esperanza de vida de quienes padecían diabetes, estando limitada a dos o tres años. El diagnóstico de diabetes consistía en la “demostración de orina dulce” y la diferenciación entre diabetes tipo 1 y 2 era solo anecdótica.

La diabetes se conoce hace mas de 2000 años. La primera referencia que se hace de ella se encuentra en el papiro egipcio de Ebers, que data del año 1500 AC, donde se describen síntomas que parecen corresponder a la DM. El término “diabetes” fue usado por primera vez por Areteo de Capadocia en el siglo 2d.c., y significa en griego “sifón”; es decir, se refiere a la eliminación exagerada de orina. Durante los siguientes años, Galeno, Susruta y Sharuka, entre otros, hicieron

observaciones importantes respecto a las características de la enfermedad como, por ejemplo, la asociación de la poliuria con una sustancia que daba sabor dulce a la orina. Incluso, la medicina india ya distinguía entre una forma que se daba en jóvenes delgados que no sobrevivían mucho tiempo, y otra que se daba en personas mayores y obesas. En 1679, Thomas Willis describió la diabetes, la designó con el nombre de *diabetes mellitus* (haciendo referencia al sabor dulce de la orina) y a partir de entonces quedó considerada como una entidad clínica. Las observaciones hechas por Willis son ciertas hasta la actualidad, incluyendo el aumento explosivo de los casos debido a las dietas malsanas, la obesidad y las formas de vida sedentarias.

En lo que se refiere a la historia moderna de la diabetes y el embarazo se comprenden dos periodos antes del descubrimiento de la insulina y el posterior a la misma, marcándose diferencias significativas en las tasas generales de mortalidad materna y perinatal. En 1949 Priscilla White presenta la primera versión de su clasificación, ha sido su contribución más conocida, dicha clasificación ha sido difundida mundialmente y es de gran utilidad en el estudio y manejo del padecimiento. Un aspecto importante es el concepto de daño vascular progresivo, tanto macro como micro vascular.

La Dra. White fue la primera en asociar la diabetes con las malformaciones congénitas, reportando una prevalencia del 12.9% en las embarazadas diabéticas en comparación con el 2% en las embarazadas no diabéticas de los Estados Unidos de Norteamérica.

EPIDEMIOLOGIA DE LA DIABETES EN MEXICO

Actualmente la DM ha alcanzado proporciones pandémicas. En el año 2000, se calculó que había 171 millones de diabéticos alrededor del mundo, y se estima que la cifra aumentará a 366 millones antes del 2030. Además, el número de muertes anuales atribuidas a la diabetes en el mundo es de alrededor de 3.2 millones, lo que corresponde a 6 muertes por minuto. Los 10 países con mayor número de víctimas son la India, China, EUA, Indonesia, Japón, Paquistán, Rusia, Brasil, Italia y Bangladesh (Córdova, 2008).

Tabla 1.1. Estadísticas de la DM en México.

| | ENSA 2000 | ENSANUT 2006 |
|--|--------------|--------------|
| Tasa de mortalidad (por 100 mil habitantes) | 46.8 | 65.2 |
| No. de causa de muerte | 3 | 1 |
| No. de causa de muerte (♀) | 1 | 1 |
| No. de causa de muerte (♂) | 2 | 1 |
| % de muertes ocurridas | 10.7 | 13.8 |
| Prevalencia (diagnóstico médico previo) (%) | 5.8 | 7 |
| % diabéticos con diagnóstico previo | 77 | n.d. |
| Prevalencia global (%) | 7.5 | 14.42 |
| Prevalencia en mujeres (%) | 7.8 | n.d. |
| Prevalencia en hombres (%) | 7.2 | n.d. |
| % de inicio temprano (%) | 13.2 | 21.5 |
| Número de casos (millones) | 3.6 | 7.7 |

n.d.: no disponible. Datos obtenidos de (INEGI, 2002; Olaiz, 2006; Olaiz, 2000).

El panorama no es diferente para nuestro país, donde ocupa el primer lugar en número de defunciones por año. La tendencia de mortalidad es ascendente en ambos sexos, con más de 60 mil muertes y 400 mil casos nuevos anualmente. La mortalidad por DM ha tenido un ritmo de crecimiento del 6% en los últimos 7 años (Córdova, 2008). La Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 (Olaiz, 2000), informó que la prevalencia nacional de DM para adultos mayores de 20 años es de 7.5%. Por su parte, en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 (Olaiz, 2006) se reportó que dicha prevalencia aumentó a 14.42%. El número de adultos jóvenes diabéticos (20-40 años de edad) también se ha incrementado, siendo el 13.2% del total de pacientes en 2000 (Olaiz, 2000) y el 21.5% en el 2006 (Olaiz, 2006). De manera alarmante un porcentaje importante de estos pacientes no se sabía diabético ya que fue diagnosticado durante la realización de las encuestas (tabla 1.1).

La prevalencia es mayor: 1) en mujeres, 2) entre la población con antecedentes familiares de DM (padre, madre o ambos y hermanos, 3) entre la población obesa, 4) entre grupos de edad mayores a 40 años y 5) en la región norte del país y el área metropolitana de la Ciudad de México (Córdova, 2008).

La mayoría de la población diabética detectada a través de las encuestas presentó niveles altos de hemoglobina glucosilada (marcador de un pobre control metabólico), lo que refleja una cobertura de control de apenas un 20% en el país. Los costos directos totales de la atención médica atribuibles a la DM van desde 2.5% hasta 15% de los presupuestos anuales, dependiendo del predominio local y de la sofisticación del tratamiento disponible.

METABOLISMO EN EL EMBARAZO

Durante el embarazo, la madre adapta su metabolismo para asegurar el suministro continuo de nutrientes al feto para asegurar su crecimiento de forma exponencial. Entre los nutrientes que cruzan la placenta, la glucosa es cuantitativamente más importante, seguido de los aminoácidos. Aunque los lípidos atraviesan la placenta en menor proporción el metabolismo lipídico de la madre se encuentra acelerado con la finalidad de cumplir con los requerimientos fetales y maternos. El crecimiento y desarrollo del feto también depende de otros nutrientes esenciales como son las vitaminas. El metabolismo de las vitaminas sufre también modificaciones para asegurar su disponibilidad en el feto a continuación se describen las adaptaciones maternas en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y vitaminas que se requieren en un embarazo normal para posteriormente describir las alteraciones en el embarazo complicado por diabetes.

METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

La glucosa es la principal fuente de energía de la unidad fetoplacentaria. Durante el primer trimestre del embarazo los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y la gluconeogénesis hepática no presentan cambios, mientras que al final del embarazo la madre experimenta estados de hipoglicemia, principalmente evidenciados durante el ayuno por lo que aumenta la gluconeogénesis de otros sustratos. La utilización de diferentes sustratos para la obtención de energía por medio de la gluconeogénesis es variable, siendo principalmente a partir de glicerol en vez del piruvato o alanina (vías más frecuente fuera del embarazo). La hipoglicemia materna, la gluconeogénesis y la resistencia a la insulina en los tejidos maternos periféricos hacen que la transferencia de glucosa a la unidad fetoplacentaria sea mayor que la de cualquier otro sustrato metabólico. La transferencia de glucosa hacia el feto es por medio de difusión facilitada, por medio de gradientes de concentración y por medio de transportadores de glucosa llamados GLUT 1. El feto no sintetiza glucosa, pero la utiliza como su principal

sustrato oxidativo. Normalmente la glicemia fetal es menor a la materna favoreciendo una diferencia positiva de gradiente materno-fetal con lo que se facilita la transferencia de glucosa hacia el feto.

METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS Y PROTEINAS

El aporte suficiente de proteínas es necesario para que el crecimiento fetal alcance su potencial. El transporte de aminoácidos a través de la placenta se lleva a cabo mediante transporte activo, y se caracteriza por tener un gradiente de concentración mayor en el compartimento fetal que en el materno caso contrario a lo que sucede con la glucosa, es decir la aminoacidemia es mayor en el feto que en la madre y conservan esta relación durante todo el embarazo haciéndose mayor de las 20 a las 40 semanas, etapa en la que el metabolismo materno disminuye la utilización de proteínas para favorecer el paso de proteínas hacia el feto esto se manifiesta como una disminución en el nitrógeno urinario y una disminución en la síntesis de urea. La retención de nitrógeno para favorecer la síntesis proteica fetal se asocia con una hipoaminoacidemia materna, siendo más evidente durante el ayuno. En mujeres no embarazadas, la infusión de insulina provoca hipoaminoacidemia, en la mujer embarazada no se explica por resistencia a la insulina sino por el aumento de utilización de aminoácidos a nivel placentario. El transporte de aminoácidos a nivel placentario es en contra de un gradiente de concentración, requiere por esto transportadores dependientes de energía los factores que alteran este aporte proteico a nivel placentario son múltiples como son alteración de los sistemas transportadores, alteraciones en el tamaño de la superficie placentaria, y alteraciones en la invasión trofoblástica.

METABOLISMO DE LOS LIPIDOS

En el embarazo se dan cambios en el metabolismo de los lípidos, con la finalidad de asegurar el paso hacia el feto de ácidos grasos esenciales y ácidos grasos polinsaturados de cadena larga ya que estos son muy importantes para el crecimiento fetal. La acumulación de tejido graso se presenta en el primer y segundo trimestre y representan el tejido materno de mayor aumento durante el embarazo, esto se debe tanto a la hiperfagia así como a al aumento de la síntesis de lípidos dada por el incremento a la respuesta de la insulina en los tejidos grasos. En el tercer trimestre la disminución en los depósitos de grasa se debe a una disminución en la actividad de la lipoproteinlipasa disminuyendo la hidrólisis con esto aumenta los triglicéridos circulantes y las lipoproteínas de muy baja densidad otro mecanismo que disminuye los depósitos de grasa en el tercer trimestre es la lipólisis acelerada. Los triglicéridos son dirigidos hacia el hígado materno donde son con vertidos a acetyl-CoA y glicerol 3 fosfato mismos siendo estos importantes en las reacciones de beta oxidación para la producción de ATP, por medio de la gluconeogénesis y formación de cetonas, las cetonas atraviesan fácilmente la placenta y muestran concentraciones similares en el feto y en la madre a diferencia del adulto el feto puede asimilar las cetonas como energético y para la formación de lípidos a nivel cerebral. El metabolismo de los lípidos durante el embarazo se caracteriza por incremento materno de depósitos de grasa a manera de reserva energética, lipólisis para la obtención de energía este mecanismo permite que la glucosa esté disponible para su transferencia al feto y para el cerebro, los ácidos grasos cumplirán función también como sustrato para la estructura del sistema nervioso central.

Para poder entender la fisiopatología de la DM, es necesario conocer la fisiología normal.

En individuos sanos, las concentraciones de glucosa plasmáticas están finamente controladas por un sistema complejo cuyo regulador principal es la insulina. Cualquier alteración de este sistema puede resultar en hipoglucemia o hiperglucemia. La insulina es una hormona sintetizada y secretada por las células

β de los islotes pancreáticos, en respuesta al incremento en los niveles de glucosa. Los efectos principales de la insulina son: 1) supresión de la liberación de ácidos grasos, 2) inhibición de la producción endógena de glucosa hepática y 3) incorporación de glucosa circulante en músculo. Para lograr estos efectos, las células de los órganos blancos tienen receptores de la insulina y a partir de ellos se desencadenan las distintas respuestas fisiológicas (figura 1.1).

Es por ello que para mantener la normoglucemia (70-125 mg/dl) es necesario conservar un balance entre la secreción de la insulina y la incorporación de glucosa. Cuando las concentraciones normales de insulina producen una respuesta biológica disminuida, se dice que hay resistencia a la insulina y para compensarlo, el organismo debe secretar mayores cantidades de insulina. Existen diferentes condiciones biológicas en las que puede presentarse disfunción de las células β o resistencia a la insulina, una de ellas es la DM.

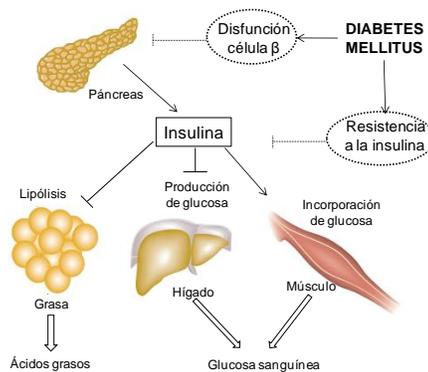


Figura 1.1. Papel de la insulina en el metabolismo. *Modificada de (Stumvoll et al., 2008).* La célula β pancreática juega un papel central en la fisiopatología de la DM ya que la secreción de insulina promueve distintos efectos biológicos a nivel de diversos órganos y tejidos.

DEFINICIÓN DE DM Y SU CLASIFICACIÓN

La DM es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia que resulta de defectos en la secreción de insulina, su acción o ambas ("Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," 2008). De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA, *American Diabetes Association*) hay tres formas de diagnosticarla, todas deben ser confirmadas al día subsecuente, a menos que haya síntomas inequívocos de hiperglucemia. En dos de estas formas de clasificación, se utiliza la información arrojada durante una Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG) en la que se administran 75 gr de glucosa disueltas en 375 ml de agua en ayuno y, se realizan determinaciones de glucosa en suero, antes y 2 horas después de su administración. La interpretación se realiza siguiendo puntos de corte ya establecidos (tabla 1.2).

Tabla 1.2. Criterios de diagnóstico de la DM según la ADA, 2007.

| | | |
|---|-------------------|-----------------------------|
| Normoglucemia | | |
| CTOG de 75 gr | Glucosa ayuno | <110 mg/dl |
| | Glucosa 2 hrs | <140 mg/dl |
| Intolerancia a los carbohidratos | | |
| CTOG de 75gr | Glucosa ayuno | 110-125 mg/dl |
| | Glucosa 2 hrs | 140-199 mg/dl |
| Diabetes Mellitus | | |
| CTOG de 75gr | Glucosa ayuno | ≥126 mg/dl |
| | Glucosa 2 hrs | ≥200 mg/dl |
| Casual | Glucosa sin ayuno | ≥200 mg/dl + síntomas de DM |

El diagnóstico se realiza cuando el paciente cumple con cualquiera de las condiciones de algún grupo.

La DM puede clasificarse en cuatro tipos principales que se describen a continuación ("Standards of Medical Care in Diabetes," 2007).

DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DT1)

Es un desorden autoinmune en el cual el cuerpo ataca y destruye sus células β pancreáticas. Esto resulta en la producción casi nula de insulina (causa directa de la hiperglucemia), y los pacientes que la padecen, necesitan la administración exógena de dicha hormona, de modo que también es llamada diabetes mellitus insulino dependiente (figura 1.2). Además, estos pacientes son muy propensos a la cetosis y presentan anticuerpos contra los islotes pancreáticos, característica utilizada para su diagnóstico (Porterfield, 2007). Generalmente, los pacientes tienen síntomas agudos de la enfermedad y niveles muy elevados de glucosa sanguínea, debido a lo cual son diagnosticados muy jóvenes ("Standards of Medical Care in Diabetes," 2007). El 90% de los casos de DT1 comienzan en la infancia (entre 10-14 años de edad).

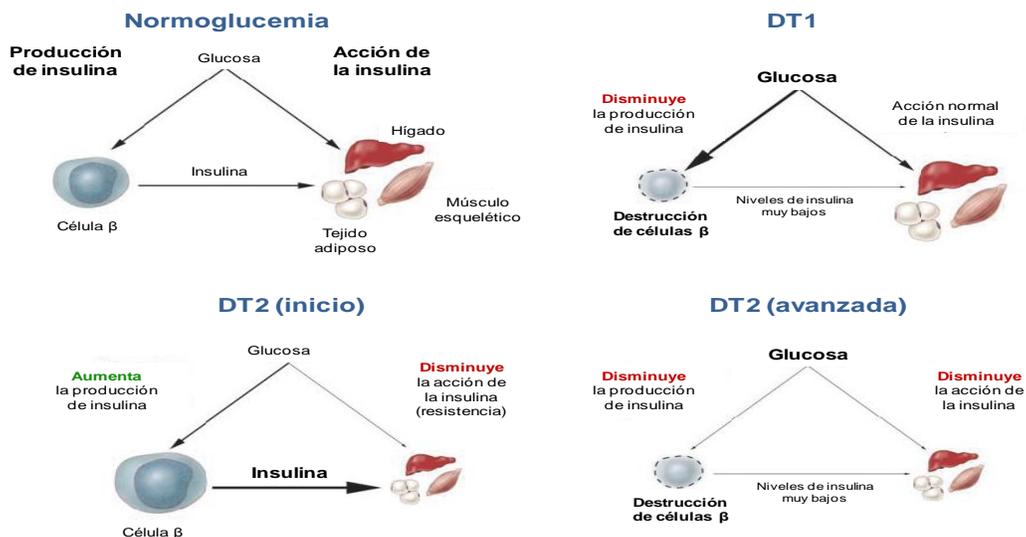


Figura 1.2. Secreción de la insulina y resistencia a esta, en condiciones de normoglucemia o cuando se padece algún tipo de DM. Modificada de (Permutt et al., 2005).

DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DT2)

Es la forma más común, en México representa el 97% de todos los casos diagnosticados (Salud, 2008). Generalmente, se diagnostica hasta que aparecen complicaciones, y aproximadamente un tercio de los afectados permanecen sin diagnóstico ("Standards of Medical Care in Diabetes," 2007). La causa de la hiperglucemia en este tipo de diabetes es más compleja debido a que es resultado tanto de defectos progresivos en la secreción de la insulina como de la resistencia a esta hormona. En un inicio, los pacientes continúan secretando insulina, incluso suelen presentar hiperplasia de las células β e hiperinsulinemia, sin embargo, los órganos blancos no responden adecuadamente a la acción de hormona. Conforme avanza la enfermedad, las células β van perdiendo poco a poco su función, o bien la masa de las células β va disminuyendo (figura 1.2).

No es posible establecer una secuencia causal única puesto que la gravedad de estas dos alteraciones (defecto secretorio y sensibilidad a la insulina) es variable en cada paciente; no obstante, se pueden distinguir diferencias si se clasifica de acuerdo a ciertos factores clínicos. Uno de los más importantes es la edad a la cual son diagnosticados, en función a esta ya se han establecido puntos de corte (Frayling *et al.*, 2003). En lo que respecta a la población mestiza mexicana, hay estudios que contemplan diferentes intervalos de edad y, han demostrado las siguientes diferencias:

- 1) **DT2 de inicio temprano:** se da en aquellos pacientes diagnosticados entre los 20-39 años de edad. Su principal característica es la deficiencia severa en la secreción de insulina, y por tanto, requieren del tratamiento con insulina mucho más rápido. Se trata de una forma mucho más agresiva de la enfermedad, en la que los pacientes tienen mayor riesgo de sufrir complicaciones crónicas (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001;Garcia-Garcia *et al.*, 2002).

- 2) **DT2 de inicio tardío:** se da en aquellos pacientes diagnosticados a partir de los 40 años de edad. Su principal característica es la resistencia a la insulina. Presentan mayor índice de masa corporal (IMC) y perfiles lipídicos adversos, incluyendo: niveles altos de triglicéridos, colesterol y de lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoprotein). En consecuencia, la proporción de personas hipertensas es mucho mayor en este grupo (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001;Garcia-Garcia *et al.*, 2002).

Existe un estudio similar en población estadounidense donde los resultados son opuestos a los de población mestiza mexicana; es decir, en ese estudio, los pacientes diabéticos de inicio temprano (edad de diagnóstico menor a 45 años de edad) presentan mayor IMC, mayor frecuencia de dislipidemias e hipertensión, aunque mantienen el riesgo elevado de sufrir más complicaciones (Hillier *et al.*, 2001;2003). Esto podría reflejar la existencia de diferentes mecanismos de desarrollo de la enfermedad entre diferentes poblaciones. Por otro lado, en la población mestiza mexicana, también se ha observado que los pacientes que requieren acudir a un hospital para su control, son casos de mayor gravedad donde son más frecuentes las complicaciones. Estos sujetos son delgados y necesitan administración constante y temprana de insulina (al poco tiempo después del diagnóstico) (Aguilar-Salinas *et al.*, 2002). De acuerdo a lo anterior, es posible definir grupos que poseen mayor riesgo a desarrollar DT2 (tabla 1.3).

DIABETES GESTACIONAL (DG)

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). Durante la gestación, se producen cambios drásticos en el metabolismo materno que son necesarios para asegurar las demandas de nutrientes del feto en crecimiento, aún cuando la madre también mantenga su incorporación (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 organismo compensa aumentando la secreción; sin embargo, en las mujeres con DG este mecanismo compensatorio no es suficiente y se presenta la hiperglucemia (Buchanan et al., 2005; Vambergue et al., 2002).

La forma mundialmente aceptada para el diagnóstico de la DG es mediante la realización de una CTOG de 100 gr de 3 hrs en las semanas 24-28 de gestación. Se diagnostica DG, cuando hay dos o más valores alterados de acuerdo a los criterios establecidos por Carpenter y Coustan, 1982 (tabla 1.4). La curva debería realizarse a todas las mujeres embarazadas, sin embargo, dado su alto costo, se reemplaza por una prueba de escrutinio o tamiz de 50 gr realizado entre las semanas 13-28 de gestación, lo que permite identificar a las mujeres con mayor probabilidad de sufrir DG. De esta manera únicamente a estas mujeres se les realiza la CTOG de 100gr para verificar su estado metabólico (*Endocrinología Clínica*, 2004).

Tabla 1.3. Similitudes entre la DT2 y la DG.

| | DT2 y DG | DT2 | DG |
|---------------------------|---|--|--|
| Aparición | | Adultos | Embarazo |
| Síntomas | Hiperglucemia Glucosuria Poliuria, polidipsia, polifagia Pérdida de peso inexplicable | | |
| Factores de riesgo | Obesidad Antecedentes familiares Etnicidad Intolerancia a la glucosa previa Resistencia a la insulina previa Sedentarismo, tabaquismo Tamaño pequeño al nacer | | Edad avanzada Productos macrosómicos Multiparidad |
| Tratamiento | Dieta Ejercicio Hipoglucemiantes Insulina | | |
| Complicaciones | | Retinopatías Neuropatías Nefropatías Microangiopatías Problemas visuales | Macrosomía fetal Complicaciones en parto Hipoglucemia fetal Riesgo a DT2 fetal DT2 en la madre |

La DG puede desaparecer horas después del parto, sin embargo, un porcentaje alto de las pacientes pueden desarrollar DT2 (17-63% en un periodo de 5-16 años después de resuelto el embarazo), 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 es del 35 al 80% y está influenciada por el IMC, la paridad, características del embarazo afectado (etapa de la gestación en que se diagnosticó por primera vez, requerimientos de insulina y ganancia de peso), y el intervalo de tiempo entre los embarazos (Ben-Haroush *et al.*, 2004).

Tabla 1.4. Criterios de diagnóstico de la DG, según Carpenter y Coustan, 1982.

| Glucosa (mg/dL) | |
|------------------------|-----|
| Ayuno | 95 |
| 1 h | 180 |
| 2 h | 155 |
| 3 h | 140 |

La prevalencia de la DG también ha aumentado en los últimos años y varía entre las diferentes poblaciones étnicas; por ejemplo, en asiáticas es de 5-10%, en mexicanoamericanas de 5-7%, en árabes de 5-7%, mientras que en europeas se estima entre 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. Un estudio realizado por el Instituto Nacional de Perinatología Isidro de los Reyes (INPer) de la Ciudad de México reveló una prevalencia del 8.4% en la población mestiza mexicana en 2005 (Ramírez, 2005).

Si se le 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. Todo esto ha hecho muy complejo el estudio de la DG.

Podemos distinguir distintas características comunes por las que se ha propuesto que la DT2 y a la DG como entidades etiológicamente relacionadas, e incluso se ha considerado a la DG 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).

OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DM

Se desarrollan debido a otras causas, entre las que destacan: 1) defectos genéticos en la función de la célula β o en la acción de la insulina por mutaciones dominantes en diferentes genes, 2) enfermedades en el páncreas exocrino (como la fibrosis quística); o bien, 3) secundaria a la administración de medicamentos u otros químicos (como aquellos utilizados en el tratamiento del SIDA) ("Standards of Medical Care in Diabetes," 2007).

GENÉTICA Y ESTRATEGIAS DE ESTUDIO

La DM es una enfermedad heterogénea y multifactorial, en la que participa un factor genético que va desde mutaciones puntuales que por sí mismas son suficientes para desarrollar la enfermedad –en las formas monogénicas de la enfermedad, como los casos MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), hasta combinaciones de variantes alélicas en distintos *loci* –en las formas más comunes y poligénicas– que resultan en el fenotipo diabético en presencia de diversos factores ambientales de diferente magnitud tales como el tipo de alimentación, el sedentarismo, la obesidad o la exposición a agentes genotóxicos, etc. Es el factor genético influenciado por el ambiente y el estilo de vida lo que determina la susceptibilidad de un individuo a desarrollar diabetes (figura 1.3).

Entre la evidencia que apoya que la DT2 tiene un fuerte componente genético destaca que: 1) la tasa de concordancia en gemelos monocigóticos idénticos (35-58%) es mayor a de gemelos dicigóticos no idénticos (17-20%) pues éstos sólo comparten el 50% de sus genes; 2) los antecedentes familiares confieren 2.4 veces más riesgo de desarrollar DT2 y aumenta cuando ambos padres la padecen (Stumvoll *et al.*, 2008). Esto demuestra también la existencia de factores ambientales predisponentes; entre ellos podemos mencionar que el riesgo a desarrollar DT2: 1) aumenta 20 veces en individuos obesos, 2) aumenta en individuos que tuvieron bajo peso al nacer y que en la vida adulta llevan mala nutrición (la malnutrición fetal puede provocar un pobre desarrollo de las células β pancreáticas y resistencia a la insulina) (Permutt *et al.*, 2005).

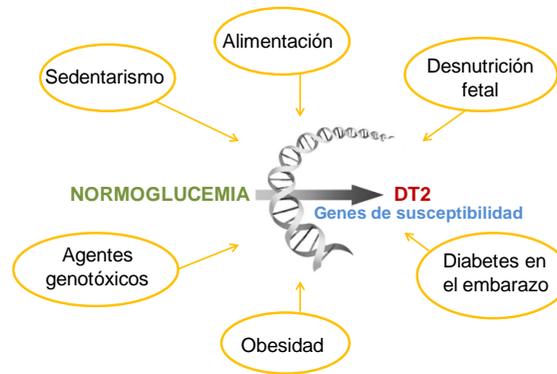


Figura 1.3. Interacción genes-ambiente en el desarrollo de la DT2.

En 1962, Neel propuso la hipótesis del gen ahorrador. En esta plantea que ciertas poblaciones (cazadores y recolectores) tienen rasgos genéticos que alguna vez confirieron ventajas de supervivencia en tiempos antiguos porque mejoraban la eficiencia metabólica y el almacenamiento de calorías como grasa, pero que en la actualidad, donde las provisiones de alimentos son abundantes y la actividad física es mínima, esos mismos rasgos se han vuelto perjudiciales.

En un esfuerzo por identificar aquellos genes o regiones genéticas que generen susceptibilidad a la DT2, se han desarrollado dos estrategias principales (análisis de ligamiento y análisis de asociación) con sus respectivas variantes (figura 1.4). Se distinguen tres de ellas:

- 1) Análisis de ligamiento: se realizan en núcleos familiares o pares de hermanos afectados bajo la premisa de que compartirán regiones genómicas no al azar, el propósito es identificarlas. Tiene dos desventajas importantes: 1) tienen poco poder estadístico para detectar efectos modestos; 2) la resolución del mapeo es muy baja, por lo que aún cuando se ha identificado la región, detectar el gen funcional resulta complicado (Freeman et al., 2006).

- 2) Análisis de genes candidatos: tiene como objetivo estudiar genes de los cuales se tiene sospecha de su participación en la enfermedad, ya sea porque participan en vías metabólicas relacionadas o bien, porque se tiene evidencia en modelos animales. Es un tipo de estudio de asociación y su propósito es analizar la relación entre la enfermedad y alelos particulares, genotipos, o haplotipos de un marcador o conjunto de marcadores. Un estudio de este tipo compara la frecuencia de un marcador entre individuos afectados y no afectados (diseño caso-control).

El desarrollo de esta técnica se facilitó gracias al uso de los polimorfismos de una sola base (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), ya que permiten no sólo evaluar las regiones funcionales del gen, sino también aquéllas que son intrónicas o intergénicas. Por otra parte, el desarrollo de proyectos como el HapMap ayudó a conocer cuáles SNP serían redundantes de estudiar, debido a que se heredan en bloque junto con un conjunto de SNP (desequilibrio de ligamiento, LD). A partir de este momento, fue evidente la importancia de usar miles de casos y controles, además de estudios de replicación, generalmente en diferentes poblaciones para tener suficiente evidencia de la asociación (Freeman *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 2008).

- 3) Análisis de asociación del genoma completo ** (GWAS, Genome Wide Association Studies): es otra variante de los estudios de asociación en los que en lugar de ser restringidos a una sola región génica o gen, se tipifican cientos de miles de marcadores polimórficos (de 100 mil a 500 mil) espaciados a lo largo de todo el genoma en un mismo experimento. Al no tenerse ninguna hipótesis de la participación de los genes en la enfermedad, permite detectar regiones inesperadas y ampliar así el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados.

El desarrollo de nueva tecnología permitió diseñar chips de DNA que capturan una proporción importante de la variación genética en miles de muestras. Hay dos plataformas comerciales principales de genotipificación

para analizar variabilidad en el genoma completo: 1) el panel Illumina, diseñado con información de LD procedente del HapMap, lo cual permite una cobertura completa del genoma y, 2) los chips de Affymetrix, diseñados sin considerar el LD (elección de los SNP al azar), por lo que no son específicos para una población y al ser redundantes ayudan a compensar las fallas de genotipificación. La desventaja de ambos es que no cubren los SNP raros (frecuencia del alelo menor < 5%) o los que son particulares a ciertas poblaciones humanas, ni variaciones estructurales como las variantes de número de copias (CNV) (Perry *et al.*, 2008).

GENES ASOCIADOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Los GWAS son los análisis que han tenido el mayor avance en poco tiempo, tan sólo en un año entre 2007 a 2008 se realizaron más de 10 GWAS en diferentes poblaciones, la mayoría europeas (tabla 1.5). Los primeros estudios no sólo permitieron identificar nuevas variantes alélicas, sino confirmar aquéllas que ya habían sido identificadas mediante otras estrategias (p.ej. *KCNJ11* rs5219, *TCF7L2* rs7903146). A excepción de *TCF7L2*, la contribución de los SNP que se han identificado en el riesgo a la DT2 es baja, evidenciado por los valores de OR (*Odds Ratio*) de entre 1.1-1.2, lo cual explica por qué es necesario analizar un número mucho mayor de muestras, o bien, realizar meta-análisis para alcanzar poderes estadísticos suficientes (figura 1.4)

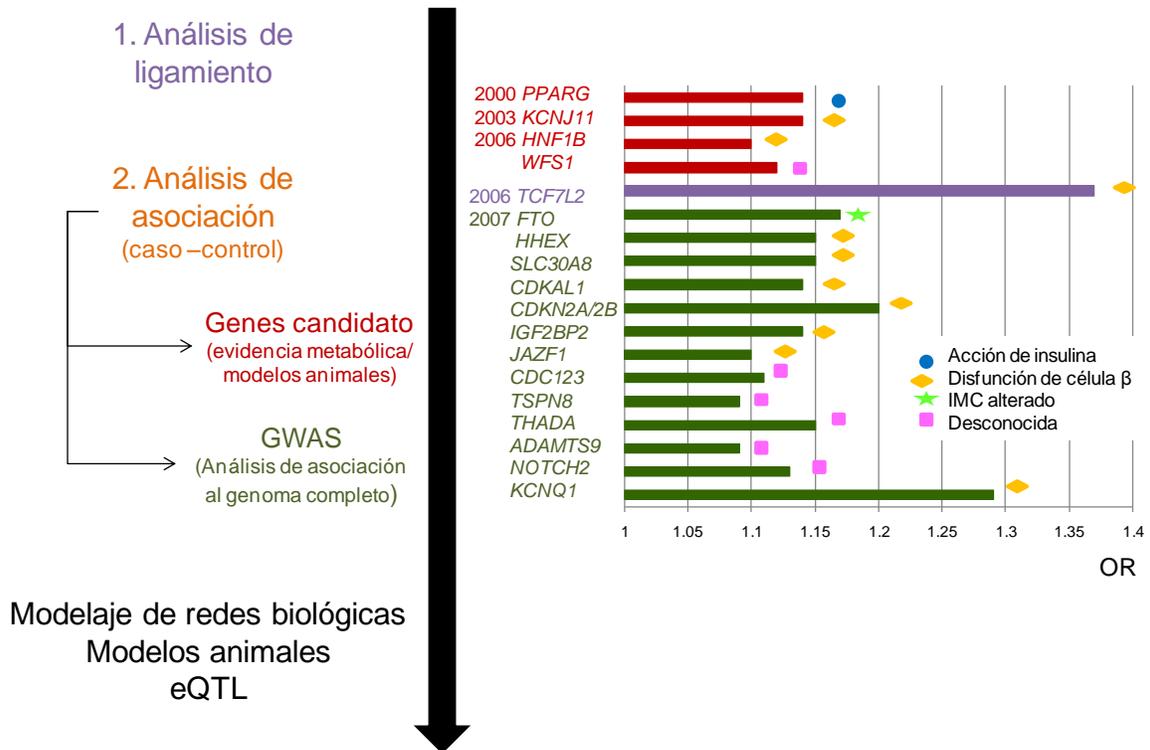


Figura 1.4. Estrategias de estudio de los genes relacionados con la DT2 (izquierda) y, los genes identificados con ellas, el riesgo que confieren a la enfermedad (OR) y su posible participación biológica (derecha). Los valores de OR proceden de meta-análisis estimados a partir de información en poblaciones europeas (excepto *KCNQ1*, que incluye también información de población asiática), los datos se reportan en (Prokopenko *et al.*, 2008).

El rango de frecuencia del alelo de riesgo va del 10-90%, en parte como consecuencia del uso de los arreglos de genotipificación, que se han orientado a detectar variantes comunes (presentes en la mayoría de las poblaciones humanas), pero que tienen muy bajo poder para detectar asociaciones causadas por variantes raras (exclusivas de una o pocas poblaciones) La frecuencia de las variantes raras sólo es alta en aquellas poblaciones donde se fijó el alelo y donde el riesgo que confieren es mucho mayor comparado con el resto. Ejemplos de estas variantes son: G319 S de *HNF1α* en población Oji-Cree y R230C de *ABCA1* en la población mestiza mexicana. La selección de los paneles de genotipificación también ha provocado que para la mayoría de los *loci*, la variante causal no se conozca con certeza. Es probable entonces que las variantes

causales o relacionadas al efecto de riesgo estén en LD con la variante inicialmente identificada.

Los estudios de replicación han mostrado que muchas de las variantes inicialmente identificadas en población europea, también ejercen efectos similares en otras poblaciones, aún cuando presentan con frecuencias alélicas diferentes. De este modo, cambia la facilidad para detectarlas y la magnitud de su efecto poblacional (tabla 1.8). Esto mismo ha sucedido a la inversa; por ejemplo, el gen *KCNQ1* fue detectado de forma más fácil en la población asiática, puesto que las frecuencias del alelo de riesgo son mucho más altas (Unoki *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008). Es por esto que la realización de estudios en pacientes no europeos será útil para identificar nuevos *loci* que dadas las diferencias en frecuencias alélicas, estructura de haplotipos, fondo genético o exposición ambiental, serían difíciles de encontrar en poblaciones europeas.

Todos los esfuerzos para detectar a estos genes están impulsados, en un principio, por el hecho de encontrar asociaciones genotipo-fenotipo que ayuden a dilucidar los mecanismos de la enfermedad y más adelante, que estos conocimientos puedan ser aplicados en la profilaxis y tratamiento. Sin embargo, con las estrategias más recientes sorprende que en varios de los genes encontrados, no sea tan obvia su participación en la enfermedad. Sólo de algunos genes asociados a la DT2, la evidencia es clara respecto a su función y es posible concluir cuál es el polimorfismo responsable (p.ej. *SLC30A8*). En otros casos, más de un gen candidato está en la región donde se encuentra la señal de asociación (p.ej. *HHEX/IDE*). En los más recientes, la relación es mucho menos obvia e, incluso, los efectos se traslapan con alguna otra enfermedad (p.ej. cáncer).

Sin embargo, a la mayoría se les ha atribuido un papel importante en la disfunción de la célula β pancreática debido a que las proteínas para las cuales codifican se expresan dentro de la misma (figura 1.5). Son pocos a los que se les ha relacionado con la resistencia a la insulina. Entre las razones que explican la

ausencia de genes directamente asociados con la resistencia a la insulina destacan las siguientes: 1) el diseño del estudio podría favorecer la detección de variantes de riesgo asociadas a un defecto secretorio de insulina; 2) los rasgos asociados a la resistencia a la insulina están fuertemente influenciados por covariables ambientales; 3) podría haber pocas variantes que afecten la sensibilidad a la insulina; 4) las variantes podrían ser menos frecuentes en la población y 5) las variantes podrían tener efectos muy modestos. Todo esto sugiere que aún hay muchos genes y mecanismos por identificar (Florez, 2008).

| Tabla 1.5. Resumen de GWAS realizados para la DT2. | | | | |
|---|---------------------|---|--|--|
| Estudio | Casos/ controles | Origen | Arreglo | Fenotipo de casos |
| <i>Wellcome Trust Case Control Consortium</i> (Zeggini <i>et al.</i> , 2007) | 1924/ 2938 | Inglaterra | <i>Affymetrix</i> 500K | Con historia familiar de DT2, edad de diagnóstico <65 años |
| <i>Diabetes Genetics Initiative</i> (Saxena <i>et al.</i> , 2007) | 1464/ 1467 | Finlandia, Suecia | <i>Affymetrix</i> 500K | Con historia familiar de DT2, pacientes delgados |
| <i>deCODE Genetics</i> (Steinthorsdottir <i>et al.</i> , 2007) | 1399/ 5275 | Islandia | <i>Illumina</i> 300K | Ningún tipo de enriquecimiento |
| <i>Finland-US Investigation of NIDDM Genetics</i> (FUSION) (Scott <i>et al.</i> , 2007) | 1161/ 1174 | Finlandia | <i>Illumina</i> 300K | Con historia familiar de DT2 |
| <i>Diabetes Gene Discovery Group</i> (Sladek <i>et al.</i> , 2007) | 694/ 645 | Francia | <i>Illumina</i> 300K + <i>Illumina</i> 100K | Con historia familiar de DT2, edad de diagnóstico menor a 45 años, IMC<30 |
| <i>DiaGen</i> (Salonen <i>et al.</i> , 2007) | 500/ 497 | Finlandia del Este, Alemania, Inglaterra, Ashkenazi | <i>Illumina</i> 300K | Con historia familiar, edad de diagnóstico <60 años |
| Pima (Hanson <i>et al.</i> , 2007) | 300/ 334 | Indios Pima | <i>Affymetrix</i> 100K | Con historia familiar de DT2, edad de diagnóstico <25 años |
| Starr Country, Texas (Hayes <i>et al.</i> , 2007) | 281/ 280 | Mexico-Americanos | <i>Affymetrix</i> 100K | Controlado por <i>admixture</i> |
| <i>BioBank</i> (Unoki <i>et al.</i> , 2008) | 194/ 1556 | Japón | Panel de diseño ~268K | Con retinopatía |
| <i>Japanese multi-disease collaborative genome scan</i> (Yasuda <i>et al.</i> , 2008) | 187/ 1504 | Japón | Panel de diseño 100K | Ningún tipo de enriquecimiento |
| <i>Old Order Amish</i> (Rampersaud <i>et al.</i> , 2007) | 124/ 295 | Amish | <i>Affymetrix</i> 100K | Con historia familiar de DT2 |
| <i>Framingham Health Study</i> (Florez <i>et al.</i> , 2007) | 91/ 1087 | Massachusetts | <i>Affymetrix</i> 100K | Ningún tipo de enriquecimiento |
| WTCCC, DGI, FUSION (Zeggini <i>et al.</i> , 2008) | 4549/ 5579 | Inglaterra, Finlandia, Suecia | <i>Affymetrix</i> 500K <i>Illumina</i> 300K | Con historia familiar de DT2, edad de diagnóstico <65 años, pacientes delgados |

Modificada de (Prokopenko *et al.*, 2008).

Son pocos los estudios genéticos de DT2 en la población mestiza mexicana. A la fecha sólo se han obtenido asociaciones positivas en los genes *TCF7L2* rs12255372 (OR=1.78, IC 95%: 1.11-2.88, $p=0.017$) (Parra *et al.*, 2007) y *ABCA1* rs9282541 (OR=2.76 IC 95%: 1.87-3.92, $p=9.4 \times 10^{-8}$) en diabéticos de inicio temprano (Villarreal-Molina *et al.*, 2008). La primera es la variante común con mayor efecto de riesgo reportada hasta el momento; mientras que la segunda es

una variante rara (específica de poblaciones amerindias), que también se ha asociado con bajos niveles séricos de lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*) y obesidad (Villarreal-Molina et al., 2007). En cuanto a la DG, los reportes son más escasos aún. Sólo hay tres reportes donde se replican en poblaciones europeas y asiáticas, algunas de las variantes inicialmente asociadas a la DT2 (Cho et al., 2009; Lauenborg et al., 2009; Shaat et al., 2005) y para población mestiza mexicana, aún no hay estudios genéticos de la DG.

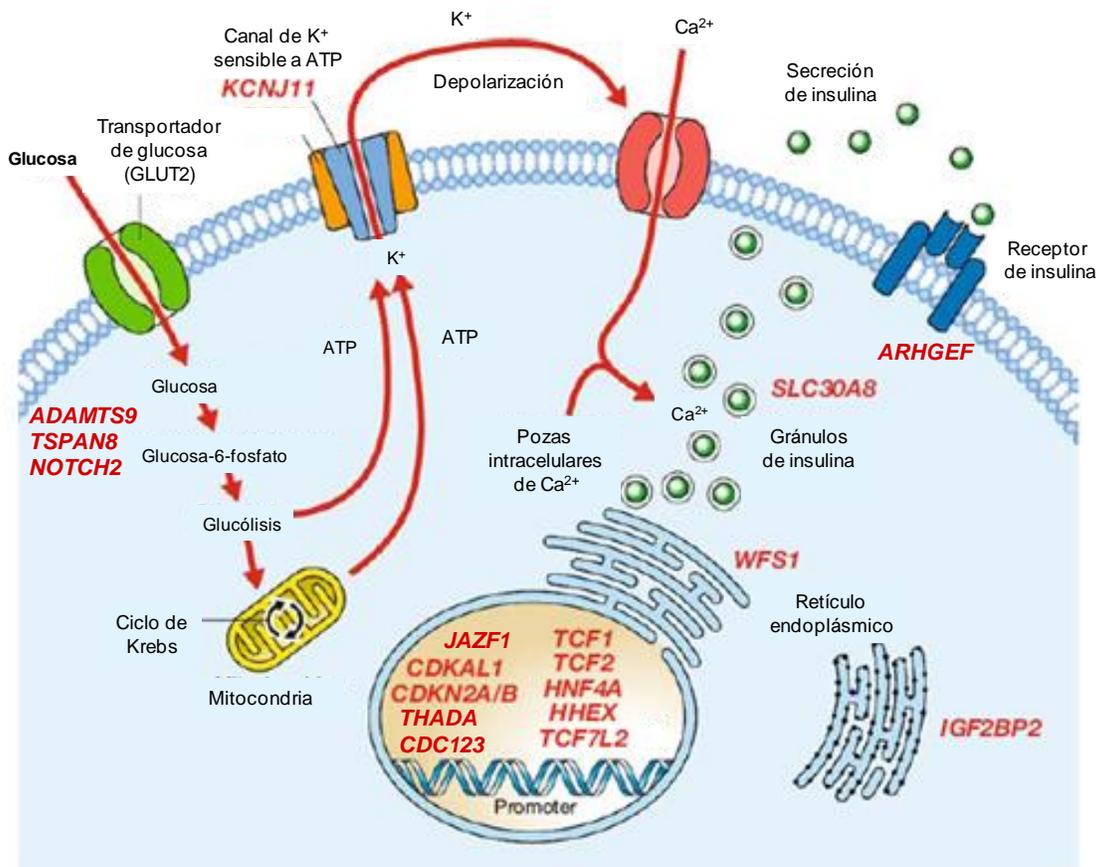


Figura 1.5. Localización de las proteínas codificadas por los genes asociados a la DT2 en la célula β pancreática. Modificada de (Florez, 2008).

En las tablas subsecuentes, se hace un resumen de algunos de los genes asociados a la DT2, la información biológica conocida para estos genes, la evidencia fisiológica de su participación en la enfermedad, las magnitudes de sus efectos en distintas poblaciones así como su relación con la DG (tablas 1.6-1.9).

Tabla 1.6. Genes asociados a la DT2.

| Gen | Cr | Tipo de molécula | Función | Expresión | Relación DT2 |
|----------------------|----------|--|---|--|--|
| KCNJ11 | 11p15.1 | Subunidad Kir6.2 del canal de K ⁺ membranaral | Forma el poro que conduce los iones K ⁺ . Ante un aumento de ATP citosólico, el canal cierra provocando la despolarización de las células β y finalmente, la liberación de insulina (Riedel <i>et al.</i> , 2005). | Ubicua | Disfunción célula β, resistencia a la insulina |
| SLC30A8 | 8q24.11 | Transportador de Zn ²⁺ membranaral | Permite la entrada de Zn ²⁺ a las vesículas donde se almacenará la insulina, formando hexámeros con ésta (Lemaire <i>et al.</i> , 2009). | Células β Adipocitos | Disfunción célula β |
| HHEX/IDE | 10q23.33 | Factor de transcripción homeobox // Enzima degradadora de insulina | Regula el desarrollo embrionario de hígado, páncreas tiroides, linfocitos, entre otros (Hunter <i>et al.</i> , 2007) // Metalopeptidasa dependiente de Zn ²⁺ que degrada la insulina intracelular (Pivovarova <i>et al.</i> , 2009a). | Endodermo, hígado y tiroides adultos // Ubicua | Disfunción célula β |
| CDKN2A/2B | 9p21 | Proteínas de unión a cinasas dependientes de ciclina | Proteínas supresoras de tumores que inhiben a CDK4 y CDK6, cinasas promotoras de la proliferación (Kim <i>et al.</i> , 2006). | Ubicuas | Disfunción célula β |
| CDKAL1 | 6p22.3 | Proteína reguladora de CDK5 | Se une a p35, una proteína que a su vez regula a CDK5, cinasa implicada en la expresión de la insulina (Wei <i>et al.</i> , 2005). | Células β | Disfunción célula β |
| IGF2BP2 | 3q27.2 | Proteína reguladora | Se une a la 5' UTR del RNAm de IGF2 (factor de crecimiento tipo insulina 2) y desacopla su traducción. IGF2 está involucrado en el desarrollo postnatal (Chao <i>et al.</i> , 2008; Christiansen <i>et al.</i> , 2009). | Tejidos embrionarios; cerebro, intestino, músculo, hígado, páncreas adultos | Disfunción célula β |
| ARHGEF11 | 1q21 | Factor de intercambio de nucleótido guanina Rho | Interacciona con GTPasas pequeñas y funciona como interruptor molecular (Ma <i>et al.</i> , 2007). | Ubicuo | Disfunción célula β |
| JAZF1 | 7p15.1 | Represor transcripcional de NR2C2 | Involucrado en la expresión de NR2C2, receptor nuclear que favorece el crecimiento peri y postnatal (Frayling <i>et al.</i> , 2008). | Ubicuo | Desconocida |
| CDC123/CAMK1D | 10p13 | Proteína reguladora del ciclo celular // Cinasa dependiente de Ca ²⁺ -calmodulina | CDC123 es necesaria para la entrada a fase S del ciclo celular; ante privación nutricional disminuye los niveles de eIFy (Bieganowski <i>et al.</i> , 2004; Onisto <i>et al.</i> , 1998). // CAMK1D es una cinasa citosólica que regula procesos de proliferación celular, apoptosis y balance de energía; sin embargo, sus sustratos fisiológicos aún no se conocen (Colomer <i>et al.</i> , 2007; Soderling, 1999). | Bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino, colon, leucocitos // Ubicua | Desconocida |
| TSPAN8/LGR5 | 12q14.1 | Glucoproteína de membrana // Receptor 5 acoplado a proteína G | TSPAN8 se acopla con integrinas y regula señales de transducción para el desarrollo, activación, crecimiento y motilidad celular (Zoller, 2009) // LGR5 es un marcador de células madre que se expresa en células en división activa (Haegebarth <i>et al.</i> , 2009). | Células escamosas, músculo liso y estriado, endotelio vascular // Intestino, folículos pilosos, ojo, cerebro, mamas, órganos reproductivos, estómago | Desconocida |
| THADA | 2p21 | Gene asociado al adenoma de tiroides | Parece ser una proteína en la cual se unen otras involucradas con la ruta del receptor de muerte y apoptosis. Es un sitio blanco de rearrreglos observados en las neoplasias de tiroides (Drieschner <i>et al.</i> , 2007). | Ubicua | Desconocida |
| ADAMTS9 | 3p14.3 | Metalopeptidasa | Implicada en la ruptura de proteoglicanos para controlar el desarrollo y la maduración de los órganos, e inhibición de la angiogénesis (Boesgaard <i>et al.</i> , 2009). | Tejidos fetales; corazón y músculo esquelético adultos | Desconocida |
| NOTCH2 | 1p13 | Proteína de membrana de unión a ligandos | Participa en el desarrollo vascular, renal y hepático. Se expresa en células del ducto embrionarias durante la organogénesis pancreática (Roman <i>et al.</i> , 2006). | Tejidos fetales | Desconocida |

Tabla 1.7. Evidencia biológica de la participación de los genes asociados a la DT2.

| Gen | SNP | Ubicación | Evidencia funcional del gen y/o SNP | Evidencia del SNP en humanos |
|-------------------|-------------------------|----------------------------|---|---|
| KCNJ11 | rs5219 | Exón 1 E23K | El alelo K aumenta la actividad del canal de K ⁺ y en consecuencia disminuye la secreción de la insulina, lo que aumenta la disponibilidad de sustratos. No obstante, con el estilo de vida occidental, donde los niveles de ácidos grasos circulantes son elevados, representa una desventaja. Estas moléculas se unen al canal aumentando más la corriente del canal, disminuye la respuesta a la glucosa y finalmente, genera hiperglucemia (Riedel et al., 2005; Wan et al., 2009). | ↑ IMC (Riedel et al., 2005), ↓ secreción de insulina (Villareal et al., 2009). |
| SLC30A8 | rs13266634 | Exón 10 R325W | El Zn ²⁺ es esencial para la formación de los cristales de insulina y hacer eficiente su empaquetamiento y almacén; pero no modifica el procesamiento de la hormona (Lemaire et al., 2009). La disminución en su expresión en condiciones de hiperglucemia o bajo dietas altas en grasa, da como resultado una disminución en la secreción de la insulina porque el contenido de insulina intracelular es insuficiente (Fu et al., 2009; Lemaire et al., 2009). | ↑ efecto en diabéticos no obesos (Cauchi et al., 2008), ↓ secreción de la insulina de primera fase (Boesgaard et al., 2008). |
| HHEX/ IDE | rs1111875 rs7923837 | Intergénico Intergénico | La ausencia de HHEX detiene el desarrollo del hígado y páncreas y es letal, en modelos murinos. Además, regula la expresión de otros factores de transcripción ya implicados en la DT2 (HNF1β, HNF4α) (Hunter et al., 2007) // IDE degrada a la insulina una vez que ha producido su efecto. Tanto el ATP como los ácidos grasos libres interaccionan con IDE y la inhiben; de modo que en condiciones de hiperglucemia, disminuye su actividad y puede producirse hiperinsulinemia (Pivovarova et al., 2009a). | ↑ efecto en diabéticos obesos (Horikoshi et al., 2007), ↓ secreción de insulina (Staiger et al., 2007), ↓ peso al nacer (Freathy et al., 2009). |
| CDKN2A/2B | rs10811661 | Intergénico | CDKN2a y 2b se unen a las CDK4 y 6, responsables del paso de G1 a S del ciclo celular, y las inhiben. Cuando envejecemos, aumentan sus niveles de expresión, lo cual detiene la regeneración celular. Se ha visto deletado en adenocarcinomas pancreáticos (Kim et al., 2006). En la célula β, la activación de CDKN2a produce reducción en la masa β pancreática y en la secreción de insulina (Dhawan et al., 2009). | ↓ secreción de insulina (Horikoshi et al., 2007). |
| CDKAL1 | rs7754840 rs10484634 | Intrón 5 Intrón 2 | Cdkal1 podría ser el inhibidor del complejo CDK5/p35, al unirse a este último (Steinthorsdottir et al., 2007). Esto evita que el factor de transcripción Pdx-1 salga del núcleo, se una al promotor del gen de la insulina y continúe su expresión, bajo condiciones de hiperglucemia (Ubeda et al., 2006). Además, aumenta el influjo de Ca ²⁺ a las células β y con ello, la secreción de la insulina (Wei et al., 2005). | ↓ secreción de insulina, ↓ conversión proinsulina-insulina (Kirchhoff et al., 2008). |
| IGF2BP2 | rs4402960 rs1470579 | Intrón 2 Intrón 2 | El SNP podría tener una interacción con la malnutrición fetal para afectar el metabolismo de glucosa en el adulto (van Hoek et al., 2009). | ↓ secreción de insulina (Horikoshi et al., 2007). |
| ARHGEF11 | rs945508 | Exón 39 R1467H | Arhgef11 participa en la regulación de la vía de señalización de la insulina, pero no hay suficiente evidencia reportada. | ↓ incorporación de glucosa (Ma et al., 2007), ↓ almacenamiento de glucosa (Ma et al., 2007). |
| JAZF1 | rs864745 | Intrón 1 | Los ratones carentes de NR2C2 sufren de hipoglucemia neonatal y postnatal (Frayling et al., 2008). NR2C2 puede inducir la expresión de ApoE en células HepG2, por lo que podría estar implicado en la aterosclerosis (Kim et al., 2003) y funciona como un sensor de ácidos grasos para modular la formación de células (Xie et al., 2009). | ↓ IMC, ↓ resistencia a insulina (Grarup et al., 2008), ↓ secreción de insulina (Grarup et al., 2008). |
| CDC123/ CAMK1D | rs12779790 | Intergénico | No se ha reportado una relación directa. | ↓ secreción de insulina, ↓ respuesta a la insulina (Grarup et al., 2008). |
| TSPAN8/ LGR5 | rs7961581 | Intergénico | TSPAN8 se sobreexpresa en carcinoma hepático y pancreático (Zoller, 2009). Para LGR5 no se ha reportado una relación directa. | ↓ secreción de insulina, ↓ respuesta a la insulina (Grarup et al., 2008). |
| THADA | rs7578597 | Exón 24 T1187A | No se ha reportado una relación directa. | ↓ respuesta β pancreática (Simonis-Bik et al.). |
| ADAMTS9 | rs4607103 | Intergénico | No se ha reportado una relación directa. | ↓ sensibilidad a la insulina (Boesgaard et al., 2009). |
| NOTCH2 | rs10923931 | Intrón 5 | NOTCH2 se puede reactiva en el adulto, lo cual está involucrado con la regeneración del tejido pancreático, hepático y muscular. También puede causar metaplasias (Rooman et al., 2006). | No hay evidencia. |

Tabla 1.8. Magnitud del efecto de los genes asociados a la DT2 en diferentes poblaciones.

| Gen | SNP | Población | Alelo menor | Alelo riesgo | f alelo riesgo | OR (IC95%) | p | Referencia |
|----------------------|------------|------------------|-------------|--------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| KCNJ11 | rs5219 | Europea | T | T | 0.47 | 1.14 (1.10-1.19) | 6.7x10 ⁻¹¹ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Asiática | C | C | 0.37 | 1.03 (0.89-1.20) | 0.68 | (Horikoshi <i>et al.</i> , 2007) |
| SLC30A8 | rs13266634 | Europea | T | C | 0.65 | 1.12 (1.07-1.16) | 5.3x10 ⁻⁸ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Asiática | C | C | 0.43 | 1.19 (1.03-1.37) | 0.016 | (Horikoshi <i>et al.</i> , 2007) |
| HHEX/IDE | rs1111875 | Europea | T | C | 0.53 | 1.13 (1.08-1.17) | 5.7x10 ⁻¹⁰ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Asiática | C | C | 0.26 | 1.30 (1.11-1.52) | 0.0013 | (Horikoshi <i>et al.</i> , 2007) |
| | rs7923837 | Europea | A | G | 0.62 | 1.22 (1.01-1.43) | 3.4x10 ⁻⁶ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) |
| CDKN2A/2B | rs10811661 | Asiática | G | G | 0.19 | 1.40 (1.17-1.68) | 2x10 ⁻⁴ | (Horikoshi <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Europea | C | T | 0.83 | 1.20 (1.14-1.25) | 7.8x10 ⁻¹⁵ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) |
| CDKAL1 | rs7754840 | Asiática | C | T | 0.43 | 1.22 (1.05-1.41) | 0.0076 | (Horikoshi <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Europea | C | C | 0.31 | 1.12 (1.08-1.16) | 4.1x10 ⁻¹¹ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) |
| | rs10484634 | Mexico-americana | C | C | 0.36 | 1.29 (1.17-1.43) | 1.0x10 ⁻⁶ | (Ng <i>et al.</i> , 2008) |
| IGF2BP2 | rs4402960 | Europea | C | T | 0.95 | 2.83 (n.d.) | 0.004 | (Hayes <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Asiática | T | T | 0.30 | 1.14 (1.11-1.18) | 8.9x10 ⁻¹⁶ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) |
| | rs1470579 | Europea | T | T | 0.31 | 1.05 (0.90-1.23) | 0.55 | (Horikoshi <i>et al.</i> , 2007) |
| | Asiática | C | C | 0.30 | 1.17 (1.11-1.23) | 1.13x10 ⁻⁹ | (Saxena <i>et al.</i> , 2007) | |
| ARHGEF11 | rs945508 | Asiática | C | C | 0.35 | 1.12 (0.96-1.30) | 0.16 | (Horikoshi <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Alemana | C | C | 0.46 | 1.43 (1.12-1.87) | 0.004 | (Bottcher <i>et al.</i> , 2008) |
| | | Amish | T | C | 0.53 | 0.66 (0.44-0.98) | 0.04 | (Fu <i>et al.</i> , 2007) |
| JAZF1 | rs864745 | Pima | T | T | 0.10 | 3.39 (1.29-8.93) | 0.01 | (Ma <i>et al.</i> , 2007) |
| | | Europea | C | T | 0.50 | 1.10 (1.07-1.13) | 5x10 ⁻¹⁴ | (Zeggini <i>et al.</i> , 2008) |
| CDC123/CAMK1D | rs12779790 | Asiática | C | T | 0.79 | 1.15 (1.03-1.27) | 0.0098 | (Omori <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Europea | G | G | 0.18 | 1.11 (1.07-1.14) | 1.2x10 ⁻¹⁰ | (Zeggini <i>et al.</i> , 2008) |
| TSPAN8/LGR5 | rs7961581 | Asiática | G | G | 0.15 | 1.11 (0.99-1.26) | 0.0729 | (Omori <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Europea | C | C | 0.27 | 1.09 (1.06-1.12) | 1.1x10 ⁻⁹ | (Zeggini <i>et al.</i> , 2008) |
| THADA | rs7578597 | Asiática | C | C | 0.21 | 1.099 (0.99-1.22) | 0.0730 | (Omori <i>et al.</i> , 2009) |
| ADAMTS9 | rs7578597 | Europea | C | T | 0.90 | 1.15 (1.10-1.20) | 1.1x10 ⁻⁹ | (Zeggini <i>et al.</i> , 2008) |
| NOTCH2 | rs4607103 | Europea | T | C | 0.76 | 1.09 (1.06-1.12) | 1.2x10 ⁻⁸ | (Zeggini <i>et al.</i> , 2008) |
| | rs10923931 | Europea | T | T | 0.11 | 1.13 (1.08-1.17) | 4.1x10 ⁻⁸ | (Zeggini <i>et al.</i> , 2008) |

n.d., no disponible

Tabla 1.9. Magnitud del efecto de los genes inicialmente asociados a la DT2, en mujeres con DG.

| Gen | SNP | Población | Alelo menor | Alelo riesgo | f alelo riesgo | OR (IC95%) | p | Referencia |
|------------------|------------|-----------|-------------|--------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------------------|
| KCNJ11 | rs5219 | Europea | T | T | 0.36 | 1.20 (0.99-1.45) | 0.070 | (Lauenborg <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Asiática | T | T | 0.38 | 1.12 (0.97-1.30) | 0.130 | (Cho <i>et al.</i> , 2009) |
| SLC30A8 | rs13266634 | Europea | T | C | 0.17 | 1.19 (0.97-1.44) | 0.092 | (Lauenborg <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Asiática | T | C | 0.59 | 1.24 (1.07-1.43) | 0.005 | (Cho <i>et al.</i> , 2009) |
| HHEX/IDE | rs1111875 | Europea | T | C | 0.59 | 1.18 (0.98-1.43) | 0.082 | (Lauenborg <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Asiática | C | C | 0.31 | 1.27 (1.09-1.49) | 0.003 | (Cho <i>et al.</i> , 2009) |
| | rs7923837 | Asiática | G | G | 0.21 | 1.26 (1.06-1.50) | 0.011 | (Cho <i>et al.</i> , 2009) |
| CDKN2A/2B | rs10811661 | Europea | C | T | 0.83 | 1.13 (0.88-1.46) | 0.340 | (Lauenborg <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Asiática | C | T | 0.51 | 1.49 (1.29-1.72) | 1.1x10 ⁻⁷ | (Cho <i>et al.</i> , 2009) |
| CDKAL1 | rs7754840 | Asiática | C | C | 0.46 | 1.55 (1.34-1.79) | 4.2x10 ⁻⁹ | (Cho <i>et al.</i> , 2009) |
| IGF2BP2 | rs4402960 | Europea | T | T | 0.30 | 1.16 (0.95-1.41) | 0.130 | (Lauenborg <i>et al.</i> , 2009) |
| | | Asiática | T | T | 0.30 | 1.18 (1.01-1.38) | 0.034 | (Cho <i>et al.</i> , 2009) |

JUSTIFICACION

Nuestro grupo de investigación cuenta con amplia experiencia en el diseño y la realización de estudios de ligamiento genético, asociación caso-control y más recientemente de asociación genómica (GWAS) y biología de sistemas para la identificación de genes y variantes de riesgo a enfermedades metabólicas complejas. Además participamos también con el grupo del Dr. David Riech en la generación de un mapa de *admixture* para distintas poblaciones de América, incluida la población mexicana donde identificamos un conjunto de cerca de 1700 marcadores de etnicidad (AIMS) con cobertura completa del genoma, útiles para el mapeo de genes de riesgo a enfermedades complejas como la DT2 o la DG (Price et al, 2007). La población mestiza mexicana mostró el mayor poder estadístico con tamaños de muestra necesarios para detectar *loci* asociados a enfermedades de $n= 1,700$ para alelos con un riesgo relativo (OR) de 1.2; $n= 500$ para alelos con una OR= 1.4, $n= 250$ para alelos con una OR= 1.6 El avance en la detección 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. Las plataformas de genotipificación han sido diseñadas con base en información genética caucásica, de modo que sólo permiten detectar las variantes que están presentes en dichas poblaciones. Las réplicas de estos estudios en otras, principalmente asiáticas, han demostrado que aunque algunas variantes de riesgo son comunes entre poblaciones, sus frecuencias alélicas y la magnitud del efecto, son diferentes. Aún más, con las mismas plataformas, se han podido identificar nuevas variantes de riesgo que no fueron reportadas para las poblaciones en donde originalmente se investigó. Pese a los esfuerzos, se ha calculado que sólo una pequeña proporción (alrededor del 10%) de la variación total en la predisposición a la DT2 ha sido descrita (Prokopenko *et al.*, 2008).

La población mestiza mexicana se originó hace 8.8 ± 1.2 generaciones (Price et al., 2007), a partir de la mezcla de ancestría 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. Por otra parte, la prevalencia de la DT2 en población amerindia (46% en 1998) es mucho mayor que en población mestiza mexicana (21.5% en 2006) y a su vez la prevalencia es mayor que en la de población española (9.9% en 2003). Debido a lo anterior, este estudio servirá para reconocer la contribución de las variantes comunes en el riesgo a la DT2 y si es necesario establecer estrategias alternas para identificar variantes con mayor efecto o bien específicas de nuestra población.

Ya se han reportado diferencias en las características fisiopatológicas de los pacientes diabéticos, pero a la fecha sólo se ha analizado la modulación del efecto de riesgo de las variantes de acuerdo a la presencia de obesidad y la predisposición de los pacientes que se diagnostican jóvenes con respecto a los que son diagnosticados más tardíamente. Dichos resultados sugieren que las variantes que afectan la capacidad secretoria de las células β confieren mayor riesgo en los pacientes no obesos; por su parte, las que se relacionan con la resistencia a la insulina modulan el riesgo en los sujetos obesos (Cauchi *et al.*, 2008). Otros estudios proponen que habrá regiones de susceptibilidad específicas en los diabéticos jóvenes y que el componente genético podría ser menor en aquéllos diagnosticados a mayor edad, o bien, que en su etiología participa fuertemente el ambiente (Frayling *et al.*, 2003).

Por ello, estudiar diferentes subgrupos de pacientes diabéticos permitirá identificar si existen diferencias fisiológicas y/o genéticas entre ellos. La arquitectura genética de la DT2 podría ser diferente en individuos obesos, en aquellos que son diagnosticados a temprana edad y que desarrollan complicaciones rápidamente, así como en los que no requieren un control y seguimiento médico tan estricto. Sabemos que también hay diferencias poblacionales en las prevalencias no sólo de la DT2, sino de obesidad y de distintas dislipidemias, de modo que las interacciones genético-ambientales serán específicas de cada población, por lo que es fundamental hacer estos estudios en población mestiza mexicana.

Finalmente, la dificultad para distinguir entre mujeres con intolerancia a los carbohidratos y DT2 no diagnosticada, ha hecho muy complejo 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 entender si para ambas patologías existen regiones genéticas de susceptibilidad compartidas, así como valorar la pertinencia de buscar variantes específicas de la DG.

OBJETIVO GENERAL

Identificar distintos locus y genes de susceptibilidad para el desarrollo de la DG en pacientes de la población mestiza mexicana a través del mapeo por *admixture* acoplado al análisis de expresión de genes de tejidos potencialmente relevantes en la fisiopatología de la DG como placenta, tejido adiposo y musculo.

1. Conocer la frecuencia y distribución alélica de un conjunto de 1,649 AIMS seleccionados previamente para el mapa de *admixture* en un grupo de casos y controles para DG de la población mestiza mexicana.
2. Analizar la ancestría del grupo de casos y controles para identificar nuevas regiones cromosómicas potencialmente asociadas a la DG en nuestra población (software ANCESTRYMAP).
3. Determinar la posible contribución de los genes o *loci* identificados a los distintos fenotipos relacionados (e.g. obesidad, niveles de lípidos, hipertensión arterial).
4. Estudiar en detalle la estructura de haplotipos para cada una de las regiones que muestren evidencia de asociación.
5. Correlacionar los datos generados a través del mapeo por *admixture* con los datos de expresión génica global de placenta y tejido adiposo.

HIPOTESIS

A través del MALD será posible identificar regiones de susceptibilidad a la diabetes gestacional en la población mestiza mexicana. La evaluación de las diferencias en la expresión génica global entre casos y controles en tejidos fisiológicamente relevantes para la enfermedad, así como la correlación de estos cambios con los datos de variabilidad genómica orientara sobre los genes y las rutas metabólicas involucradas en la fisiopatología.

METODOS:

SUJETOS DE ESTUDIO

Se reunió una muestra de mujeres mestizas mexicanas no relacionados (donde los probandos, padres y abuelos se reconocieron como mexicanos), y mayores de 18 años de edad. Para cada sujeto, se elaboró una hoja de colección de datos, en la cual se recabó información sociodemográfica, datos antropométricos, antecedentes clínicos personales y heredofamiliares. También se recolectaron datos diagnósticos y de los recién nacidos. Además, se les tomó una muestra de sangre después de ayuno de doce horas para la purificación de DNA y la medición de rasgos bioquímicos.

La muestra está integrada por mujeres embarazadas atendidas en el Hospital 20 de Noviembre (H20N) del ISSSTE, para todas se siguió el mismo protocolo de diagnóstico. Se les realizó una CTOG de 100 g y el diagnóstico se llevó a cabo siguiendo los criterios de Carpenter y Coustan, 1982. Una vez concluido el embarazo, las mujeres con DG recibieron una solicitud para que acudieran entre la semana 6-8 del puerperio a la realización de una CTOG de 75 g para la reclasificación de la DM. De acuerdo a los resultados se clasificaron según los criterios de la ADA. Por otra parte, se excluyeron mujeres con otros padecimientos que modifican *per se* el metabolismo de carbohidratos.

Criterios de inclusión y exclusión para la muestra de DG.

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

El DNA genómico fue extraído de sangre total usando un *kit comercial* (Qiagen Cat.51162). La genotipificación fue realizada usando ensayos KASPar (KBiosciences Allele Specific PcR) de la compañía KBiosciences (Hoddesdon, UK). En la muestra de DG sólo se genotipificaron 5 de los SNP que en las pruebas iniciales mostraron asociación a la DT2: rs5219 (KCNJ11); rs13266634 (SLC30A8); rs1111875 (HHEX/IDE); rs10811661 (CDKN2A/2B) y; rs7578507 (THADA). Esto, con el fin de explorar la relevancia de continuar el análisis del resto de las variantes.

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

El índice de masa corporal se calculó siguiendo la fórmula:
$$IMC = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Altura}^2 (\text{m}^2)}$$
. Se considero *obesidad* cuando el $IMC \geq 30$ y, *no obesidad* cuando el $IMC < 30$.

También se calcularon los índices de evaluación del modelo homeostático (HOMA, Homeostasis Model Assessment). Dichos índices son modelos matemáticos que permiten evaluar el grado de disfunción de la célula β y de resistencia a la insulina a partir de datos de glucosa e insulina en ayuno. Se diseñaron con información en humanos, construyendo gráficos de las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno que son esperadas para diferentes grados de disfunción β y resistencia a la insulina; de modo que uno puede estimar los índices a partir de datos de los pacientes. De esta forma, se puede predecir: 1) HOMA B, porcentaje de función

de la célula β , 2) HOMA S, porcentaje de sensibilidad a la insulina por parte de sus órganos blancos (recíproco del HOMA IR) y, 3) HOMA IR, resistencia a la insulina (Matthews *et al.*, 1985).

En este trabajo se utilizó la aplicación HomaCalculator v.2.2.2 (<http://www.dtu.ox.ac.uk/homa>) que incluye modificaciones a las aproximaciones lineales, las cuales, toman en cuenta las variaciones en la resistencia a la glucosa hepática y periférica, el aumento en la curva de secreción de la insulina para concentraciones de glucosa plasmática por arriba de 180 mg/dL, así como la contribución de la proinsulina circulante. Además, el modelo fue recalibrado para los valores de HOMA B y HOMA S, de modo que dieran exactamente 100% en adultos jóvenes normales. El valor normal de HOMA IR es de 1.

El área bajo la curva de los niveles de glucosa plasmática durante la CTOG de 100 gr fue calculada utilizando el método del trapecoide:

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, sobre la Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido (Echeverría, 1993), se consideró: 1) **PRETÉRMINO** si el parto se dio entre la semana 28-36; 2) *prematuro* si el parto se dio entre la semana 28-37 pero el producto pesó entre 1.0-2.5 kg y; 3) *muerte neonatal* si el parto se dio después de la semana 21 pero el producto nació sin vida. Adicionalmente, se evaluó la edad gestacional con el método del capurro, el cual considera datos somáticos y neurológicos del producto al momento del parto para su clasificación.

GENOTIPIFICACIÓN

El DNA genómico fue extraído de sangre total usando un *kit comercial* (Qiagen Cat.51162). La genotipificación fue realizada usando ensayos KASPAR (KBiosciences, UK) diseñados para cada variante. Se utilizaron duplicados y controles de calidad. En la muestra de DT2, se genotipificó un total de 16 SNP correspondientes a 13 regiones génicas distintas, reportados en los análisis GWAS recientes y que han resultado asociados a la DT2 en poblaciones europeas y asiáticas: rs5219 (*KCNJ11*); rs13266634 (*SLC30A8*); rs1111875 y rs7923837 (*HHEX/IDE*); rs10811661 (*CDKN2A/2B*); rs7754840 y rs10484634 (*CDKAL1*); rs4402960 y rs1470579 (*IGF2BP2*); rs945508 (*ARHGEF11*); rs864745 (*JAZF1*); rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*); rs7961581 (*TSPAN8/LGR5*); rs7578507 (*THADA*); rs4607103 (*ADAMTS9*); y rs10923931 (*NOTCH2*). Por su parte, en la muestra de DG, se genotipificaron 5 SNP: 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 y el desequilibrio de ligamiento entre SNP se calcularon 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: 1) *aditivo*, el efecto es dependiente del número de alelos de riesgo; 2) *dominante*, una sola copia del alelo de riesgo es suficiente

para dar el efecto y 3) *recesivo*, se necesitan dos copias del alelo de riesgo para dar el efecto.

En cada modelo se incluyeron las variables confusoras identificadas en las pruebas de comparación: 1) edad y/o sexo y/o IMC, para la asociación a DT2, 2) edad y/o sexo y/o DT2, para la asociación a obesidad y 3) edad y/o obesidad y/o antecedentes familiares a DT2, para la asociación a DG; cuando la p Wald > 0.05. Los modelos ajustados se usaron para calcular la probabilidad de un individuo a desarrollar la enfermedad en presencia de distintos genotipos, suponiendo que tuvieran 30 años de edad e IMC de 25 kg/m². El poder estadístico fue calculado con el programa QUANTO v1.2 (<http://hydra.usc.edu/GXE>), utilizando como parámetros una prevalencia de 14.4% para DT2 (Olaiz, 2006), 8.4% para DG (Ramírez, 2005), de 30% para obesidad (Olaiz, 2006) y 70% para obesidad más sobrepeso (Olaiz, 2006). Asimismo, se consideró un error α del 95%.

En la muestra de DT2, se analizó la asociación del genotipo y las variables continuas por medio del ajuste de modelos de regresión lineal incluyendo las variables confusoras: edad y/o sexo y/o IMC y/o procedencia de los casos y/o DT2, cuando la p [f] < 0.05. Se utilizó el modelo genético al cuál se asoció el SNP en los análisis de asociación o según el tamaño de muestra. En las pruebas que incluyeran múltiples comparaciones, se utilizó ANOVA de una vía en aquellas variables con distribución normal, así como; la prueba de Kruskal-Wallis, usando la prueba de U Mann-Whitney y el ajuste de Bonferroni como *post hoc*, en aquellas que no cumplieron con el supuesto de normalidad.

Además, se realizó un análisis de interacción génica entre pares de las variantes genotificadas, utilizando dos métodos: 1) el programa MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) (<http://www.multifactor dimensionality reduction.org/>) y, 2) modelos de regresión logística. El programa MDR es una herramienta no paramétrica y que no considera un modelo genético, de tal forma que es posible detectar interacciones de alto orden; no obstante, no contempla la participación de otras covariables (p.ej.: ambientales). Es por esto, que se decidió usar ambos

métodos en la búsqueda de interacciones genéticas en nuestra muestra. MDR realiza permutaciones para minimizar los falsos positivos que resultarían de las múltiples comparaciones si se probaran todos los pares de SNP con modelos de regresión logística; y lo hace dividiendo el conjunto de datos tantas veces como se pida y, probando los modelos en las diferentes combinaciones.

El mejor modelo es el que arroja los mismos resultados en la mayoría de las combinaciones solicitado, a lo que se le llama *consistencia*. La *exactitud* de predicción de los modelos es un promedio de los valores de cada combinación (Moore *et al.*, 2006). El programa se configuró para hacer 10 divisiones y, se escogieron los modelos con la mejor consistencia y exactitud para ser probados con el método de regresión logística. Para estos, se consideró la muestra total, se usaron modelos aditivos y, se incluyeron las variables confusoras: edad y/o sexo y/o IMC, cuando la $p [t] < 0.05$.

Finalmente, considerando únicamente las variantes alélicas que resultaron asociadas a la DT2 en nuestra población, se analizó el efecto acumulativo de estas sobre el riesgo a la enfermedad. Para cada individuo se sumó el número de alelos de riesgo que portaban (0 si eran homocigotos para el alelo de no riesgo; 1 si eran heterocigotos; 2 si eran homocigotos para el alelo de riesgo), sólo fueron considerados aquellos cuyos datos de genotipificación para todos los SNP incluidos estaban completos. Se realizaron histogramas para comparar la distribución de frecuencias entre número de alelos de riesgo en diferentes grupos y, se hizo una curva ROC para establecer un punto de corte a considerar para calcular el número de alelos en que el riesgo a DT2 aumenta significativamente. Utilizando dicho punto de corte, se ajustaron modelos de regresión logística para calcular el riesgo a DT2 al poseer ese número de alelos de riesgo o más y, se corrigieron por edad y/o sexo y/o IMC, cuando la $p \text{ Wald} < 0.05$. Dado que en la muestra de DG se analizaron sólo 5 SNP, únicamente fue posible realizar los histogramas.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del INCMNSZ, con número de referencia 1212 y por el comité de ética del CMN Nacional 20 de Noviembre con numero de control 473. Los individuos incluidos firmaron una hoja de consentimiento informado antes de su inclusión al estudio y la toma de muestra.

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: el 56.4% permanecieron normoglucémicas; el 31.6% desarrollaron intolerancia a los carbohidratos; mientras que el 12% desarrollaron DT2. En la tabla se observan las características de la muestra de DG entre casos y controles.

Características generales de la muestra de DG.

| | | Controles DG n=113 | Casos DG n=243 |
|-----------------------|---|-----------------------|-------------------|
| Factores maternos | Edad (años) | 30.4±7.3 | 34.9±5.4 * |
| | Obesidad (%) | 12.5 | 30.8 * |
| | Presión sistólica (mmHg) | 106.4±9.8 | 112.5±12.1 * |
| | Presión diastólica (mmHg) | 67.7±8.5 | 72.4±8.7 * |
| | Edad materna avanzada (>35 años) (%) | 32.7 | 57.3 * |
| | Paridad (>3 gestas) (%) | 44.9 | 57.1 * |
| | Antecedentes de DT2 (%) | 78.7 | 83.3 |
| | Antecedentes de DG (%) | 0 | 7.3 * |
| | DG previa (%) | 0 | 11.1 * |
| Datos diagnósticos | Semana de gestación | 27.9±3.8 | 23.9±4 * |
| | Glucosa ayuno (mg/dl) | 80.2±6.8 | 94.6±12.5 * |
| | Glucosa a 60' (mg/dl) | 128.1±25.5 | 195.3±27.2 * |
| | Glucosa a 120' (mg/dl) | 114.1±18.2 | 176.1±27.2 * |
| | Glucosa a 180' (mg/dl) | 98.1±16.8 | 140.5±27.3 * |
| Datos postparto | Glucosa en ayuno (mg/dl) | 95.9±6.7 | 103.3±31.2 * |
| | Glucosa a 120' (mg/dl) | 108.9±15.7 | 139.9±64 * |
| Factores producto | Semana de parto | 38.1±2.2 | 37.1±2.1 * |
| | Peso (gr) | 2901.3±521 | 2899.1±604.1 |
| | Talla (cm) | 48.8±2.8 | 48.6±3.9 |
| | Capurro | 38.6±1.8 | 37.5±2.4 * |
| | Pretérmino y MNT (%) | 9.8 | 22.9 * |

Se muestra la media ± DS. * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

La tasa de la genotipificación fue del 92%. Se analizaron 5 SNP antes considerados para una muestra de DT2. 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 ($p<0.05$). Sólo se utilizaron los datos de las mujeres de una 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.

Para todas las variantes, las frecuencias del alelo de riesgo fueron mayores en los casos de DT2 en comparación con su grupo de controles, aunque debido a la selección de los grupos mencionado arriba, no se alcanzó la significancia estadística. Sucedió lo contrario en la muestra de DG, en la que las frecuencias de los alelos de riesgo de los controles fueron mayores que las de los casos e, incluso, también lo fueron con respecto a las de los casos de DT2. Por su parte, las frecuencias alélicas de los casos de DG fueron muy similares a las de los casos de DT2.

Comparación de las frecuencias alélicas de riesgo entre mujeres con DT2 y DG.

| Gen | SNP | Alelo riesgo | DT2 ♀ | | DG | |
|------------------|------------|--------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|
| | | | Controles n=194 | Casos n=182 | Controles n=113 | Casos n=243 |
| <i>KCNJ11</i> | rs5219 | T | 0.318 | 0.383 | 0.436 | 0.388 |
| <i>SLC30A8</i> | rs13266634 | C | 0.723 | 0.757 | 0.766 | 0.753 |
| <i>HHEX/IDE</i> | rs1111875 | T | 0.348 | 0.359 | 0.445 | 0.354 * |
| <i>CDKN2A/2B</i> | rs10811661 | T | 0.892 | 0.905 | 0.912 | 0.916 |
| <i>THADA</i> | rs7578597 | T | 0.958 | 0.980 | 0.972 | 0.963 |

* $p<0.05$ con respecto al grupo control.

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

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 95% | (IC 95%) | <i>p</i> | OR 95% | (IC 95%) | <i>p</i> | OR 95% | (IC 95%) | <i>p</i> |
| <i>KCNJ11</i> | 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 |
| <i>SLC30A8</i> | 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 |
| <i>HHEX/IDE</i> | 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 |
| <i>CDKN2A/2B</i> | rs10811661 | <i>T</i> | 0.84 (0.62-11.5) | | 0.897 | 0.84 (0.067-10.5) | | 0.891 | 2.46 (0.45-13.6) | | 0.301 |
| <i>THADA</i> | 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.

CONCLUSIONES:

La realización de esta investigación permitió derivar las siguientes conclusiones:

- La DT2 es una enfermedad tan heterogénea, que es posible identificar subgrupos de pacientes distinguibles tanto por sus características clínicas (fenotipo) como por sus características genéticas (genotipo).
- Las variantes alélicas comunes tienen un efecto relativamente modesto en la susceptibilidad a desarrollar DT2 en la población mestiza mexicana.
- Cuatro variantes alélicas que se han corroborado como participantes del componente genético de la DT2 en poblaciones europeas y asiáticas se asociaron en la población mestiza mexicana en general: *KCNJ11* (rs5219), *HHEX/IDE* (rs1111875), *CDKN2A/2B* (rs10811661), *ARHGEF11* (rs945508).
- El efecto de *ARHGEF11* (rs945508) es mayor en los pacientes diabéticos no obesos.
- Tres variantes alélicas confieren riesgo sólo en algunos subgrupos de DT2: *SLC30A8* (rs13266623) en pacientes diabéticos de inicio temprano, mientras que *IGF2BP2* (rs4402960) y *CDC123/CAMK1D* (rs12779790) en pacientes diabéticos captadas de población abierta.
- Algunas de estas variantes alélicas ejercen efectos sobre rasgos propios de la enfermedad y su magnitud está modulada por el ambiente.
- Existen interacciones génicas entre pares de variantes que pueden modular el efecto individual de cada una de las variantes de riesgo.
- La carga alélica es fundamental en la predisposición de un individuo para desarrollar la enfermedad, pero la magnitud con la cual influye no es la misma en todos los subgrupos de DT2.
- La mayor proporción de los pacientes diabéticos no obesos, los captados de población abierta y los de inicio tardío tienen mayor número de variantes alélicas de riesgo.

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

REFERENCIAS

1. 1.- Aguilar-Salinas, C. A., Reyes-Rodriguez, E., Ordonez-Sanchez, M. L., Torres, M. A., Ramirez-Jimenez, S., Dominguez-Lopez, A., Martinez-Francois, J. R., Velasco-Perez, M. L., Alpizar, M., Garcia-Garcia, E., Gomez-Perez, F., Rull, J. Tusie-Luna, M. T. 2001 "Early-Onset Type 2 Diabetes: Metabolic and Genetic Characterization in the Mexican Population". *J Clin Endocrinol Metab* **86**:220-6.
2. Aguilar-Salinas, C. A., Rojas, R., Gomez-Perez, F. J., Garcia, E., Valles, V., Rios-Torres, J. M., Franco, A., Olaiz, G., Sepulveda, J. Rull, J. A. 2002 "Prevalence and Characteristics of Early-Onset Type 2 Diabetes in Mexico". *Am J Med* **113**:569-74.
3. Ben-Haroush, A., Yogev, Y. Hod, M. 2004 "Epidemiology of Gestational Diabetes Mellitus and Its Association with Type 2 Diabetes". *Diabet Med* **21**:103-13.
4. Bieganowski, P., Shilinski, K., Tschlis, P. N. Brenner, C. 2004 "Cdc123 and Checkpoint Forkhead Associated with Ring Proteins Control the Cell Cycle by Controlling Eif2gamma Abundance". *J Biol Chem* **279**:44656-66.
5. Bodmer, W. Bonilla, C. 2008 "Common and Rare Variants in Multifactorial Susceptibility to Common Diseases". *Nat Genet* **40**:695-701.
6. Boesgaard, T. W., Gjesing, A. P., Grarup, N., Rutanen, J., Jansson, P. A., Hribal, M. L., Sesti, G., Fritsche, A., Stefan, N., Staiger, H., Haring, H., Smith, U., Laakso, M., Pedersen, O. Hansen, T. 2009 "Variant near Adamts9 Known to Associate with Type 2 Diabetes Is Related to Insulin Resistance in Offspring of Type 2 Diabetes Patients--Eugene2 Study". *PLoS One* **4**:e7236.
7. Boesgaard, T. W., Zilinskaite, J., Vanttinen, M., Laakso, M., Jansson, P. A., Hammarstedt, A., Smith, U., Stefan, N., Fritsche, A., Haring, H., Hribal, M., Sesti, G., Zobel, D. P., Pedersen, O. Hansen, T. 2008 "The Common Slc30a8 Arg325trp Variant Is Associated with Reduced First-Phase Insulin Release in 846 Non-Diabetic Offspring of Type 2 Diabetes Patients--the Eugene2 Study". *Diabetologia* **51**:816-20.
8. Bottcher, Y., Schleinitz, D., Tonjes, A., Bluher, M., Stumvoll, M. Kovacs, P. 2008 "R1467h Variant in the Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 11 (Arhgef11) Is Associated with Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes in German Caucasians". *J Hum Genet* **53**:365-7.
9. Buchanan, T. A., Xiang, A., Kjos, S. L. Watanabe, R. 2007 "What Is Gestational Diabetes?" *Diabetes Care* **30 Suppl 2**:S105-11.

10. Buchanan, T. A. Xiang, A. H. 2005 "Gestational Diabetes Mellitus". *J Clin Invest* **115**:485-91.
11. Cauchi, S., Nead, K. T., Choquet, H., Horber, F., Potoczna, N., Balkau, B., Marre, M., Charpentier, G., Froguel, P. Meyre, D. 2008 "The Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes May Be Modulated by Obesity Status: Implications for Association Studies". *BMC Med Genet* **9**:45.
12. Colomer, J. Means, A. R. 2007 "Physiological Roles of the Ca²⁺/Cam-Dependent Protein Kinase Cascade in Health and Disease". *Subcell Biochem* **45**:169-214.
13. Córdova, J., Lee, M., Hernández, M., Aguilar-Salinas, A., Barriguete-Melendez, J. A., Kuri, P., Lara-Esqueda, A., Álvarez, C., Molina Cuevas, V., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., González, A., Sánchez, J., Rosas, J., Rodríguez, G. 2008 Numeralia 2008: Diabetes Mellitus. pp 2166-78. Ed Salud, S. d. México.
14. Chao, W. D'Amore, P. A. 2008 "Igf2: Epigenetic Regulation and Role in Development and Disease". *Cytokine Growth Factor Rev* **19**:111-20.
15. Cho, Y. M., Kim, T. H., Lim, S., Choi, S. H., Shin, H. D., Lee, H. K., Park, K. S. Jang, H. C. 2009 "Type 2 Diabetes-Associated Genetic Variants Discovered in the Recent Genome-Wide Association Studies Are Related to Gestational Diabetes Mellitus in the Korean Population". *Diabetologia* **52**:253-61.
16. Christiansen, J., Kolte, A. M., Hansen, T. O. Nielsen, F. C. 2009 "Igf2 Mrna-Binding Protein 2: Biological Function and Putative Role in Type 2 Diabetes". *J Mol Endocrinol* **43**:187-95.
17. Darvasi, A. Shifman, S. 2005 "The Beauty of Admixture". *Nat Genet* **37**:118-9.
18. Dhawan, S., Tschen, S. I. Bhushan, A. 2009 "Bmi-1 Regulates the Ink4a/Arf Locus to Control Pancreatic Beta-Cell Proliferation". *Genes Dev* **23**:906-11.
19. "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus" 2008. *Diabetes Care* **31 Suppl 1**:S55-60.
20. Drieschner, N., Kerschling, S., Soller, J. T., Rippe, V., Belge, G., Bullerdiek, J. Nimzyk, R. 2007 "A Domain of the Thyroid Adenoma Associated Gene (Thada) Conserved in Vertebrates Becomes Destroyed by Chromosomal Rearrangements Observed in Thyroid Adenomas". *Gene* **403**:110-7.
21. Echeverría, Y. S. 1993 Norma Oficial Mexicana Nom-007-Ssa2-1993, Atención De La Mujer Durante El Embarazo, Parto Y Puerperio Y Del Recién Nacido. Criterios Y Procedimientos Para La Prestación Del Servicio. In *Diario Oficial de la Federación*. Ed Salud, S. d.
22. *Endocrinología Clínica* 2004. México: El Manual Moderno.

23. Flavell, D. M., Ireland, H., Stephens, J. W., Hawe, E., Acharya, J., Mather, H., Hurel, S. J. Humphries, S. E. 2005 "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Gene Variation Influences Age of Onset and Progression of Type 2 Diabetes". *Diabetes* **54**:582-6.
24. Florez, J. C. 2008 "Newly Identified Loci Highlight Beta Cell Dysfunction as a Key Cause of Type 2 Diabetes: Where Are the Insulin Resistance Genes?" *Diabetologia* **51**:1100-10.
25. Florez, J. C., Manning, A. K., Dupuis, J., McAteer, J., Irenze, K., Gianniny, L., Mirel, D. B., Fox, C. S., Cupples, L. A. Meigs, J. B. 2007 "A 100k Genome-Wide Association Scan for Diabetes and Related Traits in the Framingham Heart Study: Replication and Integration with Other Genome-Wide Datasets". *Diabetes* **56**:3063-74.
26. Frayling, T. M., Colhoun, H. Florez, J. C. 2008 "A Genetic Link between Type 2 Diabetes and Prostate Cancer". *Diabetologia* **51**:1757-60.
27. Frayling, T. M., Wiltshire, S., Hitman, G. A., Walker, M., Levy, J. C., Sampson, M., Groves, C. J., Menzel, S., McCarthy, M. I. Hattersley, A. T. 2003 "Young-Onset Type 2 Diabetes Families Are the Major Contributors to Genetic Loci in the Diabetes UK Warren 2 Genome Scan and Identify Putative Novel Loci on Chromosomes 8q21, 21q22, and 22q11". *Diabetes* **52**:1857-63.
28. Freathy, R. M., Bennett, A. J., Ring, S. M., Shields, B., Groves, C. J., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Lindgren, C. M., Lango, H., Perry, J. R., Pouta, A., Ruukonen, A., Hypponen, E., Power, C., Elliott, P., Strachan, D. P., Jarvelin, M. R., Smith, G. D., McCarthy, M. I., Frayling, T. M. Hattersley, A. T. 2009 "Type 2 Diabetes Risk Alleles Are Associated with Reduced Size at Birth". *Diabetes* **58**:1428-33.
29. Freeman, H. Cox, R. D. 2006 "Type-2 Diabetes: A Cocktail of Genetic Discovery". *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**:R202-9.
30. Fu, M., Sabra, M. M., Damcott, C., Pollin, T. I., Ma, L., Ott, S., Shelton, J. C., Shi, X., Reinhart, L., O'Connell, J., Mitchell, B. D., Baier, L. J. Shuldiner, A. R. 2007 "Evidence That Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 11 (Arhgef11) on 1q21 Is a Type 2 Diabetes Susceptibility Gene in the Old Order Amish". *Diabetes* **56**:1363-8.
31. Fu, Y., Tian, W., Pratt, E. B., Dirling, L. B., Shyng, S. L., Meshul, C. K. Cohen, D. M. 2009 "Down-Regulation of Znt8 Expression in Ins-1 Rat Pancreatic Beta Cells Reduces Insulin Content and Glucose-Inducible Insulin Secretion". *PLoS One* **4**:e5679.

32. Garcia-Garcia, E., Aguilar-Salinas, C. A., Tusie-Luna, T., Rull-Rodrigo, J. A. 2002 "Early-Onset Type 2 Diabetes in Mexico". *Isr Med Assoc J* **4**:444-8.
33. Grarup, N., Andersen, G., Krarup, N. T., Albrechtsen, A., Schmitz, O., Jorgensen, T., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., Pedersen, O. 2008 "Association Testing of Novel Type 2 Diabetes Risk Alleles in the Jazf1, Cdc123/Camk1d, Tspan8, Thada, Adamts9, and Notch2 Loci with Insulin Release, Insulin Sensitivity, and Obesity in a Population-Based Sample of 4,516 Glucose-Tolerant Middle-Aged Danes". *Diabetes* **57**:2534-40.
34. Haegebarth, A., Clevers, H. 2009 "Wnt Signaling, Lgr5, and Stem Cells in the Intestine and Skin". *Am J Pathol* **174**:715-21.
35. Hanson, R. L., Bogardus, C., Duggan, D., Kobes, S., Knowlton, M., Infante, A. M., Marovich, L., Benitez, D., Baier, L. J., Knowler, W. C. 2007 "A Search for Variants Associated with Young-Onset Type 2 Diabetes in American Indians in a 100k Genotyping Array". *Diabetes* **56**:3045-52.
36. Haupt, A., Staiger, H., Schafer, S. A., Kirchhoff, K., Guthoff, M., Machicao, F., Gallwitz, B., Stefan, N., Haring, H. U., Fritsche, A. 2009 "The Risk Allele Load Accelerates the Age-Dependent Decline in Beta Cell Function". *Diabetologia* **52**:457-62.
37. Hayes, M. G., Pluzhnikov, A., Miyake, K., Sun, Y., Ng, M. C., Roe, C. A., Below, J. E., Nicolae, R. I., Konkashbaev, A., Bell, G. I., Cox, N. J., Hanis, C. L. 2007 "Identification of Type 2 Diabetes Genes in Mexican Americans through Genome-Wide Association Studies". *Diabetes* **56**:3033-44.
38. Hillier, T. A., Pedula, K. L. 2001 "Characteristics of an Adult Population with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes: The Relation of Obesity and Age of Onset". *Diabetes Care* **24**:1522-7.
39. Hillier, T. A., Pedula, K. L. 2003 "Complications in Young Adults with Early-Onset Type 2 Diabetes: Losing the Relative Protection of Youth". *Diabetes Care* **26**:2999-3005.
40. Horikoshi, M., Hara, K., Ito, C., Shojima, N., Nagai, R., Ueki, K., Froguel, P., Kadowaki, T. 2007 "Variations in the Hhex Gene Are Associated with Increased Risk of Type 2 Diabetes in the Japanese Population". *Diabetologia* **50**:2461-6.
41. Hunter, M. P., Wilson, C. M., Jiang, X., Cong, R., Vasavada, H., Kaestner, K. H., Bogue, C. W. 2007 "The Homeobox Gene Hhex Is Essential for Proper Hepatoblast Differentiation and Bile Duct Morphogenesis". *Dev Biol* **308**:355-67.

42. INEGI 2002 Estadísticas De Mortalidad En México: Muertes Registradas En El Año 2000. In *Indicadores*, pp 266-82. Ed México, S. P. d. México.
43. Kim, E., Xie, S., Yeh, S. D., Lee, Y. F., Collins, L. L., Hu, Y. C., Shyr, C. R., Mu, X. M., Liu, N. C., Chen, Y. T., Wang, P. H. Chang, C. 2003 "Disruption of Tr4 Orphan Nuclear Receptor Reduces the Expression of Liver Apolipoprotein E/C-I/C-II Gene Cluster". *J Biol Chem* **278**:46919-26.
44. Kim, W. Y. Sharpless, N. E. 2006 "The Regulation of Ink4/Arf in Cancer and Aging". *Cell* **127**:265-75.
45. Kirchhoff, K., Machicao, F., Haupt, A., Schafer, S. A., Tschritter, O., Staiger, H., Stefan, N., Haring, H. U. Fritsche, A. 2008 "Polymorphisms in the Tcf7l2, Cdkal1 and Slc30a8 Genes Are Associated with Impaired Proinsulin Conversion". *Diabetologia* **51**:597-601.
46. Kraft, P., Wacholder, S., Cornelis, M. C., Hu, F. B., Hayes, R. B., Thomas, G., Hoover, R., Hunter, D. J. Chanock, S. 2009 "Beyond Odds Ratios--Communicating Disease Risk Based on Genetic Profiles". *Nat Rev Genet* **10**:264-9.
47. Lango, H., Palmer, C. N., Morris, A. D., Zeggini, E., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I., Frayling, T. M. Weedon, M. N. 2008 "Assessing the Combined Impact of 18 Common Genetic Variants of Modest Effect Sizes on Type 2 Diabetes Risk". *Diabetes* **57**:3129-35.
48. Lauenborg, J., Grarup, N., Damm, P., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Pedersen, O. Hansen, T. 2009 "Common Type 2 Diabetes Risk Gene Variants Associate with Gestational Diabetes". *J Clin Endocrinol Metab* **94**:145-50.
49. Lemaire, K., Ravier, M. A., Schraenen, A., Creemers, J. W., Van de Plas, R., Granvik, M., Van Lommel, L., Waelkens, E., Chimienti, F., Rutter, G. A., Gilon, P., in't Veld, P. A. Schuit, F. C. 2009 "Insulin Crystallization Depends on Zinc Transporter Znt8 Expression, but Is Not Required for Normal Glucose Homeostasis in Mice". *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:14872-7.
50. Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr., Ory, D. S. Schaffer, J. E. 2003 "Triglyceride Accumulation Protects against Fatty Acid-Induced Lipotoxicity". *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3077-82.
51. Lusis, A. J. 2006 "A Thematic Review Series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders". *J Lipid Res* **47**:1887-90.
52. Ma, L., Hanson, R. L., Que, L. N., Cali, A. M., Fu, M., Mack, J. L., Infante, A. M., Kobes, S., Bogardus, C., Shuldiner, A. R. Baier, L. J. 2007 "Variants in Arhgef11, a Candidate Gene for the Linkage to Type 2 Diabetes on

Chromosome 1q, Are Nominally Associated with Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in Pima Indians". *Diabetes* **56**:1454-9.

53. Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., Turner, R. C. 1985 "Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and Beta-Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man". *Diabetologia* **28**:412-9.
54. Moore, J. H., Gilbert, J. C., Tsai, C. T., Chiang, F. T., Holden, T., Barney, N., White, B. C. 2006 "A Flexible Computational Framework for Detecting, Characterizing, and Interpreting Statistical Patterns of Epistasis in Genetic Studies of Human Disease Susceptibility". *J Theor Biol* **241**:252-61.
55. Ng, M. C., Park, K. S., Oh, B., Tam, C. H., Cho, Y. M., Shin, H. D., Lam, V. K., Ma, R. C., So, W. Y., Cho, Y. S., Kim, H. L., Lee, H. K., Chan, J. C., Cho, N. H. 2008 "Implication of Genetic Variants near Tcf7l2, Slc30a8, Hhex, Cdkal1, Cdkn2a/B, Igf2bp2, and Fto in Type 2 Diabetes and Obesity in 6,719 Asians". *Diabetes* **57**:2226-33.
56. Olaiz, G., Rivera, J., Shamah, T., Rojas, R., Villalpando, S., Hernández, M., Sepúlveda, J. 2006 Encuesta Nacional De Salud Y Nutrición 2006. Cuernavaca, Morelos: Instituto Nacional de Salud Pública.
57. Olaiz, G., Rojas, R., Barquera, S., Shamah, T., Aguilar Salinas, C. A., Cravioto, P., López, M., Hernández, M., Tapia, R., Sepúlveda, J. 2000 Encuesta Nacional De Salud 2000. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
58. Omori, S., Tanaka, Y., Horikoshi, M., Takahashi, A., Hara, K., Hirose, H., Kashiwagi, A., Kaku, K., Kawamori, R., Kadowaki, T., Nakamura, Y., Maeda, S. 2009 "Replication Study for the Association of New Meta-Analysis-Derived Risk Loci with Susceptibility to Type 2 Diabetes in 6,244 Japanese Individuals". *Diabetologia* **52**:1554-60.
59. Onisto, M., Zeilante, P., Scannapieco, P., Pellati, D., Pozza, M., Caenazzo, C., Negro, A., Garbisa, S. 1998 "Expression Study on D123 Gene Product: Evidence for High Positivity in Testis". *Exp Cell Res* **242**:451-9.
60. Parra, E. J., Cameron, E., Simmonds, L., Valladares, A., McKeigue, P., Shriver, M., Wachter, N., Kumate, J., Kittles, R., Cruz, M. 2007 "Association of Tcf7l2 Polymorphisms with Type 2 Diabetes in Mexico City". *Clin Genet* **71**:359-66.
61. Permutt, M. A., Wasson, J., Cox, N. 2005 "Genetic Epidemiology of Diabetes". *J Clin Invest* **115**:1431-9.

62. Perry, J. R. Frayling, T. M. 2008 "New Gene Variants Alter Type 2 Diabetes Risk Predominantly through Reduced Beta-Cell Function". *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**:371-7.
63. Pivovarova, O., Gogebakan, O., Pfeiffer, A. F. Rudovich, N. 2009a "Glucose Inhibits the Insulin-Induced Activation of the Insulin-Degrading Enzyme in Hepg2 Cells". *Diabetologia* **52**:1656-64.
64. Pivovarova, O., Nikiforova, V. J., Pfeiffer, A. F. Rudovich, N. 2009b "The Influence of Genetic Variations in Hhex Gene on Insulin Metabolism in the German Mesybepe Cohort". *Diabetes Metab Res Rev* **25**:156-62.
65. Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D. Fontes, G. 2009 "Glucolipototoxicity of the Pancreatic Beta Cell". *Biochim Biophys Acta*.
66. Porterfield, S., White, B 2007 *Endocrine Physiology*. EUA: Elsevier.
67. Price, A. L., Patterson, N., Yu, F., Cox, D. R., Waliszewska, A., McDonald, G. J., Tandon, A., Schirmer, C., Neubauer, J., Bedoya, G., Duque, C., Villegas, A., Bortolini, M. C., Salzano, F. M., Gallo, C., Mazzotti, G., Tello-Ruiz, M., Riba, L., Aguilar-Salinas, C. A., Canizales-Quinteros, S., Menjivar, M., Klitz, W., Henderson, B., Haiman, C. A., Winkler, C., Tusie-Luna, T., Ruiz-Linares, A. Reich, D. 2007 "A Genomewide Admixture Map for Latino Populations". *Am J Hum Genet* **80**:1024-36.
68. Prokopenko, I., McCarthy, M. I. Lindgren, C. M. 2008 "Type 2 Diabetes: New Genes, New Understanding". *Trends Genet* **24**:613-21.
69. Ramírez, M. 2005 "Diabetes Mellitus Gestacional. Experiencia En Una Institución De Tercer Nivel De Atención." *Ginecol Obstet Mex* **73**:489-91.
70. Rampersaud, E., Damcott, C. M., Fu, M., Shen, H., McArdle, P., Shi, X., Shelton, J., Yin, J., Chang, Y. P., Ott, S. H., Zhang, L., Zhao, Y., Mitchell, B. D., O'Connell, J. Shuldiner, A. R. 2007 "Identification of Novel Candidate Genes for Type 2 Diabetes from a Genome-Wide Association Scan in the Old Order Amish: Evidence for Replication from Diabetes-Related Quantitative Traits and from Independent Populations". *Diabetes* **56**:3053-62.
71. Riedel, M. J., Steckley, D. C. Light, P. E. 2005 "Current Status of the E23k Kir6.2 Polymorphism: Implications for Type-2 Diabetes". *Hum Genet* **116**:133-45.
72. Rooman, I., De Medts, N., Baeyens, L., Lardon, J., De Breuck, S., Heimberg, H. Bouwens, L. 2006 "Expression of the Notch Signaling Pathway and Effect on Exocrine Cell Proliferation in Adult Rat Pancreas". *Am J Pathol* **169**:1206-14.

73. Salonen, J. T., Uimari, P., Aalto, J. M., Pirskanen, M., Kaikkonen, J., Todorova, B., Hypponen, J., Korhonen, V. P., Asikainen, J., Devine, C., Tuomainen, T. P., Luedemann, J., Nauck, M., Kerner, W., Stephens, R. H., New, J. P., Ollier, W. E., Gibson, J. M., Payton, A., Horan, M. A., Pendleton, N., Mahoney, W., Meyre, D., Delplanque, J., Froguel, P., Luzzatto, O., Yakir, B., Darvasi, A. 2007 "Type 2 Diabetes Whole-Genome Association Study in Four Populations: The Diagen Consortium". *Am J Hum Genet* **81**:338-45.
74. Salud, S. d. 2008 "Numeralia 2008: Diabetes Mellitus" **X**:2166-78.
75. Saxena, R., Voight, B. F., Lyssenko, V., Burt, N. P., de Bakker, P. I., Chen, H., Roix, J. J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J. N., Daly, M. J., Hughes, T. E., Groop, L., Altshuler, D., Almgren, P., Florez, J. C., Meyer, J., Ardlie, K., Bengtsson Bostrom, K., Isomaa, B., Lettre, G., Lindblad, U., Lyon, H. N., Melander, O., Newton-Cheh, C., Nilsson, P., Orho-Melander, M., Rastam, L., Speliotes, E. K., Taskinen, M. R., Tuomi, T., Guiducci, C., Berglund, A., Carlson, J., Gianniny, L., Hackett, R., Hall, L., Holmkvist, J., Laurila, E., Sjogren, M., Sterner, M., Surti, A., Svensson, M., Tewhey, R., Blumenstiel, B., Parkin, M., Defelice, M., Barry, R., Brodeur, W., Camarata, J., Chia, N., Fava, M., Gibbons, J., Handsaker, B., Healy, C., Nguyen, K., Gates, C., Sougnez, C., Gage, D., Nizzari, M., Gabriel, S. B., Chirn, G. W., Ma, Q., Parikh, H., Richardson, D., Richey, D., Purcell, S. 2007 "Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels". *Science* **316**:1331-6.
76. Scott, L. J., Mohlke, K. L., Bonnycastle, L. L., Willer, C. J., Li, Y., Duren, W. L., Erdos, M. R., Stringham, H. M., Chines, P. S., Jackson, A. U., Prokunina-Olsson, L., Ding, C. J., Swift, A. J., Narisu, N., Hu, T., Pruim, R., Xiao, R., Li, X. Y., Conneely, K. N., Riebow, N. L., Sprau, A. G., Tong, M., White, P. P., Hetrick, K. N., Barnhart, M. W., Bark, C. W., Goldstein, J. L., Watkins, L., Xiang, F., Saramies, J., Buchanan, T. A., Watanabe, R. M., Valle, T. T., Kinnunen, L., Abecasis, G. R., Pugh, E. W., Doheny, K. F., Bergman, R. N., Tuomilehto, J., Collins, F. S., Boehnke, M. 2007 "A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants". *Science* **316**:1341-5.
77. Seldin, M. F. 2007 "Admixture Mapping as a Tool in Gene Discovery". *Curr Opin Genet Dev* **17**:177-81.
78. Shaat, N., Ekelund, M., Lernmark, A., Ivarsson, S., Almgren, P., Berntorp, K., Groop, L. 2005 "Association of the E23k Polymorphism in the Kcnj11 Gene with Gestational Diabetes Mellitus". *Diabetologia* **48**:2544-51.
79. Shaat, N., Groop, L. 2007 "Genetics of Gestational Diabetes Mellitus". *Curr Med Chem* **14**:569-83.

80. Simonis-Bik, A. M., Nijpels, G., van Haeften, T. W., Houwing-Duistermaat, J. J., Boomsma, D. I., Reiling, E., van Hove, E. C., Diamant, M., Kramer, M. H., Heine, R. J., Maassen, J. A., Slagboom, P. E., Willemsen, G., Dekker, J. M., Eekhoff, E. M., de Geus, E. J. t Hart, L. M. "Gene Variants in the Novel Type 2 Diabetes Loci Cdc123/Camk1d, Thada, Adamts9, Bcl11a, and Mtnr1b Affect Different Aspects of Pancreatic Beta-Cell Function". *Diabetes* **59**:293-301.
81. Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., Balkau, B., Heude, B., Charpentier, G., Hudson, T. J., Montpetit, A., Pshezhetsky, A. V., Prentki, M., Posner, B. I., Balding, D. J., Meyre, D., Polychronakos, C. Froguel, P. 2007 "A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Risk Loci for Type 2 Diabetes". *Nature* **445**:881-5.
82. Smith, M. W. O'Brien, S. J. 2005 "Mapping by Admixture Linkage Disequilibrium: Advances, Limitations and Guidelines". *Nat Rev Genet* **6**:623-32.
83. Soderling, T. R. 1999 "The Ca-Calmodulin-Dependent Protein Kinase Cascade". *Trends Biochem Sci* **24**:232-6.
84. Staiger, H., Machicao, F., Stefan, N., Tschritter, O., Thamer, C., Kantartzis, K., Schafer, S. A., Kirchhoff, K., Fritsche, A. Haring, H. U. 2007 "Polymorphisms within Novel Risk Loci for Type 2 Diabetes Determine Beta-Cell Function". *PLoS One* **2**:e832.
85. "Standards of Medical Care in Diabetes" 2007. *Diabetes Care* **30 Suppl 1**:S4-S41.
86. Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Jonsdottir, T., Walters, G. B., Styrkarsdottir, U., Gretarsdottir, S., Emilsson, V., Ghosh, S., Baker, A., Snorraddottir, S., Bjarnason, H., Ng, M. C., Hansen, T., Bagger, Y., Wilensky, R. L., Reilly, M. P., Adeyemo, A., Chen, Y., Zhou, J., Gudnason, V., Chen, G., Huang, H., Lashley, K., Doumatey, A., So, W. Y., Ma, R. C., Andersen, G., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., van Vliet-Ostapchouk, J. V., Hofker, M. H., Wijmenga, C., Christiansen, C., Rader, D. J., Rotimi, C., Gurney, M., Chan, J. C., Pedersen, O., Sigurdsson, G., Gulcher, J. R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A. Stefansson, K. 2007 "A Variant in Cdkal1 Influences Insulin Response and Risk of Type 2 Diabetes". *Nat Genet* **39**:770-5.
87. Stumvoll, M., Goldstein, B. J. van Haeften, T. W. 2008 "Type 2 Diabetes: Pathogenesis and Treatment". *Lancet* **371**:2153-6.
88. Torgersen, K. L. Curran, C. A. 2006 "A Systematic Approach to the Physiologic Adaptations of Pregnancy". *Crit Care Nurs Q* **29**:2-19.

89. Ubeda, M., Rukstalis, J. M., Habener, J. F. 2006 "Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 5 Activity Protects Pancreatic Beta Cells from Glucotoxicity". *J Biol Chem* **281**:28858-64.
90. Unoki, H., Takahashi, A., Kawaguchi, T., Hara, K., Horikoshi, M., Andersen, G., Ng, D. P., Holmkvist, J., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Hansen, T., Nurbaya, S., Tsunoda, T., Kubo, M., Babazono, T., Hirose, H., Hayashi, M., Iwamoto, Y., Kashiwagi, A., Kaku, K., Kawamori, R., Tai, E. S., Pedersen, O., Kamatani, N., Kadowaki, T., Kikkawa, R., Nakamura, Y., Maeda, S. 2008 "Snps in Kcnq1 Are Associated with Susceptibility to Type 2 Diabetes in East Asian and European Populations". *Nat Genet* **40**:1098-102.
91. Vambergue, A., Valat, A. S., Dufour, P., Cazaubiel, M., Fontaine, P., Puech, F. 2002 "[Pathophysiology of Gestational Diabetes]". *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **31**:4S3-4S10.
92. van Hoek, M., Langendonk, J. G., de Rooij, S. R., Sijbrands, E. J., Roseboom, T. J. 2009 "Genetic Variant in the Igf2bp2 Gene May Interact with Fetal Malnutrition to Affect Glucose Metabolism". *Diabetes* **58**:1440-4.
93. Villareal, D. T., Koster, J. C., Robertson, H., Akrouh, A., Miyake, K., Bell, G. I., Patterson, B. W., Nichols, C. G., Polonsky, K. S. 2009 "Kir6.2 Variant E23k Increases Atp-Sensitive K⁺ Channel Activity and Is Associated with Impaired Insulin Release and Enhanced Insulin Sensitivity in Adults with Normal Glucose Tolerance". *Diabetes* **58**:1869-78.
94. Villarreal-Molina, M. T., Aguilar-Salinas, C. A., Rodriguez-Cruz, M., Riano, D., Villalobos-Comparan, M., Coral-Vazquez, R., Menjivar, M., Yescas-Gomez, P., Konigsoerg-Fainstein, M., Romero-Hidalgo, S., Tusie-Luna, M. T., Canizales-Quinteros, S. 2007 "The Atp-Binding Cassette Transporter A1 R230c Variant Affects Hdl Cholesterol Levels and Bmi in the Mexican Population: Association with Obesity and Obesity-Related Comorbidities". *Diabetes* **56**:1881-7.
95. Villarreal-Molina, M. T., Flores-Dorantes, M. T., Arellano-Campos, O., Villalobos-Comparan, M., Rodriguez-Cruz, M., Miliar-Garcia, A., Huertas-Vazquez, A., Menjivar, M., Romero-Hidalgo, S., Wachter, N. H., Tusie-Luna, M. T., Cruz, M., Aguilar-Salinas, C. A., Canizales-Quinteros, S. 2008 "Association of the Atp-Binding Cassette Transporter A1 R230c Variant with Early-Onset Type 2 Diabetes in a Mexican Population". *Diabetes* **57**:509-13.
96. Wan, J., Jiang, X., Bai, J., Shen, D., Wang, T. 2009 "The Effects of E23k Polymorphism in Kir6.2 Subunit on Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle Cells by Long-Chain Fatty Acyl Coa". *Biochem Biophys Res Commun* **381**:496-501.

97. Wei, F. Y., Nagashima, K., Ohshima, T., Saheki, Y., Lu, Y. F., Matsushita, M., Yamada, Y., Mikoshiba, K., Seino, Y., Matsui, H., Tomizawa, K. 2005 "Cdk5-Dependent Regulation of Glucose-Stimulated Insulin Secretion". *Nat Med* **11**:1104-8.
98. Xie, S., Lee, Y. F., Kim, E., Chen, L. M., Ni, J., Fang, L. Y., Liu, S., Lin, S. J., Abe, J., Berk, B., Ho, F. M., Chang, C. 2009 "Tr4 Nuclear Receptor Functions as a Fatty Acid Sensor to Modulate Cd36 Expression and Foam Cell Formation". *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:13353-8.
99. Yasuda, K., Miyake, K., Horikawa, Y., Hara, K., Osawa, H., Furuta, H., Hirota, Y., Mori, H., Jonsson, A., Sato, Y., Yamagata, K., Hinokio, Y., Wang, H. Y., Tanahashi, T., Nakamura, N., Oka, Y., Iwasaki, N., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Seino, Y., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Takeda, J., Maeda, E., Shin, H. D., Cho, Y. M., Park, K. S., Lee, H. K., Ng, M. C., Ma, R. C., So, W. Y., Chan, J. C., Lyssenko, V., Tuomi, T., Nilsson, P., Groop, L., Kamatani, N., Sekine, A., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Yoshida, T., Tokunaga, K., Itakura, M., Makino, H., Nanjo, K., Kadowaki, T., Kasuga, M. 2008 "Variants in Kcnq1 Are Associated with Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus". *Nat Genet* **40**:1092-7.
100. Zeggini, E., Scott, L. J., Saxena, R., Voight, B. F., Marchini, J. L., Hu, T., de Bakker, P. I., Abecasis, G. R., Almgren, P., Andersen, G., Ardlie, K., Bostrom, K. B., Bergman, R. N., Bonnycastle, L. L., Borch-Johnsen, K., Burtt, N. P., Chen, H., Chines, P. S., Daly, M. J., Deodhar, P., Ding, C. J., Doney, A. S., Duren, W. L., Elliott, K. S., Erdos, M. R., Frayling, T. M., Freathy, R. M., Gianniny, L., Grallert, H., Grarup, N., Groves, C. J., Guiducci, C., Hansen, T., Herder, C., Hitman, G. A., Hughes, T. E., Isomaa, B., Jackson, A. U., Jorgensen, T., Kong, A., Kubalanza, K., Kuruvilla, F. G., Kuusisto, J., Langenberg, C., Lango, H., Lauritzen, T., Li, Y., Lindgren, C. M., Lyssenko, V., Marvelle, A. F., Meisinger, C., Midthjell, K., Mohlke, K. L., Morken, M. A., Morris, A. D., Narisu, N., Nilsson, P., Owen, K. R., Palmer, C. N., Payne, F., Perry, J. R., Pettersen, E., Platou, C., Prokopenko, I., Qi, L., Qin, L., Rayner, N. W., Rees, M., Roix, J. J., Sandbaek, A., Shields, B., Sjogren, M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Swift, A. J., Thorleifsson, G., Thorsteinsdottir, U., Timpson, N. J., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Walker, M., Watanabe, R. M., Weedon, M. N., Willer, C. J., Illig, T., Hveem, K., Hu, F. B., Laakso, M., Stefansson, K., Pedersen, O., Wareham, N. J., Barroso, I., Hattersley, A. T., Collins, F. S., Groop, L., McCarthy, M. I., Boehnke, M., Altshuler, D. 2008 "Meta-Analysis of Genome-Wide Association Data and Large-Scale Replication Identifies Additional Susceptibility Loci for Type 2 Diabetes". *Nat Genet* **40**:638-45.
101. Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., Timpson, N. J., Perry, J. R., Rayner, N. W., Freathy, R. M., Barrett, J. C., Shields, B., Morris, A. P., Ellard, S., Groves, C. J., Harries, L.

W., Marchini, J. L., Owen, K. R., Knight, B., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Morris, A. D., Doney, A. S., McCarthy, M. I., Hattersley, A. T. 2007 "Replication of Genome-Wide Association Signals in Uk Samples Reveals Risk Loci for Type 2 Diabetes". *Science* **316**:1336-41.

102. Zoller, M. 2009 "Tetraspanins: Push and Pull in Suppressing and Promoting Metastasis". *Nat Rev Cancer* **9**:40-55.