



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONTRIBUCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS COMUNES EN EL
DESARROLLO DE LA DIABETES GESTACIONAL Y SU EFECTO EN LA
EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSITO Y PLACENTA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

ALICIA HUERTA CHAGOYA

TUTOR PRINCIPAL: Dra. Teresa Tusié Luna
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
[Centro de Ciencias Genómicas](#)

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
[Instituto Nacional de Nutrición](#)

MÉXICO, D. F. noviembre, 2015



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.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al **Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP)** por el apoyo otorgado para la asistencia al I Congreso de Biología Computacional en Bogotá, Colombia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	Marcador informativo de ancestría
AUC	Área bajo la Curva
CT	Colesterol total
CTOG	Curva de tolerancia oral a la glucosa
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DT1	Diabetes Tipo 1
DT2	Diabetes Tipo 2
EFA	Ácidos grasos esenciales
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FA	<i>Fatty acids</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HGDP	<i>Human Genome Diversity Panel</i>
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
IC	Intervalo de confianza
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IMC	Índice de masa corporal
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteína lipasa
M	Músculo
MCR	<i>Metabolic Clearance Rate</i>
MGDP	<i>Mexican Genome Diversity Panel</i>
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes in the Young</i>
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	<i>Odds ratio</i>
PCA	Análisis de componentes principales
PF	Placenta fetal
PM	Placenta materna
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RI	Resistencia a la insulina
SDG	Semanas de gestación
sdLDL	<i>Small dense low density lipoprotein</i>
SES	Estatus socioeconómico
SIGMA DT2	<i>Slim Initiative in Genomic Medicine for the Americas Type 2 Diabetes</i>
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
TG	Triglicéridos
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Hiperglucemia en el embarazo (20-49 años) por región IDF en 2013	4
Tabla 1.2. Estadísticas de la DM en México	4
Tabla 1.3. Criterios de diagnóstico de la hiperglucemia en el embarazo	11
Tabla 1.4. Criterios de diagnóstico de la DM de la OMS, 2006.....	12
Tabla 1.5. Consecuencias fetales y maternas de la DMG	13
Tabla 1.6. Factores de riesgo para el desarrollo de la DMG	13
Tabla 6.1. Criterios de inclusión y exclusión de la muestra de DMG	19
Tabla 7.1. Descripción clínica y sociodemográfica de la muestra de DMG	29
Tabla 7.2. Descripción metabólica materna de la muestra completa de DMG	31
Tabla 7.3. Factores de riesgo para la DMG en población mexicana.....	32
Tabla 7.4. Reclasificación metabólica de las mujeres con DMG.....	32
Tabla 7.5. Efectos de la DMG y la obesidad pregestacional materna en el recién nacido	32
Tabla 7.6. Variantes genéticas asociadas con el riesgo de DMG en mujeres mexicanas	33
Tabla 7.7. Comparación de los efectos de los alelos de riesgo entre las muestras de DMG delgadas vs. no delgadas	34
Tabla 7.8. Haplotipos asociados con el riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados	34
Tabla 7.9. Variantes genéticas asociadas significativamente con fluctuaciones en rasgos metabólicos en mujeres mexicanas embarazadas.....	35
Tabla 7.10. Comparación de los efectos de los alelos de riesgo de <i>TCF7L2</i> y <i>KCNQ1</i> entre la DMG y la DT2	35
Tabla 7.11. Frecuencias alélicas de las variantes genéticas asociadas con el riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados en mujeres mexicanas, así como el <i>loci SLC16A11</i>	37
Tabla 7.12. Anotación funcional de las variantes genéticas asociadas al riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados en mujeres mexicanas	38
Tabla 7.13. Descripción clínica y sociodemográfica de la submuestra de DMG.....	39
Tabla 7.14. Características metabólicas maternas de la submuestra de DMG	40
Tabla 7.15. Características antropométricas y metabólicas de los recién nacidos de la submuestra de DMG	41
Tabla 7.16. Expresión relativa de <i>TCF7L2</i> en mujeres con DMG en tejidos de relevancia metabólica.....	42
Tabla 7.17. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs7903146 en la submuestra de DMG	42
Tabla 7.18. Asociación de la variante rs7903146 con los niveles de expresión de <i>TCF7L2</i> por tejido analizado	43
Tabla 7.19. Asociación de la disminución en la expresión de <i>TCF7L2</i> con rasgos metabólicos materno-fetales	44
Tabla 7.20. Expresión relativa de <i>KCNQ1</i> y <i>KCNQ1OT1</i> en mujeres con DMG en tejidos de relevancia metabólica	45
Tabla 7.21. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes rs231362 y rs2237897 en la submuestra de DMG	46
Tabla 7.22. Asociación de las variantes rs231362 y rs2237897 con los niveles de expresión de <i>KCNQ1</i> y <i>KCNQ1OT1</i> por tejido.....	47
Tabla 7.23. Análisis de los efectos del origen parental del alelo T de rs231362 en la asociación con los niveles de <i>KCNQ1</i> y <i>KCNQ1OT1</i>	48
Tabla 7.24. Asociación de la disminución en la expresión de <i>KCNQ1</i> y <i>KCNQ1OT1</i> con rasgos metabólicos materno-fetales.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Metabolismo del embarazo fisiológico	7
Figura 1.2. Fisiopatología de la DMG	9
Figura 1.3. Diagrama de Venn de los <i>loci</i> de riesgo para la DMG, DT2 y aumento del IMC reportados en poblaciones caucásicas y asiáticas.....	15
Figura 1.2. <i>Loci</i> de riesgo para la DMG, DT2 y aumento del IMC reportados en poblaciones caucásicas y asiáticas.....	12
Figura 6.1. Diagrama de flujo de la estrategia del estudio	18
Figura 6.2. Tejidos biopsiados durante la cesárea electiva.....	20
Figura 6.3. Validación del panel de 118 AIM usado para corregir la estratificación de la población.....	22
Figura 6.4. Evaluación del efecto del origen parental de rs231362	25
Figura 7.1. Estructura poblacional de las muestras de DMG y DT2	30
Figura 8.1. Factores de riesgo pregestacionales para el desarrollo de la DMG, efectos de la DMG en el embarazo y sus consecuencias para la madre y el recién nacido	50
Figura 8.2. Efecto de la disminución de <i>TCF7L2</i> en diversos tejidos en que se expresa	50
Figura 8.3. Representación gráfica del <i>locus</i> de <i>TCF7L2</i> y su patrón de expresión en la DMG.....	54
Figura 8.4. Funciones de los complejos <i>KCNQ1+KCNE</i> en diversos tejidos en que se expresan	56
Figura 8.5. Representación gráfica del <i>locus</i> de <i>KCNQ1</i> y su patrón de expresión en la DMG	57
Figura 8.6. Diagrama de Venn de los genes asociados a la DMG, DT2 y aumento del IMC que se han identificado en población mexicana.....	59

RESUMEN

Las similitudes epidemiológicas y fisiológicas entre la Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) y la Diabetes Tipo 2 (DT2) sugieren que las mismas variantes genéticas se asocian con el desarrollo de ambas enfermedades. Aunque algunas variantes de riesgo para el desarrollo de la DT2 se han asociado con la susceptibilidad a la DMG, su arquitectura genética no se entiende por completo. En este estudio analizamos 176 SNP ubicados en 115 *loci* previamente asociados con la DT2, la DMG y el aumento del IMC, en 750 mujeres mexicanas embarazadas. Se encontró que dos de los *loci* mayormente replicados con el riesgo de desarrollar DT2, también se asocian con la DMG: *TCF7L2* (rs7901695, rs4506565, rs7903146, rs12243326) y *KCNQ1* (rs2237892, rs163184, rs2237897). Además, encontramos que otros dos *loci* se asocian con fluctuaciones en rasgos glucémicos: *CENTD2* (glucemia OGTT 60', rs1552224) y *MTNR1B* (HOMA B, rs1387153). De forma interesante, *SLC16A11*, el *locus* de mayor susceptibilidad a la DT2 en mexicanos, no mostró jugar un papel importante en el riesgo a la DMG.

Con el fin de evaluar la participación de los genes asociados a la DMG, se analizaron sus patrones de expresión en placenta, tejido adiposo y músculo de 47 mujeres mexicanas embarazadas. Se encontró que la expresión de *TCF7L2* disminuye en tejido adiposo visceral y subcutáneo, así como en músculo de mujeres con DMG, pero que dicho cambio no se asocia con ser portador de la variante de riesgo rs7903146, genotipada a partir del DNA de la madre o del recién nacido.

Por su parte, el nivel de expresión de *KCNQ1OT1*, un *lncRNA* codificado en dirección antisentido a *KCNQ1*, disminuyó en placenta de mujeres con DMG. Mientras que la variante de protección rs2237897 se asoció con un mayor nivel de expresión de *KCNQ1OT1*, la variante de riesgo rs231362, ambas genotipadas a partir del DNA de la madre, se asoció con menores niveles de expresión de *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* en el lado materno de la placenta.

Además de confirmar que los patrones de expresión de los genes de susceptibilidad a la DMG se modifican de manera tejido-específica, se observó que la disminución en su expresión se acompaña de fluctuaciones en rasgos metabólicos con potenciales efectos adversos en la madre y el recién nacido, tales como desregulación de los procesos adipogénicos maternos y de crecimiento fetal.

ABSTRACT

Epidemiological and physiological similarities between Gestational Diabetes Mellitus (GDM) and Type 2 Diabetes (T2D) suggest the same set of genetic variants are associated with the development of both diseases. Although several T2D risk variants have also been associated with GDM, its genetic architecture is not well understood. In this study, we assessed 176 SNPs near 115 loci previously associated with T2D, DMG and high BMI, in 750 Mexican pregnant women. It was found that two of the most replicated T2D risk *loci* are also associated with GDM: *TCF7L2* (rs7901695, rs4506565, rs7903146, rs12243326) and *KCNQ1* (rs2237892, rs163184, rs2237897). Besides, we found that two other *loci* are associated with glycemic traits: *CENTD2* (OGTT 60' glucose, rs1552224) y *MTNR1B* (HOMA B, rs1387153). Interestingly, *SLC16A11*, the most important *locus* for T2D risk in Mexican population did not show to play any role in GDM risk.

To address the role of the GDM associated genes, we analyzed their expression patterns in placenta, adipose tissue and muscle of 47 Mexican pregnant women. It was found that *TCF7L2* expression was lower in visceral and subcutaneous adipose tissue, as well as in muscle of GDM women. However, *TCF7L2* low expression was not associated with being carrier of the rs7903146 risk variant, genotyped from maternal or neonatal DNA.

Meanwhile, *KCNQ1OT1* expression level, an antisense lncRNA of *KCNQ1*, was lower in placenta of GDM women. While the rs2237897 protective variant was associated with a higher *KCNQ1OT1* expression level, the rs231362 risk variant, both genotyped from maternal DNA, was associated with both *KCNQ1* and *KCNQ1OT1* expression levels in the maternal side of the placenta.

Apart from confirming that the expression patterns of the GDM risk genes were modified in a tissue-specific manner, it was observed the gene expression decrease is associated with metabolic traits changes with potential adverse effects in the mother and newborn, such as maternal deregulation of adipogenesis and fetal growth impairment.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. LA DIABETES MELLITUS.....	2
1.2. HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA DMG.....	3
1.3. METABOLISMO EN EL EMBARAZO NORMAL	4
1.4. METABOLISMO EN EL EMBARAZO COMPLICADO POR DMG	8
1.5. DIAGNÓSTICO DE LA DMG Y EFECTOS DURANTE Y DESPUÉS DEL EMBARAZO	10
1.6. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LA DMG	13
1.7. GENÉTICA DE LA DMG	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. OBJETIVOS	17
5. HIPÓTESIS	17
6. METODOLOGÍA	18
6.1. DECLARACIÓN DE ÉTICA	18
6.2. PARTICIPANTES DEL ESTUDIO Y MUESTRAS	18
6.3. MEDICIONES BIOQUÍMICAS Y CÁLCULOS	20
6.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE SNP	21
6.5. PURIFICACIÓN DE DNA, GENOTIPIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD	22
6.6. CONTROL DE LA ESTRATIFICACIÓN POBLACIONAL	23
6.7. PURIFICACIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DEL cDNA	23
6.8. ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA	23
6.9. INFERENCIA DEL ORIGEN PARENTAL ALÉLICO DE LA VARIANTE rs231362.....	23
6.10. ANOTACIÓN FUNCIONAL DE LOS SNP Y ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENES	24
6.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
7. RESULTADOS	28
7.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA COMPLETA DE DMG	28
7.2. FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR LA DMG Y EFECTOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO.....	31
7.3. VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS CON LA DMG Y CON RASGOS RELACIONADOS.....	33
7.4. DESCRIPCIÓN DE LA SUBMUESTRA DE DMG.....	38
7.5. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>TCF7L2</i> EN LA DMG Y SU ASOCIACIÓN CON LA VARIANTE rs7903146.....	41
7.6. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>KCNQ1</i> EN LA DMG Y SU ASOCIACIÓN CON LAS VARIANTES rs231362 Y rs2237897	44
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIONES	61
10. PERSPECTIVAS	61
11. BIBLIOGRAFÍA	63
12. APÉNDICES	71
12.1. APROBACIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA	71
12.2. LISTA DE SNP ANALIZADOS EN ESTE TRABAJO	72
12.3. PUBLICACIONES.....	78

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) fue reconocida como desorden médico hace más de 2000 años. A la fecha se ha convertido en una de las enfermedades con mayor impacto epidemiológico en el mundo. La DM ha alcanzado proporciones pandémicas. En el año 2010 se calculó que había 285 millones de diabéticos alrededor del mundo [1] y 382 millones en 2013 [2]. Se estima que aumentará a 592 millones en menos de 25 años [2]. 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 anuales. La Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 [3], informó que la prevalencia nacional de DM para adultos mayores de 20 años era de 7.5%; mientras que en solo seis años, la prevalencia aumentó a 14.42%, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 [4]. Estas diferencias no son atribuibles al diseño de los estudios o a la metodología para el diagnóstico y la estimación de la prevalencia, por lo que la tendencia es alarmante.

La DM es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia que resulta de defectos en la secreción de insulina, su acción o ambas [5]. La Organización Mundial de la Salud (OMS, *Organización Mundial de la Salud*), reconoce cuatro tipos principales que se describen a continuación [6].

- 1) *Diabetes mellitus Tipo 1 (DT1)*: es un trastorno autoinmune a causa del cual el cuerpo ataca y destruye sus células β pancreáticas, resultando en la producción casi nula de insulina (causa directa de la hipoglucemia). Los pacientes que la padecen, necesitan la administración exógena continua de dicha hormona, por lo que también es llamada diabetes mellitus dependiente de insulina. Además, estos pacientes son muy propensos a la cetosis (acidosis causada por una producción excesiva de cuerpos cetónicos) y una proporción variable de los casos presentan anticuerpos contra los islotes pancreáticos, característica utilizada para su diagnóstico [7]. Generalmente, los pacientes tienen síntomas agudos de la enfermedad y niveles muy elevados de glucosa sanguínea; debido a esto, son diagnosticados muy jóvenes [6]. El 90% de los casos comienzan en la infancia (entre 10-14 años de edad).
- 2) *Diabetes mellitus Tipo 2 (DT2)*: es la forma más común de esta enfermedad, en México representa el 97% de los casos diagnosticados [8]. Generalmente, se diagnostica de manera tardía hasta que aparecen complicaciones; debido a esto, aproximadamente un tercio de los afectados permanecen no diagnosticados [6]. La causa de la hiperglucemia en este tipo de diabetes es más compleja debido a que resulta tanto de defectos progresivos en la secreción de la insulina como de la resistencia a dicha 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 hormona [9]. Conforme avanza la enfermedad, las células β van perdiendo poco a poco su capacidad de proliferación y función.
- 3) *Otros tipos específicos de DM*: dentro de este grupo se ubican el resto de tipos de DM que se desarrollan por otras causas, entre las que destacan [6] defectos genéticos en la función de la célula β (MODY, *Maturity Onset Diabetes in the Young*; y otras), defectos genéticos

en la acción de la insulina (Síndrome de Berardinelli-Seip, autoinmunidad al receptor de insulina, leprechaunismo), enfermedades en el páncreas exocrino (DM secundaria a pancreatitis, trauma o remoción quirúrgica del páncreas, cáncer de páncreas o fibrosis quística), enfermedades en el páncreas endocrino (Síndrome de Cushing, feocromocitoma, acromegalia) e inducción por administración de medicamentos u otros químicos.

- 4) *Diabetes mellitus Gestacional (DMG)*: se define como una intolerancia a los carbohidratos de severidad variable que se presenta o se diagnostica por primera vez durante el embarazo [10]. Éste es el tipo de DM que ocupa a este trabajo y será explicado a detalle en las secciones que siguen.

1.2. HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA DMG

A pesar de que la DMG, es ahora objeto de mucha atención, hace más de 200 años que fue descrita. El primer caso registrado se documenta en la tesis doctoral de Bennewitz en 1824, quien consideró que la DM era un síntoma del embarazo y que ésta, como la glucosuria, desaparecían después de resuelto el embarazo. Al respecto, escribió que: *“La enfermedad aparece a lo largo del embarazo y, en el mismo momento [...]; cuando el embarazo aparece, ésta aparece; mientras el embarazo dura, ésta dura; terminando poco después del embarazo”*. La única evidencia que tuvo sobre la enfermedad fue la medición de glucosa en orina y, aunque el recién nacido murió durante el parto, Bennewitz recaló que era *“tan robusto y de carácter saludable, que se hubiera pensado que Hércules había sido engendrado”*. La madre mejoró poco a poco hasta desaparecer la medición de glucosa alta en orina.

El caso de Bennewitz ya correspondía a la definición de DMG aceptada hasta el momento, arriba mencionada, propuesta en 1980 durante la primera Conferencia-*Workshop* al respecto. A través del tiempo, este tipo de DM ha tomado diferentes nombres, entre los cuales destaca “prediabetes” en 1940; sin embargo, fue O’Sullivan el primero en usar el término “diabetes gestacional”. En 1982, Duncan realizó más observaciones mostrando que: 1) la DMG puede aparecer durante el embarazo; 2) puede ocurrir sólo durante el embarazo y estar ausente en otros momentos de la vida de la paciente; 3) puede cesar con la resolución del embarazo pero ser recurrente; 4) el embarazo puede ocurrir durante la diabetes; 5) el embarazo y el parto pueden no ser afectados por la diabetes; 6) el embarazo es muy propenso a ser interrumpido y probablemente implica la muerte del feto [11].

A nivel mundial, se estima que 21.4 millones o 16.9% de los nacimientos vivos en 2013 sufrieron algún tipo de hiperglucemia en el embarazo. Tan solo un 16% de esos casos se debieron a diabetes pre-existente antes del embarazo, mientras que el resto se debieron a la DMG. La prevalencia de hiperglucemia del embarazo varía entre las diferentes regiones geográficas, siendo la del sureste de Asia la de mayor prevalencia (25%) comparada con un 10.4% en Norteamérica y el Caribe (Tabla 1.1). Alarmantemente, el 91.6% de los casos se observaron en países de ingresos bajos y medios, donde el acceso a los servicios médicos maternos son limitados. Además, la prevalencia de hiperglucemia en el embarazo aumenta significativamente con la edad, siendo más alta en las mujeres mayores de 45 años (47.7%). Dado que son pocos los embarazos que suceden en dicho grupo de edad, se ha calculado que el 23% de los casos de hiperglucemia en el embarazo ocurren en mujeres mayores de 35 años [2]. Es importante mencionar que la comparabilidad entre estudios y cifras de prevalencia es poco confiable dada la gran diversidad de métodos y criterios usados para el diagnóstico de la DMG.

Tabla 1.1. Hiperglucemia en el embarazo (20-49 años) por región IDF en 2013.

Región IDF	Casos en nacimientos vivos (millones)	Prevalencia estimada (%)	Proporción de casos debidos a diabetes pre-existente (%)
África	4.6	14.4	19.6
Europa	1.7	12.6	10.9
Norte de África y Medio Oriente	3.4	17.5	17.7
Norteamérica y Caribe	0.9	10.4	24.9
Sudamérica y Centroamérica	0.9	11.4	17.3
Sureste de Asia	6.3	25.0	9.5
Pacífico Oeste	3.7	11.9	14.1

Datos obtenidos de [2]. Los datos de hiperglucemia en el embarazo estuvieron disponibles para 34 países a través de las regiones de la IDF, a partir de los cuales se generaron los estimados. IDF, *International Diabetes Federation*.

En México, no se han reportado cifras de prevalencia nacional de DMG debido a la carencia de programas y métodos de diagnóstico consenso. Sin embargo, un estudio reciente realizado en el Instituto Nacional de Perinatología encontró una prevalencia hospitalaria de 12.9% [12], comparada con la prevalencia nacional de DM de 24.2% entre individuos con menos de 40 años de edad, ambas reportadas en 2012 [13]. La DMG ha cobrado gran relevancia epidemiológica, las Encuestas Nacionales de Salud han llamado la atención sobre ella a partir de algunas observaciones: 1) el número de adultos jóvenes diabéticos (20-40 años de edad) se ha incrementado [3][4]; 2) un porcentaje importante de estos pacientes no se sabía diabético, fue diagnosticado durante la realización de las Encuestas; 3) la prevalencia de síndrome metabólico es mayor en mujeres [14][15][16] (Tabla 1.2). Con base en lo anterior, se piensa que la prevalencia de DMG en el país podría estar subestimada, muchas pacientes podrían ser diabéticas no diagnosticadas y un buen control de la mujer con DMG podría disminuir la presencia de complicaciones materno-fetales asociadas y, asegurar un buen estado metabólico al terminar el embarazo.

Tabla 1.2. Estadísticas de la DM en México.

	ENEC 1993	ENSA 2000	ENSA 2006
No. de causa de muerte (♀)	n.d.	1	1
No. de causa de muerte (♂)	n.d.	2	1
Prevalencia global (%)	6.7	7.5	14.42
Prevalencia de DM inicio temprano (%)	1.8	2.3	5.8
% del total de diabéticos de inicio temprano	14.8	13.2	21.5
Ratio DP:ND	1:0.45	1:0.26	1:0.97
Prevalencia de DM en mujeres (%)	n.d.	7.8	13.2
Prevalencia de DM en hombres (%)	n.d.	7.2	15.8
Nuevos diagnósticos (%)	2.1	1.7	7.1
Prevalencia síndrome metabólico ATP III (%)	26.6	34	36.8
Prevalencia síndrome metabólico en mujeres (%)	n.d.	44.2	42.2
Prevalencia síndrome metabólico en hombres (%)	n.d.	24.1	30.3

Datos obtenidos de [14][15][16] DP(diagnóstico previo); ND (nuevo diagnóstico); n.d. (no disponible).

1.3. METABOLISMO EN EL EMBARAZO NORMAL

Para poder entender la fisiopatología de la DMG, es necesario conocer la fisiología del embarazo normal. A lo largo del embarazo, ocurren diversos cambios en el metabolismo de la madre gestante para asegurar un suministro continuo de nutrientes al feto en crecimiento, a pesar de la ingesta intermitente de alimentos de la madre. Desde un punto de vista metabólico, en la gestación hay dos periodos [17]:

- 1) La primera mitad se caracteriza por cambios en el organismo materno que llevan al almacenamiento de energía y nutrientes. El apetito, así como la sensibilidad a la insulina, aumentan. Estos cambios facilitan la incorporación de glucosa y lípidos en el tejido adiposo. De hecho, la mayoría de las mujeres muestran un aumento en la proporción de grasa corporal.
- 2) La segunda mitad utiliza la reserva acumulada para facilitar el rápido crecimiento fetal y placentario. Este periodo se caracteriza por un estado de resistencia a la insulina (RI), en el que disminuye la incorporación de glucosa por parte de los tejidos maternos sensibles a la hormona, principalmente el tejido adiposo blanco y el músculo. Tal condición facilita que durante el postprandio, los niveles de glucosa plasmática se mantengan altos por un tiempo más prolongado, favoreciendo así la transferencia alta de glucosa al feto vía difusión pasiva, cuyo requerimiento diario es muy alto (30-50 g de glucosa/día). Este comportamiento es secundario a la resistencia a la insulina y no debido a una disfunción en la célula β . A pesar del aumento en la gluconeogénesis y la resistencia a la insulina después de periodos de ayuno moderados, la madre tiene tendencia a desarrollar hipoglucemia.

Como respuesta a la creciente resistencia a la insulina, se desencadena un aumento adaptativo en la secreción de insulina materna, resultado de hiperplasia, hipertrofia e hiperfunción de las células β pancreáticas. Durante la primera semana postparto, la homeostasis normal de las células β se recupera gracias a la involución de la masa β pancreática dada por la disminución en la proliferación y tamaño, así como al aumento en la muerte de dichas células [18].

La resistencia a la insulina en el embarazo fisiológico es multifactorial e involucra [19]:

- 1) *Una reducción en la capacidad de la insulina para fosforilar a su receptor.* Una de las consecuencias del aumento de la adiposidad materna es el incremento en la secreción de adipocinas proinflamatorias, entre ellas TNF α . Éste, aumenta la fosforilación en serinas del sustrato del receptor de insulina I (IRS-1) disminuyendo así la actividad tirosin cinasa del receptor de insulina. A su vez, los niveles altos de TNF α disminuyen la transcripción de la adiponectina, adipocina que en condiciones fisiológicas normales favorece la sensibilidad a la insulina al estimular la incorporación de glucosa en músculo esquelético y reducir la gluconeogénesis hepática.
- 2) *Una disminución en la expresión del sustrato 1 del receptor de la insulina IRS-1 y de los transportadores de glucosa GLUT4.*
- 3) *Un aumento en la expresión de la subunidad p85 α de la PI3K.* El incremento en la concentración de hormonas placentarias reprograman el metabolismo materno para alcanzar un estado de resistencia a la insulina suficiente para mantener el embarazo. Por ejemplo, la hormona de crecimiento placentario humana (hPGH) provoca un aumento en la expresión de la subunidad p85 α de PI3K en músculo esquelético, inhibiendo consigo la vía de señalización de la insulina.

Respecto a las vías metabólicas de los principales nutrientes, a continuación, se resumen algunos de los cambios más importantes que ocurren en ellas (Figura 1.1):

- 1) *Carbohidratos:* la glucosa es la fuente primaria de energía de los tejidos feto-placentarios, seguida de los aminoácidos. En el embarazo temprano, la tolerancia a la glucosa es

normal o ligeramente mejor, mientras que la sensibilidad periférica a la insulina y la producción de glucosa basal hepática son normales. Además, los niveles de glucosa e insulina plasmáticos no cambian. Por su parte, en el embarazo tardío, la acción de la insulina disminuye en un 50-70%, mientras que la secreción de la insulina se potencia. Adicionalmente, la producción de glucosa hepática aumenta en un 16-30%, siendo el glicerol su principal sustrato, lo que no son aquellos clásicos del metabolismo normal como el piruvato y la alanina, que son transferidos al feto [17].

A pesar de lo anterior y del reducido consumo de glucosa por parte de los tejidos maternos (debido a la RI), la madre puede desarrollar hipoglucemia, especialmente en condiciones de ayuno. Esto es resultado de la alta tasa de transferencia de glucosa transplacentaria, a través de difusión facilitada usando principalmente el transportador GLUT1. El feto no sintetiza glucosa pero la usa como principal sustrato oxidativo. La concentración de glucosa es, generalmente menor en el feto que en la madre, lo cual permite un gradiente positivo materno-fetal, que facilita la transferencia placentaria.

- 2) *Proteínas y aminoácidos*: los ajustes metabólicos, que aseguran las demandas fetales proteicas, consisten en potenciar la utilización de la proteína dietaria y la retención de nitrógeno, principalmente en la segunda mitad del embarazo. La madre incorpora un excedente de proteínas en sus propios tejidos, debido a la reducción en la excreción de nitrógeno en orina, como consecuencia de la disminución en la síntesis de urea. Aunque estas alteraciones favorecen la conservación proteica, en el embarazo se observa hipoaminoacidemia, especialmente durante el ayuno. Esto refleja que hay una gran incorporación placentaria de aminoácidos. Adicionalmente, la oxidación materna de aminoácidos de cadena ramificada disminuye, favoreciendo su disponibilidad para la transferencia al feto. Contrario a lo que ocurre con la glucosa, la concentración de la mayoría de los aminoácidos en plasma fetal es mayor que en la madre, debido a que la transferencia se hace a través de transporte activo usando transportadores selectivos.
- 3) *Lípidos*: un embarazo normal se caracteriza por cambios en el metabolismo hepático y de tejido adiposo que alteran las concentraciones circulantes de triglicéridos (TG), ácidos grasos, colesterol (CT) y fosfolípidos. Después de una disminución inicial en las primeras 8 semanas del embarazo, hay un aumento continuo en las concentraciones séricas de dichos compuestos, así como de las lipoproteínas que los transportan [17]. La acumulación de grasa en tejidos maternos, así como la hiperlipidemia durante los dos primeros tercios de la gestación, representan la mayor parte del incremento en el peso corporal de la madre. En parte, es resultado de la hiperfagia materna, pero también del aumento de su síntesis endógena y de cambios en su regulación metabólica.

En modelos de rata, ya se ha reportado modulación de la actividad de proteínas del metabolismo de lípidos durante el embarazo, lactancia y post-lactancia. Por ejemplo, la actividad de la HMG-CoA reductasa hepática, enzima limitante para la síntesis del colesterol, se reduce en un 60% en el embarazo tardío y vuelve a aumentar durante la lactancia [20]. Adicionalmente, se ha observado un aumento de la HMG-CoA reductasa en glándulas adrenales, así como en el cuerpo lúteo de conejas preñadas, a partir del día 4 del apareamiento [21]. Por su parte, la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) hepática, enzima limitante para la síntesis de TG, se duplica al final del embarazo en rata, sugiriendo un gran requerimiento de síntesis y secreción de TG en lipoproteínas para su uso en placenta y glándulas mamarias [20].

En el embarazo humano temprano, el incremento en los niveles de estrógenos, progesterona e insulina favorecen la deposición de lípidos e inhibición de la lipólisis. Por ejemplo, la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) se eleva entre las semanas 8-11 de gestación en el tejido adiposo de la región femoral. Por el contrario, en el embarazo tardío, la hormona somatotropina coriónica (HSC) promueve la lipólisis y movilización de grasas. En contraste al embarazo temprano, la actividad de la LPL disminuye en tejido adiposo e hígado con lo cual se reduce la hidrólisis e incorporación de TG circulantes. En placenta, por su parte, la actividad LPL aumenta para favorecer el paso de nutrientes al feto. El cambio de estado anabólico a catabólico promueve el uso de los lípidos almacenados como fuente de energía materna mientras que preserva la glucosa y los aminoácidos para el feto. Específicamente en los períodos de ayuno prolongados, la actividad de la LPL hepática es alta, permitiendo un aumento en la oxidación de lípidos maternos almacenados, así como la cetogénesis [17]. Para músculo, no hay reportes sobre el comportamiento de la LPL durante el embarazo.

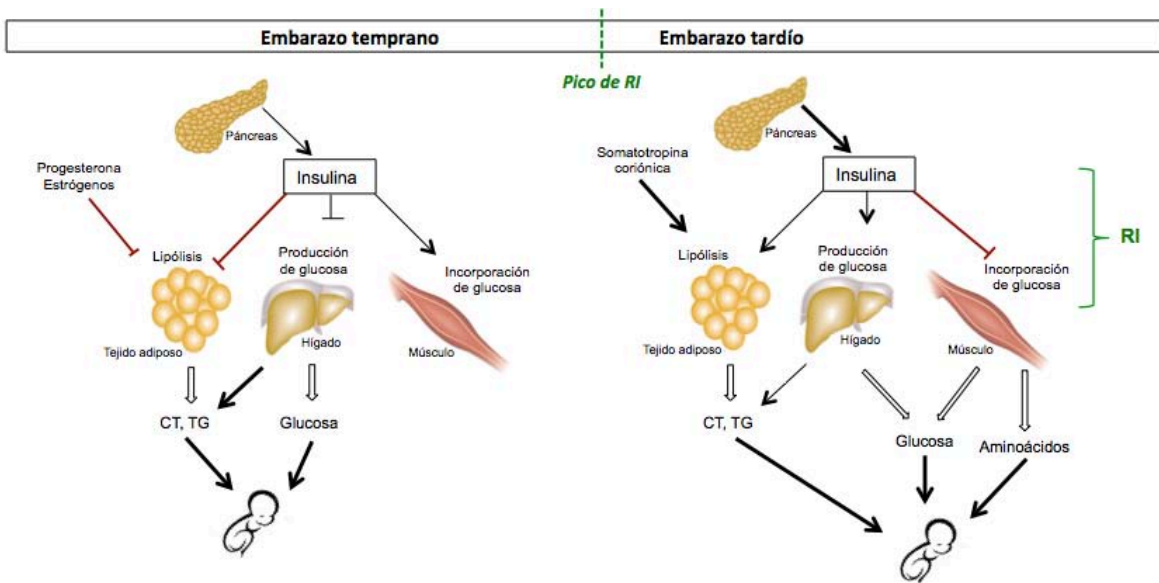


Figura 1.1. Metabolismo del embarazo fisiológico. Cambios metabólicos maternos en el embarazo temprano y tardío.

Respecto a la utilización de los nutrientes para el crecimiento fetal, se sabe que el colesterol es usado por la placenta para la síntesis de esteroides y formación de membranas. La transferencia placentaria de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y glicerol, productos de la lipólisis en tejido adiposo, es muy baja, así que una vez en el hígado materno, son reesterificados en TG y liberados en forma de VLDL a la circulación. El glicerol es usado como sustrato preferencial para la gluconeogénesis, mientras que los NEFA son oxidados para producir energía y sintetizar cuerpos cetónicos, los cuales si cruzan fácilmente la placenta. Aún cuando el feto no puede sintetizarlos, pueden alcanzar los mismos niveles plasmáticos que la madre. A diferencia de los adultos, el feto los puede usar tanto como combustible energético como sustratos de lípidos cerebrales.

La conversión preferencial de glicerol a glucosa, permite la conservación de otros sustratos gluconeogénicos, como alanina, para su transferencia al feto. La producción activa de cuerpos cetónicos sirve también como energía alternativa de tejidos maternos, como el músculo

esquelético; mientras que la glucosa se destina al mantenimiento del sistema nervioso materno y la transferencia al feto.

Los ácidos grasos esenciales son transportados en su forma esterificada en lipoproteínas. La placenta expresa receptores para las principales lipoproteínas, así como proteínas de unión a ácidos grasos; de modo que los ácidos grasos esenciales (EFA) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), son incorporados junto con su lipoproteína o solos. En la placenta, son hidrolizados y en su forma libre, difunden a la circulación fetal.

Después del parto, se observa un rápido incremento en la actividad de la LPL de las glándulas mamarias; la cual junto con la baja actividad de la LPL en tejido adiposo, dirige la circulación de TG a las mamas. Este mecanismo media en parte, la rápida desaparición de la hipertrigliceridemia materna. Los EFA y PUFA son incorporados por las mamas para la síntesis de leche, contribuyendo al desarrollo normal del recién nacido.

1.4. METABOLISMO EN EL EMBARAZO COMPLICADO POR DMG

Una vez descritas brevemente las condiciones del embarazo normal, se procede a explicar las complicaciones debidas a la DMG en el metabolismo. Aún cuando los mecanismos que llevan al desarrollo de la DMG no han sido totalmente definidos, están probablemente relacionados con una predisposición a la DT2, o bien, con una manifestación extrema de las alteraciones metabólicas que ocurren de forma normal en el embarazo. En este sentido, la DMG tendría un componente fisiopatológico similar a la DT2.

La DMG aparece cuando la resistencia a la insulina del embarazo se acompaña de un inadecuado aumento compensatorio en la secreción de insulina (Figura 1.2) [18]. Los mecanismos por los que la función β pancreática no se adapta a las nuevas demandas metabólicas aún no se conocen por completo; sin embargo, se han propuesto los siguientes:

- 1) Además de la disminución en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT4 y consecuente aumento en la RI en músculo esquelético y tejido adiposo, la progesterona tiene efectos directos en las células β . Se ha probado que los niveles altos de progesterona –vistos en las pacientes con DMG en comparación con las normoglucémicas [22], inducen la producción de especies reactivas del oxígeno, potenciando el estrés del retículo endoplásmico y contribuyendo finalmente a la muerte de células β por apoptosis [23]. Aunque estos estudios se han realizado en cultivos de líneas celulares productoras de insulina, así como en cultivos primarios de células β de rata, no se descarta la expresión del receptor de progesterona en otros tipos celulares pancreáticos y consecuentes efectos a los niveles altos de progesterona.
- 2) Bajo concentraciones fisiológicas, los ácidos grasos (FA) son cruciales en el mantenimiento de la secreción de insulina estimulada por glucosa; sin embargo las concentraciones altas y la exposición crónica de las células β a FA –vistos en las pacientes con DMG, parecen tener el efecto opuesto. Es importante, que la mayoría de los efectos deletéreos de los FA se han observado en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (glucolipototoxicidad). Entre los mecanismos implicados en las fallas β pancreáticas destacan: la producción de especies reactivas del oxígeno, la producción de citocinas proinflamatorias y señales de muerte celular, así como estrés del retículo endoplásmico [24].

Siendo el embarazo un periodo de altos requerimientos de insulina, estos procesos comprometerían la capacidad secretora de las células β y favorecerían el desarrollo de DMG. Cualquier condición adicional que exacerbe la resistencia a la insulina, establecida en la segunda mitad del embarazo, puede jugar un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad, por ejemplo, la obesidad.

Además de los mecanismos de resistencia a la insulina propios del embarazo, existen factores adicionales que agravan la resistencia a la insulina y contribuyen a la DMG. Entre ellos destacan [19]:

- 1) Aumento de la fosforilación de serinas/treoninas en el receptor de la insulina, que a diferencia de la fosforilación de tirosinas, disminuyen la señalización de la insulina río abajo.
- 2) Activación de cinasas de serina (activadas por mediadores inflamatorios como $\text{TNF}\alpha$ (JNK y $\text{NF-}\kappa\text{B}$) o exceso de nutrientes (mTOR, p70 S6K1 y la proteína cinasa C- Θ).
- 3) Disminución más pronunciada en los niveles de IRS-1 en músculo esquelético.
- 4) Mayores niveles de $\text{TNF}\alpha$ y menores de adiponectina como resultado de inflamación subclínica.

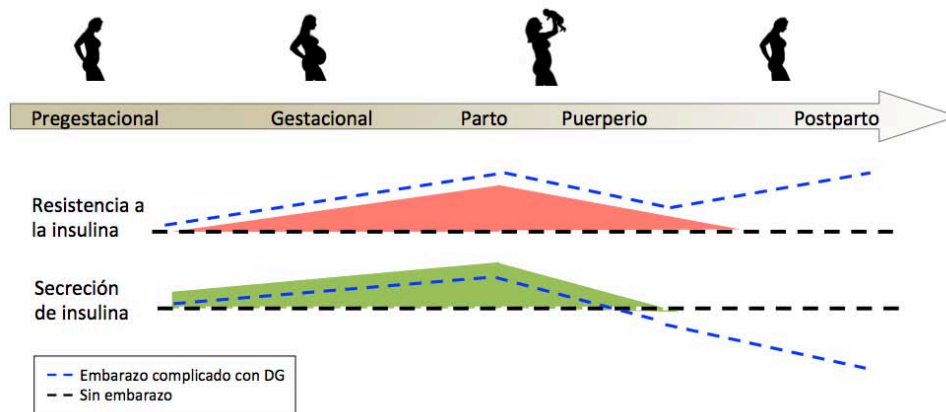


Figura 1.2. Fisiopatología de la DMG. Alteraciones en los patrones de resistencia y secreción de insulina en las pacientes con DMG, en comparación con un embarazo fisiológico.

Respecto a las vías metabólicas de los principales nutrientes, a continuación, se resumen algunos de los cambios más importantes que ocurren en la DMG:

- 1) **Carbohidratos:** durante la DMG, la relativa carencia de insulina necesaria para compensar la resistencia a esta hormona, provoca el desarrollo de hiperglucemia. Debido a que la transferencia de glucosa madre-placenta-feto es dependiente de la concentración, bajo condiciones de hiperglucemia, se potencia la transferencia placentaria. En consecuencia, el feto también desarrolla hiperglucemia e hiperinsulinemia. Finalmente, la hiperglucemia provoca macrosomía y todas las complicaciones secundarias al nacimiento de un bebé hipertrófico, principalmente daño de la región perineal materna y trauma fetal (p.ej. distocia de hombro). La hiperinsulinemia se mantiene por un periodo de tiempo en el recién nacido y aumenta el riesgo a desarrollar hipoglucemia cuando el paso de glucosa umbilical se detiene. De no ser monitoreada y tratada, puede causar daño cerebral. Paralelamente, la

macrosomía fetal también aumenta el riesgo a desarrollar obesidad, DT2 y enfermedades cardiovasculares a lo largo de su vida.

- 2) *Proteínas y aminoácidos*: el intercambio placentario, así como el metabolismo fetal y materno de aminoácidos se ve afectado en la DMG. Entre los diferentes transportadores de aminoácidos, se ha observado que la expresión del sistema A, el cual media la transferencia de aminoácidos neutrales como alanina, serina y glutamina, aumenta, llevando consigo un crecimiento fetal acelerado. Otros transportadores, como el sistema L (de leucina) también aumentan su expresión en la placenta de madres con DMG que dieron a luz bebés macrosómicos.
- 1) *Lípidos*: la DMG induce un estado de dislipidemia consistente con la resistencia a la insulina. Las mujeres con DMG tienen mayores concentraciones séricas de TG pero bajas de HDL y LDL, en comparación con las mujeres gestantes normoglucémicas [17, 25]. El aumento en los niveles de TG (>120 mg/dl aproximadamente) conduce a la generación de subfracciones de LDL pequeñas y densas (sdLDL, *small dense LDL*) [26]. Estas partículas se caracterizan por tener una conformación alterada de la ApoB, con lo cual disminuye su afinidad por el receptor de LDL pero aumenta su unión a los proteoglicanos de la pared arterial, dando como resultado un mayor tiempo de residencia en sangre (5 días) y mayor susceptibilidad a cambios aterogénicos [26, 27]. En especial, las mujeres gestantes con DMG y preeclampsia presentan mayores niveles de sdLDL [28].

El estado de hipertrigliceridemia en el embarazo puede conducir a dos escenarios opuestos en el recién nacido: productos con alto peso al nacer, así como con bajo peso al nacer. El primer caso se explica con el hecho de que las mujeres con DMG suelen presentar niveles plasmáticos más elevados de triglicéridos, que el descrito en mujeres con un embarazo normal. Se ha observado una correlación positiva entre los niveles de triglicéridos en plasma materno y el peso al nacer, debido a que los FA derivados de los TG maternos cruzan la placenta contribuyendo con la macrosomía fetal [17].

El segundo caso se explica con el aumento en la formación de subfracciones de sdLDL, las cuales son más susceptibles a la oxidación [26]. Este efecto es neutralizado por el aumento en los niveles de vitamina E y de estradiol, dos antioxidantes poderosos, cuyos niveles se aumentan en el embarazo; sin embargo, bajo condiciones de dislipidemia exacerbada, los efectos prooxidantes pueden provocar un aumento en la oxidación de LDL y las consecuencias asociadas a este proceso, entre las que destaca la disfunción placentaria. En caso de que el daño sea muy grande, la transferencia de nutrientes y oxígeno al feto disminuye, retardando el crecimiento fetal intrauterino. En el trofoblasto, las LDL oxidadas se unen a receptores *scavengers* y no a su receptor, de tal suerte que el colesterol no sigue las rutas fisiológicas normales, generando una carencia de este en placenta y disminuyendo la síntesis de hormonas, así como la transferencia de colesterol al feto. Además, puede generar disfunción vascular y disminuir el flujo sanguíneo y la transferencia de nutrientes al feto [25].

1.5. DIAGNÓSTICO DE LA DMG Y EFECTOS DURANTE Y DESPUÉS DEL EMBARAZO

Aún con las recomendaciones de la OMS, no hay un consenso internacional para el método de diagnóstico de la DMG. Hasta el año 2012, una de las formas mundialmente aceptada

para el diagnóstico de la DMG era mediante la realización de una Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG) en la que se administraban 100 g de glucosa en ayuno y, se realizaban mediciones séricas de ésta, antes y 1, 2 y 3 horas después de la ingestión. Debía realizarse en las semanas 24-28 de gestación. Se diagnosticaba DMG, cuando habían dos o más valores alterados de los establecidos por Carpenter y Coustan en 1982 [29] (Tabla 1.3). La curva debía realizarse a todas las mujeres embarazadas; sin embargo, dado su alto costo, se reemplazaba por una prueba de escrutinio o tamiz de 50 g en las semanas 13-28 de gestación que permitía identificar a las mujeres con mayor probabilidad de desarrollar DMG. Sólo a ellas, se les realizaba la CTOG de 100 g para verificar su estado metabólico [30].

En 2013, la OMS publicó las nuevas recomendaciones para el diagnóstico de la hiperglucemia en el embarazo [2]; sin embargo, aún no ha sido aceptada por todas las instancias de salud, las cuales siguen implementando diferentes métodos de diagnóstico. En las nuevas recomendaciones, la carga de glucosa de la CTOG fue reemplazada de 100 g a 75 g y la tercera medición de glucemia fue eliminada. El diagnóstico de DMG puede realizarse en cualquier momento del embarazo, si uno o más valores de la CTOG están alterados. Para diferenciar a las mujeres cuya hiperglucemia del embarazo es debida a diabetes pre-existente no diagnosticada, los datos de ayuno y 2 h de la CTOG de 75 g se deben interpretar de acuerdo a los criterios de la OMS del año 2006 para el diagnóstico de la DT2 (Tablas 1.3 y 1.4).

Tabla 1.3. Criterios de diagnóstico de la hiperglucemia en el embarazo.

Criterio	Diagnóstico	Semana de gestación	Método	Tiempo	Glucosa (mg/dl)	No. valores alterados para diagnóstico
Carpenter y Coustan, 1982	DMG	24-28	CTOG 100 g	Ayuno	95	2
				1 h	180	
				2 h	155	
				3 h	140	
OMS, 2013	DMG	cualquiera	CTOG 75 g	Ayuno	92-125	1
				1 h	180	
				2 h	153-199	
	Diabetes pre-existente	cualquiera	CTOG 75 g	Ayuno	126	1
1 h	no se interpreta					
2 h	200					

La DMG 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 [30]. Adicionalmente, la recurrencia de DMG es del 35 al 80% y está influenciada por el IMC, la paridad, las características del embarazo afectado (etapa de la gestación en que se diagnosticó la primera vez, requerimientos de insulina y ganancia de peso) y el intervalo entre los embarazos [31].

Para verificar el estado metabólico postparto, se les realiza una CTOG de 75 g, la forma de diagnóstico recomendada por la OMS en 2006. En ésta se realizan mediciones de glucosa, antes y después de 2 horas de la ingestión de glucosa (Tabla 1.4). Normalmente, se les practica a partir de las 6 semanas del puerperio.

Tabla 1.4. Criterios de diagnóstico de la DM de la OMS, 2006.

Diagnóstico	Glucosa (mg/dl)	
	Ayuno	2 h
Normoglucemia	<110	<140
Intolerancia a los carbohidratos	110-125	140-199
Diabetes Tipo 2	≥126	≥200

* Se diagnostica intolerancia a los carbohidratos o DT2 cuando el paciente tiene al menos 1 de los valores alterados.

De acuerdo con la OMS, la hiperglucemia del embarazo es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en mujeres. Se asocia con complicaciones severas tanto en la madre como en su descendencia, mismas que aumentan de forma proporcional con la glucemia materna [32] y pueden presentarse tanto a corto como a largo plazo (Tabla 1.5). Las complicaciones a corto plazo se refieren a las que suceden en cualquiera de los tres trimestres del embarazo y entre ellas destacan la hipertensión y preeclampsia materna, disturbios en el volumen del líquido amniótico, aumento en la tasa de pérdidas fetales por aborto u óbito, así como ganancia de peso, hipoglucemia y malformaciones congénitas fetales. En parte, lo anterior es resultado de la absorción y distribución insuficiente de nutrientes esenciales (p.ej. ácido fólico) e hipoxia crónica. En conjunto con la obesidad materna, la macrosomía fetal dificulta las labores del nacimiento y aumenta el riesgo de presentar complicaciones anestésicas en partos resueltos por cesárea; así como hemorragias, infecciones, tromboembolismos y endometritis en el puerperio [33, 34].

Adicional a las complicaciones a corto plazo, la DMG también tiene efectos en intervalos posteriores al puerperio. Un meta-análisis realizado en mujeres de diferentes grupos étnicos mostró que las mujeres con DMG tienen 7.43 (IC 4.79-11.51) veces más riesgo de desarrollar DT2, en comparación con las mujeres que cursaron un embarazo normoglucémico. El riesgo relativo para el desarrollo de DT2 a menos de 5 años fue de 4.69 (IC 2.84-7.75), mientras que para más de 9 años fue de 9.34 (IC 3.42-25.54) [35]. Además, se ha observado que la obesidad pregestacional es un factor de riesgo sinérgico de la DMG para el desarrollo de alteraciones metabólicas [36]. Otros padecimientos de importancia, para los cuales son más susceptibles las mujeres con DMG, incluyen la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y los eventos arterio coronarios [33, 34].

De forma similar, se ha reportado que la descendencia de madres con obesidad y DMG también es más propensa a desarrollar desórdenes metabólicos en su vida adulta [33, 34]. La importancia del ambiente intrauterino, más que el posterior a la infancia, fue resaltado por Barker en 1990. Según su hipótesis, las condiciones en el útero materno tienen un efecto programador en la fisiología fetal, fenómeno denominado "programación fetal". Si el feto no recibe un suministro adecuado de nutrientes en el útero, estará irremediablemente "programado" y predispuesto a desarrollar enfermedades en la vida adulta. Diversas investigaciones apoyan el concepto de programación fetal; por ejemplo, en un estudio de cohorte que incluyó 4168 jóvenes de 16 años, hijos de madres obesas y con DMG, se encontró que la prevalencia de obesidad era de 40% y 26%, respectivamente [37]. Se ha propuesto que el riesgo a desarrollar dichas enfermedades está presente previo al nacimiento, dado que se ha confirmado que los fetos de mujeres con obesidad desarrollan resistencia a la insulina *in utero*, demostrado por sus valores de glucosa e insulina en cordón umbilical [38]. Además de la predisposición a enfermedades metabólicas, se ha demostrado que la programación fetal puede contribuir a un aumento en el riesgo de cáncer, autismo, esquizofrenia, retraso del desarrollo, déficit en el lenguaje y otros desórdenes del neurodesarrollo [32, 34].

Tabla 1.5. Consecuencias fetales y maternas de la DMG.

		Riesgos fetales	Riesgos maternos
Corto plazo	Durante el embarazo	Aborto espontáneo, muerte intrauterina y óbito Malformaciones congénitas letales o discapacitantes	Hidroamnios Hipertensión y preeclampsia
	Al nacimiento	Distocia de hombro y otras heridas Hipoglucemia neonatal Síndrome de estrés respiratorio infantil Macrosomía	Labor prolongada, obstrucción y cesárea Atonía uterina y hemorragia postparto Infecciones Muerte
Largo plazo	Postparto y vida adulta	Sobrepeso, obesidad, síndrome metabólico y DT2 Enfermedades cardiovasculares Cáncer Desórdenes del neurodesarrollo Envejecimiento prematuro	Recurrencia de DMG Sobrepeso, obesidad, síndrome metabólico y DT2 Enfermedades cardiovasculares Osteoporosis

1.6. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LA DMG

Se han propuesto conjuntos de características clínicas para clasificar a las mujeres con bajo y alto riesgo de desarrollar DMG (Tabla 1.6). Algunas organizaciones de salud sugieren su uso para identificar desde la primera cita obstétrica a aquellas pacientes con DT2 no diagnosticada, si poseen un número elevado de factores de riesgo. Además, mientras algunas organizaciones sugieren la omisión de la CTOG diagnóstica en pacientes con bajo riesgo de desarrollar DMG, otras sugieren que debería realizarse a todas las mujeres gestantes, sin importar su clasificación de riesgo [39]. Dadas las discusiones, la decisión se ha dejado a discreción del obstetra tratante.

Tabla 1.6. Factores de riesgo para el desarrollo de la DMG.

Riesgo	No. requerido	Características clínicas
Bajo	Todas	Edad <25 años Etnicidad de bajo riesgo Ausencia de DM en familiares de primer grado IMC <25 kg/m ² Ausencia de historia personal de intolerancia a carbohidratos Historia obstétrica sin complicaciones
Alto	Al menos 1	Historia previa de DMG Niveles previos de glucemia elevados Edad materna ≥40 años Historia familiar de DM (familiares de primer grado con DM o hermana con DMG) IMC >35 kg/m ² Macrosomía previa (bebé con peso al nacer >4500 g o >percentila 90) Síndrome de ovario poliquístico Medicamentos: corticosteroides, antipsicóticos

No obstante, se reconoce que la obesidad materna es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar DMG, así como otras complicaciones del embarazo, como la hipertensión gestacional y preeclampsia [33]. La ganancia de peso excesiva en el embarazo temprano también se asocia con mayor riesgo de desarrollar DMG o formas menos severas de intolerancia a los carbohidratos, especialmente entre las mujeres con sobrepeso y obesidad pregestacional [40].

Otros estudios observacionales epidemiológicos han sugerido que el consumo alto de colesterol y grasas saturadas, pero bajo de grasas poliinsaturadas se asocia con un aumento en la incidencia y

recurrencia de la DMG. Respecto al consumo de micronutrientes, el bajo consumo de vitaminas C y D en el embarazo temprano se ha asociado con mayor riesgo de desarrollar DMG. En general, los patrones dietarios occidentales (p.ej. alto consumo de carnes rojas, carnes procesadas, productos de granos refinados, dulces y comida chatarra) se asocian con la susceptibilidad a la DMG [40].

Adicionalmente, se ha mostrado que la etnicidad es un factor importante en la determinación del riesgo a desarrollar múltiples desórdenes metabólicos. En particular, la ancestría nativa americana correlaciona positivamente con la alta prevalencia de DT2 y DMG [41-43], lo que podría estar relacionado no sólo con el estilo de vida, la dieta y el acceso a los servicios de salud, sino también a factores genéticos. Debido a la alta prevalencia reportada en poblaciones de origen nativo americano, la población mexicana está considerada como un grupo étnico de alto riesgo para el desarrollo de DMG.

1.7. GENÉTICA DE LA DMG

Al igual que la DT2, la DMG es una enfermedad compleja; esto es, participan en su etiología múltiples factores, entre los que destacan el estilo de vida, así como factores ambientales, genéticos y epigenéticos. En referencia a los genéticos, se reconoce la participación de múltiples variantes genéticas ubicadas en diferentes genes. Dicha variación genética es debida a: 1) polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) que son frecuentes entre las poblaciones y cuyos tamaños de sus efectos son bajos, 2) SNP de baja frecuencia y cuyos tamaños de sus efectos son altos, 3) deleciones e inserciones. Aunque el estudio genético de la DMG ha sido lento, el número de variantes genéticas que han resultado asociadas a la susceptibilidad de desarrollar la DT2 supera los 70 *loci* [44].

El desarrollo de nuevas tecnologías de genotipado y de secuenciación han promovido el rápido avance en la identificación de regiones genéticas de susceptibilidad para diversas enfermedades. Dichas tecnologías han permitido el estudio del genoma completo, sin restringirse a solo aquellas regiones de las que se tiene sospecha de su participación, debido a evidencia clínica o modelos animales. Por lo anterior, de una gran proporción de los genes de susceptibilidad que se han identificado, aún no se conoce su papel en la enfermedad y en las vías metabólicas en que se implican. En contraste, no se han encontrado variantes de susceptibilidad dentro de genes que *a priori* apuntaban a ser buenos candidatos, por su participación evidente en el desarrollo de la enfermedad. Tal es el caso del gen del receptor de la insulina (*INSR*), que si bien tiene una función clave en la homeostasis de la glucosa, hasta el momento no se le han identificado polimorfismos genéticos de susceptibilidad a la DT2 o a la DMG [44, 45].

Las similitudes fisiológicas entre la DT2 y la DMG sugieren que las variantes genéticas que confieren susceptibilidad para una también lo hacen para la otra [31]. A este respecto, ya se ha reportado que algunas de las variantes genéticas comunes de riesgo para la DT2 también se asocian con el riesgo a desarrollar la DMG en poblaciones Caucásicas y Asiáticas [46, 47] (Figura 1.3); sin embargo, a la fecha hay poca información para otros grupos étnicos. A pesar de que las variantes comunes de susceptibilidad a la DT2 son homogéneas o existentes entre los diferentes grupos ancestrales, se ha encontrado que su frecuencia y sus efectos de riesgo difieren entre poblaciones [44].

Un estudio reciente mostró que la inclusión de sujetos con alta ancestría nativa americana en un estudio de asociación del genoma completo (GWAS, *Genome Wide Association Analysis*), permitió la identificación de nuevos alelos de riesgo para el desarrollo de la DT2, los cuales son raros o están ausentes en otras poblaciones humanas [48]. Más aún, a pesar de la inclusión de tamaños de muestra grandes, algunas de las asociaciones a DT2 previamente reportadas no pudieron ser replicadas en poblaciones con ancestría nativa americana, resaltando la importancia de evaluar la contribución de las variantes de riesgo conocidas hasta el momento, en sujetos de diferentes grupos étnicos.

Al contrario de la DT2, para la que se han reportado más de 70 *loci* de riesgo [44], la genética de la DMG ha sido menos estudiada. Pese a ello, se ha reportado la concordancia de los alelos de riesgo estudiados para ambas enfermedades, así como la dirección de sus efectos. Referente a la población mexicana, sólo se han realizado estudios genéticos de la DMG para algunos genes candidato y se han incluido tamaños de muestra pequeños. Como resultado de dichos estudios, se han asociado variantes ubicadas en los *loci* *TCF7L2*, *TNF* y *HNF4A* con el riesgo a desarrollar DMG en mujeres mexicanas; sin embargo, ningún estudio ha evaluado el conjunto completo de las variantes consistentemente asociadas a la DT2 [49-52].

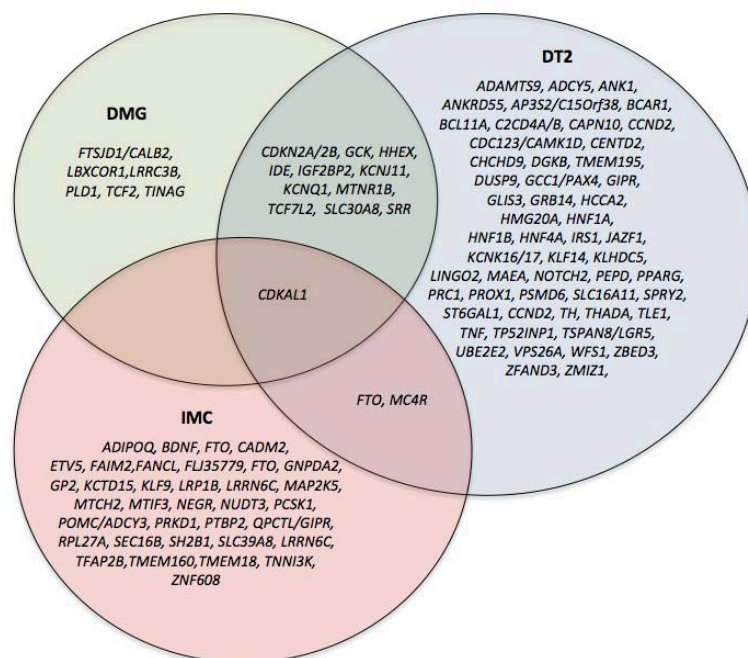


Figura 1.3. Diagrama de Venn de los *loci* de riesgo para la DMG, DT2 y aumento del IMC reportados en poblaciones caucásicas y asiáticas. Se muestran los *loci* de riesgo identificados hasta el momento en poblaciones primordialmente caucásicas y asiáticas; así como aquéllos compartidos entre los desórdenes.

2. JUSTIFICACIÓN

La DMG y la DT2 tienen similitudes fisiopatológicas y genéticas, lo que dificulta la identificación de sus características individuales. En el caso de la DMG, los estudios de diseño caso-control resultan metodológicamente complicados de realizar, dada la dificultad de reunir muestras suficientes. Si bien los análisis de asociación del genoma completo permiten la identificación de regiones genéticas de susceptibilidad sin previa sospecha de participación, se requieren tamaños de muestra del orden de miles de participantes. Por lo anterior, a excepción de un GWAS realizado en población asiática, el resto de los estudios genéticos para la DMG siguen estrategias de gen candidato, restringiendo la posibilidad de encontrar *loci* de riesgo independientes a la DT2.

Adicionalmente, el aumento de la prevalencia de la DT2, sobre todo en gente joven, exige mayor cuidado en la selección de individuos para su análisis. Sin embargo, excluir a las pacientes con antecedentes familiares de DT2, no reflejaría la situación más común de nuestra población. Además de la historia familiar de DT2, se sabe que un IMC pregestacional alto se relaciona con un aumento en el riesgo de desarrollar hiperglucemia gestacional y complicaciones adversas en el feto. Siendo la DMG una enfermedad tan compleja, resulta de interés evaluar la relación del riesgo genético al aumento de IMC y la DT2 con el desarrollo de DMG, así como otros fenotipos metabólicos materno-fetales.

En el caso de la DT2, el estudio de la población mestiza mexicana ha permitido la identificación de nuevos *loci* de susceptibilidad, así como descartar la participación de otros que lo son para regiones geográficas diferentes. En México, no se ha reportado ningún estudio que analice la participación del conjunto completo de variantes genéticas asociadas a la DT2, obesidad y otros rasgos relacionados, en el desarrollo de la DMG. Estos resultados permitirían definir si ambas enfermedades comparten mecanismos biológicos en su etiología, específicamente en población mexicana.

Por otro lado, la DMG, así como otras enfermedades metabólicas, resulta de desajustes en las funciones fisiológicas de múltiples tejidos; sin embargo, pocos estudios en humanos han evaluado simultáneamente el papel de los genes asociados en más de un tejido. Esto es entendible dado que el muestreo de algunos tejidos resulta metodológicamente complicado e invasivo. La resolución del embarazo por cesárea significa una buena oportunidad para el muestreo de bajo riesgo de tejidos relevantes no solo para el desarrollo de la DMG, sino para la programación metabólica del recién nacido.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente trabajo pretende responder y aportar información en relación a las siguientes preguntas: ¿Las variantes genéticas que ya se han reportado como asociadas con el desarrollo de la DT2 y el aumento en el IMC también se asocian con el desarrollo de la DMG? ¿Cómo es la expresión de los genes en que se ubican las variantes asociadas con la DMG en tejidos relevantes para el embarazo?

4. OBJETIVOS

- Analizar si el conjunto completo de variantes genéticas consistentemente asociadas con la DT2, así como otras relacionadas al aumento del IMC y otros rasgos, también confieren riesgo de desarrollar DMG en población mexicana.
- Comparar los niveles de RNAm de los genes asociados a la DMG en tejidos de relevancia metabólica en mujeres que desarrollaron o no la enfermedad.
- Evaluar la participación de las variantes genéticas asociadas con la DMG en los niveles de expresión de los genes en que se ubican.

5. HIPÓTESIS

Algunas de las variantes previamente asociadas con el desarrollo de la DT2 y el aumento en el IMC, también se asociarán con el desarrollo de la DMG debido a que existen múltiples similitudes fisiopatológicas entre dichos fenotipos. Las variantes genéticas de susceptibilidad que resulten asociadas a la DG podrían modular la expresión de los genes que las contienen y dicha modulación podría ser tejido-específica.

6. METODOLOGÍA

6.1. DECLARACIÓN DE ÉTICA

Este proyecto fue realizado bajo la aprobación de los Comités de Bioética de las Instituciones participantes (Número de aprobación 11-86-2010). Todos los procedimientos realizados durante el protocolo están de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, (Título segundo, capítulo IV, artículos 40-56: “De la Investigación en mujeres en edad fértil, embarazadas, durante el trabajo de parto, puerperio, lactancia, recién nacidos y; De la utilización de embriones, óbitos y fetos y de la fertilización asistida”). Según el artículo 17, la investigación se cataloga como de riesgo mínimo. Las mujeres incluidas firmaron una hoja de consentimiento informado antes de su inclusión al estudio y de la toma de muestras.

6.2. PARTICIPANTES DEL ESTUDIO Y MUESTRAS

Se reunió una muestra de mujeres mexicanas no relacionadas (donde las probando, padres y abuelos se reconocieron como mexicanos), atendidas en cuatro diferentes hospitales de la Ciudad de México: Instituto Nacional de Perinatología Isidro de los Reyes (INPer), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (CMN20N), Hospital General Manuel Gea González (GEA) y Centro de Investigación Materno Infantil Gen (CIMIGEN) (Figura 6.1).

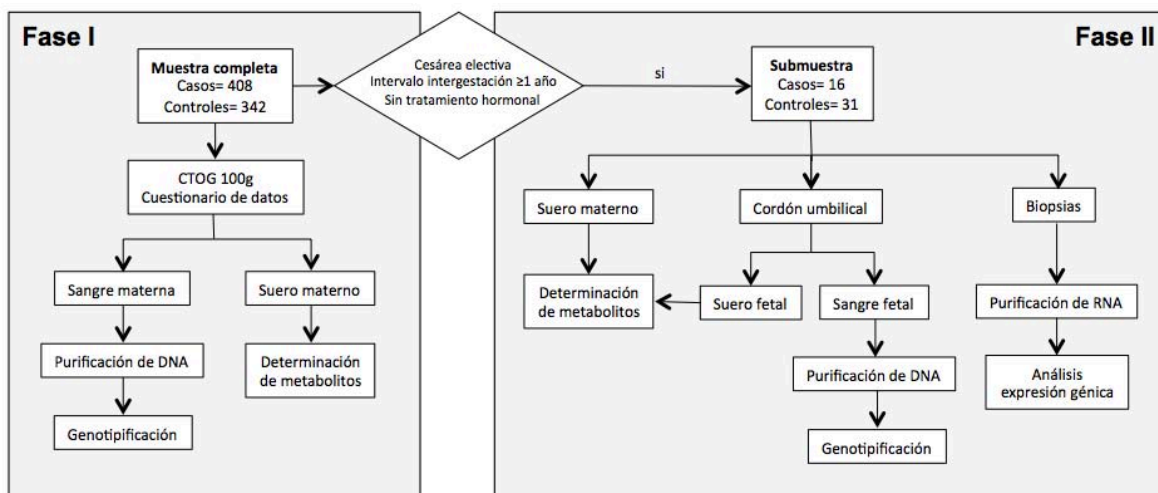


Figura 6.1. Diagrama de flujo de la estrategia del estudio.

Todas las mujeres embarazadas (<20 semanas de gestación) mayores de 18 años de edad fueron elegibles para participar en el estudio. Los criterios de exclusión incluyeron el diagnóstico médico previo de DT2 u otro tipo de DM, así como alguna enfermedad metabólica. Después de dar consentimiento informado por escrito, se fijó una cita para realizar el diagnóstico de la DMG a través de una CTOG 100g. Para todas las pacientes se siguió el mismo procedimiento de diagnóstico, siguiendo los criterios propuestos por Carpenter y Coustan (1982) [29] (Tabla 1.3).

El intervalo de semanas de gestación en que se realizó el diagnóstico fue ampliado con respecto al propuesto por Carpenter y Coustan. Dado que es durante la segunda mitad del embarazo cuando se establece el mayor pico de resistencia a la insulina, decidimos ampliar el intervalo: 1) hacia el final del embarazo en controles, puesto que se descarta que se desarrolle hiperglucemia en semanas de gestación avanzadas y 2) hacia el inicio del embarazo en casos para identificar a aquellas mujeres que desarrollan hiperglucemia temprana. Se excluyeron aquellas mujeres que no terminaron la CTOG 100g o que recibieron diagnóstico de alguna enfermedad metabólica subclínica (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Criterios de inclusión y exclusión de la muestra de DMG.

	Inclusión	Exclusión
Casos	Mujeres embarazadas con DMG CTOG en 16-30 sdg	Edad 18 años de edad No mexicanas Cualquier otra forma de DM
Controles	Mujeres embarazadas sin DMG CTOG en 22-35 sdg	Intolerancia a los carbohidratos pregestacional Hiper o hipotiroidismo Síndrome de ovario poliquístico Pancreatitis y otras

La muestra consistió en 750 muestras (408 casos y 342 controles). Para cada paciente, 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 de los recién nacidos. A todas las pacientes se les tomó una muestra de sangre después de ayuno de doce horas para la purificación de DNA y la medición de rasgos bioquímicos.

Una vez realizada la CTOG diagnóstica y de haber revisado a detalle la historia clínica de las pacientes reclutadas, se eligieron aquéllas que cumplieran con criterios de inclusión adicionales. Aquéllas que por alguna razón médica se les indicó cesárea como método de resolución del embarazo, fueron invitadas a participar nuevamente en el estudio y firmaron una nueva carta de consentimiento informado. Entre los criterios adicionales se incluyeron que tuvieran un período intergestacional de al menos un año y que no hubieran consumido tratamientos hormonales en un año previo a la gesta en estudio. Se excluyeron a las mujeres controles cuyos productos pesaron 4 kg o más. La submuestra consistió en 47 muestras (31 controles y 16 casos).

Poco antes de la cesárea, las pacientes fueron pesadas y se les tomó una muestra de sangre en ayuno. Durante la intervención quirúrgica, se tomaron biopsias de tejido adiposo subcutáneo (TAS) del sitio de la incisión, así como de tejido adiposo visceral (TAV) y músculo (M) de omento. Después del nacimiento, se tomó una muestra de sangre de cordón umbilical y se tomaron biopsias de parénquima placentario de sus lados fetal (PF) y materno (PM) (Figura 6.2). Las biopsias se enjuagaron con solución salina para eliminar el exceso de sangre en ellas y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas -70°C hasta su uso. Se obtuvieron alícuotas de suero a partir de las muestras de sangre total.

Una vez concluido el embarazo, todas las mujeres recibieron una solicitud para acudir entre la semana 9-12 del puerperio para la realización de una CTOG de 75 g para la reclasificación de la DM. De acuerdo a los resultados, el estado de glucemia de las pacientes se clasificó según los criterios de la OMS ya mencionados (Tabla 1.4).

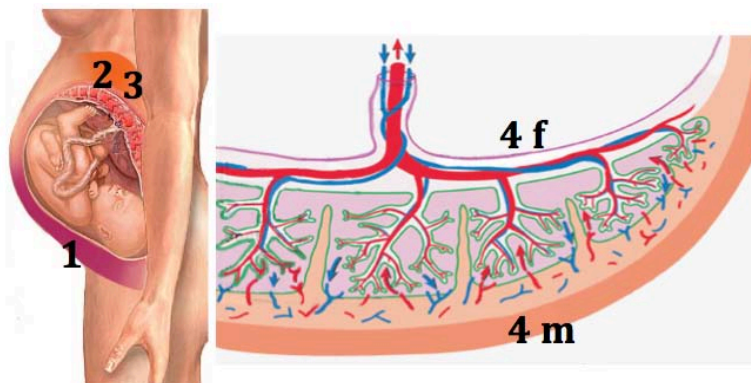


Figura 6.2. Tejidos biopsiados durante la cesárea electiva. 1 Tejido adiposo subcutáneo (TAS), 2 Tejido adiposo visceral (TAV), 3 Músculo (M), 4f Parénquima placentario lado fetal (PF), 4m Parénquima placentario lado materno (PM).

Dadas las similitudes reportadas entre la DMG y la DT2, los datos del Consorcio *SIGMA DT2 Diabetes* fueron usados con fines de comparación [48]. El proyecto *SIGMA DT2* comprende cuatro cohortes de estudio en México y Estados Unidos. Con el fin de evitar posibles sesgos de género y asegurar una comparación adecuada entre los datos de DMG y *SIGMA DT2*, sólo se incluyeron muestras de mujeres. Específicamente para el subgrupo de casos, incluimos aquellas mujeres cuya edad de diagnóstico fue ≤ 48 años, misma que fue la edad de la paciente de DMG mayor. Los mismos criterios no pudieron ser aplicados para el subgrupo de controles dado que la muestra *SIGMA DT2* tuvo como objetivo incluir hipercontroles, esto es, individuos normoglucémicos ≥ 45 años de edad. Los datos incluyeron 3027 muestras de mujeres (2467 controles, 560 casos). El conjunto de datos de *SIGMA T2D* incluye 8214 muestras (4366 controles, 3848 casos) y también fue usada para las comparaciones finales.

6.3. MEDICIONES BIOQUÍMICAS Y CÁLCULOS

Todas las determinaciones fueron realizadas en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ utilizando procedimientos comerciales estandarizados. La glucosa, el colesterol total, HDL y los triglicéridos fueron medidos por métodos enzimáticos. Los niveles de LDL se calcularon usando la fórmula de Friedewald (1972). Los niveles de insulina, progesterona y estradiol se midieron por radioinmunoensayo ^{125}I de fase sólida, mientras que los niveles de leptina y adiponectina se determinaron por ELISA. Los niveles de cortisol se determinaron por quimioluminiscencia.

Los índices de evaluación del modelo homeostático (HOMA, Homeostasis Model Assessment) fueron calculados usando la calculadora HOMA2 (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>). Dichos índices son medidas basadas en modelos matemáticos que permiten evaluar el grado de disfunción de la célula β (HOMA B) y resistencia a la insulina (HOMA IR) a partir de datos de glucosa e insulina en ayuno. HOMA2 es una versión actualizada del modelo lineal HOMA, el cual considera niveles de glucosa ≥ 24 mM, toma en cuenta la pérdida de glucosa renal, asume una disminución en la reducción de la producción hepática de glucosa y un aumento en la secreción de insulina en respuesta a niveles de glucosa ≥ 10 mM [53]. El índice Gutt fue calculado usando la concentración de glucosa e insulina plasmática en ayuno y a los 120' de la CTOG, tal como lo describió Kanauchi [54].

El estado nutricional pregestacional de las participantes se evaluó mediante el cálculo del índice de masa corporal (IMC), el cual fue calculado siguiendo la fórmula: $IMC = \frac{\text{peso en kg}}{\text{talla en m}^2}$. Se usaron como puntos de corte, los valores propuestos por la OMS [55].

El área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*) de los niveles de glucosa plasmática durante la CTOG de 100 g fue calculada utilizando el método del trapecioide:

$$AUC = \left[\left(\frac{\text{gluc ayuno} + \text{gluc 60 min}}{2} \right) 60 \right] + \left[\left(\frac{\text{gluc 60 min} + \text{gluc 120 min}}{2} \right) 60 \right] + \left[\left(\frac{\text{gluc 120 min} + \text{gluc 180 min}}{2} \right) 60 \right]$$

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 [56], se consideró:

- 1) *Parto pretérmino*, agrupa las categorías de *inmaduro* (si el parto se dio entre la semana 21-27) y *pretérmino o prematuro* (si el parto se dio entre la semana 28-36).
- 2) *Aborto*, si el producto fue expulsado antes de la semana 21; *óbito*, si el parto se dio después de la semana 21 pero el producto nació sin vida.
- 3) *Macrosómico o hipertrófico*, cuando el peso corporal fue mayor a la percentila 90.

La edad gestacional también se estimó usando el método de Capurro, el cual considera cinco datos somáticos (formación del pezón, textura de la piel, forma de la oreja, tamaño del seno y surcos plantares) y dos datos neurológicos (signo “de la bufanda” y signo “cabeza en gota”) del producto al momento del parto. Además, se usó la puntuación Apgar para evaluar el estado general del neonato después del parto. Los cinco criterios del Apgar son color de la piel, frecuencia cardíaca, reflejos e irritabilidad, tono muscular y respiración. Se usó una puntuación <7 para clasificar a los neonatos cuya condición fisiológica no es adecuada y requieren valoración clínica y recuperación inmediata.

Otras clasificaciones maternas evaluadas fueron:

- 1) *Edad materna avanzada*, si la madre tenía ≥ 35 años de edad al inicio del embarazo.
- 2) *Alta paridad*, si la madre tenía ≥ 3 gestas, incluyendo la actual.
- 3) *Pérdida gestacional recurrente*, si la madre perdió ≥ 2 gestas.
- 4) *Estatura baja*, si la talla materna es <1.50 m.

El estatus socioeconómico materno (SES) se evaluó usando la regla AMAI 10x6, la cual es un índice que clasifica a los hogares en seis niveles, considerando nueve características o posesiones del hogar y la escolaridad del jefe de familia o persona que más aporta al gasto. Se definió SES bajo cuando se obtuvo cualquiera de los tres niveles de SES inferiores (D+, D y E).

6.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE SNP

Se realizó una revisión en la literatura, que incluyó los estudios genéticos independientes publicados entre los años 2003-2013 y que hubieran identificado y/o replicado *loci* asociados con la DT2, IMC, DMG y otros rasgos relacionados con el embarazo [46, 47, 49-52, 57-85]. La base de datos fue filtrada con el fin de seleccionar los SNP que hubiesen sido replicados en al menos dos poblaciones de diferente ancestría, que hubiesen sido identificados a través de GWAS; o bien, cuyo valor *P* de asociación reportado fuera $< 1 \times 10^{-4}$ si hubiesen sido identificados a través de algún otro tipo de análisis en poblaciones Latinas o mexicanas. Dicho valor *P* fue establecido

arbitrariamente, dado que la mayoría de los datos disponibles en Latinos no proviene de estudios GWA. La base de datos filtrada incluyó 195 SNP principalmente asociados a la DT2, IMC, dislipidemias, DMG y rasgos del embarazo (105 SNP, 63 SNP, 11SNP y 16 SNP, respectivamente).

Además, se seleccionó un conjunto de 118 marcadores informativos de ancestría (AIM) a partir de un panel previamente publicado de AIM a lo largo de todo el genoma, específico para poblaciones del continente americano [86]. La ponderación de los SNP incluidos en el conjunto se basó en los siguientes criterios: 1-2 AIM por cromosoma, ningún marcador en desequilibrio de ligamiento (LD) y disponibilidad de información genética parental en bases de datos públicas. El conjunto de 118 AIM fue validado usando datos de genoma completo disponibles para una muestra independiente. La correlación entre los eigenvectores 1 estimados en un análisis de componentes principales (PCA) usando tanto los datos de genoma completo como el conjunto de 118 AIM fue 0.966. De forma similar, la correlación entre las proporciones de ancestría nativa americana fue 0.969.

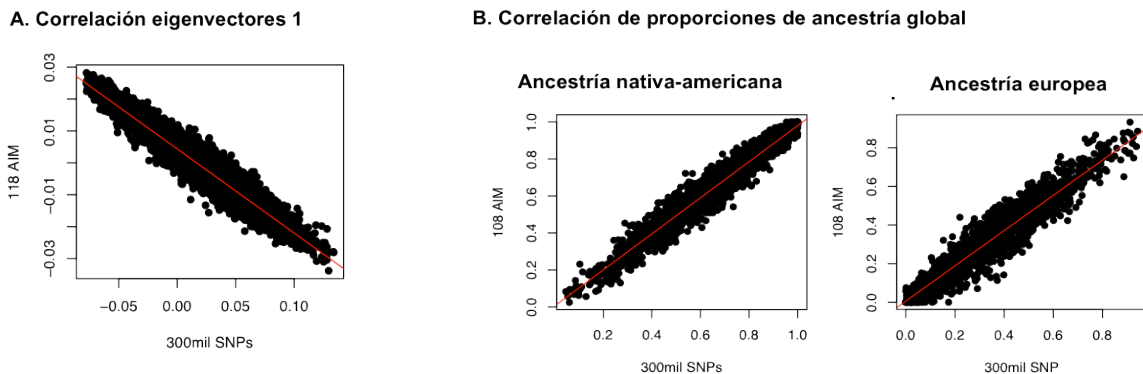


Figura 6.3. Validación del panel de 118 AIM usado para corregir la estratificación de la población. A. Correlación de eigenvectores 1 calculados a partir de ~300 mil SNP y 118 AIM. B. Cálculos de proporción de ancestría usando un panel de ~300mil SNP y 118 AIM.

6.5. PURIFICACIÓN DE DNA, GENOTIPIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

El DNA genómico fue extraído a partir de sangre entera usando el kit *QIAmp 96 DNA Blood*. La pureza y la concentración fue revisada usando un NanoDrop ND 1000. Las muestras de DNA fueron genotipificadas en LGC Genomics (Beverly, MA, USA). Los genotipos maternos se determinaron a partir de DNA purificado de sangre materna; mientras que los genotipos fetales se determinaron a partir de DNA purificado de sangre de cordón umbilical. Los SNP con una tasa de genotipificación <97% fueron considerados como fallas técnicas y fueron eliminados antes del control de calidad.

El control de calidad se realizó usando el software Plink [87]. Los SNP con 5% o más datos faltantes dentro de los datos completos o para los cuales la tasa de genotipificación entre casos y controles fue estadísticamente diferente ($P < 0.00001$) fueron eliminados. Posteriormente, se eliminaron las muestras con 10% o más datos faltantes y los SNP que tuvieron una frecuencia del alelo menor <1% dentro de los datos completos. También se eliminaron los SNP que no cumplieron con el equilibrio de Hardy Weinberg ($P < 1 \times 10^{-5}$). Después del control de calidad, los datos incluyeron 750 individuos y 294 SNP, de los cuales 118 fueron AIM. Se analizaron 176 SNP

para 115 *loci*, principalmente asociados a la DT2, IMC, DMG y rasgos del embarazo (94 SNP, 57 SNP, 10 SNP y 15 SNP, respectivamente). La tasa de genotipificación final fue 0.995.

6.6. CONTROL DE LA ESTRATIFICACIÓN POBLACIONAL

Se realizó un análisis de componentes principales con los genotipos de AIM, usando el software EIGENSTRAT [88]. Los 10 primeros componentes principales fueron usados como covariables para corregir la estratificación poblacional, dado que contuvieron la mayor proporción de varianza total.

Para estimar las proporciones de ancestría nativa americana, se usó el software STRUCTURE asumiendo $K=3$ clusters. Las muestras de DMG se unieron con las de individuos del *Human Genome Diversity Panel* (HGDP) incluyendo europeos del sur (País Vasco, Francia, Italia), africanos (Mandenka y Yoruba) y nativos americanos de México (Pima), pero también con individuos nativos americanos del *Mexican Genome Diversity Project* (MGDP), incluyendo Tepehuanos, Zapoteca y Mayas. La base de datos unida incluyó 64 europeos del sur, 43 africanos y 84 nativos americanos.

6.7. PURIFICACIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DEL cDNA

El RNA total se purificó usando el kit *Qiagen Rneasy microarray tissue*. Todas las muestras de RNA se trataron con DNasa (Qiagen). La integridad de los purificados se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 2% desnaturalizados con formamida y teñidos con bromuro de etidio. La calidad y concentración del RNA se revisó con un NanoDrop ND 1000 por duplicado. Los RNA con cocientes de absorción $OD_{260/280} > 2.0$ y $OD_{260/230} > 2.0$ fueron considerados adecuados para su análisis. El cDNA se sintetizó a partir de 1 μ g de RNA total usando el kit *Quantitect Reverse Transcription*.

6.8. ESTIMACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA

Se usó PCR tiempo real (RT-PCR) para estimar los niveles de RNAm de los genes *TCF7L2*, *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* y *PPAR γ* , usando oligonucleótidos diseñados comercialmente (SABiosciences, Qiagen). En cada reacción RT-PCR, se usaron 50 ng de cDNA, 0.5 μ M de oligonucleótidos sentido y antisentido y el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen), en un sistema de PCR tiempo real Step One Plus (Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron por duplicado. Los niveles de RNAm de ambos lados de la placenta se normalizaron contra la proteína de unión a la caja TATA (*TBP*), mientras que los niveles de RNAm de los tejidos adiposos y músculo se normalizaron contra la enzima gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa (*GADPH*). Las cantidades de RNAm de los genes analizados relativas a los controles se calcularon usando el método $\Delta\Delta C_t$.

6.9. INFERENCIA DEL ORIGEN PARENTAL ALÉLICO DE LA VARIANTE rs231362

Se sabe que el gen *KCNQ1* se ubica en una región improntada y que se expresa a partir del alelo materno. En consecuencia, sus variantes de riesgo, sujetas a impronta, ejercen sus

efectos cuando son heredadas por la madre [64, 89]. La falta de información del origen parental de los alelos de riesgo podría reducir el poder estadístico del análisis; sin embargo, al menos para la variante rs231362 pudimos evaluar el efecto parental de su asociación con los niveles de expresión de *KCNQ1* y *KCNQ1OT1*.

El origen parental de los alelos se infirió con base en los siguientes supuestos: 1) en dirección sentido, la variante rs231362 se ubica en el intrón 10 del gen *KCNQ1*; mientras que en dirección antisentido, se ubica en el lncRNA *KCNQ1OT1*. Considerando que las regiones intrónicas son depuradas durante la transcripción y no forman parte del RNAm, la secuenciación del cDNA de la región circundante a la variante corresponde a la secuencia del lncRNA *KCNQ1OT1*, pero no a la del RNAm de *KCNQ1*, 2) en contraste a *KCNQ1*, *KCNQ1OT1* se expresa a partir del alelo del padre. En consecuencia, se infiere que el alelo secuenciado a partir del cDNA de *KCNQ1OT1* será de origen paterno, mientras que el alelo complementario será de origen materno (Figura 6.4 A).

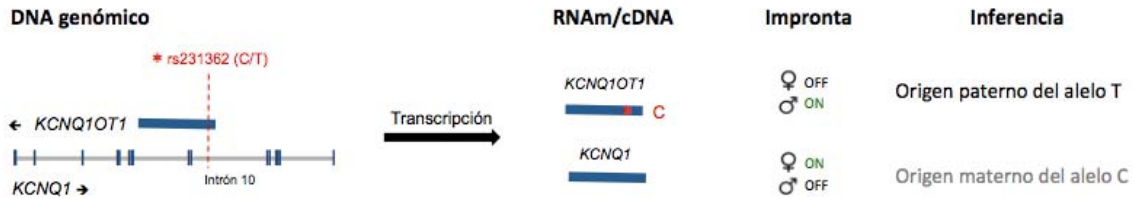
Para la inferencia del origen parental de los alelos del genotipo materno, se usaron las secuencias de cDNA de los tres tejidos maternos (TAS, TAV, M). Sin embargo, dado que la placenta se deriva de tipos celulares embrionarios [90], el origen parental de los alelos del genotipo del recién nacido se infirió a partir de secuencias de cDNA de la placenta (PF, PM). La secuenciación del cDNA de las 20 madres y los 18 recién nacidos heterocigotos (gDNA) para la variante rs231362 permitió confirmar que *KCNQ1OT1* está improntado tanto en placenta como en tejidos adultos maternos (Figura 6.4 B).

A lo largo del proceso de síntesis de cDNA, se realizaron dos tratamientos con DNasa para evitar la amplificación de DNA genómico residual. El software Primer3 se usó para el diseño de los oligonucleótidos [91]. Las muestras de heterocigotos, así como un grupo de muestras de homocigotos al azar, se amplificaron usando la polimerasa de DNA HotStarTaq (Qiagen) y se secuenciaron en un analizador genético ABI 3700 usando el kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). La evaluación del origen parental de los alelos de la variante rs2237897 no se pudo realizar dado que también se ubica en un intrón del gen *KCNQ1* pero no coincide con la secuencia del lncRNA *KCNQ1OT1*.

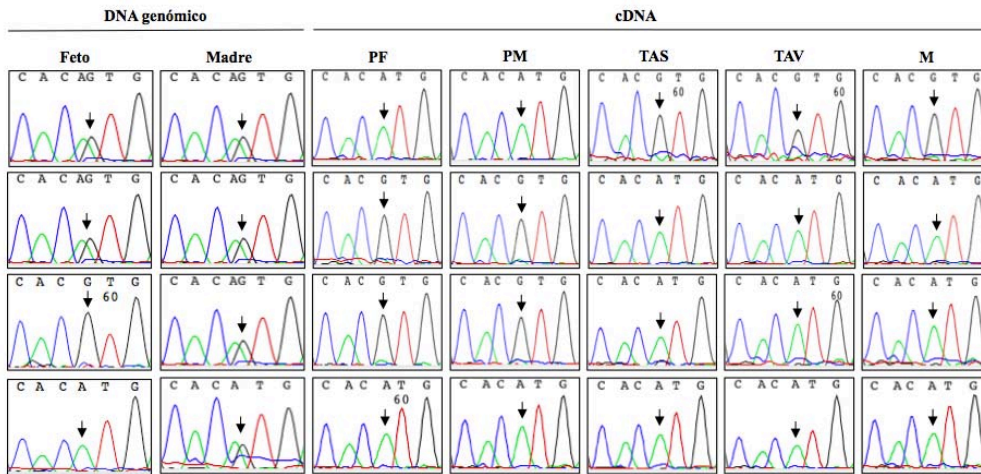
6.10. ANOTACIÓN FUNCIONAL DE LOS SNP Y ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENES

Para identificar las rutas metabólicas enriquecidas entre los genes en que se ubicaron las variantes genéticas asociadas a la DMG, se realizó un GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) usando el software Enrichr [92]. Se incluyeron los SNP con un valor *P* de asociación nominal <0.01. La base de datos pública *SNP Annotation tool* fue usada para obtener la información funcional de los SNP asociados.

A. Inferencia del origen parental de los alelos de rs231362



B. Estado de impronta de KCNQ1OT1 en placenta y tejidos maternos



C. Asignación de las variables GM y GP para los análisis del efecto del origen parental de rs231362

Fuente del gDNA (sangre)	Genotipo	Fuente del cDNA (tejido)	Alelo expresado en la secuencia de cDNA	G _M	G _P
Madre	CC	TAS, TAV, M	C	0	0
	CT	TAS, TAV, M	C	1	0
	CT	TAS, TAV, M	T	0	1
	TT	TAS, TAV, M	T	1	1
Feto	CC	PF, PM	C	0	0
	CT	PF, PM	C	1	0
	CT	PF, PM	T	0	1
	TT	PF, PM	T	1	1

Figura 6.4. Evaluación del efecto del origen parental de rs231362. A. Inferencia del origen parental de rs231362 para un individuo heterocigoto (C/T). B. Estado de impronta de *KCNQ1OT1*. Cada fila de electroferogramas muestra diferentes conjuntos de muestras de una misma paciente. Se muestran las secuencias de gDNA purificado a partir de sangre fetal (cordón umbilical) y materna, así como las secuencias de cDNA purificado de cada tejido. Las flechas muestran a la variante rs231362. Por conveniencia metodológica, se secuenció la hebra sentido. C. Asignación de variables del origen parental de los alelos para su análisis estadístico.

6.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias descriptivas entre los grupos de casos y controles de DMG se compararon con pruebas t de Student o pruebas U Mann Whitney, cuando los supuestos de normalidad no se cumplieron. Las diferencias en rasgos bioquímicos se evaluaron usando modelos de regresión lineal. Las covariables edad, IMC pregestacional, hospital de referencia y la semana de gestación pregestacional y postgestacional se incluyeron en los modelos. Las comparaciones antropométricas de los recién nacidos se ajustaron con las covariables edad materna, IMC pregestacional, semana del parto, sexo del recién nacido y hospital de referencia. Se usaron pruebas de χ^2 o exactas de Fisher para la comparación de proporciones, así como para las comparaciones de frecuencias alélicas y genotípicas.

Con el fin de analizar la participación de factores de riesgo en el desarrollo de la DMG, se evaluaron modelos de regresión logística, ajustando por el hospital de procedencia de las pacientes. Los efectos de la DMG en el fenotipo del recién nacido se evaluaron por medio de modelos de regresión lineal múltiple, ajustando por IMC pregestacional, sexo del recién nacido y hospital de referencia. Los efectos de la obesidad pregestacional materna también se evaluaron por medio de modelos de regresión lineal múltiple y se ajustaron por estado glucémico materno, sexo del recién nacido y hospital de referencia. En específico, los modelos que evaluaron el peso del peso del recién nacido y de la placenta, se ajustaron adicionalmente por semana de gestación del parto.

La asociación de las variantes genéticas con la DMG se evaluó usando modelos de regresión logística con el software PLINK [87]. Las variables confusoras edad, IMC pregestacional, hospital de referencia y los 10 primeros componentes principales fueron incluidas como covariables en los modelos de regresión. Además, para analizar los efectos del alelo de riesgo dependientes del IMC pregestacional, la muestra de DMG fue estratificada en mujeres delgadas (IMC pregestacional < 25 kg/m²) versus no delgadas (IMC pregestacional \geq 25 kg/m²). Los valores *P* fueron corregidos usando el método FDR (*False Discovery Rate*) para múltiples comparaciones. La corrección FDR fue calculada usando el software Plink y está basada en el control FDR de Benjamini y Hochberg (1995).

Los análisis de asociación a rasgos cuantitativos se analizaron mediante modelos de regresión lineal usando PLINK. Las variables cuya distribución no se ajustó a la normal, fueron transformadas a escala logarítmica natural. Después de correr los modelos de regresión ajustados, se realizaron análisis de residuos para evaluar la adecuación de los modelos. Las covariables edad, IMC pregestacional, estatus glucémico, semana gestacional del diagnóstico, hospital de referencia, así como los 10 primeros componentes principales fueron incluidas en los modelos de regresión. Los valores *P* fueron corregidos usando FDR. Ninguna de las participantes consumía medicamentos para normalizar sus niveles de glucemia o de lípidos.

Para aquellos *loci* con más de 1 SNP asociado, se realizaron análisis de haplotipos usando los software PLINK y Haploview [87, 93]. Se calculó el desequilibrio de ligamiento y los análisis de asociación por haplotipos se corrigieron como se describió anteriormente.

El poder estadístico se calculó usando el software Quanto v1.2.4 [94]. Calculamos el poder para detectar los OR reportados a diferentes frecuencias alélicas de riesgo en modelos aditivos, con un tamaño de muestra de 750 individuos (408 casos y 302 controles). Los cálculos se basaron en una

$\alpha=0.05$ de dos colas y una prevalencia de DMG de 12%. El poder estadístico alcanzó al menos 90% para las frecuencias alélicas entre 0.2 y 0.8. Las frecuencias alélicas de riesgo reportadas en este estudio van de 0.13 a 0.93.

Para comparar las frecuencias alélicas de los SNP asociados entre diferentes poblaciones, se utilizó información genética del Proyecto 1000 Genomas [95], incluyendo europeos (CEU), asiáticos (ASN) y africanos (AFR); así como de las muestras del Consorcio SIGMA DT2 [48].

Se utilizaron las muestras del subconjunto de mujeres SIGMA T2D, así como de la base de datos completa, para hacer comparaciones de la magnitud de los efectos alélicos usando pruebas de *t*. Se realizaron análisis de asociación con la DT2 usando modelos de regresión logística con Plink. Las covariables edad, IMC y los 2 primeros componentes principales fueron incluidas en los modelos.

Las diferencias en los niveles de expresión génica entre casos y controles de DMG se evaluaron usando modelos de regresión lineal ajustados por edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. La asociación general entre el genotipo y los niveles de expresión génica, sin considerar los efectos del origen parental, se evaluó usando modelos de regresión lineal ajustados por estado glucémico materno, edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. Se calculó la magnitud del efecto por copia alélica. Aún cuando la placenta se deriva de tipos celulares embrionarios [90], sus patrones de expresión génica podrían estar influenciados tanto por los genotipos fetales como por los maternos. En consecuencia, en el caso de las diferencias en la expresión génica en placenta se analizaron tanto los genotipos maternos como los fetales.

En el caso de la variante rs231362, también se evaluaron los efectos del origen parental de los alelos en su asociación con los niveles de expresión. Una vez que el origen parental de los alelos de rs231362 fue inferido, se crearon dos variables, G_M y G_P , para representar la presencia de un alelo heredado por la madre (M) o el padre (P), respectivamente. Para los individuos homocigotos, las variables se asignaron como: $G_M=1$ y $G_P=1$ para los individuos homocigotos para el alelo de riesgo, y $G_M=0$ y $G_P=0$ para los individuos homocigotos para el alelo de no riesgo. La asignación del origen parental de los alelos en individuos heterocigotos se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente (Figura 5.4 C). Para estos individuos, las variables se asignaron como: $G_M=1$ y $G_P=0$ si se infirió que el alelo de riesgo era de origen materno, y $G_M=0$ y $G_P=1$ si se infirió que el alelo de riesgo era de origen paterno. Estas dos variables fueron incluidas en los modelos de regresión lineal y se ajustaron por estado glucémico, edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. Para inferir el origen parental de los alelos del genotipo materno, se usó información de los transcritos de tejidos maternos (TAS, TAV y M); mientras que para inferir el origen parental del genotipo fetal, se usó información de los transcritos de placenta (PF y PM).

Finalmente, se ajustaron modelos de regresión lineal para evaluar la asociación entre los niveles de expresión génica y rasgos metabólicos materno-fetales al momento del parto. Los modelos se ajustaron por estado glucémico, edad, IMC pregestacional, semana de gestación del parto y hospital de referencia. Los modelos para rasgos antropométricos del recién nacido se ajustaron por estado glucémico, edad, IMC pregestacional y paridad de la madre, así como semana de gestación del parto, sexo del recién nacido y hospital de referencia.

7. RESULTADOS

7.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA COMPLETA DE DMG

La muestra de DMG incluyó 750 mujeres mexicanas (342 controles y 408 casos). Los casos fueron mayores que los controles y una mayor proporción reportó tener alta paridad y haber tenido pérdidas gestacionales recurrentes, principalmente por abortos. A pesar de que los casos mostraron un mayor IMC pregestacional ($P<0.001$), tuvieron mejor ganancia de peso durante el embarazo ($P=0.010$). Las mujeres con DMG también tuvieron cifras mayores de presión arterial, pero no hubo diferencias en la proporción de pacientes que desarrollaron preeclampsia. Adicionalmente, una mayor proporción de casos reportó tener historia familiar de diabetes, así como nivel de escolaridad universitaria y un empleo ($P<0.001$, 0.033, <0.001 , respectivamente). Proporciones similares de casos y controles reportaron haber consumido bebidas alcohólicas y tabaco previo a la gestación. Referente a las características de sus productos, los casos resolvieron el embarazo en semanas más tempranas. Una mayor proporción de los neonatos hijos de madres con DMG fueron pretérmino o macrosómicos ($P<0.001$) y aún cuando no se alcanzó significancia estadística, un porcentaje mayor tuvo puntaje Apgar <7 en el primer minuto del nacimiento ($P=0.09$).

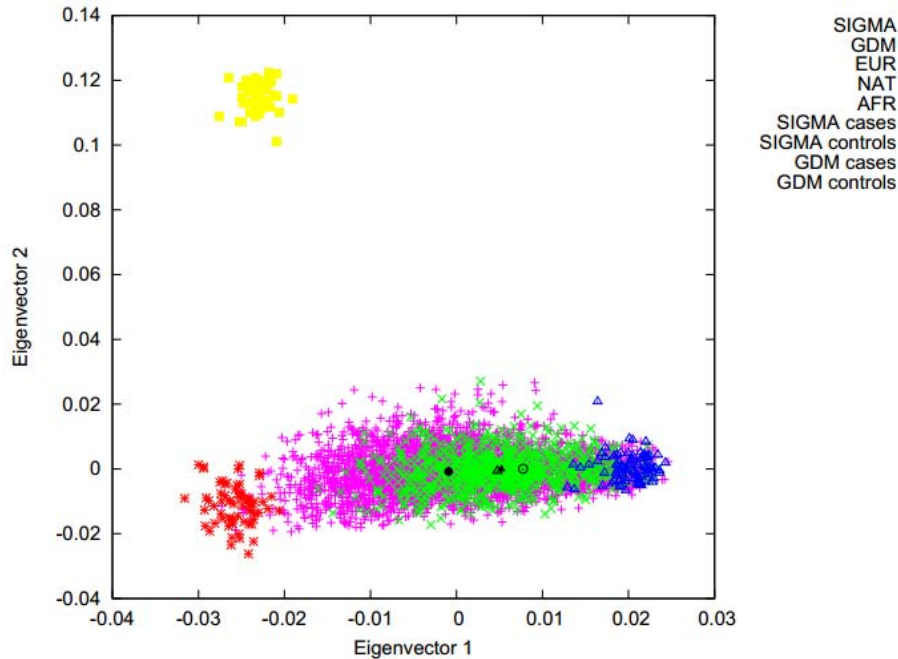
Aún cuando la prevalencia de DT2 se ha correlacionado consistentemente con una alta proporción de ancestría Nativa Americana y con un SES bajo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles de DMG (Proporción de ancestría nativa americana: 65.4% en controles vs. 63.4% en casos, $P=0.300$; y SES bajo: 32.8% en controles vs. 44.4% en casos, $P=0.272$) (Tabla 7.1). Dado que uno de los objetivos fue comparar nuestros resultados con los reportados para una muestra individuos mexicanos casos y controles de DT2, contrastamos nuestros datos con los del consorcio SIGMA DT2 [48], el cual incluyó 3027 mujeres (560 casos ≤ 48 años de edad y 2467 controles) Encontramos que las mujeres casos de DT2 tuvieron una mayor proporción de ancestría nativa americana, en comparación con las mujeres controles (51.8% en controles vs. 70.9% en casos, $P=1.02 \times 10^{-73}$). La figura 7.1 muestra una proyección de PCA de las muestras de DMG y de las muestras de mujeres de DT2 en las poblaciones parentales de nuestra población mexicana, así como los centroides de los eigenvectores 1 y 2 para los casos y controles de cada muestra. El panel B muestra un gráfico comparativo de las proporciones de ancestría global por grupo.

Tabla 7.1. Descripción clínica y sociodemográfica de la muestra de DMG.

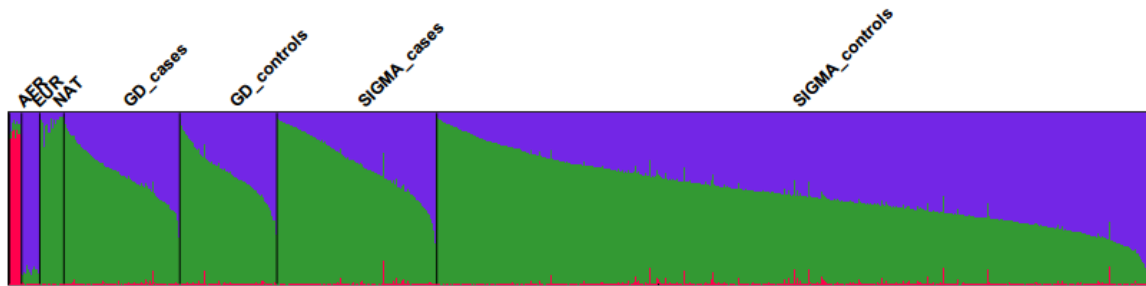
	Controles (N=342)	Casos (N=408)	Valor P
Edad (años)	28.52±6.67	34.16±5.62	<0.001
Edad materna avanzada (%)	22.29	52.84	<0.001
Alta paridad (%)	33.85	54.05	<0.001
Aborto previo (%)	29.5	41.6	0.001
Óbito previo (%)	3.75	5.14	0.480
Pérdida gestacional recurrente (%)	10.06	20.85	<0.001
Estatura baja (%)	11.93	16.5	0.101
Obesidad pregestacional (%)	9.97	29.32	<0.001
IMC pregestacional (kg/m ²)	24.69±4.61	27.84±4.79	<0.001
Ganancia de peso (kg)	11.17±4.85	9.51±5.16	0.010
Presión arterial sistólica (mmHg)	107.25±10.38	111.2±11.94	<0.001
Presión arterial diastólica (mmHg)	68.74±8.27	71.49±8.8	<0.001
Preeclampsia actual (%)	6.8	6.39	0.954
Historia familiar de DM (%)	68.21	80.15	<0.001
Consumo de bebidas alcohólicas (%)	25.13	24.29	0.961
Consumo de tabaco (%)	27.5	30	0.704
Tratamientos hormonales (%)	23.38	20	0.556
Empleadas (%)	47.12	73.19	<0.001
Escolaridad ≥Universidad (%)	37.57	50.40	0.033
SES bajo (%)	32.84	44.44	0.272
Ancestría nativa americana	65.4 [56.1-73.8]	63.4 [54.3-74.1]	0.300
Semana gestacional del parto	38.17 [37.3-39.1]	37.3 [36-38.3]	<0.001
Parto pretérmino (%)	16.97	38.64	<0.001
Capurro	38.6 [37.6-39.6]	38 [36.75-39]	0.642
Peso del recién nacido (g)	2980 [2615-3230]	2910 [2556-3260]	0.385
Talla del recién nacido (cm)	49.5 [48-51]	49 [48-50]	0.673
Producto macrosómico (%)	0.46	6.86	<0.001
Perímetro cefálico (cm)	34 [33-35]	34 [33-35]	0.320
APGAR 1' <7 (%)	2.74	7.44	0.091
APGAR 5' <7 (%)	0.68	0	1.000
Peso de la placenta (g)	555 [468.75-650]	550 [450-650]	0.626

Media ± desviación estándar, mediana [percentil 25-percentil 75] o porcentajes. Comparaciones controles vs. casos. Valor P de prueba t de Student, U Mann Whitney, prueba de chi cuadrada/exacta de Fisher o regresiones lineales para rasgos del recién nacido ajustadas por edad, IMC pregestacional, sexo del recién nacido, semana del parto y hospital de referencia.

A. Proyección de PCA



B. Ancestría global



Proporción de ancestría nativa americana (%)			
	Controles	Casos	valor P
DMG	65.42 [56.12-73.82]	63.38 [54.29-74.08]	0.3004
SIGMA DT2	51.83 [39.67-66.35]	70.86 [57.58-84.86]	1.02x10 ⁻⁷³

*Se muestra la mediana [percentila 25 – percentila 75].

Figura 7.1. Estructura poblacional de las muestras de DMG y DT2. A. Proyección de PCA de las muestras de DMG y DT2. Los componentes principales fueron calculados usando datos de poblaciones parentales del HGDP y MGDP. Los centroides de los eigenvectores 1 y 2 para casos y controles se grafican en triángulos negros para la muestra de DMG y en círculos negros para la muestra de mujeres de DT2. B. Proporciones de ancestría globales de las muestras de DMG y DT2, así como de las poblaciones parentales del HGDP y MGDP.

Después de ajustar por edad, IMC pregestacional y semana gestacional del muestreo, los casos mostraron mayores niveles de triglicéridos ($P=0.001$), pero menores niveles de CT, HDL y LDL ($P<0.001$, respectivamente). Aunque esta observación podría ser interpretada como un buen control metabólico, algunos autores han hipotetizado que podría deberse a la incapacidad de desarrollar la hiperlipidemia fisiológica del embarazo, y que los niveles de estrógenos pueden jugar un papel importante [96-98]. Los casos también fueron más resistentes a la insulina, demostrado por sus niveles altos de HOMA IR, glucosa, insulina y leptina ($P=0.002$, <0.001 , 0.005 , 0.007 ,

respectivamente) y por sus valores bajos de la tasa de incorporación metabólica de la glucosa (MCR, *Metabolic Clearance Rate*), índice Gutt y adiponectina ($P < 0.001$, 0.006, 0.002, respectivamente) (Tabla 7.2).

Tabla 7.2. Descripción metabólica materna de la muestra completa de DMG.

	Controles (N=342)	Casos (N=408)	Valor P
Semana de CTOG	28.11±3.57	25.24±5.42	<0.001
Glucosa ayuno (mg/dl)	79 [75-85]	93.5 [85-101]	<0.001
Glucosa 60' (mg/dl)	125 [108.25-143]	192 [181-207]	<0.001
Glucosa 120' (mg/dl)	110 [99-122]	174 [160.75-188]	<0.001
Glucosa 180' (mg/dl)	100 [88-111.5]	142 [125-155]	<0.001
AUC (mg*min/l)	19230 [17010-21022.5]	28560 [27120-30510]	<0.001
Insulina ayuno (μU/dl)	11.8 [8-16.02]	14.35 [9.22-22.43]	0.023
Insulina 120' (μU/dl)	67.8 [33-93.35]	85.4 [64.3-142.2]	0.259
Triglicéridos (mg/dl)	232 [179-284]	256 [197-314]	<0.001
Colesterol total (mg/dl)	234.5 [211.25-270]	214 [181.25-240]	0.005
HDL (mg/dl)	68.5 [58-81]	58 [47-68]	<0.001
LDL (mg/dl)	118 [95-138]	102 [79-126]	0.002
Leptina (ng/dl)	19.53 [13.9-27.66]	21.93 [14.55-33.99]	0.259
Adiponectina (ng/dl)	9.81 [7.66-12.66]	7.76 [6.54-10.08]	0.006
MCR	622.06 [620.99-623.35]	616.36 [614.57-618.42]	<0.001
Índice Gutt	3.97 [3.33-4.73]	2.67 [2.3-2.98]	0.029
HOMA B (%)	169.9 [136.35-206.5]	161 [117.25-213.55]	0.448
HOMA IR	1.49 [0.96-1.98]	1.75 [1.15-2.85]	0.002
Progesterona (nmol/l)	203.02 [140.41-328.16]	198.58 [82.51-342.8]	0.513
Estradiol (pmol/l)	16532.4 [11201.7-23404]	14228.7 [7321.5-22994.4]	0.018
Cortisol (μg/dl)	22.4 [18.3-28.5]	19.6 [15.5-26.6]	0.934
AST (UI/l)	17 [13-21]	14 [8.5-19]	0.075
ALT (UI/l)	11 [8-14]	9 [7-12]	0.552
Creatinina (mg/dl)	0.52 [0.44-0.58]	0.54 [0.46-0.64]	0.691

Media ± desviación estándar, mediana [percentil 25-percentil 75] o porcentajes. Comparaciones controles vs. casos. Valor P de prueba t de Student o regresiones lineales múltiples para rasgos metabólicos ajustadas por edad, IMC pregestacional y semana de gestación del muestreo.

7.2. FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR LA DMG Y EFECTOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO

Como se ha reportado anteriormente, los factores de riesgo que se asociaron con el desarrollo de la DMG fueron la obesidad pregestacional, la edad materna avanzada, los antecedentes familiares de DM y la alta paridad ($P < 0.005$). Ni el SES bajo ni la proporción de ancestría nativa americana se asoció con el riesgo a la DMG (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Factores de riesgo para la DMG en población mexicana.

	OR (IC 97.5%)	Valor P
Obesidad pregestacional	1.25 (1.15-1.35)	7.83x10⁻⁰⁸
Edad materna avanzada	1.21 (1.13-1.30)	4.52x10⁻⁰⁸
Antecedentes familiares de DM	1.15 (1.07-1.24)	0.0002
Alta paridad	1.10 (1.03-1.17)	0.0055
SES bajo	1.11 (0.98-1.26)	0.1141
Ancestría nativa americana	1.04 (0.83-1.31)	0.721

Valor P de regresiones logísticas ajustadas por hospital de referencia.

De las 408 pacientes con DMG, sólo 117 regresaron a realizarse un tamizaje metabólico dentro del primer semestre después del parto. De ellas, el 57.26% recuperó sus niveles de normoglucemia, 41.03% desarrolló intolerancia a los carbohidratos, mientras que el 1.71% fue diagnosticada con DT2 (Tabla 7.4). El tipo más común de intolerancia a los carbohidratos fue la de ayuno con 60.42% de los casos incidentes, comparados con 20.83% con intolerancia postprandial y 18.75% con una combinación de ambas. Un grupo adicional de 85 mujeres con DMG regresó a realizarse el tamizaje metabólico a partir de la semana 25-50 posterior al parto. Sólo el 27.06% de dichas mujeres mantuvo los niveles de normoglucemia; mientras que el 55.29% fue diagnosticada con intolerancia a los carbohidratos y 17.65% con DT2 (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Reclasificación metabólica de las mujeres con DMG.

	Primer semestre postparto	Segundo semestre postparto
Normoglucemia % (N)	57.26 (67)	27.06 (23)
Intolerancia a los carbohidratos % (N)	41.03 (48)	55.29 (47)
DT2 % (N)	1.71 (2)	17.65 (15)

Además, la DMG se asoció con una disminución en las semanas de gestación del parto, así como del puntaje Capurro ($P<0.05$). Por su lado, la obesidad pregestacional materna se asoció con mayor peso del recién nacido ($P<0.05$) (Tabla 7.5).

Tabla 7.5. Efectos de la DMG y la obesidad pregestacional materna en el recién nacido.

	Rasgo	Coef B±DS	Valor P
DMG ‡	Peso del recién nacido (g)	47.98±46.4	0.3029
	Semana de gestación del parto	-0.61±0.26	0.0190
	Capurro	-0.59±0.26	0.0254
	Peso de la placenta (g)	-8.83±22.8	0.6992
	Perímetro cefálico (cm)	-0.36±0.38	0.3459
Obesidad pregestacional *	Peso del recién nacido (g)	122.9±53.7	0.0226
	Semana de gestación del parto	-0.26±0.30	0.3879
	Capurro	-0.46±0.30	0.1275
	Peso de la placenta (g)	41.9±27.9	0.1348
	Perímetro cefálico (cm)	0.46±0.39	0.2390

‡ Valor P de modelos de regresión lineal ajustados por IMC pregestacional, sexo del recién nacido y hospital de referencia. * Valor P de modelos de regresión lineal ajustados por estado glucémico materno, sexo del recién nacido y hospital de referencia. Todos los modelos para analizar peso del recién nacido y de la placenta se ajustaron adicionalmente por semana de gestación del parto.

7.3. VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS CON LA DMG Y CON RASGOS RELACIONADOS

Se examinaron 176 SNP previamente asociados con el riesgo de desarrollar DT2, DMG, IMC alto y rasgos adversos del embarazo en otras poblaciones. Seis variantes correspondientes a dos *loci* alcanzaron significancia estadística para la asociación con el riesgo de DMG después del ajuste FDR para múltiples comparaciones (Tabla 7.6): *TCF7L2* (rs7901695, Q=0.00314, OR [IC 95%]=2.14 [1.47-3.11]; rs4506565, Q=0.00314, OR=2.06 [1.45-2.94]; rs7903146, Q=0.00324, OR=2.07 [1.44-2.98]; rs12243326, Q=0.00061, OR=2.89 [1.85-4.52]) y *KCNQ1* (rs2237892, Q=0.007, OR=0.58 [0.43-0.78]; rs2237897, Q=0.00314, OR=0.54[0.40-0.72]). El tamaño del efecto de los alelos y la frecuencias de dichos SNP son consistentes con estudios previos de DMG y DT2 [48, 99]. Cuando se estratificó la muestra por IMC pregestacional (delgadas vs. no delgadas), los análisis de asociación no mostraron alguna modulación de los tamaños de los efectos de *TCF7L2* y *KCNQ1* (Tabla 7.7). Además, ocho variantes genéticas mostraron significancia estadística nominal ($P<0.05$): *KLF14* (rs972283), *KCNQ1* (rs163184), *FAIM2* (rs7138803), *HHEX* (rs5015480), *GRB14* (rs3923113), *DUSP9* (rs5945326), *FTSJD1/CALB2* (rs6499500), *PEPD* (rs3786897) (Tabla 7.6).

Tabla 7.6. Variantes genéticas asociadas con el riesgo de DMG en mujeres mexicanas.

GEN	SNP	CR	BP	A1	OR [IC 95%]	Valor P	Valor Q FDR
<i>TCF7L2</i>	rs7901695	10	114754088	C	2.134 [1.47-3.11]	7.13x10 ⁻⁰⁵	0.00314
	rs4506565	10	114756041	T	2.06 [1.45-2.94]	6.39x10 ⁻⁰⁵	0.00314
	rs7903146	10	114758349	T	2.07 [1.44-2.98]	9.20x10 ⁻⁰⁵	0.00324
	rs12243326	10	114788815	C	2.89 [1.85-4.52]	3.46x10 ⁻⁰⁶	0.00061
<i>KCNQ1</i>	rs2237892	11	2839751	T	0.58 [0.43-0.78]	0.00024	0.00700
	rs163184	11	2847069	T	0.70 [0.54-0.91]	0.00774	0.1702
	rs2237897	11	2858546	T	0.54 [0.40-0.72]	4.49x10 ⁻⁰⁵	0.00314
<i>KLF14</i>	rs972283	7	130466854	A	0.66 [0.50-0.87]	0.00303	0.0761
<i>FAIM2</i>	rs7138803	12	50247468	A	0.65 [0.47-0.90]	0.01000	0.1956
<i>HHEX</i>	rs5015480	10	94465559	C	1.38 [1.04-1.84]	0.02619	0.4609
<i>FTSJD1/CALB2</i>	rs6499500	16	71348415	C	0.72 [0.54-0.97]	0.03234	0.4635
<i>GRB14</i>	rs3923113	2	165501849	G	0.68 [0.48-0.97]	0.03389	0.4635
<i>DUSP9</i>	rs5945326	23	152899922	A	1.34 [1.02-1.76]	0.03423	0.4635
<i>PEPD</i>	rs3786897	19	33893008	G	1.44 [1.02-2.04]	0.03957	0.4975

Valores P y Q de modelos de regresión logística corregidos por edad, IMC pregestacional, ancestría nativa Americana y hospital de referencia.

Después, se examinó la asociación de los haplotipos de *TCF7L2* y *KCNQ1* con la DMG y varios rasgos metabólicos relacionados. El haplotipo CTTC de riesgo de *TCF7L2* (r^2 rs7901695 vs. rs4506565=0.96, r^2 rs7901695 vs. rs7903146=0.88, r^2 rs7901695 vs. rs12243326=0.55, r^2 rs4506565 vs. rs7903146=0.92, r^2 rs4506565 vs. rs12243326=0.58, r^2 rs7903146 vs. rs12243326=0.60) se asoció al riesgo de DMG y a los niveles altos de glucemia en ayuno, y a los 60' y 120' de la CTOG diagnóstica, así como al área bajo la curva. De forma similar, además de la asociación con la DMG, el haplotipo de TTT de protección de *KCNQ1* (r^2 rs2237892 vs. rs163184=0.41, r^2 rs2237892 vs. rs2237897=0.91, r^2 rs163184 vs. rs2237897=0.39) también se asoció con los niveles bajos de glucemia a los 60' y 180' de la CTOG diagnóstica y del área bajo la curva (Tabla 7.8).

Tabla 7.7. Comparación de los efectos de los alelos de riesgo entre las muestras de DMG delgadas vs. no delgadas.

GEN	SNP	A1	Delgadas (N=184/125)		No delgadas (N=128/248)		Valor P prueba t
			OR	Valor P	OR	Valor P	
TCF7L2	rs7901695	C	2.649	0.001768	1.897	0.009695	0.3957
	rs4506565	T	2.211	0.005541	2.03	0.003126	0.8176
	rs7903146	T	2.365	0.003477	1.956	0.00634	0.618
	rs12243326	C	2.473	0.01136	3.327	9.87x10⁻⁰⁵	0.5284
KCNQ1	rs2237892	T	0.6298	0.04575	0.5216	0.0008519	0.5307
	rs2237897	T	0.6123	0.03994	0.4698	0.0002011	0.3956
CENTD2	rs1552224	T	1.154	0.7406	1.573	0.2567	0.5999
MNTR1B	rs1387153	T	0.888	0.6337	1.761	0.01297	0.0432

Valores P de modelos de regresión logística corregidos por edad, ancestría nativa americana y hospital de referencia. Valor P prueba t de la comparación entre el efecto del alelo de riesgo de las mujeres delgadas y las no delgadas. N es el tamaño de muestra de los controles/casos usados en el análisis.

Tabla 7.8. Haplotipos asociados con el riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados.

GEN	SNP	KB	HAPLOTIPO	f controles	f casos	RASGO	OR/Coef B	Valor P
TCF7L2	rs7901695 rs4506565 rs7903146 rs12243326	34	CTTC	0.0845	0.145	DMG	2.95	2.16x10⁻⁰⁶
						Glucosa 0'	0.0308	0.0128
						Glucosa 60'	0.0971	2.82x10⁻⁰⁵
						Glucosa 120'	0.0785	0.00028
						Glucosa 180'	0.0232	0.342
						AUC	0.0783	0.000154
KCNQ1	rs2237892 rs163184 rs2237897	18.8	TTT	0.3406	0.2384	DMG	0.551	1.98x10⁻⁰⁵
						Glucosa 0'	-0.0041	0.624
						Glucosa 60'	-0.0311	0.0488
						Glucosa 120'	-0.0195	0.184
						Glucosa 180'	-0.0474	0.00381
						AUC	-0.0312	0.0263

Valores P de modelos de regresión logística corregidos por edad, IMC pregestacional, ancestría nativa americana y hospital de referencia; o regresión lineal múltiple corregida por edad, IMC pregestacional, semana gestacional de la CTOG, ancestría nativa americana y hospital de referencia. Se muestran los OR y los coeficientes B, respectivamente. AUC es el área bajo la curva de la CTOG diagnóstica.

Luego, se analizó la asociación de los 176 SNP con la fluctuación de rasgos metabólicos cuantitativos. Dos variantes alcanzaron significancia estadística después del ajuste FDR para múltiples comparaciones: *CENTD2* (glucemia 60' CTOG: rs1552224, Q=0.02599), *MTNR1B* (HOMA B: rs1387153, Q=0.03881) (Tabla 7.9). Es interesante que la variante *MTNR1B* rs1387153 se asoció nominalmente a la DMG en el subconjunto de mujeres no delgadas (delgadas: OR=0.888, P=0.6337 vs. no delgadas: OR=1.761, P=0.01297, valor P de la prueba t=0.0432) (Tabla 7.7).

Tabla 7.9. Variantes genéticas asociadas significativamente con fluctuaciones en rasgos metabólicos en mujeres mexicanas embarazadas.

GEN	SNP	CR	BP	A1	RASGO	COEF B	valor P	valor Q FDR
<i>CENTD2</i>	rs1552224	11	72433098	T	Glucosa 60'	0.1118	0.00061	0.02699
<i>MTNR1B</i>	rs1387153	11	92673828	T	HOMA B	-0.1176	0.00022	0.03881

Valores P y Q de modelos de regresión lineal múltiple corregidos por edad, IMC pregestacional, estatus glucémico, semana de gestación de la CTOG, ancestría nativa americana y hospital de referencia.

Uno de los objetivos fue comparar los efectos de riesgo de las variantes de *TCF7L2* y *KCNQ1* entre la DMG y la DT2. Para este propósito, se compararon los coeficientes Beta obtenidos en el grupo caso-control de DT2 del consorcio SIGMA DT2 [48] con los obtenidos en la muestra de DMG. Como se reportó previamente, ambos *loci* alcanzaron asociación significativa en un GWAS para DT2 en población mexicana: *TCF7L2* (rs7903146, $P=2.5 \times 10^{-17}$, OR [IC 95%]=1.41[1.30-1.53]) y *KCNQ1* (rs2237897, $P=4.9 \times 10^{-16}$, OR=0.74[0.69-0.80]) [48]. El efecto de los alelos de riesgo de *TCF7L2* fue significativamente diferente entre las mujeres de la muestra de DT2 y las de DMG (P de prueba $t < 0.01$). Por el contrario, no se encontraron diferencias en el efecto de riesgo de las variantes de *KCNQ1* entre ambos grupos (P de prueba $t > 0.1$) (Tabla 7.10). La Tabla 7.11 muestra las frecuencias alélicas para las muestras analizadas.

Tabla 7.10. Comparación de los efectos de los alelos de riesgo de *TCF7L2* y *KCNQ1* entre la DMG y la DT2.

GEN	SNP	A1	DMG (N=408/342)		SIGMA T2D Sólo mujeres ≤48 años (N=2467/560)		valor P prueba t	SIGMA T2D (N=4366/3848)	
			OR	valor P	OR	valor P		OR	valor P
<i>TCF7L2</i>	rs7901695	C	2.14	7.13×10^{-05}	1.17	0.1064	0.0048	1.33	4.76×10^{-13}
	rs4506565	T	2.06	6.39×10^{-05}	1.16	0.1186	0.0075	1.35	2.51×10^{-14}
	rs7903146	T	2.07	9.20×10^{-05}	1.21	0.05725	0.0136	1.41	2.50×10^{-17}
	rs12243326	C	2.89	3.46×10^{-06}	1.17	0.1566	0.0003	1.35	1.02×10^{-11}
<i>KCNQ1</i>	rs2237892	T	0.58	2.39×10^{-04}	0.73	1.74×10^{-04}	0.2113	0.78	1.08×10^{-12}
	rs2237897	T	0.54	4.49×10^{-05}	0.68	7.26×10^{-06}	0.2052	0.74	4.9×10^{-16}

Valores P de modelos de regresión logística corregida por edad, IMC y ancestría nativa americana. Valor P prueba t de comparación entre los efectos de los alelos de riesgo de las muestras de DMG y SIGMA T2D sólo mujeres ≤48 años. N es el tamaño de muestra de los controles/casos usados en el análisis.

A pesar de la asociación observada de *TCF7L2* y *KCNQ1* con la DMG, no se encontró asociación para el haplotipo de *SLC16A11*, el cual fue identificado recientemente como uno de los principales contribuyentes al riesgo de DT2 en población mexicana [48]. Aún cuando la frecuencia de las variantes de riesgo de *SLC16A11* fue similar entre los casos de DMG y las mujeres casos de DT2 ($P > 0.1$), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles de DMG ($P > 0.1$) (Tabla 7.11). Debido a que todos los análisis de asociación incluyeron un conjunto de AIM previamente validado, la falta de asociación no se debe a un control de estratificación de la población deficiente.

Finalmente, considerando que 59 *loci* mostraron asociaciones nominales con el riesgo de desarrollar DMG o rasgos metabólicos o del embarazo relacionados, se realizó un análisis de

enriquecimiento génico (GSEA) usando un punto de corte para los valores $P < 0.01$. Además de los procesos biológicos GO evidentemente relacionados (homeostasis de la glucosa, regulación negativa de la transducción de señales, regulación positiva de los procesos metabólicos, regulación de la secreción de la insulina, generación de metabolitos precursores, procesos metabólicos de reserva de energía, comportamientos alimenticios), el análisis reveló dos procesos adicionales de interés: regulación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II y transcripción gen-específico ($P < 0.05$). Es relevante que todas las variantes genéticas que alcanzaron significancia estadística después del ajuste FDR para múltiples comparaciones, se localizan en regiones codificantes pero que no se traducen, o bien, dentro de sitios no codificantes (Tabla 7.12).

Tabla 7.11. Frecuencias alélicas de las variantes genéticas asociadas con el riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados en mujeres mexicanas, así como el *loci* SLC16A11.

GEN	SNP	A1	DMG (N=342/408)			SIGMA T2D (N=4366/3848)			1 KG		
			Casos	Controles	Valor P	Casos	Controles	Valor P	EUR	AFR	ASN
<i>TCF7L2</i>	rs7901695	C	0.203	0.136	1.5x10⁻⁰³	0.245	0.216	0.0001	0.325	0.460	0.044
	rs7903146	T	0.199	0.127	9.0x10⁻⁰⁴	0.232	0.196	2.5x10⁻⁰⁷	0.320	0.280	0.039
	rs4506565	T	0.213	0.140	1.3x10⁻⁰³	0.244	0.214	3.8x10⁻⁰⁵	0.332	0.460	0.044
	rs12243326	C	0.168	0.096	1.0x10⁻⁰⁴	0.191	0.171	0.0056	0.279	0.270	0.023
<i>KCNQ1</i>	rs2237897	T	0.247	0.344	2.0x10⁻⁰⁴	0.246	0.277	5.2x10⁻⁰⁵	0.042	0.080	0.366
	rs2237892	T	0.261	0.349	0.0012	0.263	0.287	0.0025	0.060	0.110	0.333
<i>MTNR1B</i>	rs1387153	T	0.233	0.204	0.238	0.222	0.222	0.7974	0.269	0.400	0.438
<i>CENTD2</i>	rs1552224	T	0.954	0.939	0.4328	0.942	0.929	0.0055	0.866	0.990	0.930
<i>SLC16A11</i>	rs13342232	G	0.367	0.365	0.4866	0.351	0.283	6.9x10⁻¹⁹	0.039	0.010	0.120
	rs13342692	C	0.365	0.367	0.5345	0.350	0.283	1.3x10⁻¹⁸	0.039	0.010	0.120
	rs117767867	T	0.353	0.355	0.6461	0.328	0.263	6.2x10⁻²³	0.028	0.010	0.120
	rs75418188	T	0.354	0.359	0.5565	0.330	0.264	4.4x10⁻¹⁸	0.032	0.010	0.120
	rs75493593	T	0.356	0.357	0.7619	0.330	0.264	3.1x10⁻¹⁸	0.028	0.010	0.120

A1, alelo de la frecuencia reportada. Valor P de la prueba chi o exacta de Fisher que compara las frecuencias alélicas de los casos vs. controles. N es el tamaño de la muestra de controles/casos usados en el análisis. Las frecuencias alélicas de EUR (europeos), AFR (africanos) and ASN (asiáticos) provienen de resultados públicos del Proyecto 1000 Genomas.

Tabla 7.12. Anotación funcional de las variantes genéticas asociadas al riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados en mujeres mexicanas.

GEN	CR	BANDA	SNP	ALELOS	HEBRA	FUNCIÓN PREDICHA	POS cDNA	DISTANCIA SPLICING
<i>CENTD2</i>	11	q13.4	rs1552224	A C	1	5'UTR	306	NA
<i>KCNQ1</i>	11	p15.4	rs2237892	C T	1	Intrónico	NA	29246
			rs2237897	C T	1	Intrónico	NA	10451
<i>MTNR1B</i>	11	q14.3	rs1387153	C T	1	Intergénico	NA	NA
<i>TCF7L2</i>	10	q25.2	rs12243326	T C	1	Intrónico	NA	10969
			rs4506565	A T	1	Intrónico	NA	31658
			rs7901695	T GCA	1	Intrónico	NA	29705
			rs7903146	C T	1	Intrónico	NA	33966

ALELOS: Alelos (alelo de referencia/alelo observado)

HEBRA: 1, sentido; -1, antisentido

FUNCIÓN PREDICHA: Función predicha del SNP basada en su ubicación en el transcrito

POS cDNA: Posición del SNP en el cDNA, si la función predicha es codificante, 3'UTR o 5'UTR

DISTANCIA SPLICING: Distancia a la unión del splicing, si la función predicha es intrónica.

* los alelos estudiados del rs7901695 son T/C

7.4. DESCRIPCIÓN DE LA SUBMUESTRA DE DMG

La submuestra de DMG incluyó 47 mujeres mexicanas (31 controles y 16 casos). Para favorecer el poder estadístico de las comparaciones, se procuró conformar una muestra homogénea para las principales variables confusoras, que se habían descrito en la primera parte de este estudio; sin embargo, no fue posible para todas. Los casos mostraron un mayor IMC pregestacional que los controles ($P=0.0195$). Aunque las comparaciones no alcanzaron significancia estadística, los casos fueron marginalmente mayores y una mayor proporción reportó tener historia familiar de diabetes ($P<0.150$). No se encontraron diferencias significativas en variables de estilo de vida que habían sido relacionadas previamente con el desarrollo de la DMG [100-102], tales como el consumo de alcohol y tabaco, escolaridad, estatus socioeconómico bajo y proporción de ancestría nativa americana. Sólo un caso desarrolló preeclampsia, otro tuvo un producto macrosómico y dos casos requirieron la aplicación de insulina en no más de dos ocasiones (Tabla 7.13).

Después de ajustar por edad, IMC pregestacional, semana gestacional o postgestacional del muestreo y hospital de referencia, los casos mostraron una menor tasa de incorporación metabólica de glucosa (MCR) al momento de la CTOG diagnóstica ($P=0.032$). Después del parto, las mujeres que desarrollaron DMG permanecieron hiperglucémicas ($P=0.034$) y con resistencia a la insulina periférica, demostrado por los niveles bajos de MCR e índice Gutt ($P=0.030$, 0.003 , respectivamente) (Tabla 7.14). A excepción de los altos niveles de adiponectina en el suero de cordón umbilical ($P=0.034$), los productos hijos de madres con DMG no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7.15).

Tabla 7.13. Descripción clínica y sociodemográfica de la submuestra de DMG.

	Controles (N=31)	Casos (N=16)	Valor P
Edad de diagnóstico (años)	27 [21-34]	31.5 [28-37]	0.0635
Edad materna avanzada (%)	22.58	37.5	0.4597
Estatura baja (%)	6.67	12.5	0.6019
IMC pregestacional (kg/m ²)	25.89 [21.79-27.85]	27 [25.89-32.67]	0.0195
Obesidad (%)	6.67	25	0.1628
Ganancia de peso (kg)	12.95 [8.5-15]	10 [7.5-14]	0.3784
Antecedentes familiares de DM (%)	70.97	93.75	0.1307
Alta paridad (%)	41.94	12.5	0.0522
Pérdida gestacional recurrente (%)	6.45	12.5	0.5968
Consumo de bebidas alcohólicas (%)	36.67	43.75	0.8794
Consumo de tabaco (%)	26.67	25	1.0000
Consumo de hormonas (%)	16.67	18.75	1.0000
Presión arterial sistólica (mm Hg)	100 [100-112.5]	110 [100-120]	0.2653
Presión arterial diastólica (mm Hg)	70 [60-70]	70 [70-80]	0.3631
Preeclampsia (%)	0	6.25	0.3404
Polihidramnios (%)	3.23	0	1.0000
Parto a término (%)	92.86	100	0.5349
Malformaciones en el recién nacido (%)	3.57	0	1.0000
Macrosomía del recién nacido (%)	0	6.67	0.3488
Tratamiento de insulina (%)	0	13.33	0.1110
Paciente con pareja (%)	89.66	81.25	0.6501
Paciente con empleo (%)	48.28	50	1.0000
Escolaridad ≥ licenciatura (%)	34.48	33.33	1.0000
Estatus socioeconómico bajo (%)	37.04	37.5	1.0000
Ancestría nativa americana (%)	0.68 [0.59-0.78]	0.68 [0.53-0.72]	0.8042

Mediana [percentil 25-percentil 75] o los porcentajes. Comparaciones entre casos vs. controles. Valor P de pruebas U Mann Whitney; o bien, pruebas de chi cuadrada o exacta de Fisher.

Tabla 7.14. Características metabólicas maternas de la submuestra de DMG.

	Embarazo			Parto			Postparto		
	Controles	Casos	Valor P	Controles	Casos	Valor P	Controles	Casos	Valor P
Glucosa (mg/dl)	81 [72.5-85]	96.5 [84.75-100.25]	4.47x10⁻⁰⁶	83 [75-85]	80.5 [72.5-89]	0.6828	88 [84-91.25]	95 [88-110]	0.0013
Insulina (µU/dl)	10.5 [7.12-14.25]	17.9 [13-24.9]	0.0704	11.1 [7.5-15.1]	16.75 [10.95-24.1]	0.8257	6.8 [4.6-9.2]	17.85 [5.75-26.92]	0.0707
Insulina 120' (µU/dl)	59.85 [34.95-92.63]	107.1 [64.23-161.93]	0.0582	-	-	-	41.35 [26.7-56.97]	107.8 [56.4-153.05]	9.81x10⁻⁰⁵
Triglicéridos (mg/dl)	225 [181.5-246]	249 [226-268]	0.4049	285 [227.5-349.5]	276.5 [245-352.75]	0.0322	105 [83-153.5]	121 [112.25-202.25]	0.4868
Colesterol (mg/dl)	219.5 [198-241.25]	216 [184.75-236.25]	0.7708	254 [214-280]	214 [191.5-240]	0.4571	186 [163.5-203.5]	201.5 [187-216.5]	0.1184
HDL (mg/dl)	65.5 [57.5-77]	67 [55-77]	0.6910	71 [58-79.5]	61 [56.5-68.25]	0.1876	49 [42.5-58]	50.5 [41-52.25]	0.8162
LDL (mg/dl)	106 [90.5-119.8]	121 [88-138]	0.7772	114 [93-149.5]	92.8 [81.8-114]	0.8099	104 [95-117]	122 [94-144.5]	0.1194
Leptina (ng/dl)	13.47 [9.05-17.33]	15.32 [11.14-21.8]	0.5077	19.06 [10.64-24.62]	16.32 [13.17-21.8]	0.2799	7.33 [4.62-13.4]	17.33 [12.5-23.32]	0.0718
Adiponectina (ng/dl)	8.6 [6.27-10.21]	6.96 [4.88-8.31]	0.1398	9.56 [8-11.96]	10.2 [7.35-12.73]	0.4464	9.49 [7.75-11.4]	6.66 [4.63-8.74]	0.2057
Progesterona (nmol/l)	130.07 [101.63-190.38]	130.52 [87.28-191.03]	4.1x10⁻⁰⁵	402.04 [317.74-487.54]	396.95 [366.07-482.77]	0.5742	1.22 [0.59-4.34]	0.13 [0.11-12.68]	0.3614
Estradiol (pmol/l)	14885 [13007.4-22496.5]	13762.4 [10591.5-20957.5]	0.0011	25654 [20779.9-33753.3]	16939.6 [15690.9-20180.07]	0.0020	55 [39.59-246.01]	46.73 [30.6-62.87]	0.1478
Índice m	621.36 [620.12-622.15]	617.77 [614.05-619.76]	0.0003	-	-	-	624.12 [623.25-624.97]	624.08 [619.88-625.3]	0.0222
Índice Gutt	3.97 [3.36-5.03]	2.73 [2.46-3.05]	0.0163	-	-	-	5.19 [4.05-5.6]	3.01 [2.65-4.3]	0.0699
HOMA B (%)	152.3 [118.57-172.23]	161 [109.55-178.65]	0.9771	149.1 [115.3-195.1]	200.6 [164.12-245.32]	0.1540	100.5 [70.8-112.4]	120.5 [79.7-140.82]	0.6256
HOMA S (%)	76.4 [56.25-112.17]	44.4 [31.1-59.95]	0.1355	72.6 [53.8-104.2]	47.95 [32.85-74.33]	0.1693	111.5 [84.4-165.4]	47.1 [28.67-134.5]	0.2349
HOMA IR	1.31 [0.89-1.77]	2.25 [1.67-3.22]	0.0429	1.38 [0.96-1.86]	2.08 [1.35-3.04]	0.8013	0.9 [0.6-1.18]	2.36 [0.74-3.61]	0.0533

Mediana [percentila 25-percentila 75]. Comparaciones de controles vs. casos. Valor de P de modelos de regresión lineal múltiple corregidos por semana de gestación, semana del parto o semana postparto, según sea el caso.

Tabla 7.15. Características antropométricas y metabólicas de los recién nacidos de la submuestra de DMG.

	Descendencia madres controles	Descendencia madres casos	valor <i>P</i>
Tamaño de la muestra	31	16	-
Sexo femenino (%)	46.43	40	0.934
Peso (g)	3003 [2792.25-3282.5]	2982 [2551-3341]	0.347
Talla (cm)	49 [47-50]	48 [46.5-50]	0.530
Perímetro cefálico (cm)	33.62 [33-34.81]	33 [32.5-34]	0.244
Capurro (sdg)	38.15 [37.08-39]	38.2 [37-39]	0.995
Peso de la placenta (g)	619 [561.25-722.5]	600 [525-694]	0.298
Glucosa (mg/dl)	67.5 [59.5-70.25]	66 [61.5-80.5]	0.598
Insulina (μU/dl)	4.9 [3.5-7.4]	5.7 [4.95-8.45]	0.621
Triglicéridos (mg/dl)	22 [16-29.25]	27 [20.5-30.5]	0.345
Colesterol (mg/dl)	55 [45-74]	63 [51.5-70]	0.893
HDL (mg/dl)	28 [22.75-35.5]	29 [21.5-40]	0.601
LDL (mg/dl)	24 [17.5-32]	26 [22.5-33.5]	0.595
Progesterona (nmol/l)	707.55 [560.92-993.55]	1085.5 [524.59-1430.88]	0.293
Estradiol (pmol/l)	7221.5 [4695.05-11936.25]	7732.5 [4043.57-9856.3]	0.760
Cortisol (μg/dl)	3.77 [3.04-5.09]	5.14 [4.37-6.88]	0.229
Leptina (ng/dl)	4.1 [2.69-6.16]	4.59 [2.08-10.52]	0.522
Adiponectina (ng/dl)	44.31 [38.63-63.79]	47.29 [36.04-59.52]	0.034
HOMA B (%)	308.1 [217.7-426.03]	354.8 [291.5-488.6]	0.321
HOMA IR	2.17 [1.16-3.53]	3.08 [2.62-4.1]	0.374

Mediana [percentil 25-percentil 75]. Comparaciones entre los recién nacidos de madres normoglucémicas vs. madres con DG. Valor *P* de pruebas U Mann Whitney o de regresiones lineares múltiples corregidas por edad materna, IMC pregestacional, semana gestacional del parto, sexo del recién nacido y hospital de referencia.

7.5. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE TCF7L2 EN LA DMG Y SU ASOCIACIÓN CON LA VARIANTE rs7903146

Se comparó el nivel de expresión del gen *TCF7L2* entre casos y controles en tejidos metabólicamente relevantes que se biopsiaron al momento de la cesárea. Después de ajustar por edad, IMC pregestacional y hospital de referencia, la expresión relativa de *TCF7L2* fue significativamente menor en ambos tejidos adiposos, así como en músculo de las mujeres caso. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los lados de la placenta (PF *P*=0.557, PM *P*=0.159; TAS *P*=0.007; TAV *P*=0.036; M *P*=0.036) (Tabla 7.16).

Tabla 7.16. Expresión relativa de *TCF7L2* en mujeres con DMG en tejidos de relevancia metabólica.

Gen	Tejido		Veces de cambio	Coef B	Valor P
<i>TCF7L2</i>	Placenta	PF	0.946	-0.0856	0.557
		PM	0.704	-0.6176	0.159
	Tejido adiposo	TAS	0.292	-1.9095	0.007
		TAV	0.489	-1.0309	0.036
	Músculo	M	0.704	-0.4751	0.036

Veces de cambio de los niveles de expresión de los casos de DG relativo a los controles. Coeficiente B y valor P ajustado por edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. PF, lado fetal de la placenta; PM, lado materno de la placenta; TAS, tejido adiposo subcutáneo; TAV, tejido adiposo visceral; M, músculo.

Luego, analizamos si la variante genética rs7903146 dentro del intrón 10 de *TCF7L2* modula sus niveles de expresión génica. El SNP rs7903146 fue el único que se analizó, dado que es la variante más replicada del *locus* [44], que hay evidencia funcional de su papel en la patofisiología de la diabetes [103] y que los SNP asociados circundantes se encontraron en LD en la muestra de 750 mujeres mexicanas (rs7901695, rs4506565, rs12243326; $r^2 > 0.6$, $P < 0.05$). El alelo materno T de riesgo de la variante rs7903146 mostró una frecuencia alélica mayor en el grupo de casos (f controles=0.097 vs. f casos=0.313, $P=0.019$). Ninguno de los participantes, caso o control, fue homocigoto de riesgo (genotipo TT). En contraste, el alelo T de riesgo de cordón umbilical no mostró diferencias en su frecuencia entre los productos nacidos de madre diabética y normoglucémica (f controles=0.150 vs. f casos=0.250, $P=0.239$) (Tabla 7.17).

Tabla 7.17. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs7903146 en la submuestra de DMG.

Gen	SNP	Genotipo		Controles (N=31)	Casos (N=16)	Valor P	
<i>TCF7L2</i>	rs7903146	Madre	Genotipo (N)	CC	25	6	0.008
				CT	6	10	
			Alelo menor (f)	T	0.097	0.313	0.019
		Recién nacido		CC	21	9	0.305
			Genotipo (N)	CT	9	6	
				TT	0	1	
Alelo menor (f)	T		0.150	0.250	0.239		

Valor P de pruebas chi cuadrada o exacta de Fisher. Comparaciones de frecuencias genotípicas o alélicas de casos vs. controles. N es la cuenta de individuos para cada genotipo. f es la frecuencia alélica. El genotipo materno se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre materna. El genotipo del recién nacido se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre de cordón umbilical.

Después de ajustar por estado glucémico, edad, IMC pregestacional y hospital de referencia, el alelo materno T de riesgo, genotipado a partir de sangre materna, no se asoció con la expresión génica de *TCF7L2* en ninguno de los tejidos analizados. Tampoco se encontró asociación del alelo T del recién nacido, genotipado a partir de sangre de cordón umbilical, con los niveles de expresión de *TCF7L2* en placenta (Tabla 7.18).

Tabla 7.18. Asociación de la variante rs7903146 con los niveles de expresión de *TCF7L2* por tejido analizado.

Gen	Tejido		Genotipo materno CC=31, CT=16		Genotipo recién nacido CC=30, CT=15, TT=1	
			Coef B	Valor P	Coef B	Valor P
<i>TCF7L2</i>	Placenta	PF	-0.0086	0.980	-0.1982	0.699
		PM	-0.346	0.114	-0.1089	0.522
	Tejido adiposo	TAS	0.1218	0.786	-	-
		TAV	0.0289	0.891	-	-
	Músculo	M	-0.2865	0.216	-	-

Valor *P* ajustado por estatus glucémico, edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. Coef B es la magnitud del efecto por copia del alelo T. PF, lado fetal de la placenta; PM, lado materno de la placenta; TAS, tejido adiposo subcutáneo; TAV, tejido adiposo visceral; M, músculo. El genotipo materno se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre materna. El genotipo del recién nacido se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre de cordón umbilical.

También analizamos si la disminución en la expresión de *TCF7L2* se relaciona con variaciones de los rasgos metabólicos en suero materno y de cordón umbilical al momento del parto. Después de ajustar por estado glucémico, edad, IMC pregestacional, semana de gestación del parto y hospital de referencia, nuestros resultados sugirieron que una disminución en la expresión de *TCF7L2* en tejido adiposo visceral y músculo se asocia con niveles bajos de colesterol total y triglicéridos en suero materno, respectivamente (VAT: CT $P=0.035$; M: TG $P=0.007$) (Tabla 7.19). Basados en estos resultados, nos preguntamos si los mecanismos relacionados con la adipogénesis podrían estar alterados en las mujeres con DMG. Cuando analizamos la expresión del gen *PPAR γ* en tejido adiposo visceral, encontramos que las mujeres con DMG tuvieron mayores niveles de RNAm de *PPAR γ* y en consecuencia, un mayor ratio de expresión *PPAR γ :TCF7L2* (*PPAR γ* Veces de cambio=2.4, $P=0.058$; ratio *PPAR γ :TCF7L2* Coeficiente B=0.54, $P=0.026$).

Adicionalmente, la disminución de la expresión de *TCF7L2* en músculo se asoció con menores niveles de adiponectina en suero de cordón umbilical y con un mayor peso de la placenta (M: adiponectina $P=0.031$, peso de la placenta $P=0.025$). A pesar de que no se observó asociación con el peso del recién nacido, el ratio del peso del recién nacido y de la placenta disminuyó marginalmente, sugiriendo un menor peso del recién nacido relativo al de su placenta ($P=0.071$) (Tabla 7.19). Dicha asociación se hizo significativa cuando se corrigió por nivel socioeconómico (Ratio del peso del recién nacido:placenta corregido por nivel SES: $\beta=-0.175$, $P=0.015$, datos no mostrados).

Tabla 7.19. Asociación de la disminución en la expresión de *TCF7L2* con rasgos metabólicos materno-fetales.

Tejido	Rasgo	Coef B	Valor P	
TAS	Suero materno	TG (mg/dl)	-0.1649	0.993
		CT (mg/dl)	0.7461	0.940
		LDL (mg/dl)	1.0440	0.886
	Suero de cordón umbilical	LDL (mg/dl)	-0.9318	0.753
		Adiponectina (ng/dl)	-1.8415	0.581
	Placenta	Peso (g)	-15.807	0.482
	Recién nacido	Peso (g)	-147.69	0.215
Radio peso recién nacido:placenta	-	-0.0966	0.142	
TAV	Suero materno	TG (mg/dl)	-56.443	0.079
		CT (mg/dl)	-37.471	0.035
		LDL (mg/dl)	-22.401	0.193
	Suero de cordón umbilical	LDL (mg/dl)	-4.2023	0.339
		Adiponectina (ng/dl)	-14.255	0.106
	Placenta	Peso (g)	28.125	0.551
	Recién nacido	Peso (g)	26.919	0.725
Radio peso recién nacido:placenta	-	-0.1521	0.596	
M	Suero materno	TG (mg/dl)	-107.70	0.007
		CT (mg/dl)	-23.932	0.148
		LDL (mg/dl)	-3.4352	0.074
	Suero de cordón umbilical	LDL (mg/dl)	3.4903	0.068
		Adiponectina (ng/dl)	-8.4381	0.031
	Placenta	Peso (g)	38.303	0.025
	Recién nacido	Peso (g)	12.131	0.908
Radio peso recién nacido:placenta	-	-0.2747	0.071	

Valor *P* ajustado por estatus glucémico, edad, IMC pregestacional, semana de gestación del parto y hospital de referencia. Valor *P* para rasgos antropométricos y de la placenta ajustado por estatus glucémico, edad, IMC pregestacional, semana de gestación del parto, sexo del recién nacido, paridad y hospital de referencia.

7.6. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *KCNQ1* EN LA DMG Y SU ASOCIACIÓN CON LAS VARIANTES *rs231362* Y *rs2237897*

También se analizaron los niveles de expresión génica de *KCNQ1* entre casos y controles de DMG. Con base en lo que se sabe acerca de su regulación, también cuantificamos la abundancia relativa del RNA largo no codificante *KCNQ1OT1*. Después de ajustar por edad, IMC pregestacional y hospital de referencia, los niveles de RNAm de *KCNQ1OT1* fueron menores en ambos lados de la placenta de los casos de DMG. Es interesante que también se encontró una regulación marginal a la baja de *KCNQ1* en placenta (*KCNQ1*: FP *P*=0.062, MP *P*=0.065); así como de *KCNQ1OT1* en tejido adiposo visceral (*KCNQ1OT1*: TAV *P*=0.078) (Tabla 7.20).

Por lo anterior, analizamos el radio de expresión *KCNQ1:KCNQ1OT1* y encontramos una menor abundancia del transcrito de *KCNQ1* en el lado fetal, pero no en el lado materno de la placenta de mujeres con DMG (PF *P*=0.038, PM *P*=0.625). En contraste, el radio *KCNQ1:KCNQ1OT1* se

encontró marginalmente aumentado en ambos tejidos adiposos de las mujeres con DMG (TAS $P=0.063$, TAV $P=0.087$) (Tabla 7.20).

Tabla 7.20. Expresión relativa de *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* en mujeres con DMG en tejidos de relevancia metabólica.

Gen	Tejido	Veces de cambio	Coef B	Valor P	
<i>KCNQ1</i>	Placenta	PF	0.63	-0.7603	0.062
		PM	0.633	-0.7091	0.065
	Tejido adiposo	TAS	1.489	0.3699	0.350
		TAV	1.035	-0.0444	0.753
	Músculo	M	0.94	-0.2215	0.313
<i>KCNQ1OT1</i>	Placenta	PF	0.889	-0.1546	0.013
		PM	0.588	-0.7576	0.041
	Tejido adiposo	SAT	0.889	-0.3741	0.115
		VAT	0.543	-0.9427	0.078
	Músculo	M	0.714	-0.3704	0.285
<i>KCNQ1:OT1</i>	Placenta	PF	0.856	-0.2885	0.038
		PM	1.017	0.0126	0.625
	Tejido adiposo	SAT	1.056	0.0791	0.063
		VAT	1.075	0.1039	0.087
	Músculo	M	1.018	0.0107	0.176

Veces de cambio de los niveles de expresión de los casos de DG relativo a los controles. Coeficiente B y valor P ajustado por edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. PF, lado fetal de la placenta; PM, lado materno de la placenta; TAS, tejido adiposo subcutáneo; TAV, tejido adiposo visceral; M, músculo.

En el caso del *locus KCNQ1*, analizamos la contribución de dos variantes genéticas (rs231362 y rs2237897) en los niveles de los transcritos, dado que cada una es marcadora de dos bloques de LD independientes ($r^2=0.03$, $P<0.05$). Además, el alelo T de la variante rs2237897 se encontró asociado con protección al desarrollo de DMG en mujeres mexicanas, mientras que la variante rs231362 no se asoció (rs2237897: OR=0.54, FDR $P=0.003$; rs231362: OR=0.43, FDR $P=0.896$) (Tabla 6.9). No obstante, el alelo T del rs231362 ha sido consistentemente asociado al desarrollo de la DT2 en otras poblaciones [78]. Cuando se compararon las frecuencias alélicas de los genotipos maternos entre los casos y controles de DMG, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los SNP analizados (rs231362: f controles=0.258 vs. f casos=0.313, $P=0.576$; rs2237897: f controles=0.403 vs. f casos=0.281, $P=0.244$). Tampoco cuando se compararon las frecuencias alélicas entre los neonatos nacidos de una madre diabética y los nacidos de madre normoglucémica (rs231362: f controles=0.283 vs. f casos=0.233, $P=0.613$; rs2237897: f controles=0.367 vs. f casos=0.250, $P=0.278$) (Tabla 7.21).

Tabla 7.21. Frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes rs231362 y rs2237897 en la submuestra de DMG.

Gen	SNP	Genotipo		Controles (N=31)	Casos (N=16)	Valor P	
<i>KCNQ1</i>	rs231362		CC	17	7		
		Madre	Genotipo (N)	CT	12	8	0.785
				TT	2	1	
			Alelo menor (<i>f</i>)	T	0.258	0.313	0.576
		Recién nacido	Genotipo (N)	CC	15	9	
				CT	13	5	0.881
			TT	2	1		
		Alelo menor (<i>f</i>)	T	0.283	0.233	0.613	
	rs2237897	Madre	Genotipo (N)	CC	11	9	
				CT	15	5	0.458
				TT	5	2	
			Alelo menor (<i>f</i>)	T	0.403	0.281	0.244
Recién nacido		Genotipo (N)	CC	12	8		
			CT	14	5	0.586	
		TT	4	1			
	Alelo menor (<i>f</i>)	T	0.367	0.250	0.278		

Valor *P* de pruebas chi cuadrada o exacta de Fisher. Comparaciones de frecuencias genotípicas o alélicas de casos vs. controles. N es la cuenta de individuos para cada genotipo. *f* es la frecuencia alélica. El genotipo materno se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre materna. El genotipo del recién nacido se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre de cordón umbilical.

El alelo materno T de riesgo de rs231362 se asoció con menores niveles de expresión de *KCNQ1* en el lado materno de la placenta ($P=0.009$). También se encontró una asociación marginal con la disminución de los niveles de expresión de *KCNQ1OT1* ($P=0.076$) (Tabla 7.22). Es interesante que en dichas asociaciones, encontramos evidencia de efectos de origen parental (*KCNQ1* *P* prueba $t=0.014$; *KCNQ1OT1* *P* prueba $t=0.096$, para la diferencia en los efectos maternos y paternos). Aunque no se obtuvo significancia estadística, se observó la misma dirección del efecto en la asociación con niveles bajos de *KCNQ1* cuando el alelo T es heredado por la madre, pero no cuando es heredado por el padre (Coef $B_M=-0.2898$, $P=0.123$; Coef $B_P=-0.0692$, $P=0.522$). De forma similar, el alelo T se asoció marginalmente con niveles bajos de expresión de *KCNQ1OT1* cuando se hereda por la madre (Coef $B_M=-0.2806$, $P=0.064$; Coef $B_P=-0.0146$, $P=0.926$) (Tabla 7.23).

Además, el alelo materno T protector de rs2237897 mostró asociación con un aumento en los niveles de expresión de *KCNQ1OT1* en el lado materno de la placenta ($P=0.021$). Tampoco se observaron asociaciones significativas de los genotipos del recién nacido con los niveles de expresión en placenta (Tabla 7.22).

Tabla 7.22. Asociación de las variantes rs231362 y rs2237897 con los niveles de expresión de *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* por tejido.

Gen	Tejido		rs231362				rs2237897			
			Genotipo materno CC=24, CT=20, TT=3		Genotipo recién nacido CC=24, CT=18, TT=3		Genotipo materno CC=20, CT=20, TT=7		Genotipo recién nacido CC=20, CT=19, TT=5	
			Coef B	Valor P	Coef B	Valor P	Coef B	Valor P	Coef B	Valor P
<i>KCNQ1</i>	Placenta	PF	0.0410	0.575	0.0865	0.070	-0.0177	0.818	0.0377	0.627
		PM	-0.1033	0.009	-0.2528	0.233	0.1320	0.207	0.2012	0.083
	Tejido adiposo	TAS	-0.0449	0.778	-	-	0.0674	0.565	-	-
		TAV	-0.0797	0.578	-	-	0.1390	0.147	-	-
	Músculo	M	0.1240	0.274	-	-	0.0525	0.768	-	-
<i>KCNQ1OT1</i>	Placenta	PF	-0.0757	0.483	-0.0394	0.405	0.1455	0.072	-0.0179	0.898
		PM	-0.1425	0.076	-0.1445	0.269	0.2089	0.021	0.0770	0.588
	Tejido adiposo	TAS	0.2294	0.219	-	-	-0.2433	0.387	-	-
		TAV	0.0779	0.688	-	-	-0.1577	0.339	-	-
	Músculo	M	0.2860	0.231	-	-	-0.2699	0.547	-	-

Valor *P* ajustado por estatus glucémico, edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. Coef B es la magnitud del efecto por copia del alelo T. PF, lado fetal de la placenta; PM, lado materno de la placenta; TAS, tejido adiposo subcutáneo; TAV, tejido adiposo visceral; M, músculo. El genotipo materno se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre materna. El genotipo del recién nacido se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre de cordón umbilical.

Tabla 7.23. Análisis de los efectos del origen parental del alelo T de rs231362 en la asociación con los niveles de *KCNQ1* y *KCNQ10T1*.

Gen	Tejido		Genotipo materno					Genotipo recién nacido				
			Coef B _M	Valor P	Coef B _P	Valor P	Valor P prueba t	Coef B _M	Valor P	Coef B _P	Valor P	Valor P prueba t
<i>KCNQ1</i>	Placenta	PF	-0.0295	0.861	0.1063	0.079	0.375	0.0455	0.746	0.1284	0.285	0.585
		PM	-0.2898	0.123	0.0692	0.522	0.014	-0.2199	0.334	-0.2865	0.179	0.767
	Tejido adiposo	TAS	-0.0558	0.768	-0.0357	0.841	0.930	-	-	-	-	-
		TAV	0.0447	0.858	-0.1894	0.353	0.391	-	-	-	-	-
	Músculo	M	0.1914	0.122	0.0586	0.638	0.309	-	-	-	-	-
	<i>KCNQ10T1</i>	Placenta	PF	-0.1761	0.054	0.0172	0.910	0.173	-0.1003	0.151	0.0230	0.833
PM			-0.2806	0.064	-0.0146	0.926	0.096	-0.0869	0.415	-0.2035	0.244	0.441
Tejido adiposo		TAS	0.0992	0.757	0.3412	0.261	0.498	-	-	-	-	-
		TAV	0.0357	0.677	0.1167	0.706	0.772	-	-	-	-	-
Músculo		M	0.0826	0.758	0.4833	0.352	0.391	-	-	-	-	-

Coef B_M es el efecto de un alelo T heredado de la madre, Coef B_P es el efecto de un alelo T heredado del padre. Valor P de la asociación del alelo T con los niveles de expresión génica ajustada por estatus glucémico, edad, IMC pregestacional y hospital de referencia. Valor P prueba t de comparación entre los efectos del origen materno vs. del origen paterno del alelo T de rs231362, para la hipótesis nula de que los efectos parentales son iguales (Coef B_M=Coef B_P). PF, lado fetal de la placenta; PM, lado materno de la placenta; TAS, tejido adiposo subcutáneo; TAV, tejido adiposo visceral; M, músculo. El genotipo materno se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre materna. El genotipo del recién nacido se obtuvo de DNA purificado a partir de sangre de cordón umbilical.

Finalmente, analizamos si la disminución en la expresión de los genes *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* en placenta estaba relacionada con fenotipos metabólicos materno-fetales al momento del parto. Después de ajustar por estado glucémico, edad, IMC pregestacional, semana gestacional del parto y hospital de referencia, nuestros resultados mostraron que la disminución en la expresión de cualquiera de ambos genes en placenta se asocia con niveles bajos de colesterol total y LDL en suero materno y con niveles bajos de TG en suero de cordón umbilical. La disminución en la expresión de *KCNQ1OT1* también se asoció con niveles bajos de adiponectina en cordón umbilical; mientras que la disminución en la expresión de *KCNQ1* en ambos lados de la placenta se asoció con bajo peso y talla al nacer (PF peso al nacer $P=0.015$, talla al nacer $P=0.000$, PM: peso al nacer $P=0.147$, talla al nacer $P=0.025$). Otra observación interesante fue que la disminución en la expresión de *KCNQ1OT1* en placenta de lado fetal se asoció con mayores niveles de leptina en suero materno (PF leptina $P=0.040$) (Tabla 7.24).

Tabla 7.24. Asociación de la disminución en la expresión de *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* en placenta con rasgos metabólicos materno-fetales.

Tejido	Rasgo	<i>KCNQ1</i>		<i>KCNQ1OT1</i>			
		Coef B	Valor P	Coef B	Valor P		
PF	Suero materno	TG (mg/dl)	-22.806	0.736	-14.459	0.096	
		CT (mg/dl)	-39.893	0.164	-17.166	0.013	
		LDL (mg/dl)	-27.204	0.028	-11.357	0.239	
		HDL (mg/dl)	-8.0745	0.075	-2.8118	0.651	
		Adiponectina (ng/dl)	1.7747	0.587	-0.5399	0.568	
		Leptina (ng/dl)	5.3319	0.101	5.4778	0.040	
	Suero de cordón umbilical	TG (mg/dl)	-4.2667	0.194	-3.8481	0.042	
		CT (mg/dl)	7.5923	0.574	-8.9036	0.188	
		LDL (mg/dl)	0.6694	0.856	-4.9050	0.267	
		HDL (mg/dl)	7.7651	0.462	-3.1226	0.282	
		Adiponectina (ng/dl)	-1.9157	0.658	-8.3119	0.085	
	Recién nacido	Peso (g)	-361.04	0.034	-127.03	0.485	
		Talla (cm)	-1.9774	0.000	-1.0525	0.263	
	PM	Suero materno	TG (mg/dl)	-19.186	0.792	10.317	0.520
			CT (mg/dl)	-6.3260	0.896	14.608	0.529
LDL (mg/dl)			1.1906	0.969	12.842	0.549	
HDL (mg/dl)			-3.6134	0.403	-0.2044	0.901	
Adiponectina (ng/dl)			2.1231	0.052	1.0160	0.197	
Leptina (ng/dl)			4.2728	0.208	3.9974	0.124	
Suero de cordón umbilical		TG (mg/dl)	-1.0459	0.713	-1.226397	0.813	
		CT (mg/dl)	7.9727	0.404	-3.3518	0.170	
		LDL (mg/dl)	3.2388	0.587	-1.6120	0.194	
		HDL (mg/dl)	5.0067	0.138	-1.3549	0.571	
		Adiponectina (ng/dl)	3.8990	0.731	-4.2269	0.046	
Recién nacido		Peso (g)	-234.47	0.147	-93.898	0.093	
		Talla (cm)	-0.7895	0.025	-0.6615	0.131	

Valor P ajustado por estado glucémico, edad, IMC pregestacional, semana gestacional al parto y hospital de referencia. Valor P para los rasgos antropométricos del recién nacido ajustados por estado glucémico, edad, IMC pregestacional, semana de gestación al parto, sexo del recién nacido, paridad y hospital de referencia. PF, lado fetal de la placenta; PM, lado materno de la placenta.

8. DISCUSIÓN

Diversos esfuerzos se han realizado para describir los mecanismos fisiopatológicos de la DMG y para diferenciarlos de los de la DT2. Algunos resultados han evidenciado que la DMG se asemeja a un estado de hiperglucemia temprana, en la que aún cuando es insuficiente, existe un aumento en la función β pancreática como mecanismo de compensación ante la resistencia a la insulina [104]. Como ya se ha reportado anteriormente, nuestros datos confirmaron que los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la DMG en México son la obesidad pregestacional, la edad materna avanzada, seguidos por los antecedentes familiares de DM y la alta paridad (Figura 8.1). Lo anterior dificulta la identificación de las características individuales de la DMG y la DT2, al mismo tiempo que exige mayor cuidado en la selección de individuos para su análisis. Es alarmante, que las cifras observadas de incidencia de intolerancia a los carbohidratos y DT2 entre las mujeres con DMG son altas con respecto a las reportadas en la literatura.

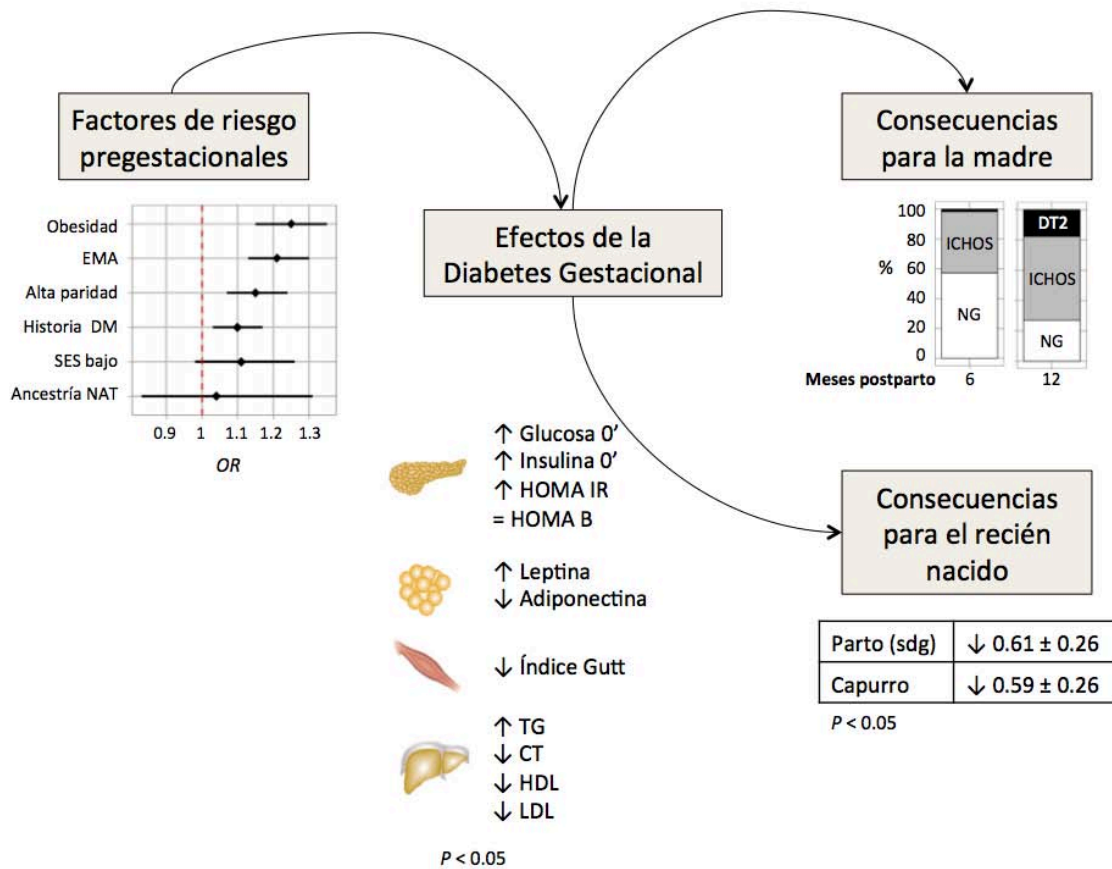


Figura 8.1. Factores de riesgo pregestacionales para el desarrollo de la DMG, efectos de la DMG en el embarazo y sus consecuencias para la madre y el recién nacido. Observaciones obtenidas en población mexicana en este trabajo.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que ambas enfermedades, la DT2 y la DMG, comparten variantes genéticas de susceptibilidad. Además de encontrar asociación de las variantes en *TCF7L2* y *KCNQ1* a la DMG, observamos que una mayor proporción de casos de DMG reportaron tener historia familiar de diabetes, en comparación con los controles. En el GWAS

recientemente publicado para DT2 en población mexicana, se demostró que las variantes comunes dentro de los genes *TCF7L2* y *KCNQ1* están dentro de los *loci* mayormente asociados a dicha enfermedad [48]. En este estudio, las variantes genéticas asociadas en estos dos *loci* presentaron una dirección del efecto consistente con los resultados de DT2 previamente reportados para mexicanos y otras poblaciones. También, encontramos que los tamaños de los efectos alélicos de las variantes de *TCF7L2* fueron significativamente diferentes entre la DMG y la DT2, lo que sugiere un mayor efecto de riesgo de este *locus* en el desarrollo de la DMG. Adicionalmente, cuando las variantes analizadas en *TCF7L2* y *KCNQ1* se agruparon en bloques, el haplotipo de riesgo en *TCF7L2* se asoció significativamente con los niveles altos de glucosa durante la CTOG de diagnóstico; mientras que el haplotipo de protección en *KCNQ1*, se asoció con menores niveles de glucosa.

El gen *TCF7L2* es uno de los principales genes asociados al riesgo de DT2, DMG y otras enfermedades [44, 105, 106]. Codifica para Tcf4, uno de los cuatro efectores de la vía de señalización Wnt/ β catenina [106]. Tcf4 puede funcionar como un activador o como un represor de la transcripción. En células no estimuladas, Tcf4 se ubica en los promotores de los genes blanco de Wnt/ β catenina, donde forma complejos con proteínas represoras para suprimir la transcripción basal. El reconocimiento de β catenina por sus receptores, induce la unión de β catenina a Tcf4 en núcleo, promoviendo el desplazamiento de los co-represores y la activación de los promotores [106, 107]. Las respuestas celulares a la vía de señalización Wnt/ β catenina son dependientes del contexto fisiológico. Los procesos que preservan el estado silencioso de los genes blanco de Tcf4 aún son desconocidos [107]. La mayoría de los esfuerzos para describir los efectos diabetogénicos de *TCF7L2* se han hecho en páncreas; sin embargo, se han reportado resultados contradictorios. Por ello, las investigaciones se han enfocado en otros tejidos pobremente caracterizados, tales como hígado, cerebro, intestino y tejido adiposo [108].

A pesar de algunas inconsistencias, la reducción en la expresión de *TCF7L2* en páncreas parece estar relacionada con el desacople en la secreción de insulina, una pobre sobrevivencia de las células β y una disminución en la acción incretina [109]. Por su lado, la disminución en la expresión de *TCF7L2* en hígado promueve la expresión de genes gluconeogénicos, ya sea a través de su unión a la secuencia de elementos regulatorios o a factores de transcripción a nivel proteína [110, 111]. Además, la reducción de las funciones de *TCF7L2* en neuronas que expresan proglucagón se relaciona con un mal control glucémico como resultado de una producción disminuida de GLP-1 y consecuentemente, el desacople de sus efectos anorécticos postprandiales [112]. Dado que las células L intestinales también expresan el gen de proglucagón, *TCF7L2* podría jugar un papel importante en su secreción, así como en el retraso del vaciado gástrico [112]. Respecto al tejido adiposo, se sabe que la activación de la señalización Wnt es necesaria para la diferenciación de las células mesodermales en mioblastos u osteoblastos, mientras que su inhibición induce la adipogénesis [113]. La pérdida del complejo activador Wnt10b-Tcf4 ejerce sus funciones adipogénicas a través de la sobre-regulación de *CEBP α* y *PPAR γ* [114] (Figura 8.2).

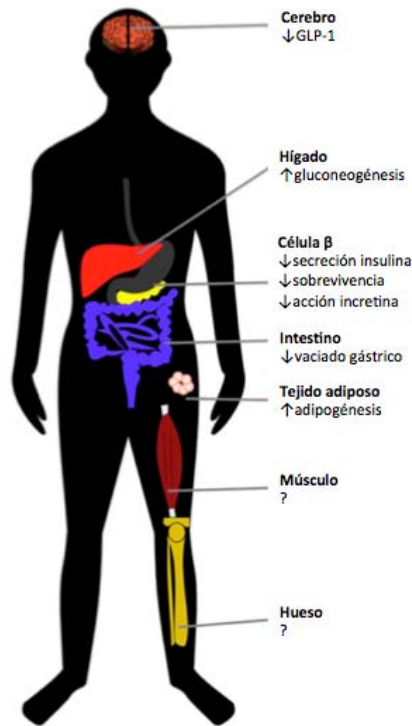


Figura 8.2. Efecto de la disminución de *TCF7L2* en diversos tejidos en que se expresa.
 Modificado de [108].

Nuestros resultados mostraron que las mujeres con DMG presentan una disminución de los niveles de RNAm de *TCF7L2* en tejido adiposo subcutáneo y visceral, así como en músculo. Es interesante, que se ha reportado una regulación a la baja de *TCF7L2* en adipocitos humanos bajo condiciones hiperinsulinémicas [115], así como una regulación a la baja en tejido adiposo de pacientes con DT2 obesos comparados con individuos normoglucémicos obesos [116]. Por lo menos para tejido adiposo visceral, se han publicado observaciones consistentes [117]. En concordancia con reportes previos [117], encontramos que junto con una disminución en la expresión de *TCF7L2*, las mujeres con DMG tienen una sobrerregulación de *PPARγ*. Además, la reducción en la expresión de *TCF7L2* en tejido adiposo visceral correlacionó con menores niveles de colesterol en suero materno, sugiriendo una estimulación del almacenamiento de lípidos dado que *PPARγ* es necesario para la diferenciación de adipocitos [113]. Adicionalmente, se ha reportado que en presencia de sus ligandos, *PPARγ* regula positivamente la expresión del receptor 1 de LDL oxidadas (*OLR1*) en tejido adiposo [118]. *OLR1* es un receptor *scavenger* que estimula la incorporación de oxLDL y CT total y está primordialmente expresado en células endoteliales. Su sobreexpresión vía *PPARγ* podría explicar la disminución en los niveles de CT sérico en el embarazo, como resultado del aumento en el contenido de colesterol total en los adipocitos (Figura 8.3).

En músculo, la reducción en la expresión de *TCF7L2* correlacionó con menores niveles de triglicéridos en suero materno. Aunque a la fecha no hay reportes sobre la función de *TCF7L2* en músculo, es probable que tal como sucede en tejido adiposo, la disminución en su expresión regule positivamente la expresión de *PPARγ*. Lo que si se ha reportado es que *PPARγ* activa la expresión de la LPL en músculo [119], potenciando una baja en los niveles de TG circulantes. El aumento en

la expresión y/o actividad de la LPL en músculo se explicaría con el hecho de que en el embarazo tardío, la madre moviliza y utiliza las reservas acumuladas durante el embarazo temprano [17].

Aún cuando la disminución en los niveles de CT sérico materno podría ser interpretado como un mecanismo compensatorio o detoxificador, es necesario hacer notar que la segunda mitad del embarazo es un estado catabólico en el que la lipólisis de las reservas acumuladas en la primera mitad aumenta, con el fin de suplir de suficiente energía a la madre, mientras que la glucosa es la principal fuente de energía fetal [120]. Resulta interesante investigar si dicho desacople en la adipogénesis se asocia con complicaciones adversas en el feto. Se ha observado que una disminución en el suministro nutricional fetal se acompaña de un crecimiento compensatorio de la placenta, sin que exista una reducción notable del peso al nacer pero teniendo, aún así, consecuencias en el producto a largo plazo, tales como hipertensión y enfermedad cardiovascular [121, 122]. Dentro de los mecanismos por los cuales se limita el suministro de nutrientes al feto se incluyen fallas en el metabolismo materno para establecer las reservas de grasa central durante el embarazo temprano, así como una nutrición inadecuada durante el periodo periconcepcional y el primer trimestre de gestación [123]. Reportes previos han mostrado que los niveles bajos de colesterol LDL en cordón umbilical, se asocian con bajo peso al nacer [139, 140]. Aún más, se han encontrado niveles bajos de colesterol LDL en recién nacidos con restricción del crecimiento intrauterino [141].

Nuestros resultados mostraron que la disminución de los niveles de RNAm de *TCF7L2* en músculo, correlacionan con menores niveles de adiponectina en cordón umbilical, pero mayor peso de la placenta. Aunque no se observaron cambios en el peso al nacer, si se asoció con una reducción en el peso del neonato relativo al de su placenta, aún después de corregir por nivel SES. Consecuentemente y junto con la evidencia reportada acerca de que la adiponectina fetal favorece la deposición de lípidos y el crecimiento fetal [124], podría especularse una transferencia limitada de nutrientes al feto. En mujeres con sobrepeso o con DMG, ya se ha reportado un aumento en el peso de la placenta y en el radio del peso placenta:neonato. Se ha propuesto que dado que la perfusión sanguínea de las placentas anormalmente grandes es menos eficiente, las demandas de O₂ para su mantenimiento limitan la disponibilidad de gases y nutrientes al feto, dando como resultado una restricción del crecimiento fetal relativo al de la placenta [122].

Las variantes de riesgo a la DT2, ubicadas dentro del gen *TCF7L2*, están localizadas en un intervalo intrónico de aproximadamente 90 kb, el cual se ha reportado que confiere el mayor efecto de riesgo a la DT2 de entre los más de 90 *loci* asociados a la enfermedad a la fecha (Figura 8.3). Mucho se ha publicado referente a los mecanismos efectores de rs7903146, la variante genética dentro del gen *TCF7L2*, más ampliamente asociada con el riesgo a desarrollar DT2 [44]. En contraste con las observaciones de que los efectos diabetogénicos de *TCF7L2* en páncreas son debidos a la reducción de su expresión génica, la evidencia sugiere que el alelo de riesgo T de rs7903146 se asocia con un aumento en la expresión del gen en células β pancreáticas [125]. En tejido adiposo se ha reportado que no hay cambios en la expresión, o incluso efectos opuestos [126, 127]. En este estudio, no encontramos diferencias en la expresión génica entre portadores y no portadores de la variante en tejido adiposo, músculo y placenta. Con el fin de entender las diferencias en la capacidad de transactivación de *TCF7L2*, las nuevas líneas de investigación se enfocan en la regulación de la estructura de su cromatina [107]. En paralelo, otras estrategias analizan cómo ciertos transcritos tejido-específicos presentan diferente capacidad para activar o inhibir la vía de señalización Wnt. Por ejemplo, se ha descrito que el transcrito más corto de *TCF7L2*, la variante Ex12-13-13a-, inhibe la vía Wnt y consecuentemente activa los procesos adipogénicos. Esta variante carece de los exones 13 y 13a, los cuales codifican para los motivos

auxiliares de interacción a DNA: CRARF y CRALF. Dichos motivos son necesarios para la activación de promotores blanco de Wnt/ β catenina. En contraste, los transcritos que incluyen al exón 12, pero no a los exones 13 y 13a, confieren un efecto protector en la supervivencia de las células β [128].

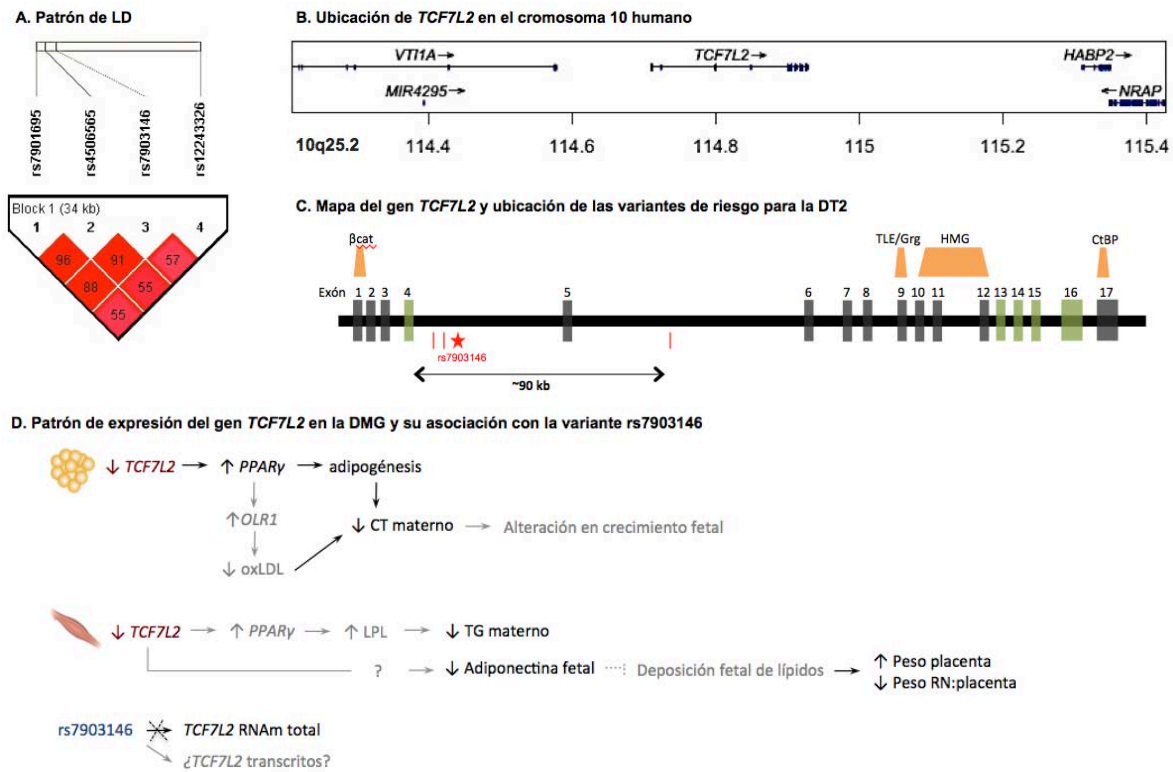


Figura 8.3. Representación gráfica del locus de TCF7L2 y su patrón de expresión en la DMG. A. Desequilibrio de ligamiento de las cuatro variantes analizadas en este trabajo. Todas forman un mismo bloque de desequilibrio de ligamiento. B. Región genómica del gen TCF7L2, así como ± 500 kb río arriba y abajo. C. Mapa del gen TCF7L2. Los rectángulos representan los 17 exones del gen. Los exones en color verde están sujetos a *splicing* alternativo. El intervalo intrónico (~90 kb) de riesgo a la DT2 abarca los intrones 4 y 5 del gen. En trapecios color naranja se representan sitios importantes para la función de Tcf4. La estrella roja representa el SNP líder del bloque de desequilibrio de ligamiento. Las rayas verticales representan los otros tres SNP analizados. E. Cambios en los patrones de expresión génica de TCF7L2 en tejido adiposo y músculo de pacientes con DMG, así como su efecto observado (letras negras) en rasgos clínicos de la madre y el recién nacido. En letras grises, se muestra evidencia de la literatura que podría explicar lo observado en este trabajo. Además, se muestra el efecto de la variante genética líder con la expresión del gen TCF7L2.

El locus *KCNQ1* también ha sido consistentemente asociado con la DT2 y la DMG [44, 105]. Codifica para la subunidad α del canal de potasio Kv7.1 sensible a voltaje, el cual regula la actividad eléctrica celular y mantiene la homeostasis del K^+ . *KCNQ1* tiene diferentes funciones fisiológicas en varios tejidos. Su flexibilidad se debe en parte a su asociación con cinco diferentes subunidades β accesorias (*KCNE*), así como a otras moléculas moduladoras. Se ha reportado que el complejo *KCNQ1/KCNE1* podría estar expresado en corazón, oído interno, riñón, cerebro y páncreas, donde participa en la repolarización de cardiomiocitos, el mantenimiento del potencial endococlear, el transporte de Cl^- , la repolarización neuronal y la secreción de insulina, respectivamente. Por su parte, el complejo *KCNQ1/KCNE2* se expresa en la glándula tiroides y el estómago, permitiendo el transporte y producción hormonal y la secreción de ácidos gástricos,

respectivamente. Por último, el complejo *KCNQ1/KCNQ3* se expresa en el intestino, colon y vías aéreas, donde regula el transporte de electrolitos [129] (Figura 8.4).

Más aún, el gen *KCNQ1* está localizado en una región cromosómica que abarca dos dominios improntados relevantes para el control del crecimiento fetal: el dominio *H19/IGF2* en la región telomérica y el dominio *KCNQ1OT1/CDKN1C* en la región centromérica (Figura 8.4). Cada dominio es independiente y está regulado por su propia región de control de impronta (ICR). Específicamente, el dominio *KCNQ1OT1/CDKN1C*, al cual pertenece *KCNQ1*, está regulado por la ICR2. La ICR2 está localizada en el intrón 10 del gen *KCNQ1* y coincide con el promotor de *KCNQ1OT1*. *KCNQ1OT1* codifica para un RNA largo no-codificante en dirección antisentido y es el iniciador epigenético de su dominio improntado. La ICR2 está metilada en el alelo materno impidiendo así la transcripción de *KCNQ1OT1* y permitiendo la expresión de los genes improntados flanqueantes, incluyendo *KCNQ1*. En contraste, la ICR2 del cromosoma paterno no está metilada, con lo que *KCNQ1OT1* se expresa y suprime la transcripción de los genes que regula [130, 131]. La pérdida o ganancia de metilación en cualquiera de los dominios *KCNQ1/CDKN1C* o *H19/IGF2*, se ha relacionado con dos desórdenes del crecimiento fetal clínicamente opuestos: el síndrome de Beckwith-Wiedemann, que se caracteriza por un crecimiento fetal excesivo que involucra anomalías del desarrollo y un aumento en el riesgo de desarrollar tumores infantiles; así como el síndrome de Russell-Silver, que se caracteriza por un retardo del crecimiento fetal y postnatal [130].

Mediante el uso de diferentes estrategias experimentales, se ha mostrado que la inhibición del canal *KCNQ1* en células β aumenta la secreción de insulina debido a un retardo en la repolarización celular; mientras que su sobre-expresión en una línea celular pancreática, la disminuyó [132, 133]. Poca información ha sido publicada para otros tejidos. En placenta humana, se ha reportado que los canales Kv7, incluyendo *KCNQ1*, se inducen durante la diferenciación del trofoblasto, pero se inhiben por hipoxia, probablemente vía *ERRy*. Kv7 podría influir en el desarrollo de la vasculatura placentaria, así como en la secreción de hormonas placentarias. La inhibición de los canales Kv7 también resulta de una disminución en la secreción de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual es marcadora de diferenciación del sincitiotrofoblasto [134]. Nuestros resultados mostraron que los niveles *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* parecen estar regulados a la baja en placenta de mujeres con DMG. En contraste con tejido adiposo, el transcrito de *KCNQ1* fue menos abundante que el de *KCNQ1OT1* en placenta, específicamente en su lado fetal. Nuestros resultados sobre la regulación negativa, tanto de *KCNQ1* como de *KCNQ1OT1*, podrían parecer discordantes, si se considera que la expresión del gen *KCNQ1* está regulada únicamente por *KCNQ1OT1*; sin embargo refuerzan las evidencias de que el gen *KCNQ1* tiene múltiples y muy complejos niveles de regulación. Estudios previos han reportado que el lncRNA *KCNQ1OT1*, no es el responsable directo del silenciamiento de los genes improntados [135].

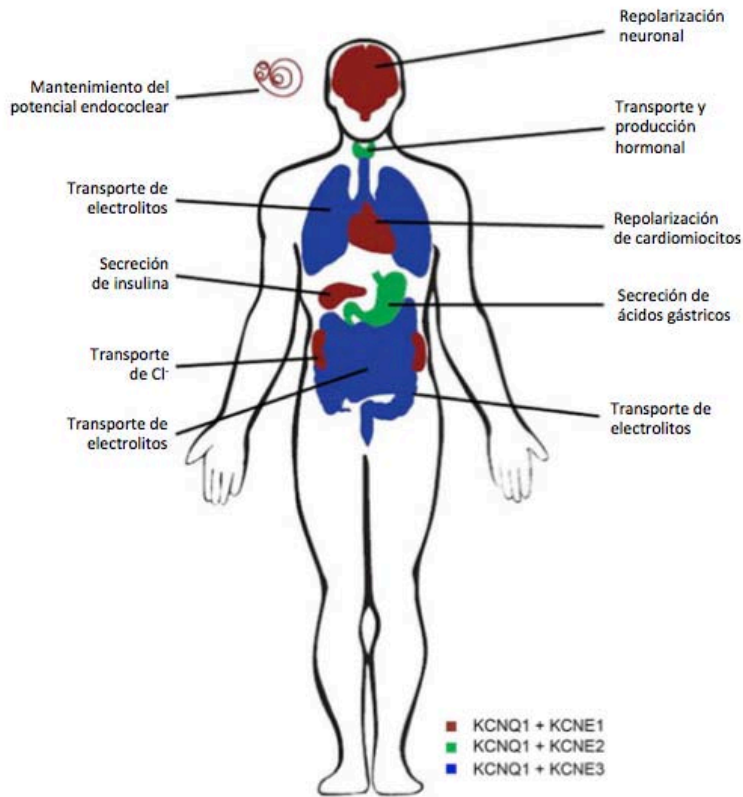
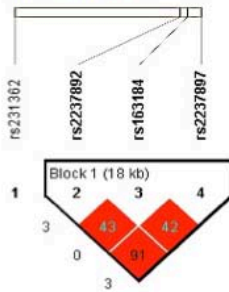


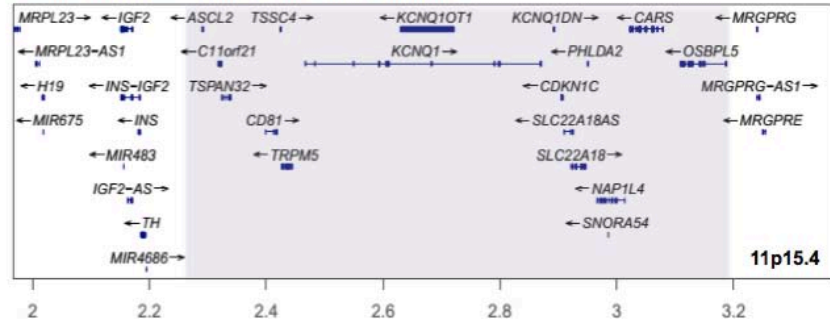
Figura 8.4. Funciones de los complejos KCNQ1+KCNE en diversos tejidos en que se expresan. Modificado de [129].

La placenta es esencial para el establecimiento y mantenimiento del embarazo. La primera mitad de la gestación se caracteriza por la proliferación y diferenciación del trofoblasto; mientras que la segunda mitad se caracteriza por una extensa vascularización y expansión de la masa placentaria. Los disturbios gestacionales tempranos, tales como la hiperglucemia, han sido asociados con efectos a largo plazo en el feto, debido a su influencia en la formación estructural de la placenta [136]. Se puede inferir que el desacople en la expresión de *KCNQ1* podría causar serias complicaciones del embarazo. La evidencia ha mostrado que los genes que se expresan de forma materna tienden a restringir el crecimiento fetal, como en el caso de *KCNQ1* [137, 138]. En este estudio, encontramos que la disminución de *KCNQ1*, así como en los niveles de *KCNQ1OT1* en placenta, se asoció con niveles bajos de colesterol en suero materno y de TG en cordón umbilical. En concordancia con los altos requerimientos de CT y FA necesarios para el crecimiento fetal, encontramos que la disminución de la expresión de *KCNQ1* en placenta se asoció con bajo peso y talla al nacer, y que la disminución de *KCNQ1OT1* se asoció con menores niveles de adiponectina en cordón umbilical (Figura 8.5). Junto con *KCNQ1*, otros 12 genes están incluidos en el dominio improntado, entre ellos, el gen *PHLDA2* también ha sido implicado con la restricción del crecimiento fetal [137, 138].

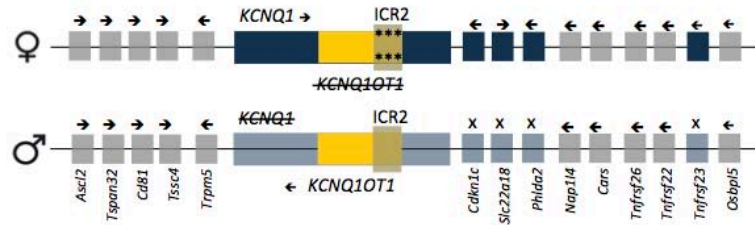
A. Patrón de LD



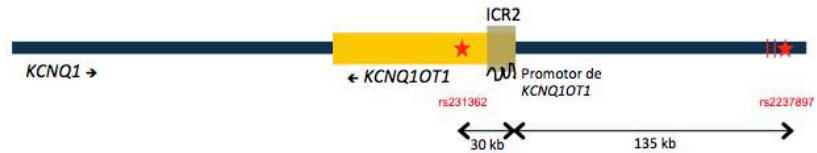
B. Ubicación de *KCNQ1* en el cromosoma 11 humano



C. Dominio improntado *KCNQ1OT1/CDKN1C* en el embrión/adulto



D. Mapa de los genes *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* y ubicación de las variantes de riesgo para la DT2



E. Patrón de expresión del gen *KCNQ1* en la DMG y su asociación con las variantes rs231362 y rs2237897



Figura 8.5. Representación gráfica del locus de *KCNQ1* y su patrón de expresión en la DMG. **A.** Desequilibrio de ligamiento de las cuatro variantes analizadas en este trabajo, formando dos bloques de desequilibrio de ligamiento. Los alelos de menor frecuencia del bloque formado por las variantes rs2237892, rs163184, rs2237897 confieren protección al desarrollo de la DMG. **B.** Región genómica del gen *KCNQ1*, así como ± 500 kb río arriba y abajo. *KCNQ1OT1* es un lncRNA codificado en dirección antisentido a *KCNQ1*. **C.** Patrón de impronta del dominio *KCNQ1OT1/CDKN1C*. *KCNQ1* se expresa vía materna, mientras que *KCNQ1OT1* se expresa vía paterna. **D.** Ubicación de las variantes genéticas analizadas dentro del loci *KCNQ1*. En azul se representa al gen *KCNQ1* y en amarillo, al gen *KCNQ1OT1*. Las estrellas rojas representan el SNP líder de cada bloque de desequilibrio de ligamiento. Las rayas verticales rojas representan los otros dos SNP analizados para el segundo bloque. **E.** Cambios en los patrones de expresión génica de *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* en placenta de pacientes con DMG, así como su efecto observado (letras negras) en rasgos clínicos de la madre y el recién nacido. En letras grises, se muestra evidencia de la literatura que podría explicar lo observado en este trabajo. Además, se muestra el efecto de las variante genética representativas de los dos bloques de desequilibrio de ligamiento con la expresión de los genes *KCNQ1* y *KCNQ1OT1*.

Al menos dos señales genéticas independientes son responsables de la asociación del *locus KCNQ1* con la DT2: una en el intrón 10, ubicada a aproximadamente 30 kb de la ICR2 y taggeada por la variante rs231362, y otra en el intrón 15, taggeada por la variante rs2237897 (Figura 8.5). Dada la expresión improntada de *KCNQ1*, los alelos de riesgo sólo ejercen sus efectos diabetogénicos cuando son heredados vía materna [64, 89]. Se ha sugerido que los alelos de riesgo para la DT2 dentro del gen *KCNQ1* están involucrados con su regulación a la alta en páncreas, dado que se han asociado con una disminución en la secreción de insulina [142] y a su vez, esa disminución está asociada con la sobre-expresión de *KCNQ1* [132]. No se ha reportado ninguna evidencia a la fecha. En este estudio, encontramos que los genotipos de las madres para las variantes analizadas no se asociaron ni con los niveles de *KCNQ1* ni con los de *KCNQ1OT1* en tejido adiposo y músculo. Sin embargo, el alelo T del genotipo materno de la variante rs231362 se asoció con menores niveles de *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* en el lado materno de la placenta. Consistente con lo previamente reportado, los efectos del alelo de riesgo se observaron cuando era heredado por la madre y no cuando era de origen paterno. El genotipo del recién nacido no tuvo efectos en los niveles de expresión de ningún tejido.

Por su parte, el alelo T del genotipo materno de la variante rs2237897 se asoció con un aumento en los niveles de *KCNQ1OT1* en el lado materno de la placenta. Dicha variante está en fuerte LD con la rs2237895, misma que se ha asociado con un desacople en la exocitosis y menor cantidad de gránulos de insulina, especialmente entre portadores no obesos [89, 143]. Además, su alelo de riesgo se ha reportado como asociado con la hipermetilación de la región ICR2, cerca de *KCNQ1OT1* en páncreas fetal; sin embargo, no tuvo efectos en los niveles de expresión génica [144]. Los mismos autores reportaron expresión bialélica en las muestras pancreáticas de estudio.

Además de *TCF7L2* y *KCNQ1*, siete *loci* adicionales previamente relacionados con DT2 (*KLF14*, *HHEX*, *GRB14*, *DUSP9* y *PEPD*), aumento en el IMC (*FAIM2*) o DMG (*FTSJD1/CALB2*), se asociaron nominalmente con el riesgo de desarrollar DMG en nuestra población. En contraste con los estudios genéticos de DT2, los realizados para DMG han generado escasos resultados. Esto en parte es debido a los tamaños de muestra pequeños y a la heterogeneidad de las muestras como resultado de los criterios de inclusión y métodos diagnóstico diferentes entre los estudios. Aunque la mayoría de los estudios genéticos de la DMG han sido realizados preferencialmente para genes candidato, los meta-análisis han encontrado consistentemente variantes asociadas en los genes previamente asociados a la DT2, esto es: *TCF7L2*, *MNTR1B*, *IGF2BP2*, *KCNJ11*, *CDKAL1*, *KCNQ1*, *GCK* e *IRS1* [99, 105]. En el único GWAS publicado para DMG y realizado en mujeres coreanas, los autores encontraron asociación de algunas variantes comunes para la DT2 e identificaron nuevas señales con asociaciones marginales [46]. Es interesante que una de ellas, *FTSJD1/CALB2*, también se asoció nominalmente en nuestra muestra.

La figura 8.6 muestra la totalidad de *loci* asociados con la DT2, la DMG y el aumento en el IMC reportados hasta el momento en diversas poblaciones. Sin embargo, se resaltan en color verde, azul y naranja (asociación a DMG, a DT2 y al aumento en el IMC, respectivamente) los que han replicado en población mexicana. Conviene recalcar que los *loci* marcados en gris sí se analizaron, pero no se obtuvo significancia estadística ($P < 0.05$). Los datos de asociación a DMG son los obtenidos en este trabajo; mientras que los datos de asociación a DT2 y al aumento en el IMC se obtuvieron del Consorcio SIGMA DT2 [48].

El hallazgo del papel diferencial del *locus SLC16A11* en la susceptibilidad a la DT2 y a la DMG es de particular relevancia. Recientemente, se reportó que *SLC16A11* es uno de los principales

contribuyentes al riesgo de la DT2 en poblaciones con ancestría nativa americana, debido a que las variantes asociadas se encontraron en mucho mayor frecuencia en individuos con alta proporción de dicha ancestría [48]. En este estudio, no observamos diferencias estadísticas en las proporciones de ancestría nativa americana entre los casos y controles de DMG y consecuentemente, se encontraron frecuencias alélicas similares en las variantes de riesgo de *SLC16A11* entre ambos grupos. Este hallazgo sugiere que además de las variantes génicas comunes con la DT2, otros factores genéticos y posiblemente ambientales podrían jugar un papel en el desarrollo de la DMG. La asociación del *locus FTSJD1/CALB2* con el riesgo a la DMG en dos estudios independientes apoya el hecho de que otros *loci* de susceptibilidad a la DMG aún no se han identificado (Figura 8.6).

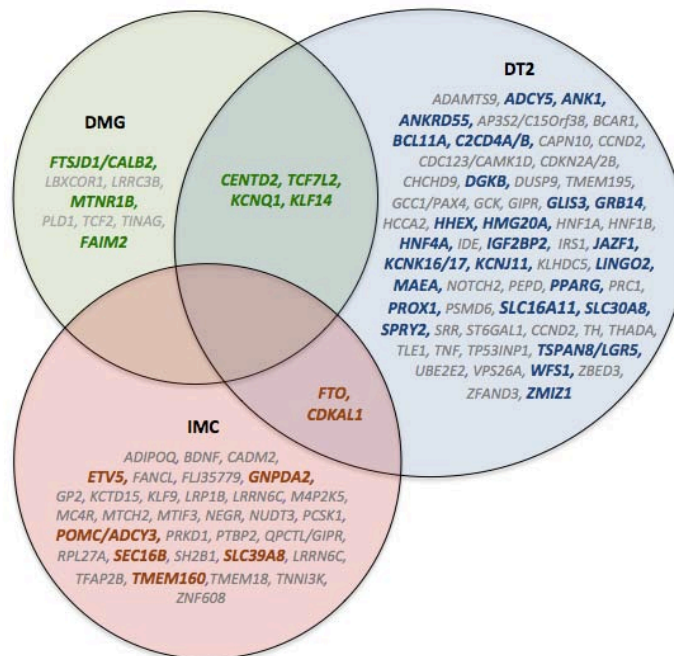


Figura 8.6. Diagrama de Venn de los genes asociados a la DMG, DT2 e IMC que se han identificado a la fecha en diversas poblaciones. En gris, se muestran genes cuyas variantes genéticas no muestran asociación en población mexicana. En verde, azul y naranja se muestran genes cuyas variantes genéticas sí tienen efecto en población mexicana ($P < 0.05$). Los resultados de asociación a DT2 y aumento al IMC provienen de los datos del Consorcio SIGMA DT2 [48].

El SES bajo también se ha asociado con el riesgo de desarrollar DT2 [43]; sin embargo, proporciones similares de casos y controles de DMG se clasificaron en la categoría de bajo SES. Es interesante que una mayor proporción de casos reportaron tener un nivel de escolaridad de licenciatura y tener un empleo. Estos resultados sugieren que factores ambientales, más que la ancestría nativa americana son determinantes importantes en la susceptibilidad a la DMG. Algunos de los factores ambientales que se han reportado asociados con el riesgo de desarrollar DMG incluyen ingestas energéticamente altas y con exceso de grasas saturadas [145], así como deficiencias dietarias de vitaminas B12 y 25OHD [146, 147].

Además de la relación entre las variantes comunes de riesgo a la DT2 con la DMG, encontramos que otros dos *loci* relacionados con la DT2 se asocian con un aumento en los niveles de glucosa a los 60' de la CTOG diagnóstica (*CENTD2*) y con una disminución en el HOMA B (*MTNR1B*). La

región en desequilibrio de ligamiento de *CENTD2* comprende al menos otros tres genes (*PDE2A*, *QTG16L2*, *FCHSD2*). Debido a que ninguno ha sido implicado en el procesamiento de la insulina o su secreción, *CENTD2*, también llamado *ARAP1*, se ha propuesto como el gen responsable dentro de dicho *locus*. Codifica para una proteína que activa a las GTPasas Arf y Rho para regular el tráfico en membrana y la reorganización de actina en citoesqueleto. Además de la DT2, el *locus* de riesgo ha sido fuertemente asociado con los niveles de proinsulina en ayuno y de proinsulina 32-33. Recientemente, se propuso que el rs1103334, el cual está en perfecto LD con rs1552224 (analizado en este estudio), es una variante funcional que regula la expresión de *ARAP1*. La variante rs11603334 está localizada en el promotor P1 y sobrelapa sitios de unión de factores de transcripción en una región de cromatina abierta que está marcada por hipersensibilidad de DNA, H3K4me3 y H3K9ac en los islotes pancreáticos. El alelo C de riesgo desacopla la unión de los factores transcripcionales PAX4/6 e incrementa la actividad transcripcional hasta dos veces, provocando en consecuencia una mayor expresión génica [148]. Los factores de transcripción PAX4/6 son reguladores conocidos tanto del promotor de glucagón como del de insulina. Las variantes codificantes dentro de ellos han sido previamente implicados en la homeostasis de la glucosa [149].

En relación al papel de *MTNR1B*, las variantes genéticas dentro de este *locus* han sido asociadas con un aumento en los niveles de glucosa en ayuno, una función de la célula beta disminuida, así como con el riesgo de DT2 y DMG [70]. Los ritmos circadianos se han reconocido como factores críticos en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y la melatonina está entre sus principales reguladores. La melatonina es una hormona diurna producida por la glándula pineal, la cual se une al receptor 2 de melatonina, codificado por el gen *MTNR1B*, para ejercer sus funciones. Aún cuando la variante causal aún debe ser identificada, la variante intrónica rs1083093 es la señal mayormente asociada. No hay evidencias referentes a su mecanismo molecular; sin embargo, no parece desacoplar sitios consenso de unión a factores de transcripción o de *splicing* alternativo. Pese a esto, el alelo G de riesgo ha sido asociado con un aumento en la expresión génica de *MTNR1B* en los islotes pancreáticos [150], interfiriendo con la secreción de la insulina. Es relevante que durante el embarazo, los niveles de melatonina plasmáticos están elevados y dicha hormona cruza la placenta y la barrera hematoencefálica, lo que juega un papel crítico no solo en la prevención de la pérdida fetal, sino también en el desarrollo de los órganos fetales y su adaptación a la vida extra-uterina [151].

Conviene recalcar que todas las variantes asociadas a la DMG están localizadas dentro de regiones no-codificantes, sugiriendo una función regulatoria. Dos de los términos GO (*Gene Ontology*) que resultaron interesantes fueron la regulación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II y la transcripción gen-específico, lo cual enfatiza la función regulatoria de los genes involucrados. Son necesarios más estudios para esclarecer los mecanismos involucrados en la susceptibilidad a la enfermedad. Además de la DT2, nuestros resultados apuntan hacia otras rutas metabólicas implicadas y hacia mecanismos regulatorios transcripcionales, resaltando la compleja fisiopatología de la DMG. También son necesarios estudios de asociación del genoma completo con tamaños de muestra grandes para identificar genes con efectos de menor magnitud y posiblemente, variantes de riesgo específicas en la DMG; así como otros estudios adicionales, tales como los estudios de expresión global en tejidos relevantes para la fisiología de la enfermedad, para elucidar el papel de las diferentes variantes de riesgo en la susceptibilidad a la diabetes.

9. CONCLUSIONES

Mediante el análisis de la totalidad de las variantes genéticas identificadas hasta el momento como de susceptibilidad a la DT2, la DMG y el aumento del IMC, encontramos que si bien la DMG y la DT2 comparten un variantes de susceptibilidad, demostrado por la asociación común de variantes en los genes *TCF7L2* y *KCNQ1*, también existen *loci* de susceptibilidad propios de cada enfermedad, demostrado por la asociación de variantes en el gen *SLC16A11* exclusivamente con la DT2. La expresión del gen *TCF7L2* se encontró disminuida en tejido adiposo visceral y subcutáneo, así como en músculo de mujeres con DMG, pero no se asoció con ser portador de su principal variante genética de riesgo, rs7903146. Además, se observó que la disminución de la expresión de *TCF7L2* en tejido adiposo se acompaña de una reducción en los niveles de colesterol sérico maternos, así como un aumento en la expresión de *PPARG*; y que en músculo se acompaña de una disminución en los niveles de triglicéridos maternos y de adiponectina en cordón umbilical, así como mayor peso de la placenta. Por su parte, la expresión del *lncRNA KCNQ1OT1*, codificado en dirección antisentido que *KCNQ1*, disminuyó en placenta de mujeres con DMG. Específicamente en el lado materno de la placenta, la variante rs2237897, de protección a DMG, afectó positivamente la expresión de *KCNQ1OT1*; mientras que la variante rs231362, de riesgo a DMG, afectó negativamente la expresión de *KCNQ1OT1* y *KCNQ1*. La disminución de la expresión de estos genes se acompaña de una reducción en los niveles de colesterol, pero un aumento en los niveles de leptina, ambos maternos. En cordón umbilical, por su parte, se asocia con niveles bajos niveles de triglicéridos y adiponectina, así como bajo peso y talla al nacer.

10. PERSPECTIVAS

Son necesarios más estudios para evaluar la relevancia de la desregulación tejido-específica de los genes asociados con el desarrollo de la DMG y sus implicaciones en la salud futura de la madre y el recién nacido. Algunas de las estrategias requeridas para dicho estudio se enumeran a continuación:

- **Aumento de tamaño de muestra.** 7 *loci* mostraron asociación marginal con la DMG. De acuerdo a la frecuencia alélica del alelo de riesgo se requiere un tamaño de muestra de 2000 casos y 2000 controles para confirmar las señales de asociación.
- **Análisis de asociación del genoma completo.** Los análisis de genes candidato se limitan al estudio de *loci* previamente identificados o de los que existe una evidencia previa por su participación en vías metabólicas relacionadas con el fenotipo. Sin embargo, los análisis de asociación del genoma completo permiten la identificación de *loci* de susceptibilidad sin previa premisa de su participación en la enfermedad. Su aplicación en otras enfermedades, como la DT2 y las dislipidemias, ha permitido la identificación de genes que de otra manera no se hubiera sospechado de su participación. La utilidad de dichos análisis resulta evidente para la DMG –en la que la mayoría de los estudios se basan en la evidencia previa. La limitante de estos estudios es que requieren de un número alto de casos y controles (más de mil individuos) para alcanzar suficiente poder estadístico.
- **Secuenciación de RNA.** A diferencia de las enfermedades mendelianas de alta penetrancia, las enfermedades complejas multigénicas se caracterizan por presentar variantes de riesgo de baja penetrancia; entre ellas, variantes de regiones regulatorias que modifican la abundancia de uno o más transcritos. Para el caso del gen *TCF7L2*, se ha descrito que la variante de mayor replicación rs7903146 se ubica en un sitio de splicing y

que podría modificar la abundancia de los transcritos producidos de forma fenotipo y tejido-dependiente, mismos que potencialmente serían funcionalmente diferentes.

- **Análisis histológicos en tejido adiposo.** El tejido adiposo es uno de los tejidos que presentan mayores adaptaciones durante la gestación y la DMG. En este trabajo observamos que el gen *TCF7L2* se regula a la baja y correlaciona con un aumento en la expresión de *PPAR γ* , uno de los principales reguladores de la adipogénesis. Resulta de interés conocer los cambios de la forma y tamaño de los adipocitos en la DMG y su relación con la expresión de *TCF7L2* y otros genes co-regulados.
- **Análisis del contenido lipídico en tejido adiposo.** La determinación del CT, TG y otras lipoproteínas séricas son informativas del estado metabólico global de un individuo; sin embargo, no son indicativas directas de la disfuncionalidad de un tejido específico. En específico, la funcionalidad del tejido adiposo no sólo depende de su contenido lipídico total, sino de la abundancia de ciertos tipos de ácidos grasos. La posibilidad de cuantificarlos a partir de biopsias de pacientes representa una buena oportunidad para el estudio funcional de dicho tejido.
- **Modelos murinos.** Los estudios en humanos se ven limitados por la complejidad de los factores de riesgo que participan en la etiología de una enfermedad y por la dificultad de realizar estudios longitudinales e intervencionales. A este respecto, los modelos murinos son una estrategia útil para mimetizar el ambiente hiperglucémico del embarazo, con la posibilidad de obtener muestras preconcepcionales, a lo largo y después del embarazo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. *Diabetes Res Clin Pract.* **87**(1): p. 4-14.
2. IDF, *Diabetes Atlas*. 2013. p. 159.
3. Olaiz, G., Rojas, R., Barquera, S., Shamah, T., Aguilar Salinas, C. A., Cravioto, P., López, M., Hernández, M., Tapia, R., Sepúlveda, J., *Encuesta Nacional de Salud 2000*. 2000, Instituto Nacional de Salud Pública: México.
4. Olaiz, G., Rivera, J, Shamah, T, Rojas, R, Villalpando, S, Hernández, M, Sepúlveda, J, *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. 2006, Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, Morelos.
5. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2008. **31 Suppl 1**: p. S55-60.
6. *Standards of medical care in diabetes--2007*. *Diabetes Care*, 2007. **30 Suppl 1**: p. S4-S41.
7. Porterfield, S., White, B, *Endocrine Physiology*. 3a ed. 2007, EUA: Elsevier.
8. 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., *Numeralia 2008: Diabetes Mellitus*, S.d. Salud, Editor. 2008: México. p. 2166-2178.
9. Permutt, M.A., J. Wasson, and N. Cox, *Genetic epidemiology of diabetes*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(6): p. 1431-9.
10. Buchanan, T.A., et al., *What is gestational diabetes?* *Diabetes Care*, 2007. **30 Suppl 2**: p. S105-11.
11. Hod, M., et al., *Textbook of Diabetes and pregnancy*. 2 ed. 2008, UK.
12. Ramirez-Torres, M.A., *The importance of gestational diabetes beyond pregnancy*. *Nutr Rev*, 2013. **71 Suppl 1**: p. S37-41.
13. Jimenez-Corona, A.A.-S., A; Rojas-Martínez, R; Hernandez-Avila, M, *Diabetes Mellitus tipo 2 y frecuencia de acciones*. *Salud Publica Mex*, 2013. **3**(35): p. S137-S142.
14. Villalpando, S., et al., *Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey*. *Salud Publica Mex.* **52 Suppl 1**: p. S19-26.
15. Jimenez-Corona, A., et al., *Early-onset type 2 diabetes in a Mexican survey: results from the National Health and Nutrition Survey 2006*. *Salud Publica Mex.* **52 Suppl 1**: p. S27-35.
16. Villalpando, S., et al., *Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006*. *Salud Publica Mex.* **52 Suppl 1**: p. S72-9.
17. Butte, N.F., *Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(5 Suppl): p. 1256S-61S.
18. Ernst, S., et al., *Mechanisms in the adaptation of maternal beta-cells during pregnancy*. *Diabetes Manag (Lond)*, 2011. **1**(2): p. 239-248.
19. Barbour, L.A., et al., *Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes*. *Diabetes Care*, 2007. **30 Suppl 2**: p. S112-9.
20. Smith, J.L., et al., *Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat*. *J Lipid Res*, 1998. **39**(11): p. 2237-49.
21. Kovanen, P.T., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *High levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol synthesis in the ovary of the pregnant rabbit*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(14): p. 5126-32.
22. Branisteanu, D.D. and C. Mathieu, *Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty?* *Trends Endocrinol Metab*, 2003. **14**(2): p. 54-6.
23. Nunes, V.A., et al., *Progesterone induces apoptosis of insulin-secreting cells: insights into the molecular mechanism*. *J Endocrinol*, 2014. **221**(2): p. 273-84.

24. Ogihara, T. and R.G. Mirmira, *An islet in distress: beta cell failure in type 2 diabetes*. J Diabetes Investig, 2010. **1**(4): p. 123-33.
25. Knopp, R.H., *Lipids in Gestational Diabetes: Abnormalities and significance*, in *Gestational Diabetes during and after pregnancy*, C. Kim, Ferrara, A., Editor. 2010, Springer-Verlag: London. p. 155-168.
26. Packard, C.J., *Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 5): p. 1066-9.
27. Nikolic, D., et al., *Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: clinical significance and therapeutic approaches*. Nutrients, 2013. **5**(3): p. 928-48.
28. Rizvi, A.A., et al., *Gestational diabetes and the metabolic syndrome: can obesity and small, dense low density lipoproteins be key mediators of this association?* Curr Pharm Biotechnol, 2014. **15**(1): p. 38-46.
29. Carpenter, M.W. and D.R. Coustan, *Criteria for screening tests for gestational diabetes*. Am J Obstet Gynecol, 1982. **144**(7): p. 768-73.
30. *Endocrinología Clínica*, ed. A. Yolanda. 2004, México: El Manual Moderno.
31. Ben-Haroush, A., Y. Yogeve, and M. Hod, *Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2004. **21**(2): p. 103-13.
32. Veeraswamy, S., et al., *Gestational diabetes: the public health relevance and approach*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **97**(3): p. 350-8.
33. Galliano, D. and J. Bellver, *Female obesity: short- and long-term consequences on the offspring*. Gynecol Endocrinol, 2013. **29**(7): p. 626-31.
34. Malcolm, J., *Through the looking glass: gestational diabetes as a predictor of maternal and offspring long-term health*. Diabetes Metab Res Rev, 2012. **28**(4): p. 307-11.
35. Bellamy, L., et al., *Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Lancet, 2009. **373**(9677): p. 1773-9.
36. Lauenborg, J., et al., *Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1194-9.
37. Pirkola, J., et al., *Risks of overweight and abdominal obesity at age 16 years associated with prenatal exposures to maternal prepregnancy overweight and gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2010. **33**(5): p. 1115-21.
38. Catalano, P.M., et al., *Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero*. Diabetes Care, 2009. **32**(6): p. 1076-80.
39. Gupta, Y., et al., *Updated guidelines on screening for gestational diabetes*. Int J Womens Health, 2015. **7**: p. 539-50.
40. Chasan-Taber, L., *Physical activity and dietary behaviors associated with weight gain and impaired glucose tolerance among pregnant Latinas*. Adv Nutr, 2012. **3**(1): p. 108-18.
41. Kim, C., K.M. Newton, and R.H. Knopp, *Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review*. Diabetes Care, 2002. **25**(10): p. 1862-8.
42. Nguyen, B.T., et al., *The effect of race/ethnicity on adverse perinatal outcomes among patients with gestational diabetes mellitus*. Am J Obstet Gynecol, 2012. **207**(4): p. 322 e1-6.
43. Florez, J.C., et al., *Strong association of socioeconomic status with genetic ancestry in Latinos: implications for admixture studies of type 2 diabetes*. Diabetologia, 2009. **52**(8): p. 1528-36.
44. Replication, D.I.G. and C. Meta-analysis, *Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility*. Nat Genet, 2014. **46**(3): p. 234-44.
45. Westermeier, F., et al., *Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus*. Diabetes Metab Res Rev, 2015.

46. Kwak, S.H., et al., *A genome-wide association study of gestational diabetes mellitus in Korean women*. *Diabetes*, 2012. **61**(2): p. 531-41.
47. Lauenborg, J., et al., *Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(1): p. 145-50.
48. The, S.T.D.C., *Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico*. *Nature*, 2013.
49. Guzman-Flores, J.M., et al., *Association analysis between -308G/A and -238G/A TNF-alpha gene promoter polymorphisms and insulin resistance in Mexican women with gestational diabetes mellitus*. *J Investig Med*, 2013. **61**(2): p. 265-9.
50. Monroy, V.S., et al., *Thr130Ile Polymorphism of HNF4A Gene Is Associated With Gestational Diabetes Mellitus in Mexican Population*. *J Investig Med*, 2014. **62**(3): p. 632-4.
51. Reyes-Lopez, R., E. Perez-Luque, and J.M. Malacara, *Metabolic, hormonal characteristics, and genetic variants of TCF7L2 associated with development of gestational diabetes mellitus in Mexican women*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2014.
52. Watanabe, R.M., et al., *Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans*. *Diabetes*, 2007. **56**(5): p. 1481-5.
53. Levy, J.C., D.R. Matthews, and M.P. Hermans, *Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program*. *Diabetes Care*, 1998. **21**(12): p. 2191-2.
54. Kanauchi, M., *A new index of insulin sensitivity obtained from the oral glucose tolerance test applicable to advanced type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2002. **25**(10): p. 1891-2.
55. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
56. Echeverría, Y.S., *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*, S.d. Salud, Editor. 1993.
57. Chelbi, S.T., et al., *Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases*. *Hum Mol Genet*, 2012. **21**(9): p. 1968-78.
58. Cho, Y.S., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians*. *Nat Genet*, 2012. **44**(1): p. 67-72.
59. Dupuis, J., et al., *New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk*. *Nat Genet*, 2010. **42**(2): p. 105-16.
60. Enns, J.E., C.G. Taylor, and P. Zahradka, *Variations in Adipokine Genes AdipoQ, Lep, and LepR are Associated with Risk for Obesity-Related Metabolic Disease: The Modulatory Role of Gene-Nutrient Interactions*. *J Obes*, 2011. **2011**: p. 168659.
61. Ernst, J., et al., *Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types*. *Nature*, 2011. **473**(7345): p. 43-9.
62. Frayling, T.M., et al., *A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity*. *Science*, 2007. **316**(5826): p. 889-94.
63. Imamura, M., et al., *Genetic variants at CDC123/CAMK1D and SPRY2 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese population*. *Diabetologia*, 2011. **54**(12): p. 3071-7.
64. Kong, A., et al., *Parental origin of sequence variants associated with complex diseases*. *Nature*, 2009. **462**(7275): p. 868-74.
65. Kwak, S.H., et al., *Association of variations in TPH1 and HTR2B with gestational weight gain and measures of obesity*. *Obesity (Silver Spring)*, 2012. **20**(1): p. 233-8.
66. Lin, Y., et al., *Association study of genetic variants in eight genes/loci with type 2 diabetes in a Han Chinese population*. *BMC Med Genet*, 2010. **11**: p. 97.

67. Loos, R.J., et al., *Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 768-75.
68. Morris, A.P., et al., *Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2012. **44**(9): p. 981-90.
69. Okada, Y., et al., *Common variants at CDKAL1 and KLF9 are associated with body mass index in east Asian populations*. Nat Genet, 2012. **44**(3): p. 302-6.
70. Prokopenko, I., et al., *Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 77-81.
71. Saxena, R., et al., *Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(3): p. 410-25.
72. Souren, N.Y., et al., *Common SNPs in LEP and LEPR associated with birth weight and type 2 diabetes-related metabolic risk factors in twins*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(8): p. 1233-9.
73. Speliotes, E.K., et al., *Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index*. Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 937-48.
74. Thorleifsson, G., et al., *Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 18-24.
75. Tsai, F.J., et al., *A genome-wide association study identifies susceptibility variants for type 2 diabetes in Han Chinese*. PLoS Genet, 2010. **6**(2): p. e1000847.
76. Unoki, H., et al., *SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations*. Nat Genet, 2008. **40**(9): p. 1098-102.
77. Urbanek, M., et al., *The role of inflammatory pathway genetic variation on maternal metabolic phenotypes during pregnancy*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32958.
78. Voight, B.F., et al., *Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis*. Nat Genet, 2010. **42**(7): p. 579-89.
79. Wang, Y., et al., *Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e26953.
80. Weedon, M.N., et al., *Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(5): p. 1208-12.
81. Wen, W., et al., *Meta-analysis identifies common variants associated with body mass index in east Asians*. Nat Genet, 2012. **44**(3): p. 307-11.
82. Willer, C.J., et al., *Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 25-34.
83. Winckler, W., et al., *Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(3): p. 685-93.
84. Yamauchi, T., et al., *A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B*. Nat Genet, 2010. **42**(10): p. 864-8.
85. Zeggini, E., et al., *Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 638-45.
86. Galanter, J.M., et al., *Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002554.
87. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 559-75.
88. Price, A.L., et al., *Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies*. Nat Genet, 2006. **38**(8): p. 904-9.

89. Hanson, R.L., et al., *Strong parent-of-origin effects in the association of KCNQ1 variants with type 2 diabetes in American Indians*. *Diabetes*, 2013. **62**(8): p. 2984-91.
90. Hudson, Q.J., et al., *Genomic imprinting mechanisms in embryonic and extraembryonic mouse tissues*. *Heredity (Edinb)*, 2010. **105**(1): p. 45-56.
91. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(15): p. e115.
92. Chen, E.Y., et al., *Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool*. *BMC Bioinformatics*, 2013. **14**: p. 128.
93. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(2): p. 263-5.
94. Gauderman, W.J., *Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction*. *Stat Med*, 2002. **21**(1): p. 35-50.
95. Genomes Project, C., et al., *A map of human genome variation from population-scale sequencing*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1061-73.
96. Qiu, C., et al., *Association of gestational diabetes mellitus and low-density lipoprotein (LDL) particle size*. *Physiol Res*, 2007. **56**(5): p. 571-8.
97. Rizzo, M., et al., *Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in women with gestational diabetes*. *Diabet Med*, 2008. **25**(12): p. 1406-11.
98. Sanchez-Vera, I., et al., *Changes in plasma lipids and increased low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in pregnancies complicated by gestational diabetes: consequences of obesity*. *Metabolism*, 2007. **56**(11): p. 1527-33.
99. Mao, H., Q. Li, and S. Gao, *Meta-analysis of the relationship between common type 2 diabetes risk gene variants with gestational diabetes mellitus*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45882.
100. Bouthoorn, S.H., et al., *Low-educated women have an increased risk of gestational diabetes mellitus: the Generation R Study*. *Acta Diabetol*, 2015. **52**(3): p. 445-52.
101. England, L.J., et al., *Glucose tolerance and risk of gestational diabetes mellitus in nulliparous women who smoke during pregnancy*. *Am J Epidemiol*, 2004. **160**(12): p. 1205-13.
102. Jenum, A.K., et al., *Impact of ethnicity on gestational diabetes identified with the WHO and the modified International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups criteria: a population-based cohort study*. *Eur J Endocrinol*, 2012. **166**(2): p. 317-24.
103. Groop, L., *Open chromatin and diabetes risk*. *Nat Genet*, 2010. **42**(3): p. 190-2.
104. Nolan, C.J., *Controversies in gestational diabetes*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2011. **25**(1): p. 37-49.
105. Zhang, C., et al., *Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review*. *Hum Reprod Update*, 2013. **19**(4): p. 376-90.
106. Jin, T. and L. Liu, *The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(11): p. 2383-92.
107. Wallmen, B., M. Schrempf, and A. Hecht, *Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/beta-catenin target gene expression*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(19): p. 9455-69.
108. Nobrega, M.A., *TCF7L2 and glucose metabolism: time to look beyond the pancreas*. *Diabetes*, 2013. **62**(3): p. 706-8.
109. Shao, W., et al., *The expression of dominant negative TCF7L2 in pancreatic beta cells during the embryonic stage causes impaired glucose homeostasis*. *Mol Metab*, 2015. **4**(4): p. 344-52.
110. Neve, B., et al., *Alternative human liver transcripts of TCF7L2 bind to the gluconeogenesis regulator HNF4alpha at the protein level*. *Diabetologia*, 2014. **57**(4): p. 785-96.

111. Ip, W., et al., *Liver-specific expression of dominant-negative transcription factor 7-like 2 causes progressive impairment in glucose homeostasis*. *Diabetes*, 2015. **64**(6): p. 1923-32.
112. Shao, W., et al., *The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 controls gut and brain proglucagon gene expression and glucose homeostasis*. *Diabetes*, 2013. **62**(3): p. 789-800.
113. Christodoulides, C., et al., *Adipogenesis and WNT signalling*. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. **20**(1): p. 16-24.
114. Ross, S.E., et al., *Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling*. *Science*, 2000. **289**(5481): p. 950-3.
115. Ahlzen, M., et al., *Expression of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) in human adipocytes is down regulated by insulin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **370**(1): p. 49-52.
116. Cauchi, S., et al., *Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2006. **55**(10): p. 2903-8.
117. Kuzmicki, M., et al., *The expression of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) in fat and placental tissue from women with gestational diabetes*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011. **94**(2): p. e43-6.
118. Chui, P.C., et al., *PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2244-56.
119. Guilherme, A., et al., *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(5): p. 367-77.
120. Herrera, E., et al., *Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era*. *Diabetes*, 1991. **40 Suppl 2**: p. 83-8.
121. Barker, D.J., et al., *Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life*. *BMJ*, 1990. **301**(6746): p. 259-62.
122. Risnes, K.R., et al., *Placental weight relative to birth weight and long-term cardiovascular mortality: findings from a cohort of 31,307 men and women*. *Am J Epidemiol*, 2009. **170**(5): p. 622-31.
123. Godfrey, K.M. and D.J. Barker, *Maternal nutrition in relation to fetal and placental growth*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1995. **61**(1): p. 15-22.
124. Aye, I.L., T.L. Powell, and T. Jansson, *Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth?* *Placenta*, 2013. **34 Suppl**: p. S40-5.
125. Lyssenko, V., et al., *Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(8): p. 2155-63.
126. Kovacs, P., et al., *TCF7L2 gene expression in human visceral and subcutaneous adipose tissue is differentially regulated but not associated with type 2 diabetes mellitus*. *Metabolism*, 2008. **57**(9): p. 1227-31.
127. Wang, J., et al., *Variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene predict conversion to type 2 diabetes in the Finnish Diabetes Prevention Study and are associated with impaired glucose regulation and impaired insulin secretion*. *Diabetologia*, 2007. **50**(6): p. 1192-200.
128. Kaminska, D., et al., *Adipose tissue TCF7L2 splicing is regulated by weight loss and associates with glucose and fatty acid metabolism*. *Diabetes*, 2012. **61**(11): p. 2807-13.
129. Liin, S.I., R. Barro-Soria, and H.P. Larsson, *The KCNQ1 channel - remarkable flexibility in gating allows for functional versatility*. *J Physiol*, 2015.
130. Azzi, S., W. Abi Habib, and I. Netchine, *Beckwith-Wiedemann and Russell-Silver Syndromes: from new molecular insights to the comprehension of imprinting regulation*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2014. **21**(1): p. 30-8.

131. Mohammad, F., T. Mondal, and C. Kanduri, *Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs*. *Epigenetics*, 2009. **4**(5): p. 277-86.
132. Liu, L., et al., *Chromanol 293B, an inhibitor of KCNQ1 channels, enhances glucose-stimulated insulin secretion and increases glucagon-like peptide-1 level in mice*. *Islets*, 2014. **6**(4): p. e962386.
133. Yamagata, K., et al., *Voltage-gated K⁺ channel KCNQ1 regulates insulin secretion in MIN6 beta-cell line*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **407**(3): p. 620-5.
134. Luo, Y., P. Kumar, and C.R. Mendelson, *Estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) regulates oxygen-dependent expression of voltage-gated potassium (K⁺) channels and tissue kallikrein during human trophoblast differentiation*. *Mol Endocrinol*, 2013. **27**(6): p. 940-52.
135. Korostowski, L., N. Sedlak, and N. Engel, *The Kcnq1ot1 long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of Kcnq1, but does not regulate its imprinting in the developing heart*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(9): p. e1002956.
136. Desoye, G. and S. Hauguel-de Mouzon, *The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network*. *Diabetes Care*, 2007. **30 Suppl 2**: p. S120-6.
137. Cordeiro, A., et al., *Relevance of genomic imprinting in intrauterine human growth expression of CDKN1C, H19, IGF2, KCNQ1 and PHLDA2 imprinted genes*. *J Assist Reprod Genet*, 2014. **31**(10): p. 1361-8.
138. Moore, G.E., et al., *The role and interaction of imprinted genes in human fetal growth*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015. **370**(1663): p. 20140074.
139. Bansal, N., et al., *Cord blood lipoproteins and prenatal influences*. *Curr Opin Lipidol*, 2005. **16**(4): p. 400-8.
140. Nayak, C.D., V. Agarwal, and D.M. Nayak, *Correlation of cord blood lipid heterogeneity in neonates with their anthropometry at birth*. *Indian J Clin Biochem*, 2013. **28**(2): p. 152-7.
141. Rodie, V.A., et al., *Fetal cord plasma lipoprotein status in uncomplicated human pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction*. *Atherosclerosis*, 2004. **176**(1): p. 181-7.
142. Mussig, K., et al., *Association of type 2 diabetes candidate polymorphisms in KCNQ1 with incretin and insulin secretion*. *Diabetes*, 2009. **58**(7): p. 1715-20.
143. Rosengren, A.H., et al., *Reduced insulin exocytosis in human pancreatic beta-cells with gene variants linked to type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2012. **61**(7): p. 1726-33.
144. Travers, M.E., et al., *Insights into the molecular mechanism for type 2 diabetes susceptibility at the KCNQ1 locus from temporal changes in imprinting status in human islets*. *Diabetes*, 2013. **62**(3): p. 987-92.
145. Park, S., et al., *Gestational diabetes is associated with high energy and saturated fat intakes and with low plasma visfatin and adiponectin levels independent of prepregnancy BMI*. *Eur J Clin Nutr*, 2013. **67**(2): p. 196-201.
146. Krishnaveni, G.V., et al., *Low plasma vitamin B12 in pregnancy is associated with gestational 'diabesity' and later diabetes*. *Diabetologia*, 2009. **52**(11): p. 2350-8.
147. Lacroix, M., et al., *Lower vitamin D levels at first trimester are associated with higher risk of developing gestational diabetes mellitus*. *Acta Diabetol*, 2014.
148. Kulzer, J.R., et al., *A Common Functional Regulatory Variant at a Type 2 Diabetes Locus Upregulates ARAP1 Expression in the Pancreatic Beta Cell*. *Am J Hum Genet*, 2014. **94**(2): p. 186-97.
149. Nielsen, T., et al., *Type 2 diabetes risk allele near CENTD2 is associated with decreased glucose-stimulated insulin release*. *Diabetologia*, 2011. **54**(5): p. 1052-6.
150. Nagorny, C. and V. Lyssenko, *Tired of diabetes genetics? Circadian rhythms and diabetes: the MTNR1B story?* *Curr Diab Rep*, 2012. **12**(6): p. 667-72.

151. Chen, Y.C., et al., *Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(3): p. 5380-401.
152. Kooner, J.S., et al., *Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides*. Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 149-51.
153. Teslovich, T.M., et al., *Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids*. Nature, 2010. **466**(7307): p. 707-13.

12. APÉNDICES

12.1. APROBACIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA



COMISIONES DE ÉTICA Y DE INVESTIGACIÓN



"2010 AÑO de la PATRIA. BICENTENARIO del INICIO de la INDEPENDENCIA y CENTENARIO del INICIO de la REVOLUCIÓN"

Oficio No. DEDI/594/10
24 de noviembre de 2010.

DRA. LIZETTE MANZO CARRILLO
INVESTIGADOR RESPONSABLE
JEFA DE LA DIVISIÓN DE OBSTETRICIA
PRESENTE.

Comunicamos a usted que en la Vigésima Segunda Sesión Ordinaria de las Comisiones de Ética y de Investigación, se presentó el protocolo: "Búsqueda de genes de susceptibilidad para el desarrollo de la Diabetes Gestacional en mujeres mestizas mexicanas, a través del mapeo por *Admixture* y el análisis de expresión génica global en placenta y tejido adiposo" y dado que cumple con los parámetros solicitados, le han otorgado el dictamen de:

Aprobado

El registro de este proyecto es el 11-86-2010. A su vez le informamos que este fallo tiene vigencia hasta el 30 de junio de 2013. Si se requiriera ampliar el periodo, le pedimos solicitar la renovación anual con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento, por medio de una carta donde se expongan los motivos correspondientes.

Así mismo le comunicamos que al realizar este proyecto adquiere el compromiso ineludible de informar cada tres meses el avance del estudio a la División de Investigación Clínica por medio del formato establecido, en el cual se debe incluir las presentaciones a congresos o las publicaciones que se han generado. Le recordamos que cualquier cambio o actualización en los integrantes o procedimientos de este estudio deberá ser enviado por escrito a estas Comisiones.

Sin otro particular por el momento, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DR. OCTAVIO SIERRA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DE LAS COMISIONES
DE ÉTICA Y DE INVESTIGACIÓN

c. c. p. Dr. Roberto Alonso Cordero Briño – Investigador Principal.

OSM/MLSR/nav



Calzada de Tlalpan 4800, Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, México, C.P. 14080, D. F.

12.2. LISTA DE SNP ANALIZADOS EN ESTE TRABAJO

SNP	CR	POS	ALELOS	GEN	RASGO	REFERENCIA
rs1501299	3	186571123	A/C	<i>ADIPOQ</i>	IMC	[60]
rs266729	3	186559474	C/G	<i>ADIPOQ</i>	IMC	[60]
rs2030323	11	27728539	G/T	<i>BDNF</i>	IMC	[69]
rs10767664	11	27725986	A/T	<i>BDNF</i>	IMC	[73]
rs4923461	11	27656910	A/G	<i>BDNF</i>	IMC	[74]
rs6265	11	27679916	A/G	<i>BDNF</i>	IMC	[81]
rs13078807	3	85884150	A/G	<i>CADM2</i>	IMC	[73]
rs9816226	3	185834499	A/T	<i>ETV5</i>	IMC	[73]
rs7647305	3	185834290	C/T	<i>ETV5</i>	IMC	[74]
rs7138803	12	50247468	A/G	<i>FAIM2</i>	IMC	[73]
rs887912	2	59302877	A/G	<i>FANCL</i>	IMC	[73]
rs2112347	5	75015242	G/T	<i>FLJ35779</i>	IMC	[73]
rs9939609	16	53820527	A/T	<i>FTO</i>	IMC	[62]
rs1121980	16	53809247	C/T	<i>FTO</i>	IMC	[67]
rs12149832	16	53842908	A/G	<i>FTO</i>	IMC	[69]
rs11642841	16	53845487	A/C	<i>FTO</i>	IMC	[71]
rs1421085	16	53800954	C/T	<i>FTO</i>	IMC	[48]
rs9941349	16	53825488	C/T	<i>FTO</i>	IMC	[48]
rs1558902	16	53803574	A/T	<i>FTO</i>	IMC	[73]
rs8050136	16	53816275	A/C	<i>FTO</i>	IMC	[74]
rs17817449	16	53813367	G/T	<i>FTO</i>	IMC	[81]
rs10938397	4	45182527	A/G	<i>GNPDA2</i>	IMC	[73]
rs29941	19	34309532	C/T	<i>KCTD15</i>	IMC	[73]
rs11142387	9	72998332	A/C	<i>KLF9</i>	IMC	[69]
rs2890652	2	142959931	C/T	<i>LRP1B</i>	IMC	[73]
rs2183825	9	28412375	C/T	<i>LRRN6C</i>	IMC	[73]
rs2241423	15	68086838	A/G	<i>MAP2K5</i>	IMC	[73]
rs17782313	18	57851097	C/T	<i>MC4R</i>	IMC	[67]
rs2331841	18	57828637	A/G	<i>MC4R</i>	IMC	[69]

rs571312	18	57839769	G/T	<i>MC4R</i>	IMC	[73]
rs12970134	18	57884750	A/G	<i>MC4R</i>	IMC	[74]
rs6567160	18	57829135	C/T	<i>MC4R</i>	IMC	[81]
rs3817334	11	47650993	C/T	<i>MTCH2</i>	IMC	[73]
rs10838738	11	47663049	A/G	<i>MTCH2</i>	IMC	[82]
rs4771122	13	28020180	A/G	<i>MTIF3</i>	IMC	[73]
rs2568958	1	72765116	A/G	<i>NEGR</i>	IMC	[74]
rs10150332	14	79936964	C/T	<i>NRXN3</i>	IMC	[73]
rs206936	6	34302869	A/G	<i>NUDT3</i>	IMC	[73]
rs261967	5	95850250	G/T	<i>PCSK1</i>	IMC	[81]
rs713586	2	25158008	C/T	<i>POMC/ADCY3</i>	IMC	[73]
rs6545814	2	25131316	A/G	<i>POMC/ADCY3</i>	IMC	[81]
rs11847697	14	30515112	C/T	<i>PRKD1</i>	IMC	[73]
rs1555543	1	96944797	A/C	<i>PTBP2</i>	IMC	[73]
rs2287019	19	46202172	C/T	<i>QPCTL/GIPR</i>	IMC	[73]
rs4929949	11	8604593	C/T	<i>RPL27A</i>	IMC	[73]
rs516636	1	177855517	A/C	<i>SEC16B</i>	IMC	[69]
rs543874	1	177889480	A/G	<i>SEC16B</i>	IMC	[73]
rs574367	1	177873210	G/T	<i>SEC16B</i>	IMC	[81]
rs7359397	16	28885659	C/T	<i>SH2B1</i>	IMC	[73]
rs13107325	4	103188709	C/T	<i>SLC39A8</i>	IMC	[73]
rs987237	6	50803050	A/G	<i>TFAP2B</i>	IMC	[73]
rs3810291	19	47569003	A/G	<i>TMEM160</i>	IMC	[73]
rs2867125	2	622827	A/G	<i>TMEM18</i>	IMC	[73]
rs7561317	2	644953	A/G	<i>TMEM18</i>	IMC	[74]
rs6548238	2	634905	C/T	<i>TMEM18</i>	IMC	[82]
rs1514175	1	74991644	C/T	<i>TNNI3K</i>	IMC	[73]
rs4836133	5	124332103	A/C/G	<i>ZNF608</i>	IMC	[73]
rs4607103	3	64711904	C/T	<i>ADAMTS9</i>	DT2	[85]
rs11708067	3	123065778	A/G	<i>ADCY5</i>	DT2	[59]
rs516946	8	41519248	A/G	<i>ANK1</i>	DT2	[68]

rs459193	5	55806751	C/T	<i>ANKRD55</i>	DT2	[68]
rs2028299	15	90374257	A/C	<i>AP3S2/C15orf38</i>	DT2	[152]
rs7202877	16	75247245	G/T	<i>BCAR1</i>	DT2	[68]
rs243021	2	60584819	C/T	<i>BCL11A</i>	DT2	[78]
rs7172432	15	62396389	A/G	<i>C2CD4A/B</i>	DT2	[84]
rs2925757	2	161101169	C/T	<i>CAPN10</i>	DT2	[80]
rs73040004	12	4362909	C/T	<i>CCND2</i>	DT2	[68]
rs12779790	10	12328010	A/G	<i>CDC123/CAMK1D</i>	DT2	[85]
rs7756992	6	20679709	A/G	<i>CDKAL1</i>	DT2	[58]
rs2206734	6	20694884	A/G	<i>CDKAL1</i>	DT2	[69]
rs7754840	6	20661250	C/G	<i>CDKAL1</i>	DT2	[71]
rs9356744	6	20685486	C/T	<i>CDKAL1</i>	DT2	[81]
rs7513574	1	65135341	G/T	<i>CDKN2A/2B</i>	DT2	[46]
rs10965250	9	22133284	A/G	<i>CDKN2A/2B</i>	DT2	[78]
rs10811661	9	22134094	C/T	<i>CDKN2A/2B</i>	DT2	[71]
rs2383208	9	22132076	A/G	<i>CDKN2A/2B</i>	DT2	[78]
rs1552224	11	72433098	G/T	<i>CENTD2</i>	DT2	[78]
rs13292136	9	81952128	C/T	<i>CHCHD9</i>	DT2	[78]
rs17168486	7	14898282	C/T	<i>DGKB</i>	DT2	[68]
rs2191349	7	15064309	G/T	<i>DGKB/TMEM195</i>	DT2	[59]
rs5945326	X	152899922	A/G	<i>DUSP9</i>	DT2	[78]
rs6467136	7	127164958	A/G	<i>GCC1/PAX4</i>	DT2	[58]
rs8108269	19	46158513	G/T	<i>GIPR</i>	DT2	[68]
rs7041847	9	4287466	A/G	<i>GLIS3</i>	DT2	[58]
rs13389219	2	165528876	C/T	<i>GRB14</i>	DT2	[68]
rs3923113	2	165501849	G/T	<i>GRB14</i>	DT2	[68]
rs2334499	11	1696849	C/T	<i>HCCA2</i>	DT2	[64]
rs7087591	10	94473629	A/G	<i>HHEX</i>	DT2	[58]
rs1111875	10	94462882	A/G	<i>HHEX</i>	DT2	[71]
rs5015480	10	94465559	C/T	<i>HHEX</i>	DT2	[78]
rs7178572	15	77747190	A/G	<i>HMG20A</i>	DT2	[152]

rs7177055	15	77832762	A/G	<i>HMG20A</i>	DT2	[68]
rs1531343	12	66174894	C/G	<i>HMGA2</i>	DT2	[78]
rs7957197	12	121460686	A/T	<i>HNF1A</i>	DT2	[78]
rs757210	17	36096515	A/G	<i>HNF1B</i>	DT2	[83]
rs4430796	17	36098040	A/G	<i>HNF1B</i>	DT2	[71]
rs6017317	20	42946966	G/T	<i>HNF4A</i>	DT2	[58]
rs1800961	20	43042364	C/T	<i>HNF4A</i>	DT2	[153]
rs10882066	10	94224746	A/G	<i>IDE</i>	DT2	[83]
rs4402960	3	185511687	G/T	<i>IGF2BP2</i>	DT2	[71]
rs1470579	3	185529080	A/C	<i>IGF2BP2</i>	DT2	[71]
rs2943641	2	227093745	C/T	<i>IRS1</i>	DT2	[71]
rs7578326	2	227020653	A/G	<i>IRS1</i>	DT2	[78]
rs849134	7	28196222	A/G	<i>JAZF1</i>	DT2	[78]
rs1635852	7	28189411	C/T	<i>JAZF1</i>	DT2	[48]
rs864745	7	28180556	A/G	<i>JAZF1</i>	DT2	[85]
rs5215	11	17408630	C/T	<i>KCNJ11</i>	DT2	[71]
rs1535500	6	39284050	G/T	<i>KCNK16/KCNK17</i>	DT2	[58]
rs163184	11	2847069	G/T	<i>KCNQ1</i>	DT2	[71]
rs2237897	11	2858546	C/T	<i>KCNQ1</i>	DT2	[76]
rs231362	11	2691471	C/T	<i>KCNQ1</i>	DT2	[78]
rs2237892	11	2839751	C/T	<i>KCNQ1</i>	DT2	[84]
rs972283	7	130466854	A/G	<i>KLF14</i>	DT2	[78]
rs10842994	12	27965150	C/T	<i>KLHDC5</i>	DT2	[68]
rs824248	9	28772700	A/T	<i>LINGO2</i>	DT2	[48]
rs6815464	4	1309901	C/G	<i>MAEA</i>	DT2	[58]
rs10923931	1	120517959	G/T	<i>NOTCH2</i>	DT2	[85]
rs3786897	19	33893008	A/G	<i>PEPD</i>	DT2	[58]
rs1801282	3	12393125	C/G	<i>PPARG</i>	DT2	[71]
rs8042680	15	91521337	A/C	<i>PRC1</i>	DT2	[78]
rs340874	1	214159256	A/G	<i>PROX1</i>	DT2	[59]
rs831571	3	64048297	C/T	<i>PSMD6</i>	DT2	[58]

rs17584499	9	8879118	C/T	<i>PTPRD</i>	DT2	[75]
rs117767867	17	6946330	C/T	<i>SLC16A11</i>	DT2	[48]
rs13342232	17	6945940	A/G	<i>SLC16A11</i>	DT2	[48]
rs13342692	17	6946287	C/T	<i>SLC16A11</i>	DT2	[48]
rs75418188	17	6945483	C/T	<i>SLC16A11</i>	DT2	[48]
rs75493593	17	6945087	G/T	<i>SLC16A11</i>	DT2	[48]
rs13266634	8	118184783	C/T	<i>SLC30A8</i>	DT2	[59]
rs3802177	8	118185025	C/T	<i>SLC30A8</i>	DT2	[66]
rs4523957	17	2208899	G/T	<i>SMG6/SRR</i>	DT2	[75]
rs1359790	13	80717156	C/T	<i>SPRY2</i>	DT2	[63]
rs16861329	3	186666461	C/T	<i>ST6GAL1</i>	DT2	[152]
rs7903146	10	114758349	C/T	<i>TCF7L2</i>	DT2	[59]
rs12243326	10	114788815	C/T	<i>TCF7L2</i>	DT2	[59]
rs4506565	10	114756041	A/T	<i>TCF7L2</i>	DT2	[59]
rs7901695	10	114754088	A/C/G/T	<i>TCF7L2</i>	DT2	[59]
rs10770141	11	2193840	A/G	<i>TH</i>	DT2	[71]
rs11899863	2	43618819	C/T	<i>THADA</i>	DT2	[78]
rs7578597	2	43732823	C/T	<i>THADA</i>	DT2	[85]
rs2796441	9	84308948	C/T	<i>TLE1</i>	DT2	[68]
rs1052248	6	31556581	A/T	<i>TNF</i>	DT2	[77]
rs11575839	6	31557791	C/T	<i>TNF</i>	DT2	[77]
rs896854	8	95960511	A/G	<i>TP53INP1</i>	DT2	[78]
rs7961581	12	71663102	C/T	<i>TSPAN8/LGR5</i>	DT2	[85]
rs6780569	3	23198484	A/G	<i>UBE2E2</i>	DT2	[84]
rs1801214	4	6303022	A/C/G/T	<i>WFS1</i>	DT2	[78]
rs4688985	4	6285715	A/G	<i>WFS1</i>	DT2	[71]
rs4457053	5	76424949	A/G	<i>ZBED3</i>	DT2	[78]
rs9470794	6	38106844	C/T	<i>ZFAND3</i>	DT2	[58]
rs11634397	15	80432222	A/G	<i>ZFAND6</i>	DT2	[78]
rs6499500	16	71348415	C/G	<i>FTSJD1/CALB2</i>	DMG	[46]
rs4607517	7	44235668	A/G	<i>GCK</i>	DMG	[59]

rs12898654	15	68128117	C/G	<i>LBXCOR1</i>	DMG	[59]
rs1387153	11	92673828	C/T	<i>MTNR1B</i>	DMG	[78]
rs10830963	11	92708710	C/G	<i>MTNR1B</i>	DMG	[70]
rs10830962	11	92698427	C/G	<i>MTNR1B</i>	DMG	[46]
rs187230	3	171270624	A/C	<i>PLD1</i>	DMG	[46]
rs391300	17	2216258	A/G	<i>SRR</i>	DMG	[79]
rs7501939	17	36101156	C/T	<i>TCF2</i>	DMG	[47]
rs9395950	6	54244192	A/G	<i>TINAG</i>	DMG	[46]
rs7554506	1	202944146	A/G	<i>ADIPOR1</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs2041139	12	1901461	A/G	<i>ADIPOR2</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs6954897	7	22750220	A/G	<i>IL6</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs2227306	4	74607055	C/T	<i>IL8</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs2886920	4	74626945	C/T	<i>IL8</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs2167270	7	127881349	A/G	<i>LEP</i>	Rasgo del embarazo	[72]
rs1137100	1	66036441	A/G	<i>LEPR</i>	Rasgo del embarazo	[72]
rs1171278	1	65988146	C/T	<i>LEPR</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs1627238	1	65986079	C/T	<i>LEPR</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs1423096	19	7739177	A/G	<i>RETN</i>	Rasgo del embarazo	[77]
rs1884082	14	95078677	G/T	<i>SERPINA3</i>	Rasgo del embarazo	[57]
rs10488683	11	18053545	A/G	<i>TPH1</i>	Rasgo del embarazo	[65]
rs2056246	11	18051446	G/T	<i>TPH1</i>	Rasgo del embarazo	[65]
rs508924	11	18060900	G/T	<i>TPH1</i>	Rasgo del embarazo	[65]
rs685249	11	18060587	G/T	<i>TPH1</i>	Rasgo del embarazo	[66]

Los **SNP** están ordenados por rasgo al que se relacionan y gen en que se ubican. Los **alelos** son los reportados por el NCBI.

12.3. PUBLICACIONES



CIENCIA

Revista de la Academia Mexicana de Ciencias, A. C.

México, D. F. a junio 2014

M en C Alicia Huerta Chagoya
PRESENTE

Estimada Maestra Huerta:

Tenemos el agrado de comunicarle que su trabajo titulado: **"Diabetes Gestacional: un desorden metabólico que trasciende el embarazo"** con el número de registro 900, ha sido aceptado para publicarse en **Ciencia**.

Anexo, encuentre la forma de Propiedad literaria (*copyright*) por medio de la cual se ceden a la Academia Mexicana de Ciencias, A. C, los derechos de propiedad literaria de su artículo. Mucho le agradecemos nos regrese dicha forma con su firma, a la mayor brevedad posible.

Agradecemos su colaboración y esperamos seguir contando con su preferencia.

Reciba cordiales saludos.

Atentamente,

Dr. Miguel Pérez de la Mora
Director

rciencia@servidor.unam.mx

Tel: (52) + (55) 5849 4903

Fax: (52) + (55) 5849 5108

Casa Tlalpan", Km 23.5, Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n,
Col. San Andrés Totoltepec, Tlalpan, 14400 México, D.F.

Tel: (52-55) 5849-4903, Fax 5849-5108

rciencia@servidor.unam.mx <http://www.amc.unam.mx>

RESEARCH ARTICLE

Genetic Determinants for Gestational Diabetes Mellitus and Related Metabolic Traits in Mexican Women

Alicia Huerta-Chagoya¹, Paola Vázquez-Cárdenas¹, Hortensia Moreno-Macías³, Leonardo Tapia-Maruri¹, Rosario Rodríguez-Guillén¹, Erika López-Vite⁴, Guadalupe García-Escalante⁵, Fernando Escobedo-Aguirre⁶, Adalberto Parra-Covarrubias⁷, Roberto Cordero-Brieño⁸, Lizette Manzo-Carrillo⁸, Rogelio Zacarías-Castillo⁸, Carlos Vargas-García^{9†}, Carlos Aguilar-Salinas², Teresa Tusié-Luna^{1*}



 OPEN ACCESS

Citation: Huerta-Chagoya A, Vázquez-Cárdenas P, Moreno-Macías H, Tapia-Maruri L, Rodríguez-Guillén R, López-Vite E, et al. (2015) Genetic Determinants for Gestational Diabetes Mellitus and Related Metabolic Traits in Mexican Women. PLoS ONE 10(5): e0126408. doi:10.1371/journal.pone.0126408

Academic Editor: Florian Kronenberg, Innsbruck Medical University, AUSTRIA

Received: May 29, 2014

Accepted: March 5, 2015

Published: May 14, 2015

Copyright: © 2015 Huerta-Chagoya et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The GDM genotype data can be found in Dryad Digital Repository <http://datadryad.org/review?doi=doi:10.5061/dryad.kq0k2>. The SIGMA T2D Diabetes project genotype data have been deposited in dbGaP under accession number phs000683.v1.p1.

Funding: This project was supported by the Fondo Sectorial de Investigación en Salud, grant number: 115250. AHC and PVC received support through graduate fellowships provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (<http://www.conacyt.mx>). The SIGMA T2D Diabetes Project

1 Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM / Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, D.F., Mexico City, Mexico, **2** Departamento de Endocrinología y Metabolismo, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, D.F., Mexico City, Mexico, **3** Departamento de Economía, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F., Mexico City, Mexico, **4** Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital General O'Horan, Mérida, Yucatán, México, **5** Departamento de Genética, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, **6** Departamento de Ginecología y Medicina Perinatal, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, D.F., Mexico City, Mexico, **7** Departamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Perinatología, D.F., Mexico City, Mexico, **8** Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital General Manuel Gea González, D.F., Mexico City, Mexico, **9** Departamento de Ginecología y Obstetricia, Centro de Investigación Materno Infantil GEN, D.F., Mexico City, Mexico

† Deceased.
* mttusie@gmail.com

Abstract

Epidemiological and physiological similarities among Gestational Diabetes Mellitus (GDM) and Type 2 Diabetes (T2D) suggest that both diseases, share a common genetic background. T2D risk variants have been associated to GDM susceptibility. However, the genetic architecture of GDM is not yet completely understood. We analyzed 176 SNPs for 115 *loci* previously associated to T2D, GDM and body mass index (BMI), as well as a set of 118 Ancestry Informative Markers (AIMs), in 750 pregnant Mexican women. Association with GDM was found for two of the most frequently replicated T2D *loci*: a *TCF7L2* haplotype (CTTC: rs7901695, rs4506565, rs7903146, rs12243326; $P=2.16 \times 10^{-06}$; OR=2.95) and a *KCNQ7* haplotype (TTT: rs2237892, rs163184, rs2237897; $P=1.98 \times 10^{-05}$; OR=0.55). In addition, we found two *loci* associated to glycemic traits: *CENTD2* (60' OGTT glycemia: rs1552224, $P=0.03727$) and *MTNR1B* (HOMA B: rs1387153, $P=0.05358$). Remarkably, a major susceptibility *SLC16A11* *locus* for T2D in Mexicans was not shown to play a role in GDM risk. The fact that two of the main T2D associated *loci* also contribute to the risk of developing GDM in Mexicans, confirm that both diseases share a common genetic background. However, lack of association with a Native American contribution T2D risk haplotype, *SLC16A11*, suggests that other genetic mechanisms may be in play for GDM.

was conducted as part of the Slim Initiative for Genomic Medicine, a joint US-Mexico project funded by the Carlos Slim Health Institute. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is defined as a condition of carbohydrate intolerance of varying severity that begins or is first recognized during pregnancy and is a common obstetric complication. It is characterized by an impaired compensatory increase in insulin secretion to overcome the pregnancy-induced insulin resistance. Nevertheless, the metabolic pathways involved need to be better understood. Previous reports indicate that GDM is a strong risk factor for developing Type 2 Diabetes (T2D) later in life, and most importantly, it also influences the metabolic health of their offspring in the short and long term [1].

In Mexico, no nationwide prevalence has been reported for GDM due to the lack of both detection programs and a consensus diagnostic method. However, a recent study found a prevalence of 12.9% [2], compared to a T2D prevalence of 24.2% among individuals under 40 years old, both reported in 2012 [3]. Physiological similarities between T2D and GDM suggests that they could share a common genetic background. It has been reported that common T2D risk genetic variants confer predisposition to GDM development in Caucasian and Asian populations [4, 5], but up to date, there is scarce information in other ethnic groups. Common T2D risk genetic variants also associated to GDM risk include: *TCF7L2* (rs7903146), *MTNR1B* (rs10830962, rs10830963), *IGF2BP2* (rs4402960, rs1470579), *KCNJ11* (rs5219), *CDKAL1* (rs7754840, rs7756992), *KCNQ1* (rs2237892, rs2237895), *GCK* (rs4607517), *CDKN2A/2B* (rs2383208, rs10811661), *SRR* (rs391300), *HHEX* (rs1111875, rs5015480, rs7923837), *SLC30A8* (rs13266634), *TCF2* (rs7501939).

Although T1D and GDM genetic similarities have been poorly explored, the evidence point out that autoimmunity is not likely to play a major role in GDM development. Although few reports have been published, none of them have shown a high prevalence of T1D risk genotypes in non-autoimmune GDM patients compared to the normoglycemic control group. Moreover, a low percent of GDM patients have shown to be positive to T1D autoimmune markers and pregnancy hyperglycemia are prone to develop T2D, but not T1D [6–9].

It has been shown that ethnicity is an important factor determining the risk of developing metabolic disorders. Particularly, Native American ancestry positively correlates with higher prevalence of T2D and GDM [10–12], a fact that may be related not only to lifestyle, diet and healthcare access, but also to genetic factors. Despite the fact that common T2D susceptibility variants are homogeneous within ancestry groups, their frequency and risk effects have been found to differ across populations [13].

A recent report showed that the inclusion of subjects with high Native American ancestry in a genome wide association study, allowed the identification of new T2D risk alleles, which are rare or absent in other human populations [14]. Furthermore, despite the inclusion of large sample sizes, some of the previously reported T2D associations could not be replicated in Native American derived populations, thus highlighting the importance of assessing the contribution of the currently known risk variants in subjects with different ethnic backgrounds.

In contrast to T2D, genetics of GDM has been less studied. However, a concordance of risk alleles, as well as direction of their effect has been reported. Regarding Mexican population, GDM genetic studies have been conducted for few candidate genes and including small sample sizes. Variants within *TCF7L2*, *TNF* and *HNF4A* loci have been associated to the risk of developing the disease in Mexican women [15–18]. However, no study has evaluated a complete set of the most associated T2D risk variants.

The aim of this work was to analyze whether common genetic variants, previously associated to T2D, obesity and other related traits, were also associated to the risk of GDM in Mexican population.

Methods

Ethics Statement

The study was conducted with the approval of the Ethics and Research Committees of the Hospital General Manuel Gea González, Ministry of Health, approval number: 11-86-2010. All participants gave written informed consent before they were included in the study.

Study participants

Unrelated pregnant Mexican women were recruited at four different health institutions in Mexico City: Instituto Nacional de Perinatología Isidro de los Reyes (INPer), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (CMN20N), Hospital General Manuel Gea González, Centro de Investigación Materno Infantil Gen. INPer is a national referral centre for the treatment of high-risk pregnancy diseases and CMN20M is a white-collar hospital. Both, GEA and CIMIGEN are open-population hospitals, but the second one preferentially provides treatment to pregnant women. All Mexican pregnant (< 20 gestational week) women of 18 years or older were eligible for the study. Exclusion criteria included previous medical diagnosis of T2D or any type of DM, as well as any metabolic disease. After written voluntary consent to participate, it was set an appointment during 24–28 gestational weeks, for a diagnostic OGTT 100 g. Patients were diagnosed following the criteria proposed by Carpenter and Coustan (1982) [19]. A control was defined when no OGTT glucose value was altered, whereas a case was defined when two or more OGTT glucose values were altered. Women who did not finish the diagnostic OGTT or who were diagnosed with a subclinic metabolic disease were excluded. Serum aliquots were immediately frozen after centrifugation for metabolite determinations.

GDM sample consisted in 750 samples (408 cases and 342 controls). Patients were interviewed following a standardized questionnaire, which included demographic, anthropometric, socioeconomic and medical history of the patients and their families. Data from the newborns was also collected.

Given the reported similarities between GDM and T2D, SIGMA T2D Diabetes Consortium data [14] was used for allele effect comparison purposes, preventing association bias given by different sample's ethnicities. SIGMA T2D Project comprises four study cohorts from Mexico and USA. In order to avoid possible gender and age biases and to ensure an adequate comparison between GDM and SIGMA T2D databases, only women samples were included for both T2D cases and controls. Specifically for cases subgroup, we included women whose age of onset was ≤ 48 years old, which was the age of the oldest GDM case. The same criteria could not be applied for the control group because SIGMA T2D sample attempted to include hypercontrols, i.e. normoglycemic individuals ≥ 45 years old. The dataset included 3027 women samples (2467 controls, 560 cases). SIGMA T2D full dataset, which includes 8214 samples (4366 controls, 3848 cases), was also used for final comparisons.

Biochemical measurements

Glucose, total and HDL cholesterol and triglycerides were measured by enzymatic methods. LDL cholesterol was computed using Friedewald formula. Insulin was determined by radioimmunoassay. Leptin and adiponectin were determined by ELISA.

HOMA index was computed using the HOMA2 calculator published by the University of Oxford, UK (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>). HOMA2 is an updated version of the linear HOMA model, which considers glucose levels ≥ 24 mM, accounts for renal glucose losses, assumes reduced suppression of hepatic glucose production and increased insulin secretion in response to glucose levels ≥ 10 mM [20]. Gutt index was computed using the plasma

glucose and insulin concentration from fasting and 120 minutes sample from the OGTT, as described by Kanauchi [21].

SNP selection criteria

In addition to T2D family history, it is well known that a high pregestational BMI is related with an increased risk of developing gestational hyperglycemia and adverse outcomes in the fetus. Thus, we were interested in assessing the relationship between high genetic BMI risk and GDM development. Furthermore, besides conventional glycemic and lipid traits, researchers have analyzed the role of genetic variation on other maternal metabolic phenotypes, as well as neonatal phenotypes. Even when those genetic variants have not been associated to GDM in other populations, we decided to test the possible association of pregnancy related traits to GDM in Mexican women.

In order to achieve this, a literature search was performed, it included independent genetic studies from 2003–2013 identifying and/or replicating *loci* associated with T2D, BMI, GDM and pregnancy related traits [4, 5, 15–18, 22–50]. The dataset was filtered in order to select SNPs that were replicated in at least two populations of different ethnicity and that were either identified through GWAS or had a reported association P value $< 1 \times 10^{-04}$, if identified through other analysis approach in Mexican or other Latino population. An arbitrary P value threshold was established, since most available data in Latinos does not come from GWA studies. The filtered dataset included 195 SNPs, mainly associated to T2D, BMI, dyslipidemia, GDM, and pregnancy traits (105 SNPs, 63 SNPs, 11 SNPs and 16 SNPs, respectively).

Also, a set of 118 AIMs was selected from a published panel of genome wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas [51]. Prioritization of SNPs included in the set was based in the following criteria: 1–2 AIMs per chromosome, no markers in LD and availability of parental genetic information from public databases. Using genome wide information data available for an independent sample, the 118 AIMs set was validated. Correlation between estimated eigenvectors 1 using either genome wide data or 118 AIMs set was 0.966. Similarly, correlation between Native American ancestry proportions was 0.969 (P value $< 2.2 \times 10^{-16}$).

DNA purification and SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood using the QIAmp 96 DNA Blood Kit. Purity and concentration was checked with a NanoDrop ND 100. DNA samples were genotyped at LGC Genomics (Beverly, MA, USA). SNPs with a call rate $< 97\%$ were considered technical failures at the genotyping facility and were automatically deleted before further quality control.

Quality control procedure

SNPs with 5% or more missing data within the full dataset or whose call rate between cases and controls was statistically different (P value < 0.00001) were removed. Subsequently, samples with 10% or more missing data and SNPs with $< 1\%$ minor allele frequency (MAF) within the full dataset, were also removed. All analyzed SNPs were tested for Hardy Weinberg equilibrium (P value $< 1 \times 10^{-5}$) using Plink software. SNPs that failed to pass the test were excluded of further analyses. After quality control, dataset included 750 individuals and 294 SNPs from which 118 were AIMs. We analyzed 176 SNPs for 115 *loci*, mainly associated to T2D, BMI, GDM, and pregnancy traits (94 SNPs, 57 SNPs, 10 SNPs and 15 SNPs, respectively) (S5 Table). The final call rate was 0.995.

Population stratification control

A principal components analysis was performed on the AIMs genotypes, using EIGENSTRAT software [52]. The top 10 principal components were used as covariates for correcting for population stratification, as they accounted for most of the total variance.

STRUCTURE software [53] was used to estimate proportions of Native American ancestry with $K = 3$ clusters. GDM samples were merged with individuals from the Human Genome Diversity Panel (HGDP) dataset including Southern Europeans (Basque, French and Italians), Africans (Mandenka and Yoruba), and Native Americans from Mexico (Pima), but also with Native Americans from the Mexican Genome Diversity Project (MGDP) including Tepehuano, Zapoteca and Maya. The merged dataset included 64 Southern Europeans, 43 Africans and 84 Native Americans.

Statistical analyses

GDM association analysis was performed via logistic regression using PLINK [54]. Age, pregestational BMI, dummy reference hospital and the top 10 principal components were included as covariates in the regression. In addition, in order to assess the risk allele effect dependent on pregestational BMI, GDM sample was stratified in lean (pregestational BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$) vs. non-lean (pregestational BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) women. P values were corrected using FDR. FDR correction was computed using Plink software, which is based in Benjamini and Hochberg (1995) step-up FDR control.

Quantitative traits association analysis was assessed via linear regression using PLINK. Natural logarithmic transformation was performed when variables distributions were not normal. After running adjusted regression models, residual analyses were conducted to evaluate the adequacy of the models. Age, pregestational BMI, glycemic status, gestational week of diagnosis, dummy reference hospital and the top 10 principal components were included as covariates in the regression. P values were corrected using FDR. None of the participants were taking any lipid or glucose medication.

For those *loci* with more than 1 associated SNP, haplotype analysis were performed using PLINK and Haploview [55] software. Linkage disequilibrium was computed and haplotype association analyses were corrected as previously described.

The Quanto v1.2.4 statistical software was used for power calculation [56]. We calculated the power to detect the reported ORs at various risk allele frequencies in additive models, with a sample size of 750 samples (408 cases and 302 controls). The calculations were based on a two-sided alpha of 0.05 and a GDM prevalence of 12%. Statistical power reached at least 90% at risk allele frequencies between 0.2 and 0.8. The risk allele frequencies reported in this study ranged from 0.13 and 0.93.

To compare the allelic frequencies of the associated SNPs among different populations, genetic information from 1000 Genomes Project [57] was used, including Europeans (CEU), Asians (ASN) and Africans (AFR); as well as SIGMA T2D Diabetes Consortium samples [14].

Women-only SIGMA T2D samples, as well as the SIGMA T2D full dataset, were used to make comparisons of the allele size effects using t tests. T2D association analysis was also performed via logistic regression using PLINK. Age, BMI and the top 2 principal components were included as covariates in the models.

SNP Functional Annotation and Gene Set Enrichment Analysis

To identify enriched metabolic pathways among the associated genes, a GSEA was performed using Enrichr [58]. SNPs with a nominal association P value < 0.01 were only included. SNP

Annotation tool [59] was used in order to obtain functional information of the associated SNPs.

Results

Our GDM sample included 750 Mexican women (408 cases and 342 controls). Cases were younger than controls and showed a higher BMI ($P < 0.001$). After adjusting for age, pregestational BMI and sampling gestational week, cases showed higher triglycerides levels ($P = 0.001$), but lower total HDL and LDL cholesterol levels ($P < 0.001$, respectively). Although this finding may be interpreted as a good metabolic control, some authors have hypothesized that it could be due to incapacity to develop the physiological hyperlipidemia of the pregnancy, and that estrogens levels may play an important role [60–62]. Cases were also more insulin resistant, as demonstrated by their higher levels of HOMA IR, glucose, insulin and leptin levels ($P = 0.002$, < 0.001 , 0.005 , 0.007 , respectively) and by their lower values of Gutt index and adiponectin levels ($P = 0.006$, 0.002 , respectively). Additionally, a higher proportion of cases reported to have family history of diabetes, as well as college education level and employment ($P < 0.001$, 0.033 , < 0.001 , respectively) (Table 1). As one of the objectives was to compare our findings to those reported for T2D Mexican individuals, we contrasted our data with that from the SIGMA T2D Consortium study [14] which included 3027 women (560 cases ≤ 48 years old and 2467 controls).

Even though T2D prevalence has been consistently correlated with a higher proportion of Native American ancestry and low socioeconomic status (SES), no statistical differences between GDM cases and controls were observed (Native American ancestry: 65.4% in controls vs. 63.4% in cases, $P = 0.300$; and low SES: 32.8% in controls vs. 44.4% in cases, $P = 0.272$) (Table 1). In contrast, women-only SIGMA T2D cases had a higher Native American ancestry proportion when compared to controls (51.8% in controls vs. 70.9% in cases, $P = 1.02 \times 10^{-73}$) (S1 Fig). Fig 1 shows a PCA projection of GDM and women-only SIGMA T2D samples onto parental populations, as well as the centroids of eigenvectors 1 and 2 for cases and controls. A comparative plot of global ancestry proportions by group is in S1 Fig.

We first examined 176 SNPs previously associated to the risk of T2D, GDM, high BMI and adverse pregnancy traits in other populations. Six variants within two *loci* reached statistical significance for the association to GDM risk after FDR multiple comparisons adjustment (Table 2): *TCF7L2* (rs7901695, $Q = 0.00314$, OR = 2.14[1.47–3.11]; rs4506565, $Q = 0.00314$, OR = 2.06[1.45–2.94]; rs7903146; $Q = 0.00324$, OR = 2.07[1.44–2.98]; rs12243326, $Q = 0.00061$, OR [95%CI] = 2.89[1.85–4.52]) and *KCNQ1* (rs2237892, $Q = 0.007$, OR = 0.58 [0.43–0.78]; rs2237897, $Q = 0.00314$, OR = 0.54[0.40–0.72]). The allele effect sizes and frequencies of these SNPs are consistent with previous studies of GDM and T2D [14, 63]. When stratifying by pregestational BMI (lean vs. non-lean), association analyses did not reveal a modulation of the *TCF7L2* and *KCNQ1* allele effects sizes (S1 Table). In addition, eight genetic variants showed nominal statistical significance ($P < 0.05$): *KLF14* (rs972283), *KCNQ1* (rs163184), *FAIM2* (rs7138803), *HHEX* (rs5015480), *GRB14* (rs3923113), *DUSP9* (rs5945326), *FTSJD1/CALB2* (rs6499500), *PEPD* (rs3786897) (Table 2).

Next, we tested the haplotypes of the *TCF7L2* and *KCNQ1* for association to GDM and various related metabolic quantitative traits. *TCF7L2* risk haplotype CTTC (r^2 rs7901695 vs. rs4506565 = 0.96, r^2 rs7901695 vs. rs7903146 = 0.88, r^2 rs7901695 vs. rs12243326 = 0.55, r^2 rs4506565 vs. rs7903146 = 0.92, r^2 rs4506565 vs. rs12243326 = 0.58, r^2 rs7903146 vs. rs12243326 = 0.60) was associated to the risk of GDM and to higher levels of fasting glycemia, 60' and 120' OGTT glycemia and area under the curve. Similarly, apart from association to GDM, *KCNQ1* protection haplotype TTT (r^2 rs2237892 vs. rs163184 = 0.41, r^2 rs2237892 vs.

Table 1. GDM dataset description.

	Controls	Cases	P value
Sample size	342	408	-
Age (years)	28 [23–34]	35 [31–38]	<0.001
Pregestational obesity (%)	10.26	29.68	<0.001
Pregestational BMI (kg/m ²)	23.93 [21.52–26.97]	27.02 [24.4–30.75]	<0.001
OGTT gestational age (week)	27.59 [25.22–30.54]	25.41 [21.96–29.02]	<0.001
Fasting glucose (mmol/l)	4.16 [4.38–4.72]	4.72 [5.19–5.61]	<0.001
Glucose 60' (mmol/l)	6.01 [6.94–7.94]	10.05 [10.66–11.49]	<0.001
Glucose 120' (mmol/l)	5.50 [6.11–6.77]	8.92 [9.66–10.43]	<0.001
Glucose 180' (mmol/l)	4.88 [5.55–6.19]	6.94 [7.88–8.60]	<0.001
Area under the curve (mmol*min/l)	944.01 [1067.27–1166.75]	1505.16 [1585.08–1693.31]	<0.001
Fasting insulin (pmol/l)	48 [70.2–96.3]	55.2 [85.8–135.6]	0.005
Insulin 120' (pmol/l)	198 [406.8–560.1]	385.8 [512.4–853.2]	0.265
Triglycerides (mmol/l)	2.023 [2.62–3.21]	2.23 [2.89–3.55]	0.001
Total cholesterol (mmol/l)	5.47 [6.07–7.0]	4.69 [5.54–6.2]	0.001
HDL (mmol/l)	1.50 [1.77–2.10]	1.22 [1.50–1.76]	<0.001
LDL (mmol/l)	2.46 [3.06–3.57]	2.03 [2.64–3.27]	0.001
Leptin (ng/dl)	21.75 [14.54–30.16]	23.46 [14.01–34.29]	0.007
Adiponectin (ng/dl)	10.16 [7.92–12.21]	7.82 [6.55–9.94]	0.002
Gutt Index	3.97 [3.33–4.73]	2.67 [2.3–2.98]	0.006
HOMA B (%)	170.55 [136.38–206.75]	161 [115.8–213.55]	0.948
HOMA IR	1.5 [1–2]	1.8 [1.1–2.85]	0.002
Diabetes family history (%)	68.21	80.15	<0.001
Employed (%)	47.12	73.19	<0.001
Education ≥college (%)	37.57	50.40	0.033
Low socioeconomic status (%)	32.84	44.44	0.272
Native American ancestry	65.4 [56.1–73.8]	63.4 [54.3–74.1]	0.300

It is shown median [25th percentile–75th percentile] or percentages. Controls vs. cases comparisons. P value of U Mann-Whitney, chi square/Fisher exact test or multiple linear regression for metabolic traits, adjusted for age, pregestational BMI and sampling gestational week.

doi:10.1371/journal.pone.0126408.t001

rs2237897 = 0.91, r^2 rs163184 vs. rs2237897 = 0.39) was also associated to lower levels of 60' and 180' OGTT glycemia, and area under the curve (Table 3).

We then examined the 176 SNPs for association to fluctuations of glycemic metabolic quantitative traits. Two variants reached statistical significance after FDR multiple comparisons adjustment: *CENTD2* (60' OGTT glycemia: rs1552224, $Q = 0.02599$), *MTNR1B* (HOMA B: rs1387153, $Q = 0.03881$) (Table 4 and S2 Table). Interestingly, *MTNR1B* rs1387153 variant was nominally associated to GDM in non-lean women subset (lean: OR = 0.888, $P = 0.6337$ vs. non-lean: OR = 1.761, $P = 0.01297$, t test P value = 0.0432) (S1 Table).

We were also interested in comparing the risk effects of *TCF7L2* and *KCNQ1* variants between GDM and T2D. For this purpose, we compared the Beta coefficients obtained in the T2D case-control group from SIGMA T2D Consortium study [14] with those obtained in GDM. As previously reported, both *loci* reached genome-wide significant association to T2D in Mexican population, *TCF7L2* (rs7903146, $P = 2.5 \times 10^{-17}$, OR [95%CI] = 1.41 [1.30–1.53]) and *KCNQ1* (rs2237897, $P = 4.9 \times 10^{-16}$, OR = 0.74 [0.69–0.80]) [14]. The effect of *TCF7L2* risk alleles was significantly different between the women-only T2D and GDM patients (t test $P < 0.01$). In contrast, no difference was found in the risk effect of the *KCNQ1* variants between the two groups (t test $P > 0.1$) (Table 5). S3 Table shows allelic frequencies for the analyzed datasets.

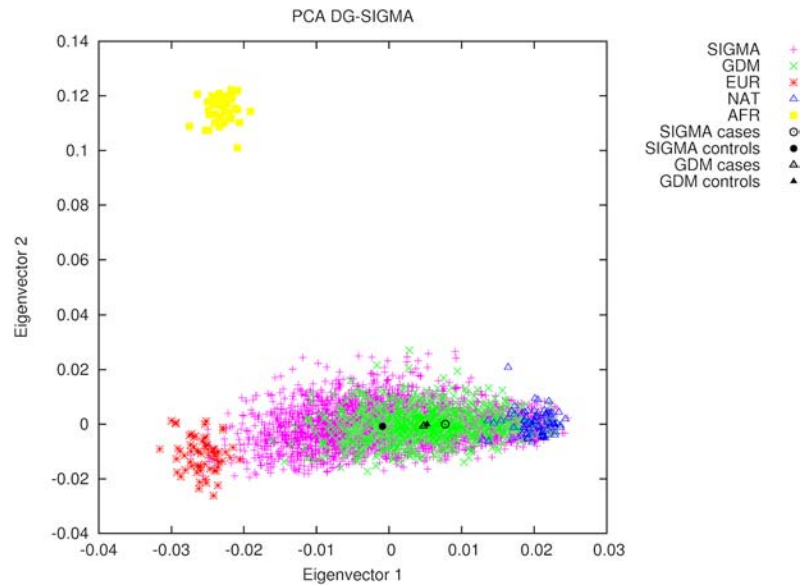


Fig 1. Principal component analysis projection of GDM and SIGMA samples. Principal components were calculated using parental data from the Human Genome Diversity Project (HGDP) and the Mexican Genome Diversity Project (MGDP). Centroids of eigenvectors 1 and 2 for cases and controls are plotted in black triangles for GDM dataset and in black circles for women-only SIGMA dataset.

doi:10.1371/journal.pone.0126408.g001

Despite the association with GDM observed for *TCF7L2* and *KCNQ1*, no association was found for *SLC16A11* haplotype, which was recently identified as a major contributor for T2D risk in Mexican population [14]. Even though the frequency of *SLC16A11* risk variants in GDM cases was found to be similar to that of women-only SIGMA T2D cases ($P > 0.1$), no statistical difference was found for the *SLC16A11* risk variants between GDM cases and controls ($P > 0.1$) (S3 Table). As all association analyses included a previously validated set of AIMs, lack of association was not due to a deficient population stratification control.

Table 2. Genetic variants associated to the risk of GDM in Mexican women.

GENE	SNP	CHR	BP	A1	OR [95% CI]	P value	FDR Q value
<i>TCF7L2</i>	rs7901695	10	114754088	C	2.134 [1.47–3.11]	7.13x10 ⁻⁰⁵	0.00314
	rs4506565	10	114756041	T	2.06 [1.45–2.94]	6.39x10 ⁻⁰⁵	0.00314
	rs7903146	10	114758349	T	2.07 [1.44–2.98]	9.20x10 ⁻⁰⁵	0.00324
	rs12243326	10	114788815	C	2.89 [1.85–4.52]	3.46x10 ⁻⁰⁶	0.00061
<i>KCNQ1</i>	rs2237892	11	2839751	T	0.58 [0.43–0.78]	0.00024	0.00700
	rs163184	11	2847069	T	0.70 [0.54–0.91]	0.00774	0.1702
	rs2237897	11	2858546	T	0.54 [0.40–0.72]	4.49x10 ⁻⁰⁵	0.00314
<i>KLF14</i>	rs972283	7	130466854	A	0.66 [0.50–0.87]	0.00303	0.0761
<i>FAIM2</i>	rs7138803	12	50247468	A	0.65 [0.47–0.90]	0.01000	0.1956
<i>HHEX</i>	rs5015480	10	94465559	C	1.38[1.04–1.84]	0.02619	0.4609
<i>FTSJD1/CALB2</i>	rs6499500	16	71348415	C	0.72 [0.54–0.97]	0.03234	0.4635
<i>GRB14</i>	rs3923113	2	165501849	G	0.68 [0.48–0.97]	0.03389	0.4635
<i>DUSP9</i>	rs5945326	23	152899922	A	1.34 [1.02–1.76]	0.03423	0.4635
<i>PEPD</i>	rs3786897	19	33893008	G	1.44 [1.02–2.04]	0.03957	0.4975

Logistic regression corrected for age, pregestational BMI, Native American ancestry and dummy reference hospital.

doi:10.1371/journal.pone.0126408.t002

Table 3. Haplotypes associated to the risk of GDM and related metabolic traits.

GENE	CHR	LOCATION	KB	SNPs	HAPLOTYPE	f controls	f cases	TRAIT	OR/B Coeff	P value
TCF7L2	10	114754088–114788815	34	rs7901695 rs4506565 rs7903146 rs12243326	CTTC	0.0845	0.145	GDM	2.95	2.16x10⁻⁰⁶
								Glucose 0'	0.0308	0.0128
								Glucose 60'	0.0971	2.82x10⁻⁰⁵
								Glucose 120'	0.0785	0.00028
								Glucose 180'	0.0232	0.342
								AUC	0.0783	0.000154
KCNQ1	11	2839751–2858546	18.8	rs2237892 rs163184 rs2237897	TTT	0.3406	0.2384	GDM	0.551	1.98x10⁻⁰⁵
								Glucose 0'	-0.0041	0.624
								Glucose 60'	-0.0311	0.0488
								Glucose 120'	-0.0195	0.184
								Glucose 180'	-0.0474	0.00381
								AUC	-0.0312	0.0263

Logistic regression corrected for age, pregestational BMI, Native American ancestry and dummy reference hospital; or multiple linear regression corrected for age, pregestational BMI, OGTT gestational week, Native American ancestry and dummy reference hospital. OR or B coefficient is shown, respectively. AUC is the OGTT Area Under the Curve.

doi:10.1371/journal.pone.0126408.t003

Finally, considering that variants near or within 59 gene loci showed nominal association to the risk of GDM or to metabolic and pregnancy related traits, we performed a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using an association *P* value threshold <0.01. Besides evident related GO biological processes (i.e. glucose homeostasis, negative regulation of signal transduction, positive regulation of metabolic process, regulation of insulin secretion, generation of precursor metabolites, energy reserve metabolic process, feeding behavior), the analysis revealed two additional interesting processes: transcription regulation from RNA polymerase II promoter and gene-specific transcription (*P*<0.05). It is noteworthy that all genetic variants that reached statistical significance after FDR multiple comparisons adjustment, are located either in coding untranslated regions or within non-coding sites (S4 Table).

Table 4. Genetic variants significantly associated with metabolic trait fluctuations in pregnant Mexican women.

GENE	SNP	CHR	BP	A1	TRAIT	B Coeff	P value	FDR Q value
CENTD2	rs1552224	11	72433098	T	Glucose 60'	0.1118	0.00061	0.02699
MTNR1B	rs1387153	11	92673828	T	HOMA B	-0.1176	0.00022	0.03881

Multiple linear regressions corrected for age, pregestational BMI, glycemic status, OGTT gestational week, Native American ancestry and dummy reference hospital.

doi:10.1371/journal.pone.0126408.t004

Table 5. Risk allele effect comparison between GDM and T2D samples.

GENE	SNP	A1	GDM (N = 408/342)		Women-only SIGMA T2D ≤48 years (N = 2467/560)		t test P value	SIGMA T2D (N = 4366/3848)	
			OR	P value	OR	P value		OR	P value
TCF7L2	rs7901695	C	2.14	7.13x10⁻⁰⁵	1.17	0.1064	0.0048	1.33	4.76x10⁻¹³
	rs4506565	T	2.06	6.39x10⁻⁰⁵	1.16	0.1186	0.0075	1.35	2.51x10⁻¹⁴
	rs7903146	T	2.07	9.20x10⁻⁰⁵	1.21	0.05725	0.0136	1.41	2.50x10⁻¹⁷
	rs12243326	C	2.89	3.46x10⁻⁰⁶	1.17	0.1566	0.0003	1.35	1.02x10⁻¹¹
KCNQ1	rs2237892	T	0.58	2.39x10⁻⁰⁴	0.73	1.74x10⁻⁰⁴	0.2113	0.78	1.08x10⁻¹²
	rs2237897	T	0.54	4.49x10⁻⁰⁵	0.68	7.26x10⁻⁰⁶	0.2052	0.74	4.9x10⁻¹⁶

Logistic regression corrected for age, BMI and Native American ancestry. **t test P value** of comparison between risk allele effect of GDM and women-only SIGMA T2D ≤48 years samples. **N** is the sample size of controls/cases used in the analyses.

doi:10.1371/journal.pone.0126408.t005

Discussion

Our results support a common genetic background for T2D and GDM. Not only did we find *TCF7L2* and *KCNQ1* variants to be associated to GDM, but GDM cases reported higher frequency of family history of diabetes than controls. In the recent SIGMA T2D GWAS in Mexicans, it was demonstrated that common variants within the *TCF7L2* and *KCNQ1* genes were among the strongest associated *loci* [14]. In the current study, associated genetic variants in these two *loci* were directionally consistent with T2D results previously reported for Mexicans and other populations [5, 14, 15, 64]. Also, we found that allele effect sizes of *TCF7L2* variants were significantly different between GDM and T2D, suggesting a major risk effect of this *locus* in the development of GDM. Additionally, when analyzed variants within *TCF7L2* and *KCNQ1* were grouped in LD blocks, the *TCF7L2* risk haplotype was significantly associated with increased glucose levels during OGTT; whereas, the *KCNQ1* protection haplotype, was associated with decreased glycemia.

TCF7L2 gene encodes for the TCF4 transcription factor, involved in the Wnt signaling pathway. Risk variants are located in an intronic 92 kb interval, which has been reported to confer the strongest effect on T2D risk among the more than 90 T2D associated *loci* to date. Despite the mechanisms through which *TCF7L2* influences disease development have not been fully understood, it has been proposed to be related to a reduced insulin secretion. One study showed that the rs7903146 risk allele T is located within a region of open chromatin and increased enhancer activity [65], thus increasing gene expression in pancreatic islets and presumably other tissues [66]. Given that others have reported downregulation of *TCF7L2* gene expression, risk variants have been proposed to alter *TCF7L2* splicing patterns, suggesting that functionally distinct mRNA isoforms, rather than levels of expression, define their phenotypic consequences [67]. In the case of GDM, expression of *TCF7L2* was decreased in visceral adipose tissue from women who developed hyperglycemia, although after adjusting for BMI, the difference was not significant [68].

KCNQ1 gene encodes the Kv7.1 voltage-gated potassium channel. Even though it is known to play an important role in shaping the cardiac action potential, as well as in controlling the water and salt homeostasis in epithelial tissues [69], its role in diabetes development is not yet clear. *KCNQ1* is located at the imprinted 11p15.4 region and its expression is monoallelic during early embryogenesis but turns biallelic during fetal heart development [70]. Two independent signals within introns 11 and 15 have been associated to T2D development, but only

when risk alleles are maternally inherited [71]. *KCNQ1* region is regulated by differential methylation at the promoter of *KCNQ1OT1*, a paternally expressed non-coding antisense RNA, which results in maternal expression of neighbouring genes. Risk allele of rs2237895 located within intron 15 was associated with impaired exocytosis and a reduced amount of docked granules of insulin, especially among non-obese allele carriers [72]. The same risk allele was reported to be associated with hypermethylation of the DMR and CTCF binding region near *KCNQ1OT1* in fetal pancreas, but no relationship with risk allele number and gene expression was found [71].

Apart from *TCF7L2* and *KCNQ1*, seven additional *loci* previously related to T2D (*KLF14*, *HHEX*, *GRB14*, *DUSP9* and *PEPD*), increased BMI (*FAIM2*) or GDM (*FTSJD1/CALB2*), were nominally associated to the risk of developing GDM. In contrast to T2D genetic studies, those performed for GDM have yielded scarce results. This is due in part, to the inclusion of smaller sample sizes, sample heterogeneity as a result of different inclusion criteria and diagnostic methods. Although most of GDM genetic studies have been preferentially conducted for candidate genes, meta-analyses have consistently revealed variants near previously T2D associated genes, i.e. *TCF7L2*, *MTNR1B*, *IGF2BP2*, *KCNJ11*, *CDKAL1*, *KCNQ1*, *GCK* and *IRS1* [63, 64]. In the only published GWAS for GDM performed in Korean women, the authors found association to common T2D variants and identified novel signals with marginal association [5]. It is of interest that one of them, *FTSJD1/CALB2*, was also nominally associated in our sample.

Of particular relevance is the finding of a differential role of *SLC16A11* gene *locus* in the susceptibility to T2D and GDM. It was recently reported that *SLC16A11* has a major contribution to T2D risk in Native American derived populations, as risk associated variants are found at a substantially higher frequency in individuals with Native American ancestry [14]. In the present study, no statistical difference was observed in Native American ancestry proportions between GDM cases and controls and consequently similar allele frequencies for *SLC16A11* risk associated variants between both groups were observed. This finding suggest that apart from T2D common gene variants, other genetic and possibly environmental risk factors may play a role in the development of GDM. The association of *FTSJD1/CALB2* *locus* with GDM risk in two independent studies supports the fact that other GDM susceptibility *loci* are yet to be identified.

Low SES has also been associated to the risk of developing T2D [12], yet similar proportions of GDM cases and controls were classified in the low SES category. It is also noteworthy that a major proportion of cases reported to be college graduates and to be employed. These findings suggest that environmental risk factors, rather than Native American ancestry are important determinants of GDM susceptibility. Reported environmental factors associated with the risk of developing GDM include excess high energy and saturated fat intakes [73], as well as dietary deficiencies of vitamins B12 and 25OHD [74, 75].

Besides the relationship between the common T2D gene risk variants with GDM, we also found association of two other T2D related *loci* with increased 60' OGTT glucose levels (*CENTD2*) and decreased HOMA B (*MTNR1B*). The *CENTD2* LD region comprises at least three other genes (*PDE2A*, *QTG16L2*, *FCHSD2*). Because none of them have been implicated in insulin processing or secretion, *CENTD2*, also known as *ARAP1*, is proposed to be the responsible gene within this *locus*. It encodes a protein which activates Arf and Rho GTPases to regulate membrane trafficking and actin cytoskeleton reorganization. Apart from T2D, this risk *locus* has been strongly associated to fasting proinsulin and 32-33-split proinsulin. Recently, it was proposed that rs11603334, which is in perfect LD with rs1552224 (analyzed in this study), is a functional variant regulating *ARAP1* expression. The variant rs11603334 is located at the P1 promoter and overlaps transcription factor binding sites within a region of open chromatin that is marked by DNA hypersensitivity, H3K4me3 and H3K9ac in pancreatic islets.

Risk allele C disrupts binding of PAX4/6 transcriptional factors and increases transcriptional activity by 2-fold, thus leading to higher gene expression [76]. PAX4/6 are known regulators of both glucagon and insulin promoters. Coding variants within them have been previously implicated in glucose homeostasis [77].

As to the role of *MTNR1B*, genetic variants within this *locus* have been associated to an increase in fasting glucose levels, reduced beta cell function, as well as T2D and GDM risk [35]. Circadian rhythms have been recognized as critical for glucose homeostasis maintenance and melatonin is among their major regulators. Melatonin is a diurnal hormone produced by the pineal gland, which binds to melatonin receptor 2, encoded by *MTNR1B* gene, to exert its functions. Even though the causal variant is yet to be identified, intronic variant rs10830963 is the strongest associated signal. No evidence has been reported regarding its molecular mechanism, but it does not seem to disrupt consensus transcription factor binding or cryptic alternative splice sites. Nevertheless, risk allele G was associated to *MTNR1B* increased gene expression in pancreatic islets [78], thus impairing insulin secretion. Of particular importance is the fact that during pregnancy, plasma melatonin levels are elevated and it crosses the placenta and fetal blood-brain barrier, playing a key role not only in the prevention of pregnancy loss, but also in the development of fetal organs and its adaptation to extra-uterine life [79].

GWAS have allowed an accelerated identification of T2D risk allele variants in a short period of time. Nevertheless, we are still missing the mechanisms by which they confer risk to the disease. It is remarkable that all associated variants are located within non-coding regions and their nearest corresponding gene belong to GO terms involved in the regulation of gene transcription and further transcript abundance, with a higher frequency that may occur by chance. Two interesting enriched GO terms were regulation of transcription from RNA polymerase II promoter and gene-specific transcription, which emphasize the putative regulatory function of involved genes. More studies are needed to clarify the mechanisms involved on disease susceptibility. Apart from T2D, our results pointed at other implicated metabolic pathways and transcriptional regulatory mechanisms, thus highlighting the complex pathophysiology of GDM. Genome-wide studies with larger sample size are still needed to identify genes with smaller allele effects and possibly GDM specific risk variants. Additional analyses, such as global expression studies in tissues relevant to disease physiology, will also be required to elucidate the role of different gene risk variants in disease susceptibility.

Supporting Information

S1 Fig. Global ancestry proportions plot of GDM and SIGMA samples, as well as parental samples from The Human Genome Diversity Project (HGDP) and The Mexican Genome Diversity Project (MGDP).

(DOCX)

S1 Table. Risk allele effect comparison between lean and non-lean GDM samples.

(DOCX)

S2 Table. Genetic variants associated to metabolic trait fluctuations during pregnancy in Mexican women.

(DOCX)

S3 Table. Allele frequencies of the genetic variants associated with the risk of GDM and related metabolic traits in Mexican women, as well as *SLC16A11* loci.

(DOCX)

S4 Table. Functional annotation of the genetic variants associated to the risk of GDM and related metabolic traits in Mexican women.

(DOCX)

S5 Table. SNPs analyzed in current study.

(DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank Fernández-López, JC. for his valuable assistance with global ancestry estimation; Rodríguez-Torres, M., Ramírez-Jiménez, S. and Ordoñez-Sánchez, ML. for their technical assistance. We also appreciate the SIGMA Consortium participants collaboration. The research team laments the death of co-author Dr. Carlos Vargas, a respected colleague who made important contributions to women's health in Mexico. We dedicate this work to his memory.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AHC TTL. Performed the experiments: AHC PVC LTM RRG. Analyzed the data: AHC HMM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AHC PVC ELV GGE FEA APC RCB LMC RZC CAS. Wrote the paper: AHC HMM TTL CAS.

References

1. Veeraswamy S, Vijayam B, Gupta VK, Kapur A. Gestational diabetes: the public health relevance and approach. *Diabetes research and clinical practice*. 2012; 97(3):350–8. doi: [10.1016/j.diabres.2012.04.024](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.04.024) PMID: [22726771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22726771/)
2. Ramirez-Torres MA. The importance of gestational diabetes beyond pregnancy. *Nutrition reviews*. 2013; 71 Suppl 1:S37–41. doi: [10.1111/nure.12070](https://doi.org/10.1111/nure.12070) PMID: [24147923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24147923/)
3. Jimenez-Corona AA-S, Rojas-Martínez R, Hernandez-Avila M. Diaberes Mellitus tipo 2 y frecuencia de acciones. *Salud Publica Mex*. 2013; 3(35):S137–S42.
4. Lauenborg J, Grarup N, Damm P, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Pedersen O, et al. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009; 94(1):145–50. doi: [10.1210/jc.2008-1336](https://doi.org/10.1210/jc.2008-1336) PMID: [18984664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18984664/)
5. Kwak SH, Kim SH, Cho YM, Go MJ, Cho YS, Choi SH, et al. A genome-wide association study of gestational diabetes mellitus in Korean women. *Diabetes*. 2012; 61(2):531–41. doi: [10.2337/db11-1034](https://doi.org/10.2337/db11-1034) PMID: [22233651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22233651/)
6. Weng J, Ekelund M, Lehto M, Li H, Ekberg G, Frid A, et al. Screening for MODY mutations, GAD antibodies, and type 1 diabetes—associated HLA genotypes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2002; 25(1):68–71. PMID: [11772903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11772903/)
7. Torn C, Gupta M, Sanjeevi CB, Aberg A, Frid A, Landin-Olsson M. Different HLA-DR-DQ and MHC class I chain-related gene A (MICA) genotypes in autoimmune and nonautoimmune gestational diabetes in a Swedish population. *Human immunology*. 2004; 65(12):1443–50. PMID: [15603871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15603871/)
8. Papadopoulou A, Lynch KF, Shaat N, Nilsson A, Lernmark B, Berntorp K, et al. The type 1 diabetes protective HLA DQB1*0602 allele is less frequent in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2009; 52(7):1339–42. doi: [10.1007/s00125-009-1351-6](https://doi.org/10.1007/s00125-009-1351-6) PMID: [19347328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19347328/)
9. Evangelista AF, Collares CV, Xavier DJ, Macedo C, Manoel-Caetano FS, Rassi DM, et al. Integrative analysis of the transcriptome profiles observed in type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus reveals the role of inflammation. *BMC medical genomics*. 2014; 7:28. doi: [10.1186/1755-8794-7-28](https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-28) PMID: [24885568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24885568/)
10. Nguyen BT, Cheng YW, Snowden JM, Esakoff TF, Frias AE, Caughey AB. The effect of race/ethnicity on adverse perinatal outcomes among patients with gestational diabetes mellitus. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2012; 207(4):322 e1-6. doi: [10.1016/j.ajog.2012.06.049](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.06.049) PMID: [22818875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22818875/)
11. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes care*. 2002; 25(10):1862–8. PMID: [12351492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12351492/)

12. Florez JC, Price AL, Campbell D, Riba L, Parra MV, Yu F, et al. Strong association of socioeconomic status with genetic ancestry in Latinos: implications for admixture studies of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009; 52(8):1528–36. doi: [10.1007/s00125-009-1412-x](https://doi.org/10.1007/s00125-009-1412-x) PMID: [19526211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19526211/)
13. Replication DIG, Meta-analysis C. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nature genetics*. 2014; 46(3):234–44. doi: [10.1038/ng.2897](https://doi.org/10.1038/ng.2897) PMID: [24509480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24509480/)
14. The STDC. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*. 2013.
15. Watanabe RM, Allayee H, Xiang AH, Trigo E, Hartiala J, Lawrence JM, et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. *Diabetes*. 2007; 56(5):1481–5. PMID: [17317761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17317761/)
16. Guzman-Flores JM, Escalante M, Sanchez-Corona J, Garcia-Zapian AG, Cruz-Quevedo EG, Munoz-Valle JF, et al. Association analysis between -308G/A and -238G/A TNF-alpha gene promoter polymorphisms and insulin resistance in Mexican women with gestational diabetes mellitus. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2013; 61(2):265–9.
17. Reyes-Lopez R, Perez-Luque E, Malacara JM. Metabolic, hormonal characteristics, and genetic variants of TCF7L2 associated with development of gestational diabetes mellitus in Mexican women. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2014.
18. Monroy VS, Diaz CA, Trenado LM, Peralta JM, Soto SM. Thr130Ile Polymorphism of HNF4A Gene Is Associated With Gestational Diabetes Mellitus in Mexican Population. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2014; 62(3):632–4.
19. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1982; 144(7):768–73. PMID: [7148898](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7148898/)
20. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes care*. 1998; 21(12):2191–2. PMID: [9839117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9839117/)
21. Kanauchi M. A new index of insulin sensitivity obtained from the oral glucose tolerance test applicable to advanced type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2002; 25(10):1891–2. PMID: [12351505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12351505/)
22. Chelbi ST, Wilson ML, Veillard AC, Ingles SA, Zhang J, Mondon F, et al. Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases. *Human molecular genetics*. 2012; 21(9):1968–78. doi: [10.1093/hmg/dds006](https://doi.org/10.1093/hmg/dds006) PMID: [22246292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22246292/)
23. Cho YS, Chen CH, Hu C, Long J, Ong RT, Sim X, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nature genetics*. 2012; 44(1):67–72.
24. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nature genetics*. 2010; 42(2):105–16. doi: [10.1038/ng.520](https://doi.org/10.1038/ng.520) PMID: [20081858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081858/)
25. Enns JE, Taylor CG, Zahradka P. Variations in Adipokine Genes AdipoQ, Lep, and LepR are Associated with Risk for Obesity-Related Metabolic Disease: The Modulatory Role of Gene-Nutrient Interactions. *Journal of obesity*. 2011; 2011:168659. doi: [10.1155/2011/168659](https://doi.org/10.1155/2011/168659) PMID: [21773001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21773001/)
26. Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. 2011; 473(7345):43–9. doi: [10.1038/nature09906](https://doi.org/10.1038/nature09906) PMID: [21441907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21441907/)
27. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007; 316(5826):889–94. PMID: [17434869](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17434869/)
28. Imamura M, Iwata M, Maegawa H, Watada H, Hirose H, Tanaka Y, et al. Genetic variants at CDC123/CAMK1D and SPRY2 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*. 2011; 54(12):3071–7. doi: [10.1007/s00125-011-2293-3](https://doi.org/10.1007/s00125-011-2293-3) PMID: [21909839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21909839/)
29. Kong A, Steinthorsdottir V, Masson G, Thorleifsson G, Sulem P, Besenbacher S, et al. Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature*. 2009; 462(7275):868–74. doi: [10.1038/nature08625](https://doi.org/10.1038/nature08625) PMID: [20016592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20016592/)
30. Kwak SH, Park BL, Kim H, German MS, Go MJ, Jung HS, et al. Association of variations in TPH1 and HTR2B with gestational weight gain and measures of obesity. *Obesity*. 2012; 20(1):233–8. doi: [10.1038/oby.2011.253](https://doi.org/10.1038/oby.2011.253) PMID: [21836641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21836641/)
31. Lin Y, Li P, Cai L, Zhang B, Tang X, Zhang X, et al. Association study of genetic variants in eight genes/loci with type 2 diabetes in a Han Chinese population. *BMC medical genetics*. 2010; 11:97. doi: [10.1186/1471-2350-11-97](https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-97) PMID: [20550665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20550665/)

32. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nature genetics*. 2008; 40(6):768–75. doi: [10.1038/ng.140](https://doi.org/10.1038/ng.140) PMID: [18454148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18454148/)
33. Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segre AV, Steinthorsdottir V, et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nature genetics*. 2012; 44(9):981–90. doi: [10.1038/ng.2383](https://doi.org/10.1038/ng.2383) PMID: [22885922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22885922/)
34. Okada Y, Kubo M, Ohmiya H, Takahashi A, Kumasaka N, Hosono N, et al. Common variants at CDKAL1 and KLF9 are associated with body mass index in east Asian populations. *Nature genetics*. 2012; 44(3):302–6. doi: [10.1038/ng.1086](https://doi.org/10.1038/ng.1086) PMID: [22344221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22344221/)
35. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nature genetics*. 2009; 41(1):77–81. doi: [10.1038/ng.290](https://doi.org/10.1038/ng.290) PMID: [19060907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19060907/)
36. Saxena R, Elbers CC, Guo Y, Peter I, Gaunt TR, Mega JL, et al. Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci. *American journal of human genetics*. 2012; 90(3):410–25. doi: [10.1016/j.ajhg.2011.12.022](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.022) PMID: [22325160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22325160/)
37. Souren NY, Paulussen AD, Steyls A, Loos RJ, Stassen AP, Gielen M, et al. Common SNPs in LEP and LEPR associated with birth weight and type 2 diabetes-related metabolic risk factors in twins. *International journal of obesity*. 2008; 32(8):1233–9. doi: [10.1038/ijo.2008.68](https://doi.org/10.1038/ijo.2008.68) PMID: [18490929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18490929/)
38. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature genetics*. 2010; 42(11):937–48. doi: [10.1038/ng.686](https://doi.org/10.1038/ng.686) PMID: [20935630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20935630/)
39. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nature genetics*. 2009; 41(1):18–24. doi: [10.1038/ng.274](https://doi.org/10.1038/ng.274) PMID: [19079260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19079260/)
40. Tsai FJ, Yang CF, Chen CC, Chuang LM, Lu CH, Chang CT, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility variants for type 2 diabetes in Han Chinese. *PLoS genetics*. 2010; 6(2): e1000847. doi: [10.1371/journal.pgen.1000847](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000847) PMID: [20174558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20174558/)
41. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nature genetics*. 2008; 40(9):1098–102. doi: [10.1038/ng.208](https://doi.org/10.1038/ng.208) PMID: [18711366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18711366/)
42. Urbanek M, Hayes MG, Lee H, Freathy RM, Lowe LP, Ackerman C, et al. The role of inflammatory pathway genetic variation on maternal metabolic phenotypes during pregnancy. *PloS one*. 2012; 7(3): e32958. doi: [10.1371/journal.pone.0032958](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032958) PMID: [22479352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22479352/)
43. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nature genetics*. 2010; 42(7):579–89. doi: [10.1038/ng.609](https://doi.org/10.1038/ng.609) PMID: [20581827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20581827/)
44. Wang Y, Nie M, Li W, Ping F, Hu Y, Ma L, et al. Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. *PloS one*. 2011; 6(11):e26953. doi: [10.1371/journal.pone.0026953](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026953) PMID: [22096510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22096510/)
45. Weedon MN, Schwarz PE, Horikawa Y, Iwasaki N, Illig T, Holle R, et al. Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *American journal of human genetics*. 2003; 73(5):1208–12. PMID: [14574648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14574648/)
46. Wen W, Cho YS, Zheng W, Dorajoo R, Kato N, Qi L, et al. Meta-analysis identifies common variants associated with body mass index in east Asians. *Nature genetics*. 2012; 44(3):307–11. doi: [10.1038/ng.1087](https://doi.org/10.1038/ng.1087) PMID: [22344219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22344219/)
47. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nature genetics*. 2009; 41(1):25–34. doi: [10.1038/ng.287](https://doi.org/10.1038/ng.287) PMID: [19079261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19079261/)
48. Winckler W, Weedon MN, Graham RR, McCarroll SA, Purcell S, Almgren P, et al. Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007; 56(3):685–93. PMID: [17327436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17327436/)
49. Yamauchi T, Hara K, Maeda S, Yasuda K, Takahashi A, Horikoshi M, et al. A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B. *Nature genetics*. 2010; 42(10):864–8. doi: [10.1038/ng.660](https://doi.org/10.1038/ng.660) PMID: [20818381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20818381/)
50. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nature genetics*. 2008; 40(5):638–45. doi: [10.1038/ng.120](https://doi.org/10.1038/ng.120) PMID: [18372903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18372903/)
51. Galanter JM, Fernandez-Lopez JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernandez-Rozadilla C, Via M, et al. Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture

- throughout the Americas. *PLoS genetics*. 2012; 8(3):e1002554. doi: [10.1371/journal.pgen.1002554](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002554) PMID: [22412386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22412386/)
52. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature genetics*. 2006; 38(8):904–9. PMID: [16862161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16862161/)
 53. Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*. 2009; 9(5):1322–32. doi: [10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x) PMID: [21564903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21564903/)
 54. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*. 2007; 81(3):559–75. PMID: [17701901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701901/)
 55. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21(2):263–5. PMID: [15297300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15297300/)
 56. Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Statistics in medicine*. 2002; 21(1):35–50. PMID: [11782049](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11782049/)
 57. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010; 467(7319):1061–73. doi: [10.1038/nature09534](https://doi.org/10.1038/nature09534) PMID: [20981092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20981092/)
 58. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics*. 2013; 14:128. doi: [10.1186/1471-2105-14-128](https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128) PMID: [23586463](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23586463/)
 59. Chelala C, Khan A, Lemoine NR. SNPnexus: a web database for functional annotation of newly discovered and public domain single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics*. 2009; 25(5):655–61. doi: [10.1093/bioinformatics/btn653](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn653) PMID: [19098027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19098027/)
 60. Qiu C, Rudra C, Austin MA, Williams MA. Association of gestational diabetes mellitus and low-density lipoprotein (LDL) particle size. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2007; 56(5):571–8. PMID: [17223732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17223732/)
 61. Rizzo M, Berneis K, Altinova AE, Toruner FB, Akturk M, Ayvaz G, et al. Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in women with gestational diabetes. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*. 2008; 25(12):1406–11. doi: [10.1111/j.1464-5491.2008.02613.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02613.x) PMID: [19046238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19046238/)
 62. Sanchez-Vera I, Bonet B, Viana M, Quintanar A, Martin MD, Blanco P, et al. Changes in plasma lipids and increased low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in pregnancies complicated by gestational diabetes: consequences of obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 2007; 56(11):1527–33. PMID: [17950104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17950104/)
 63. Mao H, Li Q, Gao S. Meta-analysis of the relationship between common type 2 diabetes risk gene variants with gestational diabetes mellitus. *PloS one*. 2012; 7(9):e45882. doi: [10.1371/journal.pone.0045882](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045882) PMID: [23029294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23029294/)
 64. Zhang C, Bao W, Rong Y, Yang H, Bowers K, Yeung E, et al. Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Human reproduction update*. 2013; 19(4):376–90. doi: [10.1093/humupd/dmt013](https://doi.org/10.1093/humupd/dmt013) PMID: [23690305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23690305/)
 65. Groop L. Open chromatin and diabetes risk. *Nature genetics*. 2010; 42(3):190–2. doi: [10.1038/ng0310-190](https://doi.org/10.1038/ng0310-190) PMID: [20179731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20179731/)
 66. Savic D, Ye H, Aneas I, Park SY, Bell GI, Nobrega MA. Alterations in TCF7L2 expression define its role as a key regulator of glucose metabolism. *Genome research*. 2011; 21(9):1417–25. doi: [10.1101/gr.123745.111](https://doi.org/10.1101/gr.123745.111) PMID: [21673050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21673050/)
 67. McCarthy MI, Rorsman P, Gloyn AL. TCF7L2 and diabetes: a tale of two tissues, and of two species. *Cell metabolism*. 2013; 17(2):157–9. doi: [10.1016/j.cmet.2013.01.011](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.011) PMID: [23395164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23395164/)
 68. Kuzmicki M, Telejko B, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Kalejta K, Lemancewicz A, Zdrodowski M, et al. The expression of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) in fat and placental tissue from women with gestational diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2011; 94(2):e43–6. doi: [10.1016/j.diabres.2011.07.033](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.07.033) PMID: [21855162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21855162/)
 69. Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology*. 2005; 20:408–16. PMID: [16287990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16287990/)
 70. Korostowski L, Sedlak N, Engel N. The Kcnq1ot1 long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of Kcnq1, but does not regulate its imprinting in the developing heart. *PLoS genetics*. 2012; 8(9):e1002956. doi: [10.1371/journal.pgen.1002956](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002956) PMID: [23028363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23028363/)
 71. Travers ME, Mackay DJ, Dekker Nitert M, Morris AP, Lindgren CM, Berry A, et al. Insights into the molecular mechanism for type 2 diabetes susceptibility at the KCNQ1 locus from temporal changes in

- imprinting status in human islets. *Diabetes*. 2013; 62(3):987–92. doi: [10.2337/db12-0819](https://doi.org/10.2337/db12-0819) PMID: [23139357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23139357/)
72. Rosengren AH, Braun M, Mahdi T, Andersson SA, Travers ME, Shigeto M, et al. Reduced insulin exocytosis in human pancreatic beta-cells with gene variants linked to type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012; 61(7):1726–33. doi: [10.2337/db11-1516](https://doi.org/10.2337/db11-1516) PMID: [22492527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22492527/)
 73. Park S, Kim MY, Baik SH, Woo JT, Kwon YJ, Daily JW, et al. Gestational diabetes is associated with high energy and saturated fat intakes and with low plasma visfatin and adiponectin levels independent of prepregnancy BMI. *European journal of clinical nutrition*. 2013; 67(2):196–201. doi: [10.1038/ejcn.2012.207](https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.207) PMID: [23385969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23385969/)
 74. Krishnaveni GV, Hill JC, Veena SR, Bhat DS, Wills AK, Karat CL, et al. Low plasma vitamin B12 in pregnancy is associated with gestational 'diabesity' and later diabetes. *Diabetologia*. 2009; 52(11):2350–8. doi: [10.1007/s00125-009-1499-0](https://doi.org/10.1007/s00125-009-1499-0) PMID: [19707742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19707742/)
 75. Lacroix M, Battista MC, Doyon M, Houde G, Menard J, Ardilouze JL, et al. Lower vitamin D levels at first trimester are associated with higher risk of developing gestational diabetes mellitus. *Acta diabetologica*. 2014.
 76. Kulzer JR, Stitzel ML, Morken MA, Huyghe JR, Fuchsberger C, Kuusisto J, et al. A Common Functional Regulatory Variant at a Type 2 Diabetes Locus Upregulates ARAP1 Expression in the Pancreatic Beta Cell. *American journal of human genetics*. 2014; 94(2):186–97. doi: [10.1016/j.ajhg.2013.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.12.011) PMID: [24439111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24439111/)
 77. Nielsen T, Sparso T, Grarup N, Jorgensen T, Pisinger C, Witte DR, et al. Type 2 diabetes risk allele near CENTD2 is associated with decreased glucose-stimulated insulin release. *Diabetologia*. 2011; 54(5):1052–6. doi: [10.1007/s00125-011-2054-3](https://doi.org/10.1007/s00125-011-2054-3) PMID: [21267535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21267535/)
 78. Nagorny C, Lyssenko V. Tired of diabetes genetics? Circadian rhythms and diabetes: the MTNR1B story? *Current diabetes reports*. 2012; 12(6):667–72. doi: [10.1007/s11892-012-0327-y](https://doi.org/10.1007/s11892-012-0327-y) PMID: [23015324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23015324/)
 79. Chen YC, Sheen JM, Tiao MM, Tain YL, Huang LT. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14(3):5380–401. doi: [10.3390/ijms14035380](https://doi.org/10.3390/ijms14035380) PMID: [23466884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23466884/)