



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN  
SLC16A11 EN MADRES DIAGNOSTICADAS CON  
DIABETES *MELLITUS* GESTACIONAL Y EN SUS  
RECIÉN NACIDOS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**EDUARDO YAIR VARGAS REYES**

**ASESORES:**

**DRA. RITA ANGÉLICA GÓMEZ DÍAZ  
M.C. VICTOR MAURICIO HUERTA PADILLA  
M.C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

Cd. Mx. 2023



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.

## ÍNDICE GENERAL

<b>GLOSARIO</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Introducción a la diabetes <i>mellitus</i> gestacional</b> .....	<b>6</b>
1.1.1 Definición de diabetes <i>mellitus</i> .....	6
1.1.2 Definición de diabetes <i>mellitus</i> gestacional.....	6
1.1.3 Epidemiología .....	7
1.1.4 Criterios de diagnóstico.....	7
1.1.5 Complicaciones de la diabetes gestacional .....	10
1.1.6 Regulación típica de la glucosa durante el embarazo.....	11
<b>1.2 Patogénesis de la diabetes <i>mellitus</i> gestacional</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 El papel de la inflamación en la resistencia a la insulina.....	11
1.2.2 Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	12
1.2.3 Presentación de antígenos y el papel de las adipocitocinas en la diabetes gestacional.....	14
1.2.4 Otras adipocitocinas implicadas en la diabetes gestacional.....	16
1.2.5 Adaptación de las células $\beta$ en el páncreas durante la diabetes gestacional .....	19
1.2.6 Diabetes <i>mellitus</i> gestacional y diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	19
<b>1.3 El papel de la genética y la epigenética en la diabetes gestacional</b> ..	<b>21</b>
1.3.1 Expresión génica .....	22
1.3.2 Regulación de la expresión génica .....	23
1.3.3 Polimorfismos de un solo nucleótido en la regulación génica.....	24
1.3.4 Epigenética .....	25
1.3.5 Metilación del DNA .....	25
1.3.6 Modificaciones epigenéticas durante el embarazo .....	27

---

---

1.3.7 Las células de sangre periférica como modelo de estudio en la expresión génica.....	28
1.3.8 Factores genéticos de riesgo en la diabetes gestacional.....	28
<b>1.4 El gen SLC16A11 .....</b>	<b>32</b>
1.4.1 SLC16A11 como factor genético de riesgo para la diabetes.....	33
<b>1.5 Fundamentos de las técnicas en el laboratorio de biología molecular .....</b>	<b>37</b>
1.5.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos .....	37
1.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR convencional) .....	37
1.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa punto final de transcripción Inversa (RT-PCR) .....	38
1.5.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	39
1.5.5 Análisis del estado de metilación de genes específicos de interés por conversión con bisulfito de sodio .....	40
1.5.6 Kits comerciales de conversión con bisulfito de sodio .....	43
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>45</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1 Objetivo general .....	46
3.2 Objetivos específicos.....	46
<b>4. HIPOTÉISIS .....</b>	<b>47</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
5.1 Criterios de inclusión .....	47
5.2 Criterios de exclusión .....	47
5.3 Criterios de eliminación .....	47
5.4 Colección de muestras .....	47
5.4 Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	48
5.6 Purificación del DNA.....	49
5.7 Purificación del RNA.....	49
5.8 Conversión con bisulfito .....	50

---

---

5.9 Diseño de oligonucleótidos.....	50
5.10 Amplificación del gen SLC16A11 .....	50
5.11 Electroforesis en gel de agarosa .....	52
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>7. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>10.REFERENCIAS.....</b>	<b>67</b>

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama simplificado de la señalización de la insulina .....	14
Figura 2. Factores de riesgo y consecuencias de la DMG.....	18
Figura 3. Células $\beta$ , glucosa en sangre y sensibilidad a la insulina en el embarazo normal y durante la DMG .....	20
Figura 4. Expresión génica.....	23
Figura 5. La secuencia objetivo principal para la metilación del DNA en mamíferos son los dinucleótidos 5'-CpG-3' .....	26
Figura 6. Haplotipos de SLC16A11 y sus frecuencias en distintas poblaciones .....	34
Figura 7. Los casos con el haplotipo de riesgo desarrollas DMT2 más jóvenes aún sin obesidad .....	35
Figura 8. Esquema de la conversión de DNA con bisulfito .....	42
Figura 9. Amplificación por PCR del DNA convertido con bisulfito .....	43
Figura 10. Programa de amplificación de la secuencia del gen SLC16A11 utilizando la técnica de PCR punto final .....	51
Figura 11. Programa de amplificación de la secuencia de cDNA de SLC16A11 utilizado en la técnica de RT-PCR.....	52
Figura 12. Productos de la amplificación del DNA de los binomios madre/recién nacido por PCR punto final .....	54
Figura 13. Productos de la amplificación del cDNA de los binomios madre/recién nacido por RT-PCR .....	56

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diferentes criterios de diagnóstico para la diabetes gestacional.....	<b>9</b>
<b>Tabla 2.</b> Polimorfismos genéticos predisponentes a DMG .....	<b>29</b>
<b>Tabla 3.</b> Categorización de los miembros de la familia SLC16 .....	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b> Frecuencias alélicas de las variantes genéticas asociadas con el riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados en mujeres mexicanas, así como los loci SLC16A11 .....	<b>36</b>
<b>Tabla 5.</b> Comparación de algunos kits comerciales para la conversión con bisulfito .....	<b>44</b>
<b>Tabla 6.</b> Interpretación de los posibles resultados a obtener de la conversión con bisulfito y de las pruebas de PCR punto final de los binomios M/RN .....	<b>53</b>

---

---





## Glosario

Abreviatura	Significado
<b>ADA</b>	American Diabetes Association
<b>AMT</b>	Macrófagos del tejido adiposo
<b>BLN</b>	Buffer de lisis nuclear
<b>BSG</b>	Basignina
<b>CD</b>	Grupos de diferenciación leucocitaria
<b>cDNA</b>	DNA de cadena complementaria
<b>CFRD</b>	Diabetes relacionada con fibrosis quística
<b>CIITA</b>	Transactivador de clase II
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>CpG</b>	Citosina-fosfato-guanina
<b>CS</b>	Clínicamente sana
<b>DM</b>	Diabetes <i>mellitus</i>
<b>DMG</b>	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
<b>DMT1</b>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
<b>DMT2</b>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferasa
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMB</b>	Embigina
<b>ENSANUT</b>	Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición
<b>GCK</b>	Glucocinasa
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>GWAS</b>	Estudio de asociación del genoma completo
<b>HbA1C</b>	Hemoglobina glucosilada
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>HOMA-IR</b>	Índice de resistencia a la insulina

<b>IFN</b>	Interferón
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento semejante a la insulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS</b>	Sustrato receptor de insulina
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>M/RN</b>	Madre/recién nacido
<b>MCT</b>	Transportador de monocarboxilatos
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>miRNA</b>	micro RNA
<b>MPC</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>OGTT</b>	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>RCLB</b>	Buffer de lisis de eritrocitos
<b>RN</b>	Recién nacido
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SIGMA</b>	Consortio de Genética de Diabetes tipo 2 de la Iniciativa Sigma en Medicina Genómica para las Américas
<b>SNA</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Polimorfismos de un solo nucleótido
<b>TBE</b>	Tris Boratos EDTA
<b>Th</b>	Linfocitos T cooperadores

<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral
<b>Treg</b>	Linfocitos T reguladores
<b>UmAlb</b>	Microalbúmina en orina
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad

## RESUMEN

La prevalencia de diabetes *mellitus* gestacional (DMG) en México se ha incrementado a través de los años. A pesar de ser una enfermedad controlable y que tiende a desaparecer al final de la gestación, es un factor de riesgo que predispone a madres gestantes y a su descendencia a desarrollar diabetes *mellitus* tipo 2, afectando considerablemente su calidad de vida; destacando, además, los importantes recursos económicos que el sistema público de salud requiere para su atención. La asociación fisiopatológica y los estudios epidemiológicos que demuestran la alta prevalencia de la diabetes *mellitus* tipo 2, años o décadas después de haber padecido diabetes gestacional, sugieren que ambas enfermedades poseen una etiología genética común. Se ha identificado recientemente un haplotipo de riesgo en el gen SLC16A11, el cual está involucrado en alteraciones del metabolismo lipídico y la resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2; sin embargo, continúa sin demostrarse la existencia de una posible alteración en la expresión de SLC16A11 que se correlacione con la diabetes *mellitus* gestacional.

En el presente trabajo se evaluó la expresión del gen SCL16A11 en muestras de sangre periférica de madres diagnosticadas con diabetes DMG, así como de pacientes clínicamente sanas (CS) y de sangre de cordón umbilical de sus recién nacidos utilizando la técnica de RT-PCR, PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa con el objetivo de observar si existe una alteración en la expresión del gen SLC16A11 durante la DMG. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de madres diagnosticadas con DMG, CS y la expresión de SLC16A11 ( $p= 1$ ), ni entre el grupo de RN del grupo de madres diagnosticadas con DMG y CS ( $p= 1$ ), por lo cual se sugiere que no existe una alteración en la expresión de SLC16A11 que se correlacione con la DMG en los tejidos estudiados.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes *mellitus* gestacional (DMG) se asocia a complicaciones clínicas materno-neonatales, entre ellas, un mayor riesgo de padecer obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (DMT2), además del posible nacimiento prematuro, macrosomía y muerte fetal. Los malos hábitos alimentarios y el sedentarismo de la población en edad reproductiva están relacionados con la alta prevalencia de la DMG, sin embargo, pertenecer a un grupo étnico con una tasa alta de DMT2 y un historial de DMG en un embarazo anterior son factores de riesgo importantes.

En las últimas dos décadas se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobre la etiología genética y epigenética de la DMG como respuesta a la alta incidencia de esta enfermedad que afecta considerablemente la salud y calidad de vida de las mujeres embarazadas y de su descendencia.

El gen SLC16A11, que codifica una proteína transportadora de monocarboxilatos unido a protones, está involucrado en el metabolismo lipídico de los hepatocitos humanos primarios. Recientemente, se ha identificado un haplotipo de riesgo del gen SCL16A11 asociado con una disminución de su expresión en células hepáticas y una posible contribución en el desarrollo de la DMT2 en una población de ascendencia nativo americana. Las alteraciones en el metabolismo lipídico y la resistencia a la insulina, como resultado de la disminución en la expresión de SCL6A11, forman parte de la compleja fisiopatología de la DMG y la DMT2.

El desarrollo fetal anormal causado por la DMG y el alto riesgo de padecer DMT2 entre las mujeres embarazadas ha alentado los esfuerzos por dilucidar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la DMG y es por ello que el estudio de la expresión de los genes asociados a esta enfermedad resulta de gran importancia en el sector salud, contribuyendo en su prevención, diagnóstico y tratamiento

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Introducción a la diabetes *mellitus* gestacional

### 1.1.1 Definición de diabetes

La Diabetes *mellitus* (DM) es una enfermedad endocrino metabólica, poligénica, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que caracteriza a un grupo heterogéneo de patologías cuya acción provoca hiperglucemia, causada por la destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$  del páncreas, sin secreción de insulina (tipo 1), por la resistencia a la hormona o una alteración en la secreción de la misma (tipo 2), lo que se traduce en la intolerancia a la glucosa. (Parodi & Jose, 2016). Durante el embarazo pueden presentarse un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia a consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, denominada diabetes *mellitus* gestacional (DMG), como se explica a continuación.

### 1.1.2 Definición de diabetes *mellitus* gestacional

La diabetes *mellitus* gestacional es un tipo de diabetes que se caracteriza por presentar intolerancia a la glucosa que resulta en hiperglucemia de severidad variable con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo (Baz, Jean-Pierre, & Jean-François, 2016), detectada generalmente a finales del segundo trimestre (de 13 a 26 semanas completas de gestación) o principios del tercer trimestre (de 27 a 40 semanas) y que puede o no remitir después del parto. (McIntyre, Catalano, Cuilin, & et al, 2019)

### 1.1.3 Epidemiología

La epidemia de la diabetes *mellitus* es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. Se calcula que en el mundo existen más de 180 millones de personas con diabetes y es probable que esta cifra aumente a más del doble para 2030. Hasta el 2019, 351,7 millones de personas en edad activa (20- 64 años) tenían diabetes diagnosticada o sin diagnosticar (International Diabetes Federation, 2019).

Datos de las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición (ENSANUT) informan que la diabetes en México ha seguido una tendencia ascendente y un rápido aumento en la prevalencia en los últimos años, pasando de 4.6% en personas mayores de 20 años en 2000 hasta 10.4% en 2018, (ENSANUT, 2018)

La prevalencia de la DMG ha aumentado en la última década y varía entre las diferentes poblaciones étnicas; en mujeres caucásicas es de 0.4%, en mujeres negras de 1.5%, en mujeres asiáticas de 3.5-7.3%, en mujeres de la India de 4.4% y en mujeres nativas de América de 16% (González-Ruiz, Rodríguez-Bandala, Salcedo-Vargas, et al. 2014).

En nuestro país, la prevalencia se reporta entre el 8.7 a 17.7%. La mujer mexicana tiene una mayor posibilidad de desarrollar DMG por pertenecer a un grupo étnico de alto riesgo (mestizo-americana), el cual se incrementa si es mayor de 25 años, presenta sobrepeso u obesidad, antecedentes familiares de DM, entre otros factores de riesgo. (Quintero-Medrano, García-Benavente, Valle-Leal, et al, 2018)

### 1.1.4 Criterios de diagnóstico

Desde 2013, la Organización Mundial de la Salud ha promovido y adoptado el criterio de diagnóstico para la DMG establecido en 2010 por la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo (IADPSG), el cual se realiza en la primer consulta prenatal, mediante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) tras un ayuno nocturno de 8 horas (se determina la glucosa

plasmática en ayunas y luego dos horas después de ingerir una solución con 75 g de glucosa) entre las semanas 24 y 28 de la gestación (Organización Mundial de la Salud, 2019). El diagnóstico se establece cuando uno de los valores plasmáticos se encuentra elevado:

Valores de referencia:

- Glucosa plasmática en ayuno - >92 mg/dl (5.1 mmol/L)
- Glucosa 1 horas post carga - >180 mg/dl (10.0 mmol/L)
- Glucosa 2 horas post carga - >153 mg/d (8.5 mmol/L)

Sin embargo, estos límites glucémicos son más bajos que en otros criterios (Tabla 1) y solo se requiere una lectura de glucosa anormal para el diagnóstico, lo que ha resultado en un aumento drástico en el número de casos de DMG y los costos de atención médica asociados a ésta (Plows, Stanley, Baker, et al. 2018). Por esta razón, se ha discutido entre la comunidad científica sobre si los criterios de la IADPSG deben modificarse para realizar las pruebas solo a mujeres en riesgo. Por ejemplo, la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomienda el cribado sólo en pacientes de alto y medio riesgo (es decir, aquellas que son obesas, tienen un fuerte historial familiar de DMT2, tienen un embarazo previo con DMG o macrosomía, son intolerantes a la glucosa o tienen glucosuria y/o pertenecen a un grupo étnico de riesgo) tan pronto como sea posible usando una OGTT de 75 g y nuevamente a las 24-28 semanas de gestación si el resultado de la prueba de detección original fue negativo (American Diabetes Association, 2019).



Tabla 1

Diferentes criterios de diagnóstico para la diabetes <i>mellitus</i> gestacional								
Criterio	Tipo de Embarazo	Momento de la gestación	Pasos	Carga Glc (g)	Umbral glucosa (mmol/L)			
					A	1h	2h	3h
O'Sullivan, 1964	Todos	24-28 semanas	2	100	5.0	9.2	8.1	6.9
WHO, 1999	Todos	24-28 semanas	1	75	7.0	-	7.8	-
ADA, 2004	Alto y medio riesgo	14-18 semanas para alto riesgo, 28-32 para medio riesgo	2	100	5.3	10.0	8.6	7.8
NICE	Alto riesgo	Tan pronto como sea posible	1	75	5.6	-	7.8	-
IADPSG, 2010 WHO, 2013 ADA, 2016	Todos	24-28 semanas	1	75	5.1	10.0	8.5	-

**Tabla 1. Diferentes criterios de diagnóstico para la diabetes *mellitus* gestacional.** Se muestran los criterios de diagnóstico utilizando la prueba de tolerancia a glucosa (OGTT) para la diabetes *mellitus* gestacional de acuerdo a distintos estudios realizados por instituciones de salud a través de los años. **IADPSG**, Asociación Internacional de Grupos de Estudio de Diabetes y Embarazo. **WHO**, Organización Mundial de la Salud. **ADA**, Asociación Americana de Diabetes. **NICE**, Instituto Nacional para la Calidad de la Sanidad y de la Asistencia. Fuente: Plows, J., Stanley, J., Baker, P., et al. (2018). *The Pathophysiology of Gestational Diabetes mellitus*. International Journal of Molecular Sciences.

El uso de biomarcadores moleculares ha sido considerado como una alternativa para el diagnóstico de la DMG. De acuerdo con los estudios de Zhiying, et al. (2020), el contenido de microalbúmina en orina (UmAlb) en el primer trimestre es inferior a 20 mg / 24 h. A medida que continúa el embarazo, la UmAlb puede aumentar ligeramente o permanecer en el rango normal, sin embargo, se observó que el nivel de UmAlb durante la DMG es más alto que en la gestación normal. Se sugiere que el aumento de la excreción de UmAlb es una de las razones de la progresión de la

DMG, por lo cual podría ser uno de los biomarcadores más efectivos para su diagnóstico oportuno y, además, predecir el daño renal, el cual representa la primera manifestación clínica del daño microvascular renal relacionado con DMG. (Zhiying, Yaping, & Mei, 2020)

El papel de las adipocinas como biomarcadores en mujeres diagnosticadas con DMG en el segundo trimestre del embarazo continúa siendo motivo de debate. Si bien algunos estudios informan mayores niveles de leptina y resistina en mujeres con DMG, no existe suficiente evidencia que lo confirme. Del mismo modo, se ha observado que los niveles de visfatina son significativamente menores, similares o mayores en mujeres con DMG en comparación con mujeres embarazadas sanas con la misma edad gestacional. Por otro lado, la mayoría de los estudios muestran que los niveles de adiponectina y grelina se reducen en mujeres con DMG. (Lobo, Torloni, & Mattar, 2019)

### **1.1.5 Complicaciones de la diabetes gestacional**

Como menciona Parodi y Jose (2016), debido a las alteraciones metabólicas que se producen cuando no existe un control glucémico adecuado, la DMG se asocia a una mayor incidencia de resultados perinatales adversos. También se ha reportado un aumento en la posibilidad de tener descendencia con malformaciones congénitas de todo tipo, sobre todo relacionadas con la descompensación de las cifras de glucemia. La mujer diagnosticada con DMG tiene mayor riesgo de presentar hipertensión gestacional, preeclampsia, parto por cesárea y se asocia con potenciales morbilidades. Así mismo posee el doble riesgo de desarrollar DMT2 posteriormente durante el transcurso de su vida. Se estima que hasta el 70% de las mujeres con DMG desarrollarán DMT2 dentro de los 22 a 28 años posteriores al embarazo. Los hijos de madres con DMG tienen mayor riesgo de presentar complicaciones metabólicas asociadas como hipoglicemia 20%, macrosomía 17%, hiperbilirrubinemia 5%, síndrome de distrés respiratorio 5%, malformaciones congénitas 5 a 12% y muerte neonatal. (Parodi & Jose, 2016)

### **1.1.6 Regulación típica de la glucosa durante el embarazo**

Durante el embarazo, existe una serie de adaptaciones metabólicas cuyo objetivo es el de mantener la homeostasis entre el feto y la madre, asegurando el desarrollo fetal y las necesidades nutricionales de la madre a través de la regulación de la glucosa. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas disminuyen en el primer trimestre de la gestación (posiblemente debido al efecto dilutorio por un aumento del volumen plasmático de la madre y por la alta demanda energética del feto), permanecen constantes en el segundo trimestre y posteriormente disminuyen en el tercero (Angueira, Ludvik, Reddy, et al. 2015). La sensibilidad a la insulina disminuye durante el periodo de utilización de la glucosa para alcanzar al final de ésta (de 34-36 semanas) un 50-60% del estado pregestacional (Baz, et al. 2016). La tasa de gluconeogénesis hepática en ayunas aumenta con el objetivo de compensar la disminución de glucosa en sangre, mientras que el aumento de los niveles de ácidos grasos contribuye a la disminución de la sensibilidad a la insulina para asegurar los niveles de glucosa en sangre necesarios durante los periodos de mayor demanda energética fetal. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas durante la gestación permanecen más bajos que los niveles en ayunas en el estado pregestacional, mientras que los niveles de glucosa postprandial se elevan en relación con el estado pregestacional (Angueira, et al. 2015). La producción endógena basal de glucosa (principalmente en hígado) aumenta en un 30% para satisfacer las necesidades energéticas en ayunas del embarazo en mujeres sanas al final de la gestación, sin embargo, puede observarse también un considerable aumento de los niveles de insulina en ayunas (McIntyre, et al, 2019).

## **1.2 Patogénesis de la diabetes *mellitus* gestacional**

### **1.2.1 El papel de la inflamación en la resistencia a la insulina**

La inflamación crónica y la resistencia a la insulina en la obesidad (considerado como factor de riesgo en la DMG) son el resultado de una actividad

anormal del tejido adiposo, cuyas células (adipocitos, fibroblastos, células endoteliales) se ha demostrado que expresan adipocitocinas o adipocinas (que incluyen quimiocinas, citocinas proinflamatorias y hormonas) que actúan como mediadores de la inflamación. Entre ellos, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MPC-1), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8 se han descrito como promotores de la resistencia a la insulina durante la DMG (Pantham, Aye, & Powe, 2015).

### **1.2.2. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

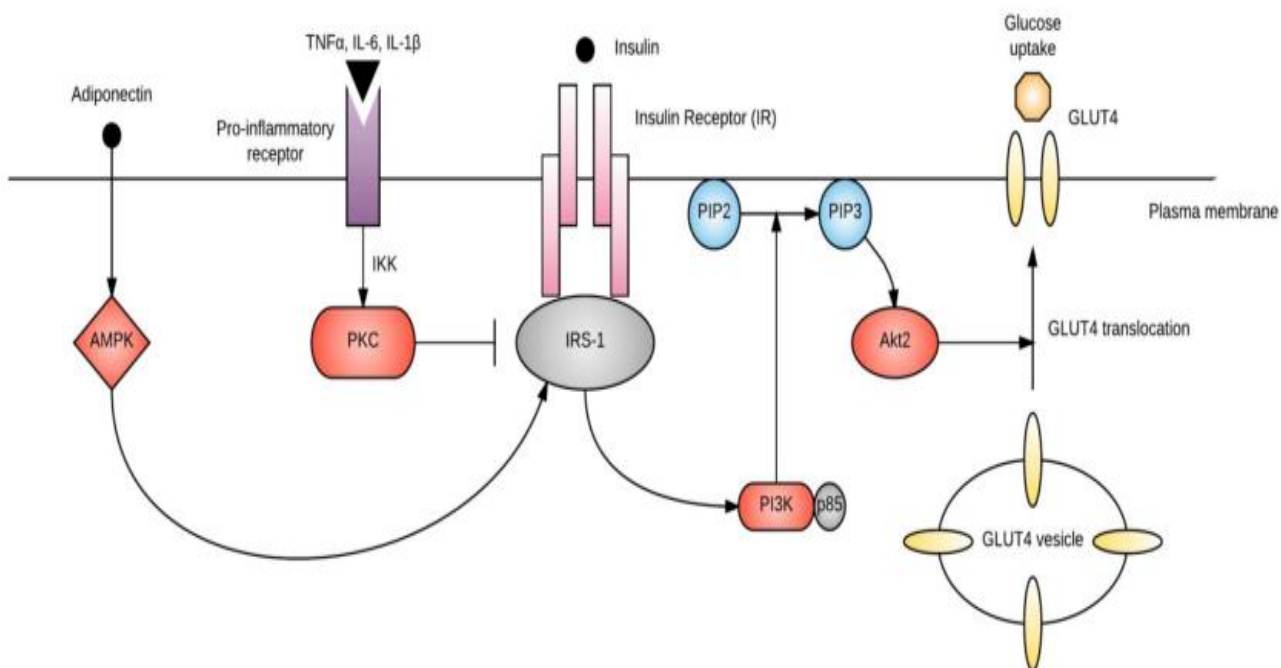
El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria expresada por monocitos y macrófagos en el tejido adiposo, aunque, en menor medida, los adipocitos también son capaces de sintetizarlo. La cantidad de macrófagos en el tejido adiposo se correlaciona con la masa corporal y el tamaño de los adipocitos. Junto con el elevado número de macrófagos en el tejido adiposo, la obesidad induce un cambio fenotípico en estas células de un estado de polarización antiinflamatorio M2 (predominante en ausencia de obesidad) a un estado de polarización proinflamatorio M1 (Jung & Myung-Sook, 2014) como resultado de la interacción del receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR-1) en macrófagos, con el TNF- $\alpha$  expresado en los adipocitos. Este cambio fenotípico induce en los macrófagos M1 la expresión de una mayor cantidad de TNF- $\alpha$  y otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 y quimiocinas MCP-1 y CCL3, además de CXL9 y CXCL10 (por exposición a IFN- $\gamma$ , también secretado por el perfil M1), producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), generación de NO, cambios fagolisosomales y un aumento en la expresión del MHC II, CD86 y de la presentación antigénica asociada con una respuesta de tipo Th1 (Pantham, et al. 2015).

De acuerdo con Świrska, Zwolak y Dudzińska (2018), el TNF- $\alpha$  promueve la resistencia a la insulina al suprimir la fosforilación de tirosina del receptor de insulina (IGF-1) y la unión del sustrato a la proteína adaptadora sustrato receptor de insulina-1 (IRS-1) ya que inhibe la acción de la enzima tirosina cinasa. Además, disminuye

la expresión del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) (también conocido como familia 2 de transportadores de solutos, transportador facilitador de glucosa miembro 1, o SLC2A1) en el tejido adiposo, músculos esqueléticos y músculo cardíaco. La actividad proinflamatoria del TNF- $\alpha$  en las células  $\beta$  del páncreas juega un papel vital en su apoptosis, contribuyendo así al desarrollo de la DMG. Durante la gestación, una elevada cantidad de TNF- $\alpha$  es secretada, particularmente en el 3° semestre, tanto en mujeres normogestantes como en embarazos complicados por DMG; sin embargo, niveles mayores de esta citosina pueden encontrarse en la DMG. También se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  no sólo se expresa en tejido adiposo, sino también en la placenta (Świrska, Zwolak, Dudzińska, et al. 2018).

En comparación con el embarazo normal, la tasa de transporte intracelular de glucosa durante la DMG se encuentra reducida en un 50%, sin embargo, la cantidad del IRS-1 no se observa alterada. La alteración en la expresión y/o fosforilación de reguladores en la señalización de la insulina como IRS-1, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y GLUT4 por citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  durante la DMG (Plows, et al, 2018) (Figura 1), en combinación con el aumento de los niveles de hormona de crecimiento placentaria (GH-V), cortisol, progesterona, y ácidos grasos contribuyen a la aparición de la resistencia a la insulina. La GH-V antagoniza la acción de la insulina a través del aumento de la subunidad reguladora alfa de fosfatidilinositol 3-cinasa (p85 $\alpha$ ), lo cual inhibe competitivamente a PI3K y la actividad asociada a IRS-1, reduciendo la translocación de GLUT-4 y el transporte de la glucosa en el músculo esquelético (Newbern & Freemark, 2011) mientras que los ácidos grasos saturados incrementan la concentración de diacilglicerol, activan a la proteína cinasa C (PKC) e inhiben la tirosina cinasa, IRS-1 y PI3K (Plows, et al. 2018).

Figura 1



**Figura 1. Diagrama simplificado de la señalización de la insulina.** La unión de la insulina al receptor de insulina (IR) activa el IRS-1. La adiponectina promueve la activación de IRS-1 a través de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), mientras que las citocinas proinflamatorias activan la proteína quinasa C (PKC) a través de la I $\kappa$ B cinasa (IKK), que inhibe el IRS-1. IRS-1 activa la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), que fosforila el fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3, 4, 5-fosfato (PIP3). PIP3 activa Akt2, que promueve la translocación de GLUT4 y el transporte de la glucosa en la célula. **Traducción:** *adiponectin* (adiponectina), *pro-inflammatory receptor* (receptor proinflamatorio), *insulin receptor* (receptor de insulina), *glucose uptake* (internalización de glucosa), *plasma membrane* (membrana plasmática), *translocation* (translocación), *vesicle* (vesícula). Fuente: Plows, J., Stanley, J., Baker, P., et al. (2018). *The Pathophysiology of Gestational Diabetes mellitus*. International Journal of Molecular Sciences.

### 1.2.3 Presentación de antígenos y el papel de las adipocitocinas en la diabetes gestacional

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos peptídicos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) de células

presentadoras de antígeno (CPA). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive* se diferencian en varias subpoblaciones o perfiles de polarización, como Th1, Th2, Th17 y reguladoras T (Treg). En general, la diferenciación de células T está regulada por una variedad de citocinas, que incluyen IFN- $\gamma$  para Th1, IL-4 para Th2, IL-6 y TGF- $\beta$  para Th17, y TGF- $\beta$  para Treg (Zhu & Paul, 2008). Los perfiles Th1 y Th17 median las respuestas proinflamatorias, mientras que los perfiles Th2 y Treg regulan las respuestas antiinflamatorias (Young, Jeong, Ham, et al. 2014).

En pacientes obesos se ha encontrado una regulación ascendente de genes relacionados al MHCII (p.ej. antígeno leucocitario humano HLA-DMB y -DPB) y el transactivador de clase II (CIITA), un regulador de la expresión de MHCII en tejido adiposo. Los adipocitos comparten características funcionales con los macrófagos, tales como la fagocitosis y la expresión de MHCII, citocinas y moléculas co-estimuladoras en respuesta al lipopolisacárido (LPS), lo cual sugiere un papel directo de los adipocitos en la respuesta inmune al actuar como células presentadoras de antígeno e influir en la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Hruskova & Biswas, 2013)

La leptina, adipocitocina secretada por el tejido adiposo y la placenta, cuya concentración asciende gradualmente alcanzando su máximo valor en la semana 28, regula la polarización a Th1 y estimula la secreción de IFN- $\gamma$ , lo cual induce la expresión de CIITA y MHCII en adipocitos. Los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, las citocinas proinflamatorias o el ingreso de alimento en el organismo que aumenta la glucosa circulante, inducen un aumento de insulina, la que a su vez estimula la producción de leptina. Como resultado, el aumento de leptina inhibe a la insulina y disminuye el apetito. (Robledo, 2010)

De acuerdo con Hrsukova & Biswas (2013), durante la fase temprana de la obesidad, los adipocitos actúan como CPA con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> liberando leptina, que regula la polarización a Th1 y la producción de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  induce la regulación ascendente de CIITA y MHCII en adipocitos que instigan la presentación de antígenos mediada por MHCII y una respuesta inflamatoria de tipo

Th1. Otros subconjuntos inmunes, como los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, Th17 y los linfocitos B (a través de la presentación de antígenos a linfocitos T residentes del tejido adiposo y anticuerpos patógenos), pueden contribuir a la inflamación. En la fase posterior de la obesidad, los macrófagos del tejido adiposo (AMT) son reclutados en respuesta a las quimiocinas (por ejemplo, CCL2), y el microambiente inflamatorio, potencialmente a través de IFN- $\gamma$  e IL-17, los polariza a un fenotipo M1. Al liberar citocinas inflamatorias como TNF e IL-1 $\beta$ , así como la presentación de antígenos a las células T, los AMT M1 amplifican aún más la inflamación del tejido adiposo, lo que conduce a la patogénesis. En condiciones de no obesidad, las células Th2 y T-reguladoras (Treg) juegan un papel primordial. Estas células, a través de la liberación de IL-4, IL-13 y IL-10, mantienen los AMT en un fenotipo M2. Los AMT M2, posiblemente a través de la liberación de citocinas antiinflamatorias, IL-10 y funciones *scavenger*, mantienen la homeostasis en el tejido adiposo. Se ha descrito que la IL-4 derivada de eosinófilos impulsa la polarización a M2 de ATM. También se sugiere que la IL-10 derivada de linfocitos B contribuya a este medio (Hruskova & Biswas, 2013). Con respecto a ello, Świrska, et al. (2018) se refiere a la adiponectina como una adipocitocina con actividad antiinflamatoria, que inhibe la producción de TNF- $\alpha$  estimulada por LPS en macrófagos, a través de la secreción de IL-10. La IL-10 también inhibe la secreción de IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  al promover la activación de macrófagos M2. El aclaramiento de las células apoptóticas por los macrófagos M2 protege al organismo de una inflamación sistémica. La expresión de adiponectina en el tejido adiposo disminuye por la presencia de TNF- $\alpha$  e IL-6. Esto explica por qué la concentración de adiponectina disminuye en estados relacionados con inflamación subclínica como la obesidad. (Świrska, Zwolak, Dudzińska, et al. 2018)

#### **1.2.4 Otras adipocitocinas implicadas en la diabetes gestacional**

**Quemerina:** Además de las adipocinas clásicas, incluidas la adiponectina y la leptina, se han evaluado otras adipocinas en el contexto de la DMG. Una de estas

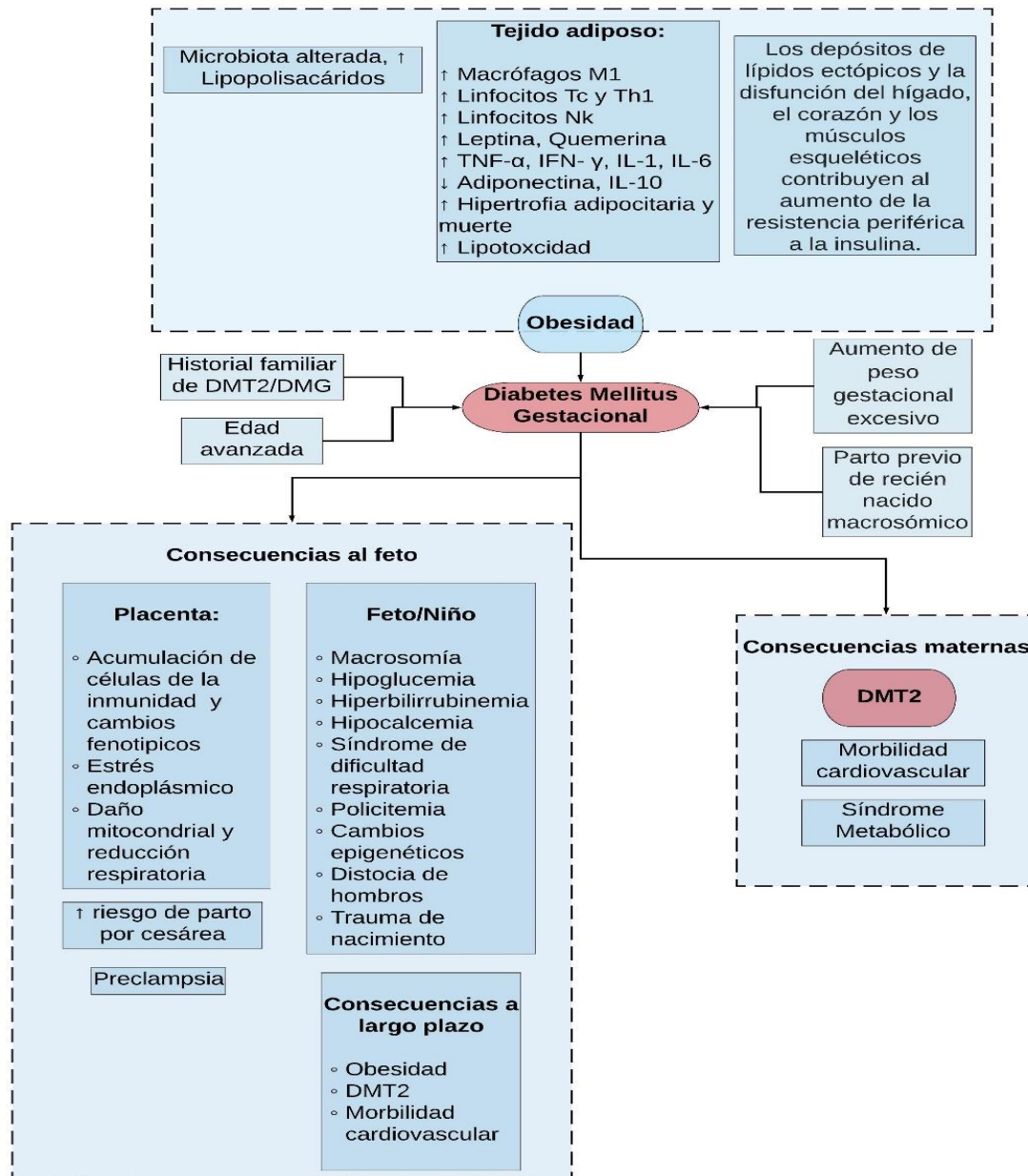


adipocinas es la quemerina. La quemerina es una adipocina que es secretada por varios tejidos, especialmente el tejido adiposo blanco; regula la sensibilidad a la insulina en los adipocitos y el músculo esquelético. Los niveles elevados de quemerina se detectan en la obesidad y están asociados con múltiples componentes de síndromes metabólicos, incluido el índice de masa corporal (IMC), triglicéridos, colesterol de alta densidad, hipertensión, inflamación y marcadores de patología hepática. La quemerina también se expresa en la placenta humana. Los niveles séricos de quemerina se correlacionan significativamente con los marcadores sistémicos de inflamación, como TNF- $\alpha$ , IL-6 y proteína C reactiva. En general, estos hallazgos sugieren que los niveles de quemerina están relacionados con la adiposidad y el metabolismo de la glucosa. También representan un posible vínculo entre la obesidad y el desarrollo de la DMG. (Görkem, Küçükler, Toğrul, et al. 2016)

**Visfatina:** Se ha demostrado que la visfatina materna circulante ejerce una amplia gama de efectos autocrinos y paracrinos durante el embarazo. Durante la DMG, el fracaso para mantener los niveles normales de glucosa puede provocar hiperglucemia a largo plazo, estimulando aún más la secreción de visfatina como un intento de regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Estos niveles elevados de visfatina pueden ejercer otros efectos, como aumentar el riesgo de preeclampsia y afectar la secreción de las adipocitocinas leptina y adiponectina. La visfatina también podría promover la diferenciación y maduración de los preadipocitos, promoviendo aún más el transporte de glucosa, la lipogénesis y la acumulación en la grasa visceral. Acumulativamente, todos estos efectos contribuyen al aumento de peso excesivo durante el embarazo, de acuerdo con los aumentos de peso observados en mujeres con DMG. (Liang, Ying, Fang, et al. 2015)

Los factores de riesgo y las consecuencias de la DMG se encuentran resumidas en la Figura 2.

Figura 2



**Figura 2. Factores de riesgo y consecuencias de la DMG.** La DMG se asocia con un mayor riesgo de complicaciones del embarazo y futuras complicaciones metabólicas para la madre y su descendencia. La obesidad es uno de los principales factores de riesgo de la diabetes gestacional. La obesidad previa al embarazo está relacionada con la inflamación subclínica en tejido adiposo y alteración del microbioma intestinal. Fuente: Šimják, P, Cinkajzlová, A, Anderlová, K, et al. (2018). *The role of obesity and adipose tissue dysfunction in gestational diabetes mellitus*. Journal of Endocrinology.

### **1.2.5 Adaptación de las células $\beta$ en el páncreas durante la diabetes gestacional**

La resistencia a la insulina durante la gestación aumenta la demanda de síntesis de insulina debido a diversos factores como el aumento de peso, la producción de hormonas placentarias y el incremento en la ingesta de alimentos. La función principal de las células  $\beta$  en el páncreas es la de almacenar y secretar insulina en respuesta a la concentración de glucosa en sangre. Los islotes pancreáticos poseen la habilidad de adaptarse al aumento de la demanda de insulina a través de la proliferación de células  $\beta$  aumentando su masa hasta en un 50% (hiperplasia) por la acción de hormonas maternas y placentarias como los lactógenos placentarios y la prolactina, que contribuyen a mejorar la secreción de insulina durante la gestación (Zhang, Zhang, Pope, et al. 2010). Sin embargo, en la DMG se observa una disfunción de las células  $\beta$  en la cual pierden la habilidad de detectar los niveles de glucosa en sangre o de secretar la insulina suficiente como resultado de una producción sostenida y excesiva de insulina durante la hiperglucemia (hipertrofia), lo cual se describe como glucotoxicidad. (Plows, et al. 2018) (Figura 3).

### **1.2.6 Diabetes *mellitus* gestacional y diabetes *mellitus* tipo 2**

La resistencia a la insulina y la alteración de la secreción de dicha hormona son condiciones metabólicas que se presentan en mujeres que desarrollan DMG, similares a aquellas observadas en la DMT2. Debido a que ambas enfermedades comparten similitudes en cuanto a mecanismos fisiopatológicos se refiere, existe un gran interés en hallar marcadores que conduzcan al entendimiento de un posible origen común. Las mujeres diagnosticadas con DMG también presentan un estado inflamatorio que, junto a la resistencia a la insulina, pueden contribuir a una alteración en la transcripción génica a nivel placentario cuyas consecuencias se traducen en el desarrollo de múltiples enfermedades metabólicas en el transcurso de la vida, tales como la intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico y un alto

riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares. También se ha observado que las mujeres diagnosticadas con DMG presentan un riesgo siete veces mayor de presentar DMT2 en el futuro (Zajdenverg & Negrato, 2017)

Figura 3

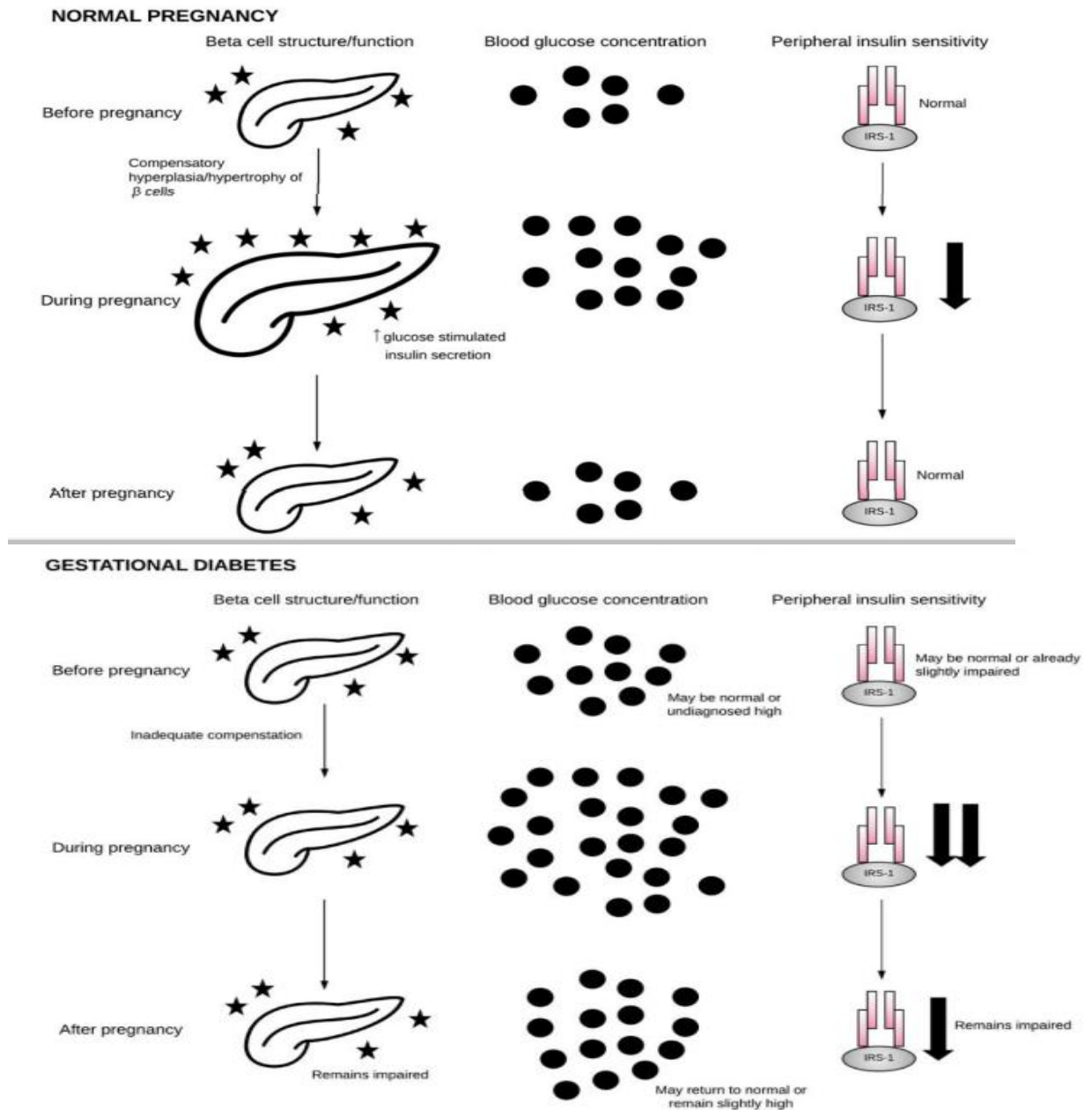


Figura 3. Células  $\beta$ , glucosa en sangre y sensibilidad a la insulina durante el embarazo normal y durante la DMG. Durante el embarazo normal, las células  $\beta$  experimentan hiperplasia e hipertrofia

para cumplir con las demandas metabólicas del embarazo. La glucosa en sangre aumenta a medida que disminuye la sensibilidad a la insulina. Después del embarazo, las células  $\beta$ , la glucosa en sangre y la sensibilidad a la insulina vuelven a la normalidad. Durante la diabetes gestacional, las células  $\beta$  fallan en compensar las demandas de insulina del embarazo y, cuando se combina con una disminución en la sensibilidad a la insulina, esta resulta en hiperglucemia. Después del embarazo, las células  $\beta$ , la glucosa en sangre y la sensibilidad a la insulina pueden volver a la normalidad o puede permanecer alteradas en un camino hacia la DMG en el futuro embarazo o DMT2. **Traducción:** *normal pregnancy* (embarazo normal), *beta cell structure/function* (función/estructura de las células beta), *peripheral insulin sensitivity* (sensibilidad a la insulina periférica), *before pregnancy* (antes del embarazo), *compensatory hyperplasia/hypertrophy of  $\beta$ -cells* (hiperplasia/hipertrofia compensatoria de las células  $\beta$ ), *during pregnancy* (durante el embarazo), *glucose stimulated insulin secretion* (secreción de insulina estimulada por glucosa), *after pregnancy* (después del embarazo), *may be normal or undiagnosed high* (puede ser normal o alta sin diagnosticar), *may be normal or already slightly impaired* (puede ser normal o ya ligeramente deteriorada), *inadequate compensation* (compensación inadecuada), *remains impaired* (permanece deteriorada), *may be normal or remain slightly high* (puede ser normal o permanecer ligeramente alta). Fuente: Plows, J., Stanley, J., Baker, P., et al. (2018). *The Pathophysiology of Gestational Diabetes mellitus*. International Journal of Molecular Sciences.

### 1.3 El papel de la genética y la epigenética en la diabetes gestacional

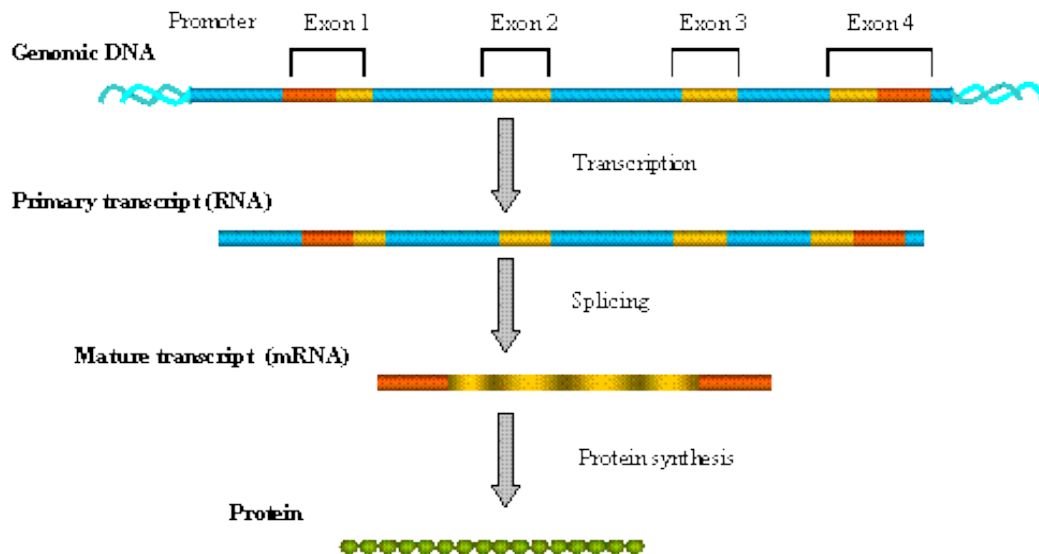
La evidencia actual sugiere que en el desarrollo de la DMG está implicada una combinación de factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Los estudios de asociación del genoma completo o GWAS, por sus siglas en inglés *Genome-Wide Association Studies*, han demostrado la asociación entre algunos genes de susceptibilidad a la DMT2 y la DMG, sugiriendo una similitud particular en la arquitectura genética y metabólica entre ambos tipos de diabetes. Dado que la DMG, de manera similar a la DMT2, se caracteriza por la resistencia a la insulina, se sabe que varios genes pueden estar implicados en un mayor riesgo de desarrollar DMT2 y estos han sido estudiados también en pacientes con DMG. Los estudios recientes GWAS enfocados en el metabolismo durante la gestación han demostrado un entrecruzamiento entre genes asociados con rasgos metabólicos

característicos de las poblaciones gestantes y no gestantes, así como en genes aparentemente únicos durante el embarazo. También se han identificado cambios epigenéticos en pacientes con DMG, en donde la expresión génica se encuentra alterada ante el estado metabólico de la mujer embarazada. (Dalfra, Burlina, Del Vescovo, & Lapolla, 2020)

### **1.3.1 Expresión génica**

En organismos eucariotas, la información hereditaria está codificada en moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), el cual se empaqueta dentro del núcleo celular en estructuras denominadas cromosomas. Los genes son la unidad física básica de la herencia y están ordenados en los cromosomas. La expresión génica (Figura 4) es el proceso biológico en el cual la información genética es utilizada para llevar a cabo la síntesis de productos funcionales, dentro de los cuales incluyen las proteínas y ácido ribonucleico (RNA) funcional (por ejemplo, RNA de transferencia o tRNA, microRNA, RNA de interferencia pequeño/corto, etc.). Los organismos eucariotas y procariotas utilizan el proceso de la expresión génica para producir la maquinaria macromolecular necesaria para la vida. Los genes juegan un papel crucial en la diferenciación celular, morfogénesis, adaptabilidad y la diversidad, controlando la estructura y función de la célula (Chuan-Chen & Jau Chen, 2019).

Figura 4



**Figura 4. Expresión génica.** La información genética (secuencia de bases) del DNA se copia, en primer lugar, en una molécula de RNA mensajero (mRNA) (transcripción). Los intrones (secuencias no codificantes del gen) son escindidos del mRNA primario, mientras que los exones (regiones codificantes del gen) se unen para generar mRNA maduro (*splicing*). El mRNA maduro codifica a la proteína como una serie de codones contiguos y cada uno de ellos es reconocido por un RNA de transferencia o tRNA, donde un extremo coincide con el código genético en una secuencia denominada anticodón, compuesta de tres nucleótidos. En el otro extremo del tRNA existe un enlace covalente al aminoácido que corresponde con la secuencia del anticodón. Una vez leída la secuencia del mRNA, cada tRNA entrega su aminoácido al ribosoma y se enlaza de forma temporal al codón correspondiente de la molécula de mRNA. Una vez que se ha unido el tRNA, éste libera su aminoácido y une a los demás aminoácidos adyacentes para formar un polipéptido (traducción). Este proceso continúa hasta que la proteína se haya sintetizado. **Traducción:** *promoter* (promotor), *genomic DNA* (DNA genómico), *exon* (exón), *primary transcript* (transcrito primario), *transcription* (transcripción), *mature transcript* (transcrito maduro), *splicing* (empalme), *protein synthesis* (síntesis de proteínas). Fuente: Gene Expression. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet], 2020.

### 1.3.2 Regulación de la expresión génica

Los genes poseen dos estados (activos o inactivos) que dependen de si la información está siendo leída o no; por ello, el producto de la transcripción de



algunos genes puede ser traducido hasta que la secuencia de la proteína esté completa. Además, se sabe que algunos genes se expresan de manera continua, mientras que la expresión de otros se encuentra regulada de forma espacio-temporal (Ramírez-Clavijo & Montoya-Ortíz, 2013). Distintos pasos en el proceso de la expresión génica pueden ser regulados; durante la transcripción, las modificaciones postranscripcionales (p. ej. *splicing* del RNA, *capping* y poliadenilación), la traducción y las modificaciones postraduccionales (p. ej. *splicing*, plegamiento y procesamiento de proteínas, la adición de grupos funcionales como la fosforilación, acilación, metilación, etc.) (Chuan-Chen & Jau Chen, 2019). La regulación génica, en general, contempla los eventos asociados con el RNA y las moléculas proteicas, los mecanismos epigenéticos y las vías de señalización. Pueden actuar en diferentes estadios durante la transcripción o durante la traducción, dependiendo de cómo sea analizado el proceso (Ramírez-Clavijo & Montoya-Ortíz, 2013).

### **1.3.3 Polimorfismos de un solo nucleótido en la regulación génica**

Un polimorfismo de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphism* o SNP) consiste en una variación que afecta a una sola base (A, T, C, G) en una secuencia del DNA. Las mutaciones pueden alterar todos los pasos de la expresión génica, dependiendo de su localización genómica. Cuando se presentan entre elementos transcripcionales regulatorios pueden afectar la expresión del Mrna o si se presentan en la secuencia codificante, pueden conllevar al cambio de un aminoácido y, por lo tanto, a una alteración en la actividad de las proteínas (Robert & Pelletier, 2018). Las enfermedades comunes como la obesidad, la DMT2 y el síndrome metabólico, entre otras, poseen un origen multifactorial en el los SNP juegan un papel importante en del desarrollo de estas patologías (Ramírez-Bello, Vargas-Alarcón, & Tovilla-Zárate, 2013).



### 1.3.4 Epigenética

La epigenética estudia los mecanismos que regulan la expresión de los genes sin modificación en la secuencia de DNA y establece la relación entre los factores genéticos y ambientales que determinan un fenotipo. Los mecanismos que intervienen en la regulación epigenética, como la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales de las histonas y la remodelación de la cromatina dependiente de ATP, influyen en el potencial de expresión genética del DNA al modificar la accesibilidad que tiene la maquinaria transcripcional a este. (Bártová, Krejčí, & Harnicarová, 2008) Así, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. (Nakao, 2001)

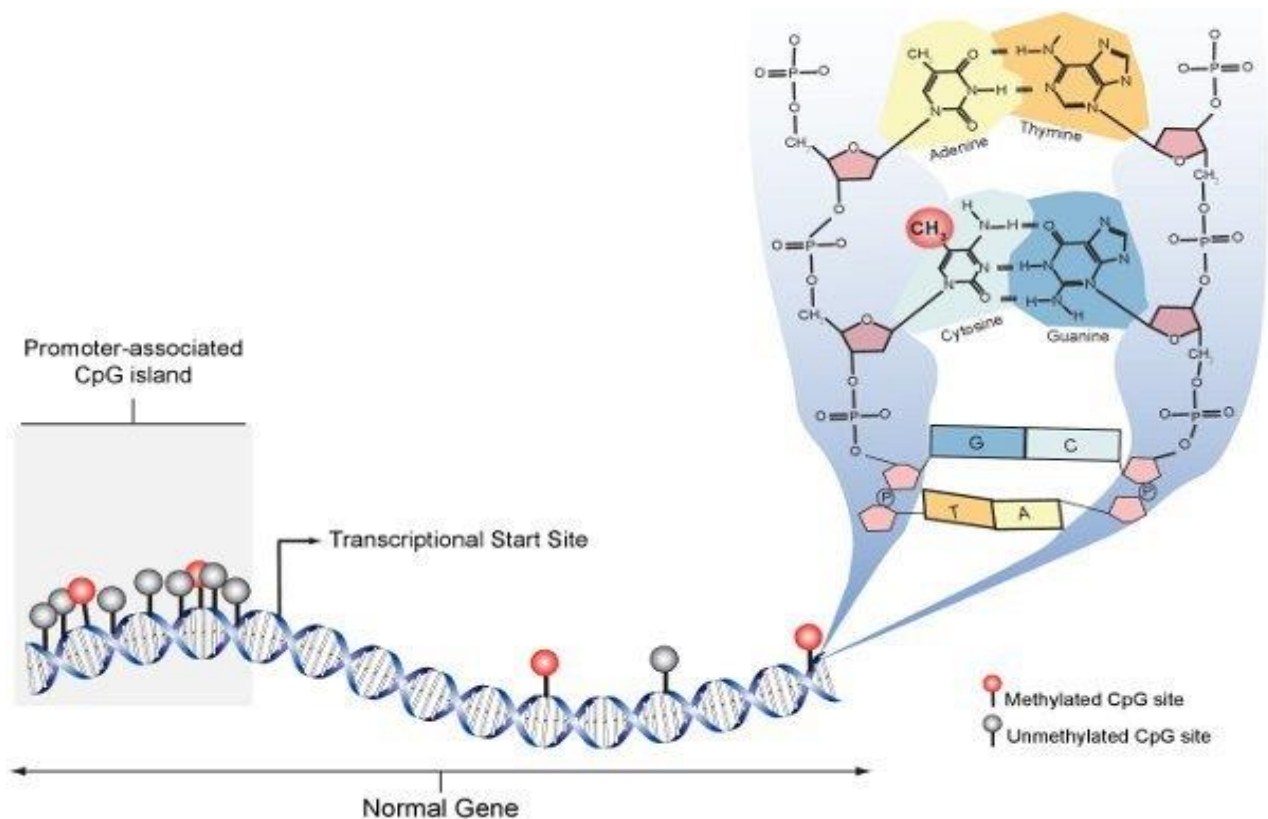
### 1.3.5 Metilación del DNA

La modificación epigenética más estudiada es la metilación de las islas de citosina- fosfatidil- guanina (CpG). La metilación de DNA es una marca epigenética hereditaria que implica la transferencia covalente de un grupo metilo a la posición C-5 del anillo de citosina por las DNA metiltransferasas (DNMT) (Figura 5). En las plantas, las citosinas están metiladas en contextos simétricos (CG o CHG) o asimétricos (CHH, donde H es A, T o C). En los mamíferos, la metilación del DNA ocurre en las citosinas en cualquier contexto del genoma. Sin embargo, más del 98% de la metilación del DNA ocurre en dinucleótidos CpG en células somáticas, mientras que hasta una cuarta parte de toda la metilación aparece en un contexto sin CpG en células madre embrionarias (Jin, Li, & Roberston, 2011). La metilación del DNA se presenta en los dinucleótidos CpG localizados en los promotores con el objetivo impedir su reconocimiento por factores de transcripción e inhibir el proceso de transcripción (Ramírez-Clavijo & Montoya-Ortíz, 2013).

La mayor parte de la metilación del DNA es esencial para el desarrollo normal y desempeña un papel de suma importancia en una serie de procesos clave que

incluyen la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X y la supresión de la transcripción y transposición de elementos repetitivos y, cuando se desregula, contribuye a enfermedades como el cáncer. (Jin, Li, & Roberston, 2011)

Figura 5



**Figura 5. La secuencia objetivo principal para la metilación del DNA en mamíferos son los dinucleótidos 5'-CpG-3'.** En la célula normal, las islas CpG asociadas a promotores se encuentran predominantemente no metiladas (gris) mientras que los sitios CpG dentro de los cuerpos genéticos son escasos y generalmente metilados (rojo). El panel de la derecha expande la estructura molecular del DNA en un sitio individual de CpG y muestra metilación con una molécula de CH<sub>3</sub> en el carbono 5 de la citosina. **Traducción:** *promoter-associated CpG island* (isla CpG asociada al promotor), *transcriptional start site* (sitio de inicio transcripcional), *methylated CpG site* (sitio CpG metilado) *unmethylated CpG site* (sitio CpG sin metilar), *normal gene* (gen normal), *adenine* (adenina), *thymine* (timina), *cytosine* (citosina), *guanine* (guanina). Fuente: Patterson, K, Molloy, L, Wenjia, Q, et al. (2011). *DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis*. Journal of Visualized Experiments.

### **1.3.6 Modificaciones epigenéticas durante el embarazo**

La epigenética es el mecanismo más probable por el cual el ambiente intrauterino afecta la salud y la enfermedad de la descendencia (Lehnen, Zechner, & Haaf, 2013). Un medio intrauterino adverso afecta el desarrollo del feto modificando la expresión en ambas células pluripotenciales y células terminalmente diferenciadas, asociado con la regulación negativa inducida epigenéticamente de genes clave que controlan el desarrollo, diferenciación y función de las células  $\beta$  (Fernández-Morera, Rodríguez-Rodero, Menéndez-Torre, et al. 2010)

El establecimiento del epigenoma y las modificaciones epigenéticas durante el desarrollo fetal están influenciados por factores ambientales como la dieta, especialmente durante las etapas prenatal y postnatal temprana debido a la ingesta de alimentos ricos en donadores de grupos metilo. La herencia epigenética inducida por la dieta es un fenómeno que ha sido estudiado previamente y se ha reportado que dietas con ingesta anormal de metionina pueden generar cambios epigenéticos que se transmiten a la siguiente generación. Diferentes componentes de la dieta proporcionan grupos metilo, por ejemplo, el folato, necesarios para la síntesis de S-adenosilmetionina, donador de los grupos metilo, necesarios para la metilación del DNA. Por tanto, es posible que factores ambientales que alteran dicha síntesis puedan alterar los patrones de metilación del genoma, influenciar el fenotipo en la edad adulta y el impacto en la salud (Zhang, 2018)

Es claro entonces que la identificación de los factores medioambientales que alteran el desarrollo embrionario permitirá la implantación de estrategias de prevención primaria para evitar su efecto. Entre los factores medioambientales, los nutricionales parecen ser los más importantes en cuanto a modificaciones epigenéticas y las estrategias de intervención en este campo serían económicas, seguras y fáciles de implementar, lo que las hace llamativas para realizar una prevención primaria de defectos congénitos y enfermedades tanto hereditarias como esporádicas (Martínez-Frías, 2010).

### **1.3.7 Las células de sangre periférica como modelo de estudio en la expresión génica**

Las fuentes de RNA derivadas de sangre humana tales como las líneas celulares linfoblastoides humanas (LCL), células de sangre completa y células mononucleares de sangre periférica (PMBC, por sus siglas en inglés *peripheral blood mononuclear cells*) han sido utilizadas ampliamente por su accesibilidad, practicidad e invasividad mínima en el estudio de la expresión génica (Joehanes, Johnson, Barb, et al. 2012) y, debido a su conexión sistémica con numerosos tejidos, constituyen un recurso biológico valioso para la identificación de biomarcadores y el perfilado de vías de señalización. Estos biomarcadores pueden ser utilizados extensamente en una gran variedad de aplicaciones; tales como el diagnóstico, el seguimiento de la progresión de la enfermedad hasta la terapéutica, el desarrollo de fármacos y la evaluación de la respuesta del paciente al tratamiento médico (Donohue, Gautam, Miller, et al. 2019).

### **1.3.8 Factores genéticos de riesgo en la diabetes gestacional**

La DMG, en la mayoría de los casos, expresa las mismas características clínicas que la DMT2, incluida la insuficiencia de secreción de insulina en relación con el aumento de la resistencia a la insulina y es ampliamente reconocido que la mayoría de las mujeres con DMG desarrolla DMT2 posparto. La DMG se ha asociado con una serie de factores genéticos que han demostrado que confieren riesgo para desarrollar DMT2. (Papadopoulou, Lynch, Shaat, & et al., 2011). La mayoría de los loci polimórficos de estos genes parecen afectar la función de las células  $\beta$  pancreáticas (Rosik, Szostak, Machaj, et al. 2019) (Tabla 2).

Tabla 2

Polimorfismos genéticos predisponentes a DMG				
Gen	Polimorfismo	Cromosoma	Alelo afectado	Odd Ratio
TCF7L2	rs34872471	10	G	1.14 (1.06–1.24)
	rs7903146	10	T	1.15 (1.06–1.24)
GCK	rs1799884	7	T	1.29 (1.17–1.42)
GCKR	rs780094	2	T	0.76 (0.66–0.87)
HNF4A	rs4812829	20	A	1.28 (1.07–1.44)
KCNJ11	rs5219	11	T	1.15 (1.06–1.26)
CDKAL1	rs7754840	6	T	1.40 (1.13–1.72)
	rs7756992	6	G	1.38 (1.26–1.52)
SLC30A8	rs13266634	8	T	0.74 (0.65–0.83)
PPARG	rs1801282	3	G	0.72 (0.56–0.93)
FTO	rs9939609	16	A	
	rs8050136	16	A	1.12 (0.90–1.40)
IRS1	rs1801278	2	T	1.42 (1.15–1.75)
MTNR1B	rs10830963	11	G	1.24 (1.14–1.35)
MTNR1B	rs1387153	11	T	1.26 (1.12–1.43)

**Tabla 2. Polimorfismos genéticos predisponentes a DMG.** En los últimos años, los *loci* en los genes responsables de la secreción de insulina, la resistencia a la insulina y el metabolismo de la glucosa se han asociado con el riesgo de padecer DMG. Se muestran los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de cada gen, el cromosoma, el alelo afectado y la razón de posibilidades (*odd ratio*). Fuente: Rosik, A, Szostak, B, Machaj, F, et al. (2019). *The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus*. *Annals of Human Genetics*.

Algunos de los genes asociados a la DMG y su papel en el metabolismo de la glucosa se describen a continuación:

**TCF7L2:** El gen TCF7L2 se encuentra en el cromosoma 10q25.2 – q25.3, contiene 20 exones y tiene herencia autosómica dominante. TCF7L2, también conocido como TCF-4, es un factor de transcripción expresado en tejido adiposo, hígado y en células de los islotes pancreáticos (Weedon, 2007). Según los estudios de Papadopoulou, et al. (2011), los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs)

rs7903146 (C es alelo sin riesgo y T es alelo de riesgo), rs12255372 (G es alelo sin riesgo y T es alelo de riesgo), y rs7901695 (T es alelo sin riesgo y C es alelo de riesgo) se asocian con DMG, cuyos alelos son los mismos asociados con un alto riesgo para desarrollar DMT2 en una población de madres nacidas en Suecia. (Papadopoulou, Lynch, Shaat, et al. 2011). Los portadores de los alelos de riesgo presentan un aumento en la expresión de TFC7L2, lo que conlleva a una alteración en la conversión de proinsulina a insulina, disminuyendo los niveles de secreción de insulina en sangre (Zhou, Park, Su, et al. 2014).

**GCK:** Se encuentra en el cromosoma 7p13, contiene 15 exones y tiene herencia autosómica dominante. La glucocinasa (GCK) es la enzima responsable de regular la captación y almacenamiento de glucosa. El receptor GCK (GCKR) juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. GCKR modula la glucocinasa, que cataliza la fosforilación hepática de glucosa, que conduce a la síntesis de glucógeno y triglicéridos; en páncreas, esta enzima participa en la secreción de insulina mediada por glucosa. Los polimorfismos en GCKR están asociados con el aumento de los niveles de glucosa y triglicéridos en ayunas (Tarnowski, Malinowski, Pawlak, et al. 2017). Se ha reportado que los polimorfismos GCKR rs780094 y GCK rs1799884 están asociados con dislipidemia y DMT2 (Wieczorek, Safranow, Tarnowski, et al. 2018). El estudio de Wieczorek et al. en 2018 sobre la relación de estos polimorfismos con la DMG revela que no existe un efecto significativo en los parámetros clínicos evaluados en mujeres gestantes, sin embargo, sugieren una posible asociación con el aumento de masa corporal (Wieczorek, et al. 2018).

**SCL30A8:** Se ubica en el cromosoma 8q24.11 y contiene 13 exones. La proteína codificada por este gen (ZNT8 o transportador de zinc 8) es un transportador de salida de zinc involucrado en la acumulación de zinc en las vesículas intracelulares. Este gen se expresa a un alto nivel solo en el páncreas, particularmente en los islotes de Langerhans. La proteína codificada se co-localiza con insulina en los gránulos de la vía secretora de las células INS-1 secretoras de insulina. Existen variantes alélicas de este gen que confieren susceptibilidad a la

diabetes *mellitus*, no dependiente de insulina (NIDDM). Se han encontrado varias variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen. (Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2020). En el estudio de Dereke, et al. (2016), se encontró que el alelo C R325W estaba asociado con un mayor riesgo de desarrollar DMG, mientras que el alelo T R325W se asoció con una disminución de riesgo (Dereke, Palmqvist, Nilsson, et al. 2016).

**IRS1:** Está localizado en el cromosoma 2q36.3 y contiene 3 exones. IRS1 actúa como una proteína de acoplamiento entre el receptor de insulina y múltiples proteínas que contienen homología Src-2- (SH2-) en la cascada de señalización de insulina, que desempeña un papel clave en la modulación de la respuesta de los tejidos a esta hormona. Hasta la fecha se han identificado varias variantes genéticas en el IRS1 humano, que estaban asociadas con la resistencia a la insulina y la susceptibilidad a la diabetes, particularmente la variante Gly (972) Arg (rs1801278). Además, se ha encontrado que las variantes Pro512Ala y Gly972Arg IRS1 se asociaron con antecedentes familiares y edad temprana de diabetes. Estudios previos informaron que las variantes genéticas (rs2943641; rs2943650) en IRS1 se asociaron con resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia y DMT2. (Juyi, Shan, Xiufang, et al. 2020)

**FTO:** Se localiza en el cromosoma 16q12.2 y contiene 16 exones. Este gen es una proteína nuclear de la superfamilia de oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato de hierro no-hemo y relacionada con AlkB, pero se desconoce la función fisiológica exacta de este gen. Los estudios en ratones y humanos indican un papel en los sistemas nervioso y cardiovascular y una fuerte asociación con el índice de masa corporal, el riesgo de obesidad y la DMT2. (Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2020). Un estudio reciente identificó rs1421085 como una variante causal de obesidad, que influye en la expresión de IRX3 y IRX5 en preadipocitos, cambiando la función de los adipocitos humanos para la utilización de combustible mediante termogénesis mejorada para funcionar como sustrato de almacenamiento. (Saucedo, Valencia,



Gutierrez, et al. 2017). Los resultados del estudio de Saucedo, et al. (2017) demostraron niveles más altos de TNF- $\alpha$  y niveles más bajos de adiponectina asociadas con FTO rs8050136 y el alelo de riesgo A rs9939609 en el grupo de mujeres diagnosticadas con GDM con respecto al grupo control (Saucedo, et al. 2017).

Dentro de los genes asociados con la DMG y la DMT2 se encuentra el gen SLC16A11, miembro de la superfamilia de transportadores de solutos (SLC, por sus siglas en inglés, *solute carrier*), el cual ha sido objeto de estudio recientemente debido a su participación en el metabolismo de los ácidos grasos y su implicación en la resistencia a la insulina.

#### **1.4 El gen SLC16A11**

SLC16A11 se localiza en el cromosoma 17p13.1 y contiene 5 exones. Es miembro de la familia SLC16 (o transportador de monocarboxilatos, MCT), un grupo de 14 transportadores de solutos que está definido por dos secuencias altamente conservadas. Los miembros de la familia SLC16 median el transporte de distintos sustratos, utilizando 2 mecanismos diferentes. La primera clase de SLC16 (categoría I) contiene a los miembros SLC16A1, SLC16A3, SLC16A7 y SC16A8, los cuales se ha demostrado su interacción con las proteínas chaperonas basignina (BSG) y embigina (EMB), importantes en la localización de estos transportadores en la membrana plasmática. Transportan ácidos monocarboxílicos simples, tales como lactato, piruvato y cuerpos cetónicos, a través de un mecanismo de acoplamiento a protones (H<sup>+</sup>). En contraste, la segunda clase de SLC16 (categoría II) que incluyen a SLC16A2 y SLC16A10, transportan monocarboxilatos hidrófobos largos, tales como triyodotironina (T<sub>3</sub>) y tiroxina (T<sub>4</sub>) y aminoácidos aromáticos, a través de difusión facilitada. A diferencia de los miembros de la categoría I, SLC16A2 y SLC16A10 no interactúan con BSG o EMB (Rusu, Hoch, Mercader, et al. 2017) (Tabla 3).



Tabla 3

Categorización de los miembros de la familia SLC16				
Categoría	Miembros	Sustratos primarios	Mecanismo	Proteínas auxiliares
I	SLCA1, SLC16A3, SLC16A7	Piruvato, lactato, cuerpos cetónicos	Acoplado a H <sup>+</sup>	BSG, EMB
	SLC16A8	Lactato		
II	SLC16A2	T3, T4	Difusión facilitada	Sin interacción
	SLC16A10	Aminoácidos aromáticos		-
Sin categorizar	SLC16A6	β-hydroxibutirato	-	-
	SLC16A9	Carnitina	No acoplado a H <sup>+</sup>	
	SLC16A4, SLC16A5 <b>SLC16A11</b> , SLC16A12 SLC16A13, SLC16A14	-		

**Tabla 3. Categorización de los miembros de la familia SLC16.** Se muestran los miembros de la familia SLC16 con sustratos de transporte, mecanismo y proteínas auxiliares. SLC16A11 (negrita) es un miembro de la familia sin categorizar. Fuente: Rusu, V, Hoch, J, Mercader, JM, et al. (2017). *Type 2 Diabetes variants disrupt function of SLC16A11 through two distinct mechanisms*. Cell.

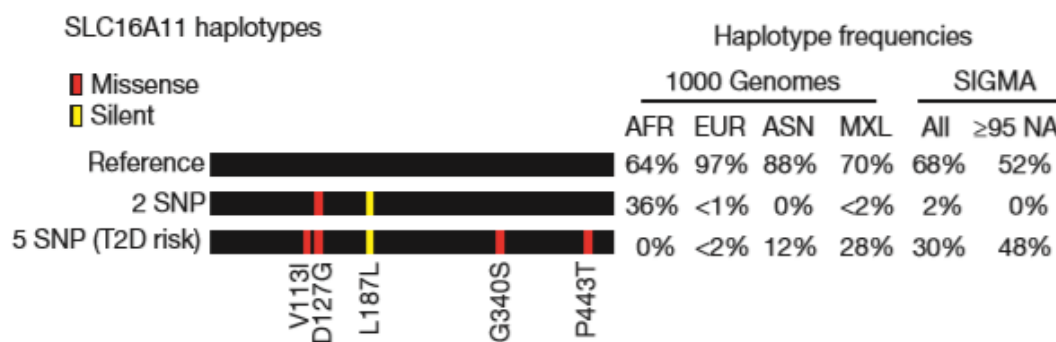
Los análisis bioinformáticos y los ensayos de transporte de sustratos en el estudio de Rusu, et al. (2017) establecen que SLC16A11 es un transportador de monocarboxilatos acoplado a protones (H<sup>+</sup>), perteneciente a la categoría I (Rusu, et al. 2017).

#### 1.4.1 SLC16A11 como factor genético de riesgo para la diabetes

En 2014, el Consorcio de Genética de Diabetes Tipo 2 de la Iniciativa Slim en Medicina Genómica para las Américas (SIGMA) identificó una asociación significativa en todo el genoma de un haplotipo en el cromosoma 17p13.1 con un mayor riesgo de desarrollar DMT2. Este haplotipo de riesgo es altamente prevalente

en poblaciones con antecedentes de nativos americanos (por ejemplo, mestizos mexicanos), en quienes las variantes de riesgo están presentes en más del 25% de esta población y con una frecuencia del 10% en Asia, mientras que en muestras europeas y africanas es raro encontrar el haplotipo de riesgo. El conjunto del haplotipo asociado incluye cuatro variantes sin sentido y una variante silenciosa en SLC16A11 (V113I, L187L, D127G, G340S y P443T) (Valdes, Bello-Chavolla, Martagon, et al. 2019) (Figura 6) con los polimorfismos rs117767867 (G337A), rs13342692 (A380G), rs13342232 (T561C), rs75418188 (G1018A) y rs75493593 (C1327A), denominado haplotipo “5 SNP”, asociado con un mayor riesgo de DMT2 en la población mexicana (Kimura, Kobayashi, Asari, et al. 2018), así como varias variantes no codificantes en regiones reguladoras cercanas al gen SLC16A11.

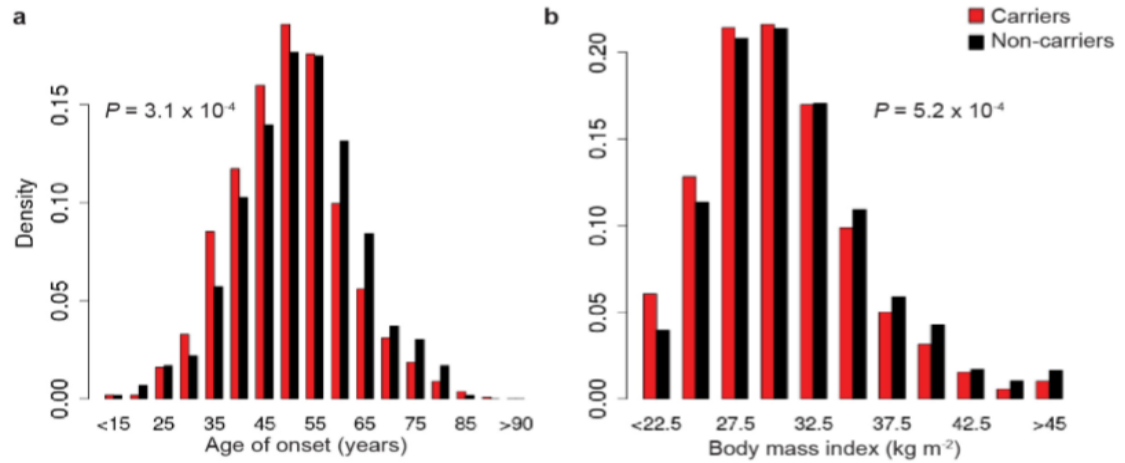
Figura 6



**Figura 6. Haplotipos de SLC16A11 y sus frecuencias en distintas poblaciones.** Representaciones gráficas de los haplotipos SLC16A11 construidos a partir de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) silentes (amarillo) y cuatro sin sentido (rojo), asociados con DMT2, con frecuencias de haplotipos derivadas del Proyecto 1000 Genomas y muestras SIGMA. AFR, africano (n= 5185); ASN, asiático oriental (n= 5286); EUR, europeo (n= 5379); MXL, muestras de mexicanos de Los Ángeles (n= 566). *Odds ratio* 1.28 (1.19- 1.37),  $P= 1.1 \times 10^{-12}$ . **Traducción:** *SLC16A11 haplotypes* (haplotipos de SLC16A11), *haplotype frequencies* (frecuencias de haplotipos), *missense* (sin sentido), *silent* (silente), *reference* (referencia), *genomes* (genomas). Fuente: SIGMA Type 2 Diabetes Consortium (2014). *Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico.* Nature.

Los individuos portadores del haplotipo de riesgo desarrollan DMT2 2.1 años antes ( $P= 3.1 \times 10^{-24}$ ) y con un IMC inferior de  $0.9 \text{ kg m}^{-2}$  ( $P= 5.2 \times 10^{-24}$ ) que los no portadores. (SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, 2014) (Figura 7).

Figura 7



**Figura 7. Los casos con el haplotipo de riesgo desarrollan DMT2 más jóvenes aún sin obesidad. a)** Distribución de la edad de inicio en los casos de la DMT2 según el genotipo en rs13342232, agrupados cada 5 años sin límites superiores indicados. (portadores n= 1,126; no portadores n= 594) **b)** Distribución del IMC en casos de diabetes tipo 2 para portadores y no portadores de rs13342232, agrupados cada 2.5 kg m<sup>-2</sup> con límites superiores indicados (portadores n= 2,161; no portadores n= 1,647). Valores P de la prueba *t* de dos muestras entre portadores de haplotipos de riesgo de diabetes tipo 2 y no portadores de DMT2. **Traducción:** *carriers* (portadores), *non carriers* (no portadores), *density* (densidad), *age of onset (years)* (edad de inicio en años), *body mass index* (índice de masa corporal). Fuente: SIGMA Type 2 Diabetes Consortium (2014). *Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico*. Nature.

Sin embargo, en el estudio de Huerta-Chagoya, Vázquez-Cárdenas, Moreno-Macías, et al. (2015) no se encontró asociación para el haplotipo SLC16A11 con la DMG, que recientemente se identificó como un contribuyente importante para el riesgo de DMT2 en la población mexicana. A pesar de que la frecuencia de las variantes de riesgo SLC16A11 en los casos de DMG fue similar a la de los casos SIGMA T2 sólo para mujeres ( $P > 0.1$ ), no se encontró diferencia estadística para las variantes de riesgo SLC16A11 entre los casos de DMG y los controles ( $P > 0.1$ ) (Huerta-Chagoya, Vázquez-Cárdenas, Moreno-Macías, et al. 2015) (Tabla 4).

Tabla 4

Frecuencias alélicas de las variantes genéticas asociadas con el riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados en mujeres mexicanas, así como los loci SLC16A11								
DMG (N=342/408)						SIGMA DMT2 (N=4366/3848)		
Gen	SNP	A1	Casos	Controles	Valor P	Casos	Controles	Valor P
<b>SLC16A11</b>	rs13342232	G	0.367	0.365	0.4866	0.351	0.283	<b>6.9x10<sup>-19</sup></b>
	rs13342692	C	0.365	0.367	0.5345	0.350	0.283	<b>1.3x10<sup>-18</sup></b>
	rs117767867	T	0.353	0.355	0.6461	0.328	0.263	<b>6.2x10<sup>-23</sup></b>
	rs75418188	T	0.354	0.359	0.5565	0.330	0.264	<b>4.4x10<sup>-18</sup></b>
	rs75493593	T	0.356	0.357	0.7619	0.330	0.264	<b>3.1x10<sup>-18</sup></b>

**Tabla 4. Frecuencias alélicas de las variantes genéticas asociadas con el riesgo de DMG y rasgos metabólicos relacionados en mujeres mexicanas, así como los loci SLC16A11.** A1, frecuencia reportada del alelo. **Valor P** de los casos exactos de chi o prueba de Fisher versus comparación de frecuencias de alelos de controles. **N** es el tamaño de la muestra de controles /casos utilizados en los análisis. Fuente: Huerta-Chagoya, A, Vázquez-Cárdenas, P, Moreno-Macías, H, et al. (2015). *Genetic Determinants for Gestational Diabetes mellitus and Related Metabolic Traits in Mexican Women*. PLOS One.

SLC16A11 se expresa mayormente en tiroides, hígado y glándula salival. Las variantes asociadas a la DMT2 conducen a una menor expresión de SLC16A11 en el hígado y también interrumpen la interacción entre SLC16A11 y la BSG. Juntos, estos efectos variantes dan como resultado una menor cantidad de SLC16A11 en la membrana celular, reduciendo así su función (Valdes, et al. 2019).

De acuerdo con los estudios de Valdes, et al. (2019), la supresión de SLC16A11 en hepatocitos humanos primarios altera el metabolismo de los ácidos grasos y los lípidos, lo que conlleva un aumento en los niveles intracelulares de acilcarnitina, diacilglicerol y triacilglicerol. Estos cambios metabólicos también se observan en modelos experimentales de lipotoxicidad y resistencia a la insulina y como parte de la fisiopatología de la DMT2 (Valdes, et al., 2019) (SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, 2014).

## **1.5 Fundamentos de las técnicas en el laboratorio de biología molecular**

### **1.5.1 Extracción y purificación de ácidos nucleicos**

El método de un solo paso para el aislamiento de RNA descrito por Piotr Chomczynski y Niccoletta Sacci en 1986 se utiliza fundamentalmente para purificar el RNA total, aunque también se pueden purificar el DNA y las proteínas a partir de células y tejidos de origen animal y vegetal, o de bacterias y levaduras (Chomczynski & Sacci, 1987). El RNA se purifica en tres pasos: un paso de lisis celular y homogenización con la solución caotrópica de tiocianato de guanidina (solución de Chomczynski) con Fenol; adición de Cloroformo, el cual produce la formación de dos fases, una acuosa, que contiene el RNA, y una orgánica, que contiene el DNA y las proteínas; y un último paso de precipitación con alcohol iso-propílico. El DNA y las proteínas se pueden purificar, después de formadas las dos fases, por precipitación secuencial, primero del DNA con alcohol etílico a partir de la interfase; y luego de las proteínas con alcohol iso-propílico, a partir de la fase orgánica (Winkler LTDA, 2017). La simplicidad y rapidez del método permiten el procesamiento simultáneo de gran número de muestras, y la pureza del RNA y DNA obtenido permite su uso posterior en cualquier aplicación en biología molecular.

Un pH óptimo juega un papel crítico en el proceso de separación del DNA, ya que éste se encuentra disuelto en la fase orgánica bajo condiciones ácidas (pH 1-6) o en la fase acuosa a pH neutro (pH 7). El principal inconveniente de este método es que el fenol y el cloroformo son productos químicos peligrosos (Ali, Pontello, & Tavares, 2017).

### **1.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR convencional)**

La PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una técnica de biología molecular basada en una reacción enzimática *in vitro* de la DNA polimerasa sintetizada por la bacteria

*Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA genómico durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia diana es copiada fielmente (Tamay de Dios & Ibarra, 2013).

Generalmente, la PCR punto final inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice del DNA mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de DNA. Una vez separadas las cadenas del DNA, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la DNA polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del DNA, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2018). El producto de la PCR punto final es posteriormente visualizado en un gel de agarosa y proporciona evidencia cualitativa de la presencia de esa secuencia de DNA en la muestra.

### **1.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR)**

Se utiliza para la detección y amplificación de RNA. Permite estudiar la expresión de determinados genes (su traducción a proteínas). En primer lugar, se extrae el RNA total de las células en estudio y se separa la fracción correspondiente al RNA mensajero (mRNA). Tras purificarlo, el mRNA se transcribe a DNA mediante

una enzima transcriptasa inversa: por cada molécula de mRNA se sintetiza una molécula de DNA complementario (cDNA) monocatenario, que posteriormente sufre la conversión a una molécula bicatenaria utilizando una DNA polimerasa (la rTth DNA polimerasa de *Thermus thermophilus* es un enzima recombinante y termoestable que actúa como transcriptasa inversa, como DNA polimerasa y también posee una función RNasa H, que degrada la porción de RNA del híbrido). A partir de aquí se aplica la técnica de PCR lo que permite una detección de la expresión de mRNA mucho más sensible que con Northern blot o con hibridación in situ. (García-Rojo & Morillo-Castro, 1999)

#### **1.5.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Se denomina electroforesis a la técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Se trata de una técnica fundamentalmente analítica, aunque también se puede realizar con fines preparativos (Herráez, 2012).

El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño; movimiento generado por el campo eléctrico. La mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran; como consecuencia, pueden desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta al de la molécula. A diferencia de las proteínas, que pueden tener una carga positiva o negativa, los ácidos nucleicos sólo poseen carga negativa, debido a su esqueleto de fosfatos. Por lo tanto, en una electroforesis, los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo, es decir, el ánodo. En el caso de las proteínas, que suelen ser de carga neutra, se realiza pretratamiento con detergentes, como el dodecilsulfato de sodio (SDS), que les confiere carga negativa; con ello se homogeneizan las proteínas de la muestra y todas migrarán hacia el polo positivo; sólo se separarán por tamaño (López de la Mora & Sandoval, 2016).

Se suelen emplear geles de agarosa (concentración entre 0,3% y 2%), más porosos que los de poliacrilamida. Las características mecánicas de estos geles hacen aconsejable la realización de la electroforesis en horizontal, habitualmente “submarina”. Las muestras se aplican en pocillos practicados dentro del gel. La movilidad en electroforesis depende exclusivamente de la longitud de la molécula (medida habitualmente como número de pares de bases, pb): la electroforesis separa los fragmentos de DNA de acuerdo con su longitud en pb. De forma similar al caso de proteínas en SDS-PAGE, se suelen aplicar patrones en uno de los pocillos para hacer una curva de calibrado de tamaños. El avance del frente de electroforesis se observa gracias a colorantes como azul de bromofenol, bromuro de etidio y xileno cianol, añadidos a la muestra, para posteriormente detectar la presencia del DNA a través de un transiluminador UV (Herráez, 2012).

#### **1.5.5 Análisis del estado de metilación de genes específicos de interés por conversión con bisulfito de sodio**

La conversión de bisulfito, desarrollada por Frommer, McDonald, Millar, et al., (1991) continúa siendo el estándar de oro en el análisis de metilación del DNA al proporcionar un enfoque cualitativo, cuantitativo y eficiente para identificar las 5-metilcitosinas con una resolución de sólo un par de bases. El tratamiento con bisulfito de sodio convierte las citosinas no metiladas en uracilos que se convierten en timinas en la posterior amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios. Esto da como resultado la conversión de la información epigenética generalmente indetectable en información de secuencia detectable a una resolución de par de bases. El estado real de metilación puede determinarse mediante secuenciación directa después de la amplificación por PCR o mediante secuenciación de clonación. En comparación con otras técnicas, el análisis de metilación del DNA basado en bisulfito tiene una mayor precisión cuantitativa, sensibilidad de detección, alta eficiencia y un amplio espectro de análisis de muestras (Leontiou, Hadjidaniel, Mina, et al. 2015)

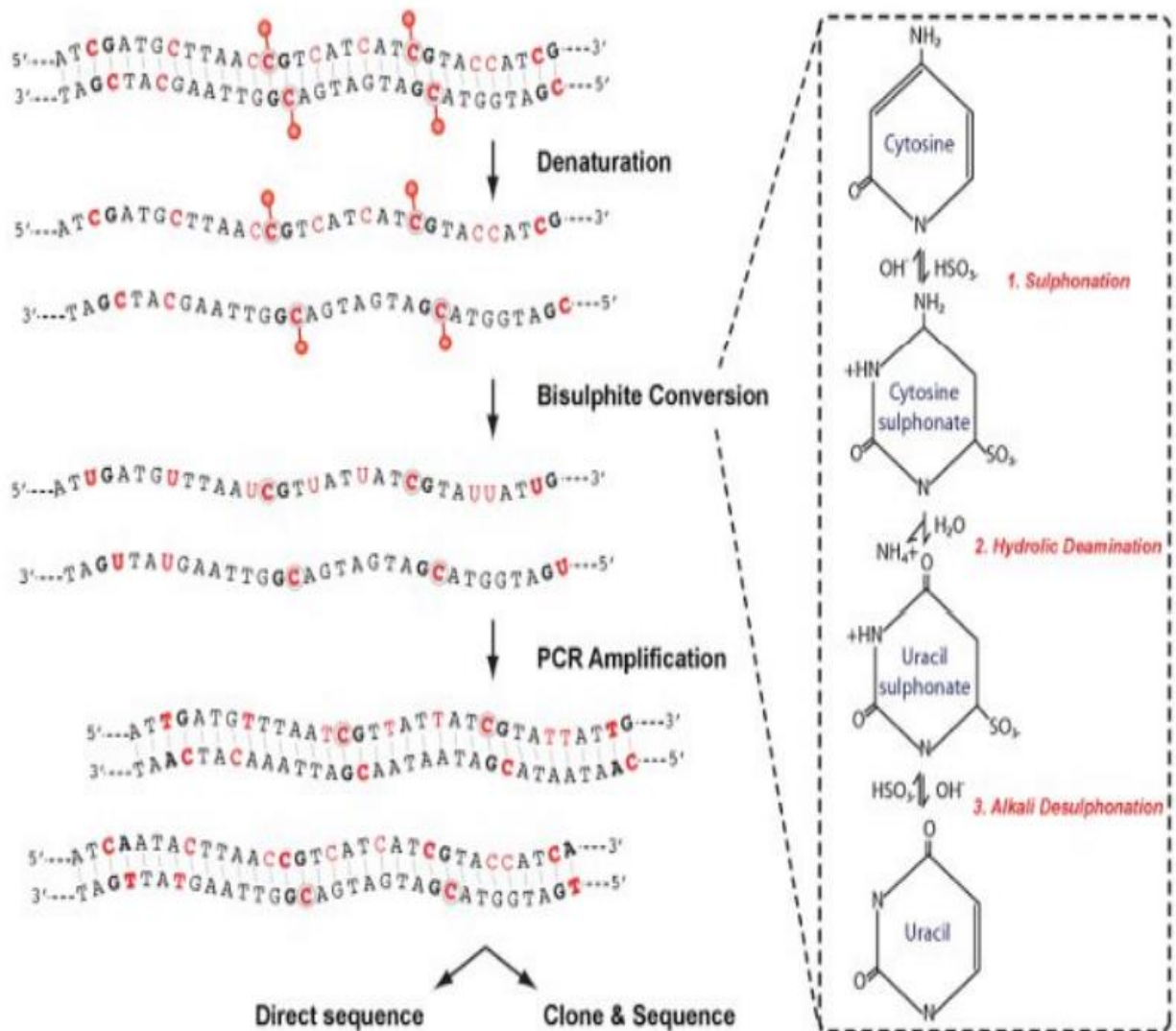


Sin embargo, los protocolos de conversión de DNA clásicos requieren mucho tiempo, a menudo requieren más de 16 h para completarse, y requieren múltiples pasos de cambio de tubo que aumentan el riesgo de contaminación y error humano. Los protocolos clásicos también corren el riesgo de perder más del 75% del DNA inicial durante la purificación y a través de roturas de cadena sencilla que ocurren durante los largos pasos de incubación (Hernández, Yat Tse, Pang, et al. 2019)

Limitaciones del método: a menudo se requiere una PCR anidada para superar el problema de la amplificación inespecífica; el diseño y la amplificación del cebador a menudo son problemáticos debido a la complejidad reducida del DNA; y la amplificación de fragmentos largos de DNA tratado con bisulfito es difícil (el límite es de 100 a 300 pb en la mayoría de los casos). (Kurdyukov & Bullock, 2015)

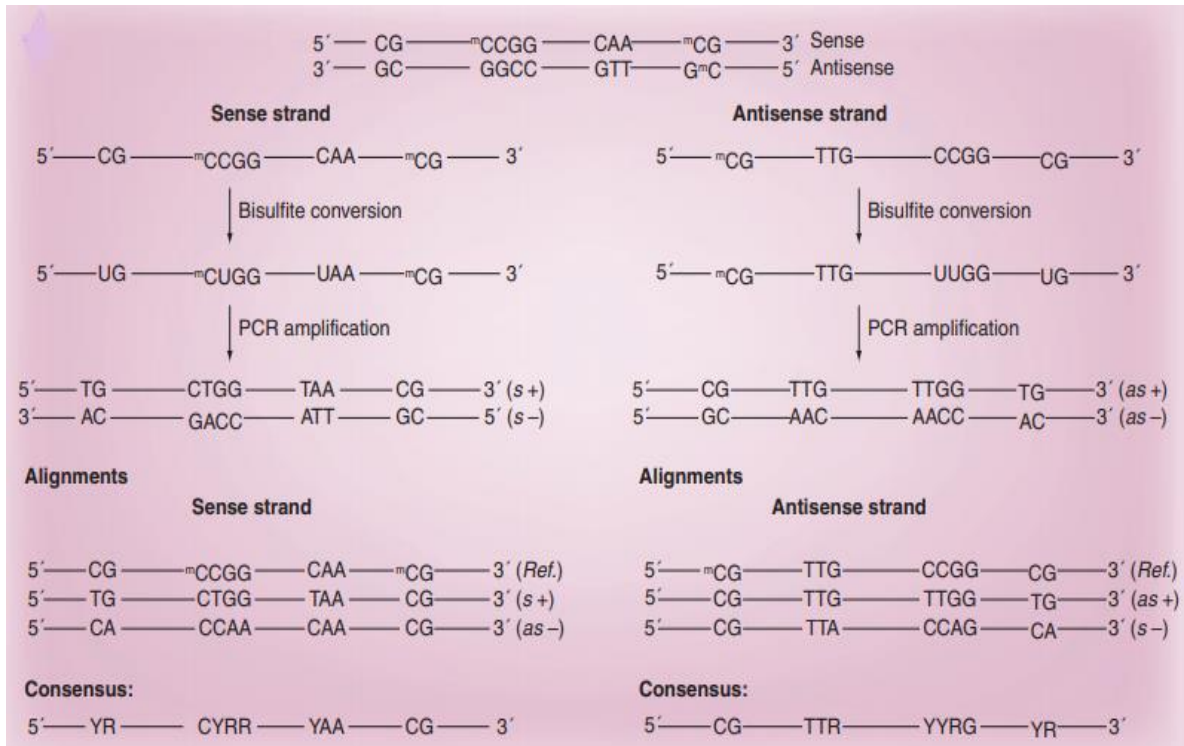
De acuerdo con Reinders y Paszkowski (2010) se requieren tres pasos de reacción para convertir la citosina en uracilo (Figura 8). Primero, el DNA desnaturalizado de cadena sencilla (ssDNA) reacciona con el bisulfito en condiciones ácidas (pH 5.2) produciendo sulfonato de citosina (paso 1), que se desamina para formar sulfonato de uracilo (paso 2). Es en este paso de reacción el grupo metilo de 5-metilcitosina protege la base de la conversión. Después de la purificación de DNA para eliminar cualquier bisulfito de sodio residual, el DNA se trata con un alcalí (p. ej., NaOH 3.0 M) para desulfonar el sulfonato de uracilo, lo que resulta en la recuperación de las bases de uracilo (U) convertidas (paso 3). Posteriormente, se lleva a cabo la amplificación mediante PCR, donde las moléculas de uracilo (U) son amplificadas como timinas (T), mientras que las 5Mc son amplificadas como citosinas (Figura 9). Los productos de PCR resultantes pueden clonarse y secuenciarse (Reinders & Paszkowski, 2010).

Figura 8



**Figura 8. Esquema de la conversión de DNA con bisulfito.** El análisis de la metilación del DNA con bisulfito de sodio incluye cuatro etapas principales como se muestra; desnaturalización, conversión con bisulfito, amplificación por PCR y análisis. En el panel derecho se representan las modificaciones a la molécula de citosina que ocurren durante la conversión de bisulfito. **Traducción:** *denaturation* (desnaturalización), *bisulphite conversion* (conversión con bisulfito), *PCR amplification* (amplificación por PCR), *direct sequence* (secuencia directa), *clone & sequence* (clonar y secuenciar), *sulphonation* (sulfonación), *hydrolytic deamination* (desaminación hidrolítica), *alkali desulphonation* (desulfuración alcalina). Fuente: Patterson, K, Molloy, L, Wenjia, Q. et al. (2011). *DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis*. Journal of Visualized Experiments.

Figura 9



**Figura 9. Amplificación por PCR del DNA convertido con bisulfito.** Un dsDNA hipotético se muestra la plantilla (arriba), con el estado de metilación indicado por la citosina o 5-metilcitosina. Inmediatamente después de la conversión, las dos cadenas ya no se complementan entre sí debido a conversiones de citosina que crean una discordancia U – G. Se proporcionan los orígenes de las secuencias específicas de la cadena, así como la orientación de plantilla introducida después de la amplificación por PCR (centro). Dentro de las alineaciones (abajo), los estados de metilación se infieren al detectar transiciones de C a T (donde Y = C o T), así como las transiciones de G a A (donde R = G o A) como resultado de la amplificación por PCR. Debido a esta complejidad, el análisis de secuenciación de bisulfito generalmente compara las lecturas de secuenciación con cada cadena original por separado. +: Cadena inicial; -: Cadena amplificada; as: Antisentido; ref: Referencia; s: Sentido. bis. **Traducción:** *sense strand* (cadena sentido), *antisense strand* (cadena antisentido), *bisulfite conversion* (conversión con bisulfito), *PCR amplification* (amplificación por PCR), *alignments* (alineaciones), *consensus* (secuencia de consenso). Fuente: Reinders, J, Paszkowski, J. (2010). *Bisulfite methylation profiling of large genomes*. Epigenomics.

### 1.5.6 Kits comerciales de conversión con bisulfito de sodio

Los kits de conversión con bisulfito disponibles comercialmente mejoran la recuperación del DNA convertido mediante el uso de una incubación más corta, pasos y procedimientos alternativos de purificación. Estos kits también facilitan la implementación eficiente de la reacción de conversión, mejorando así los resultados

posteriores con técnicas basadas en PCR. Existen muchas consideraciones para seleccionar un kit, que incluye costo, rendimiento, eficiencia y tiempo. (Hernández, Yat Tse, Pang, et al. 2019) (Tabla 5)

**Tabla 5**

Comparación de algunos kits comerciales para la conversión de bisulfito					
Proveedor	Cantidad de DNA requerido	Cantidad de DNA obtenido (1)	Tiempo (2)	Notas adicionales	# de reacciones/costo (3)
Zymo DNA Methylation Gold Kit (D5005 & D5006)	500 pg- 2µg (óptimo 200-500 ng)	≥10 ml >99% >75%	4	El DNA modificado puede ser almacenado a -20° C hasta por 1 mes	50 rxns (2.7) 200 rxn (2.3)
Qiagen EpiTect Bisulfite Kit (59104)	1 ng – 2 µg	20 ml >99% NA	6	Protocolo para muestras FFPE	48 rxns (4.4)
Zymo DNA Methylation Direct Kit (D5020 & D5021)	50 pg- 2 µg (óptimo 200 - 500ng)	10 ml >99.5% >80%	5	Protocolo para muestras FFPE	50 rxns (3.6) 200 rxns (2.5)
Zymo EZ DNA Methylation-Lightning Kit (D5030 & D5031)	100 pg - 2 µg (óptimo 200 - 500ng)	10 ml >99.5% >80%	3	Para almacenamiento a largo plazo a -70°C	50 rxns (3.6) 200 rxns (2.5)
Epigentek BisulFlash DNA Modification Kit (P-1026-050)	0.2 ng – 1 µg (óptimo 200–500 ng)	>90% >99.9%	2,5	Protocolo para cantidades pequeñas de DNA 0.2 ng/50 células	50 rxns (2.2)
Epigentek Methylamp DNA Isolation & Modification Kit (P-1002-40)	1 ng-1 µg. (óptimo 50–200 ng)	8–18 µL >99.9% >90%	3	Protocolo para células de adhesión, plasma, suero y fluidos biológicos	40 rxns (5.0)

**Tabla 5. Comparación de algunos kits comerciales para la conversión de bisulfito.** (1) Arriba: volumen de salida; Medio: eficiencia de conversión esperada; Abajo: recuperación esperada. (2) Duración aproximada del proceso de conversión en horas. (3) Número de reacciones para cada kit y costos de reacción en dólares estadounidenses (entre paréntesis), derivados de la página web del proveedor (conversión de moneda si es necesario) (Anexo). Abreviaturas: rxns: Reacciones. FFPE:

Embebida en parafina-fijada en formalina. Fuente: Hernández, H, Yat Tse, M, Pang, S, et al. (2013). *Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation análisis*. Biotechniques.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DMG es uno de los problemas sanitarios con mayor prevalencia en la población mexicana, relacionada con factores de riesgo preponderantes en niveles socioeconómicos bajos. La obesidad gestacional, como consecuencia de patrones dietéticos inadecuados y la falta de actividad física, condiciona el desarrollo fetal de forma crítica, alterando la composición corporal y metabólica en la homeostasis de la glucosa e insulina, cuyas consecuencias se expresan durante la infancia y en la edad adulta. Estudios recientes correlacionan el desarrollo de la DMG no sólo al estado de obesidad materno, sino también a factores genéticos de riesgo que juegan un papel importante en la etiología de la DMT2.

La evidencia actual demuestra que el haplotipo de riesgo “5 SNP” está relacionado con la disminución en la expresión del gen SLC16A11 y su interacción con la proteína chaperona BSG, resultando en la alteración del metabolismo lipídico como parte de la fisiopatología de la DMT2, sin embargo, a pesar de las similitudes etiológicas de la DMG y la DMT2, no existen estudios recientes que correlacionen el estado de expresión del gen SLC16A11 como un factor genético de riesgo en el desarrollo de la DMG en madres y en la predisposición de su descendencia a padecer DMT2 en la población mexicana. Por lo tanto, en el siguiente trabajo se plantea la evaluación de la expresión de SLC16A11 en pacientes diagnosticadas con DMG, clínicamente sanas y sus recién nacidos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de SLC16A11 en células de sangre periférica de madres diagnosticadas con diabetes *mellitus* gestacional y en sangre de cordón umbilical de sus recién nacidos, para saber si existe una correlación entre la expresión de SLC16A11 y la DMG.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar la extracción y purificación de DNA y mRNA a partir de muestras de sangre de recién nacidos obtenidas del cordón umbilical y por punción venosa de las madres diagnosticadas con DMG y clínicamente sanas.
- Evaluar la presencia del gen SLC16A11 en el DNA purificado de las muestras de sangre de los binomios madre/recién nacido (M/RN) utilizando la técnica de PCR punto final.
- Evaluar el estado de metilación de las muestras de DNA de los binomios madre/recién nacido mediante la técnica de conversión con bisulfito y PCR punto final
- Evaluar los resultados obtenidos de las pruebas de PCR punto final mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa, comparando la presencia de fragmentos amplificados del gen SLC16A11 en DNA de los binomios con tratamiento y sin tratamiento con bisulfito.
- Evaluar la expresión del gen SLC16A11 en cada binomio a nivel de mRNA mediante la técnica de RT-PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa

## **4. HIPÓTESIS**

Existe una subexpresión del gen SLC16A11 en madres diagnosticadas con diabetes *mellitus* gestacional, así como en sus recién nacidos.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Criterios de inclusión**

Se incluyeron en el estudio pacientes que firmaron el consentimiento informado, diagnosticadas con DMG, sin antecedentes familiares de diabetes o alguna otra enfermedad metabólica y pacientes clínicamente sanas que hayan tenido un desarrollo adecuado de la gestación.

### **5.2 Criterios de exclusión**

Se excluyeron del estudio aquellas pacientes con antecedentes familiares de diabetes y/o enfermedades metabólicas, pacientes VIH (+) y pacientes que no firmaron el consentimiento informado.

### **5.3 Criterios de eliminación**

Se eliminaron del estudio aquellas pacientes que expresaron su decisión de no seguir participando, además de eliminar aquellas muestras sanguíneas identificadas incorrectamente, con un volumen insuficiente, hemolizadas o sin EDTA.

### **5.4 Colección de muestras**

Se trabajó con 30 muestras de sangre de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, tomadas de 14 madres y sus respectivos recién nacidos (16). Las muestras provenientes de las madres fueron obtenidas mediante punción



venosa, anticoaguladas con EDTA (tubo vacutainer color morado) y las muestras de sangre de los recién nacidos se obtuvieron postparto mediante punción del cordón umbilical. Las muestras fueron obtenidas gracias al apoyo del personal médico del Hospital de Gineco-Obstetricia del Centro Médico Nacional La Raza del IMSS. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Oncología Genómica del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **5.5 Extracción y purificación de ácidos nucleicos**

Se purificaron ácidos nucleicos a partir de leucocitos de células de sangre periférica (*peripheral blood cells* o PBC, por sus siglas en inglés) de pacientes diagnosticadas con DMG, pacientes clínicamente sanas y de las células de sangre del cordón umbilical de sus recién nacidos, según lo describe Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Se centrifugó la sangre anticoagulada con EDTA por 15 min. 22400 x g a 4°C, desechando el plasma sin remover la capa leucocitaria. Posteriormente se añadió buffer de lisis de eritrocitos (RCLB, por sus siglas en inglés) en frío, se homogeneizó por inversión del tubo y se refrigeró por 5 min a -20°C. Después se agitó por inversión suave y se centrifugó por 2 minutos a 22400 x g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por inversión del tubo, sin remover el botón. Se repitió la adición de RCLB y la centrifugación hasta obtener un botón de color blanco. Después de los lavados, se procedió a realizar la adición del reactivo *TRIzol™ Reagent* de Thermo Fisher Scientific (Cat. No. 15596026), homogenizando por pipeteo y dejando incubar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó cloroformo ácido y se dejó incubar a temperatura ambiente por 3 min. Después se centrifugó por 15 min. a 12,000 x g a 4°C y transcurrido este tiempo se observó la formación de fases. La fase acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo de centrífuga, sin alterar la interfase.



## 5.6 Purificación del DNA

Se agregó etanol absoluto frío al tubo que contenía la fase orgánica y la interfase, se homogenizó por inversión y se dejó incubar por 3 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 min. a 22400 x *g*, se eliminó el sobrenadante y se agregó buffer de citratos, dejando en agitación por 20 min. Posteriormente, se centrifugó por 15 min. a 22400 x *g*, se eliminó el sobrenadante y se repitió la adición del buffer de citratos, la agitación y la centrifugación, hasta obtener el aclaramiento del botón. Después, se agregó etanol al 75% y se dejó en agitación por 15 min. a 2 x *g*. Transcurrido este tiempo, se centrifugó por 5 min. a 22400 x *g* y se recuperó el botón, eliminando la mayor cantidad de etanol posible del tubo. Se añadió buffer de lisis nuclear (BLN) y proteinasa K, homogeneizando en vortex y se dejaron actuar toda la noche a 56°C.

Al día siguiente se añadió acetato de amonio y se dejó actuar por 30 min a -20°C, después se centrifugó a 43904 x *g* por 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó isopropanol frío, dejando reposar por 12 hrs. a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 43904 x *g* por 15 min y posteriormente se recuperó el botón decantando el sobrenadante. Se agregó etanol frío al 70% y se resuspendió el botón. Se centrifugó a 12600 x *g* por 5 min y se repitieron los lavados dependiendo del tamaño del botón. Posteriormente, se decantó el sobrenadante, procurando no despegar el botón y se dejó secar en termoblock a 56°C. Se resuspendió el botón en agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C.

## 5.7 Purificación del RNA

Se adicionó etanol al 70% al tubo que contenía la fase acuosa obtenida a partir del paso de lisis celular con TRIzol™ y cloroformo ácido, homogeneizando en vortex y agitando el tubo por inversión para dispersar cualquier precipitado que se formase después de añadir el etanol. Se transfirieron 700 µL de la muestra a una columna de sílice *spin cartdrige* con tubo colector del kit *PureLink RNA® Mini Kit* de

Thermo Fisher Scientific (Cat. No. 12183020) y se centrifugó a 12,000 x *g* por 15 segundos a temperatura ambiente. Se eliminó el contenido del tubo colector y se repitió el procedimiento hasta procesar toda la muestra. Los pasos de lavado y elución para la purificación del RNA total se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en el inserto del kit. El RNA obtenido fue resuspendido en agua libre de RNAsas y conservado a -20°C hasta su procesamiento.

### **5.8 Conversión con bisulfito**

Para evaluar el estado de metilación del gen SLC16A11, el DNA extraído y purificado de los binomios madre/recién nacido se cuantificó por espectrofotometría UV/VIS a 260/280 nm y se sometió a conversión con bisulfito con el kit *EZ-DNA Methylation-Lightning™* (Cat. No. 5030) de Zymo Research, utilizando 500-700 ng de DNA de acuerdo con el protocolo descrito en el inserto del Kit.

### **5.9 Diseño de oligonucleótidos**

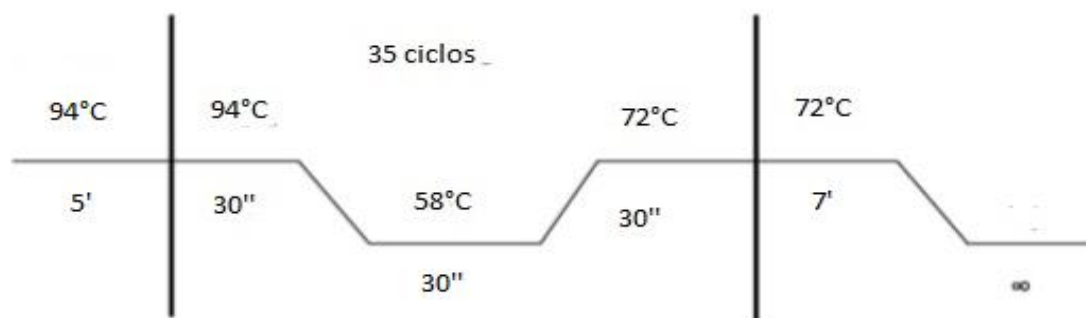
Mediante el uso de herramientas bioinformáticas como el *Primer-BLAST* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo los diseños de distintos oligonucleótidos específicos para la secuencia del gen SLC16A11.

### **5.10 Amplificación del gen SLC16A11**

Los distintos oligonucleótidos fueron estandarizados utilizando como control positivo muestras de DNA de una línea celular HELA. Para la amplificación de la secuencia del gen SCL16A11 se realizó la técnica de PCR punto final, utilizando 100 ng de DNA purificado anteriormente para el grupo control (sin tratamiento con bisulfito) y 1 µL del DNA previamente tratado con bisulfito, oligonucleótidos sentido-antisentido específicos para la secuencia de DNA con y sin tratamiento con bisulfito,

master mix y agua libre de nucleasas para un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L en un tubo para PCR. Como controles negativos se utilizaron tubos con los reactivos de la PCR (master mix), oligonucleótidos sentido/anti sentido específicos para la secuencia del DNA tratado y sin tratamiento con bisulfito y agua libre de endonucleasas, exceptuando la adición de las muestras de DNA en ambos tubos. Las condiciones del programa introducidas en el termociclador se indican a continuación:

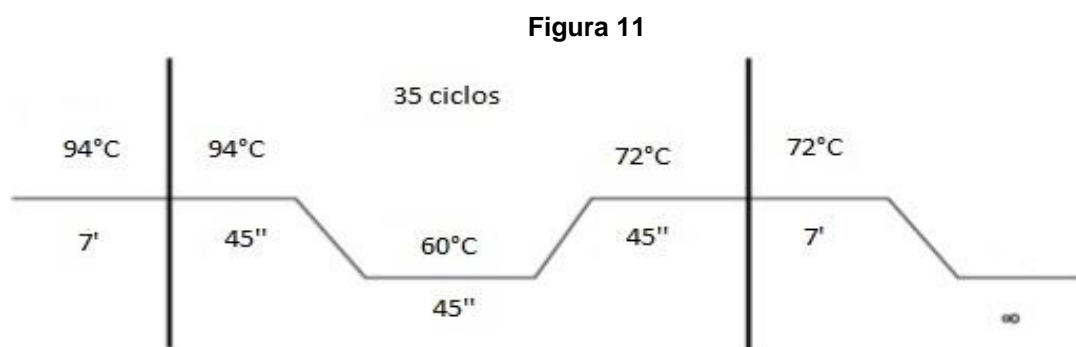
**Figura 10**



**Figura 10. Programa de amplificación de la secuencia del gen SLC16A11 utilizado en la técnica de PCR punto final.** Se muestran las condiciones de temperatura ( $^{\circ}$ C), tiempo en minutos ( $'$ ), segundos ( $''$ ) de cada fase (desnaturalización, hibridación y elongación) para cada ciclo del programa de PCR punto final.

Para el estudio de la expresión del gen SLC16A11 se utilizó el RNA total purificado y cuantificado previamente de las muestras de sangre de cordón umbilical de los recién nacidos y de punción venosa de sus madres, realizando la técnica de RT-PCR con el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*<sup>™</sup> de Thermo Fisher Scientific (Cat. No. 4368814), agregando 1  $\mu$ g de RNA total, master mix, retro-transcriptasa y de agua libre de RNAsas para un volumen total de reacción de 20  $\mu$ L en un tubo para PCR, manipulando reactivos y muestras en hielo. Las condiciones del termociclador y el procedimiento se realizaron de acuerdo al protocolo descrito en el inserto del kit. Una vez obtenido el cDNA por RT-PCR, se

cuantificó por espectrofotometría UV/VIS a 260/280 nm y se procedió a realizar la técnica de PCR punto final; para ello se utilizaron 100 ng de cDNA, master mix, oligonucleótidos específicos sentido-antisentido y agua libre de nucleasas para un volumen de reacción total de 25  $\mu$ L. Los controles negativos se prepararon utilizando master mix, oligonucleótidos específicos sentido-antisentido y agua libre de nucleasas. Las condiciones del programa introducidas en el termociclador fueron las indicadas en la Figura 11.



**Figura 11. Programa de amplificación de la secuencia de cDNA de SLC16A11 utilizado en la técnica RT-PCR.** Se muestran las condiciones de temperatura ( $^{\circ}$ C), tiempo en minutos ( $'$ ), segundos ( $''$ ) de cada fase (desnaturalización, hibridación y elongación) para cada ciclo del programa de PCR punto final.

### 5.11 Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de los productos del DNA amplificado se utilizaron geles de agarosa al 2% con buffer TBE, teñidos con bromuro de etidio. Los productos de las PCR punto final se corrieron en cámara de electroforesis con buffer TBE a 100v por 30 minutos, migrando en paralelo a los controles negativos, ubicados en los últimos 2 carriles de cada gel. El revelado de los geles se llevó a cabo mediante la exposición a la luz UV.

Tabla 6

Interpretación de los posibles resultados a obtener de la conversión con bisulfito y de las pruebas de PCR punto final de los binomios M/RN.			
Muestra DNA M/RN	Tratado con bisulfito (T)	Sin tratamiento con bisulfito (NT)	Interpretación
Resultados	(+)	(-)	Metilado
	(-)	(+)	No metilado
	(+)	(+)	Contaminación de DNA
	(-)	(-)	DNA degradado o insuficiente, mal diseño de oligonucleótidos, etc.

**Tabla 6. Interpretación de los posibles resultados a obtener de la conversión con bisulfito y de las pruebas de PCR punto final de los binomios M/RN.** Se muestra la combinación de resultados de amplificación por PCR punto final de los fragmentos de SLC16A11 sin tratamiento con bisulfito (NT) (grupo control), tratado con bisulfito (T) para cada una de las muestras de DNA de madres diagnosticadas con DMG, clínicamente sanas y sus recién nacidos (binomio M/RN). Abreviaturas: M/RN: madre/recién nacido

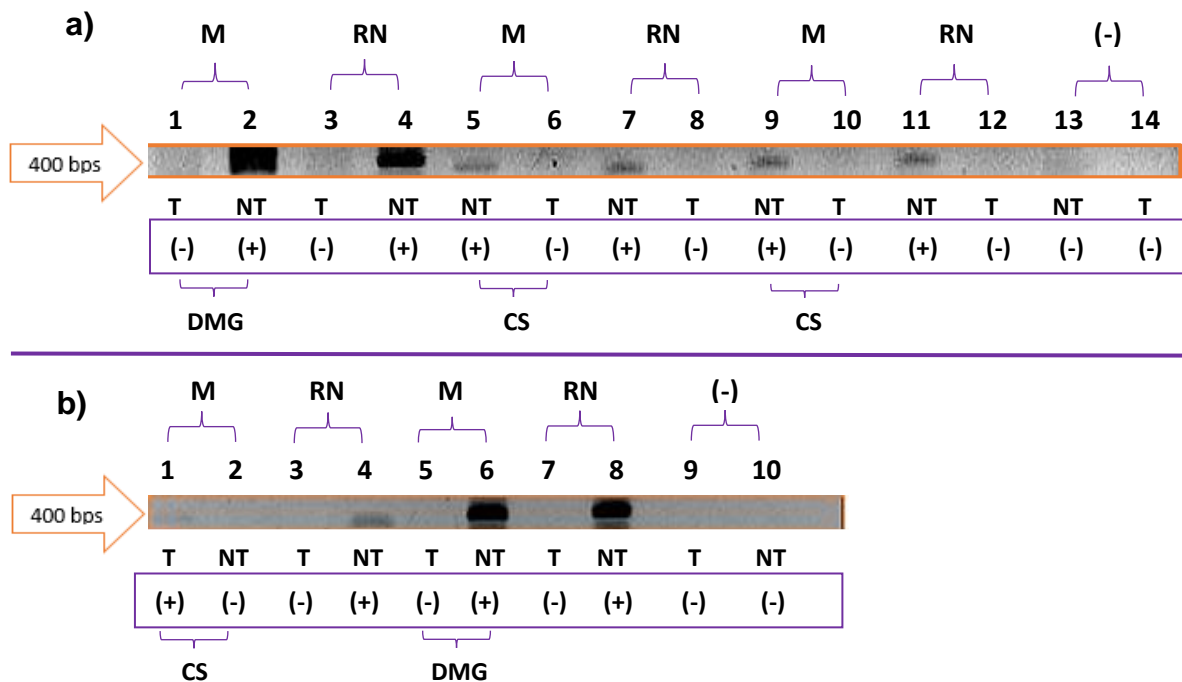
## 6. RESULTADOS

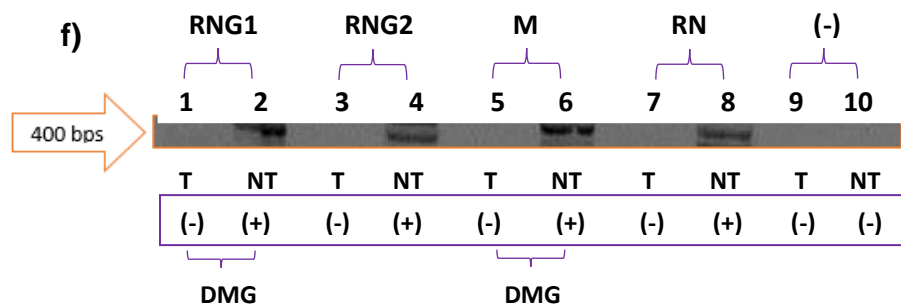
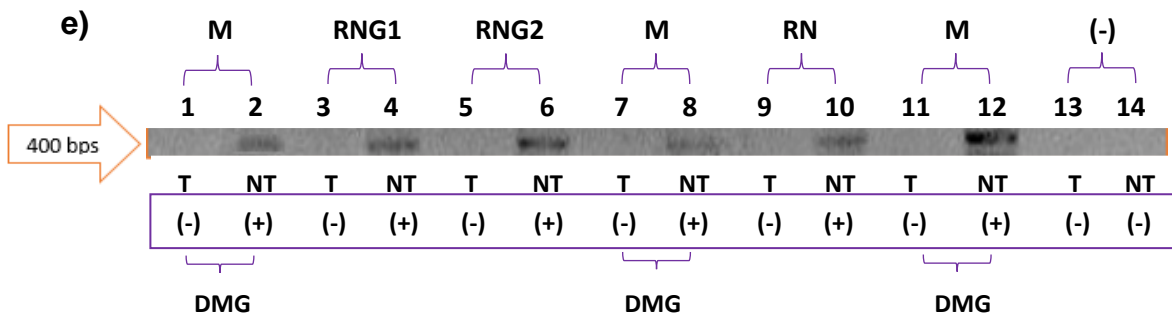
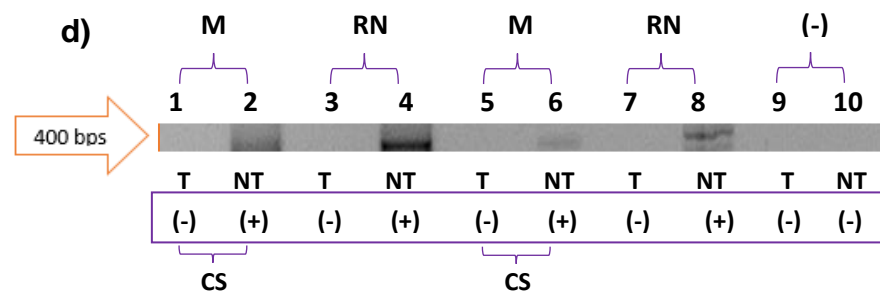
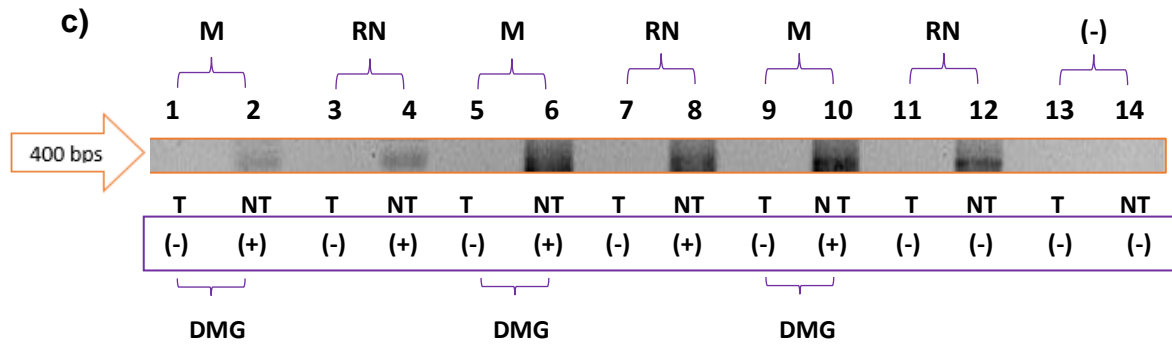
Se comprobó la integridad del DNA por espectrofotometría UV/VIS a 260/280 nm y electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, para la evaluación del estado de metilación del gen SLC16A11 se utilizaron muestras de DNA de los binomios madre/ bebé sin conversión con bisulfito como control positivo de la amplificación del fragmento de SLC16A11 mediante la técnica de PCR punto final, obteniéndose los resultados presentados en la Figura 12. De las 15 muestras de DNA materno evaluadas, en 14 de ellas se encontró un patrón de resultados negativos (-) para el DNA tratado con bisulfito (T) al observarse la ausencia de bandas de amplificación de un peso molecular aproximado de 400 pb, correspondientes al fragmento de SLC16A11. Por otro lado, se obtuvieron resultados positivos (+) en las muestras de DNA sin tratamiento con bisulfito (NT) donde se presentaron bandas de

amplificación del peso molecular esperado; por lo cual, los resultados (-) y (+) para DNA T y NT se interpretaron como un estado no metilado de SLC16A11 en el 93.33% de las muestras evaluadas. La muestra de DNA materno restante presentó un resultado positivo (+) para el DNA T y negativo (-) para el DNA NT, interpretándose como un estado metilado de SLC16A11 en el 6.67% de las muestras analizadas de DNA materno (Figura 12, inciso b). La interpretación de los resultados obtenidos se encuentra resumida en la Tabla 6.

Por otro lado, en las 15 muestras de DNA de los recién nacidos se presentó un patrón de resultados (-) para DNA T y (+) para DNA NT, por lo cual se encontró un estado no metilado de SLC16A11 en el 100% de los casos, mientras que del total de muestras de DNA de los binomios madre/ recién nacido (n= 30) se encontró que sólo el 3.33% presentó metilación de SLC16A11.

Figura 12

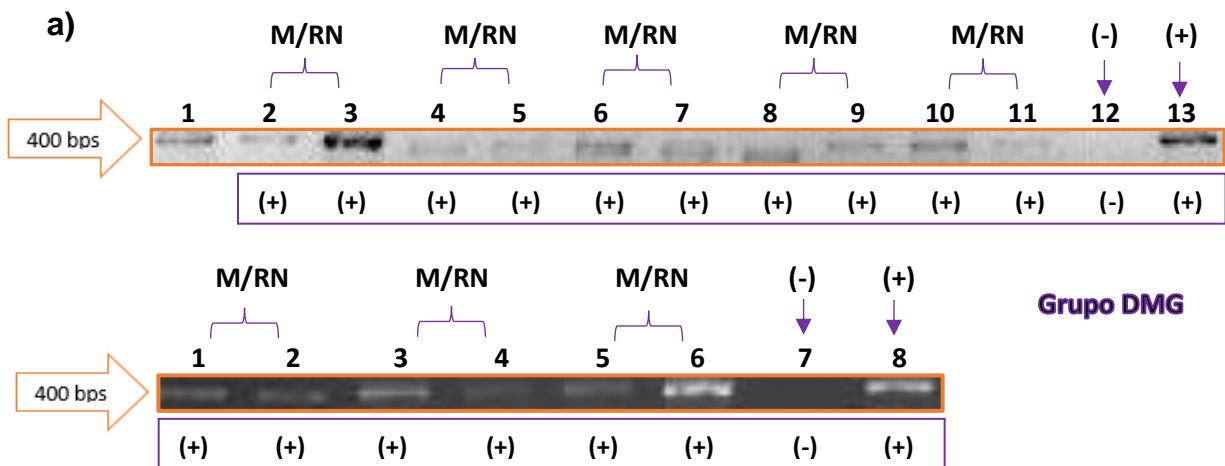




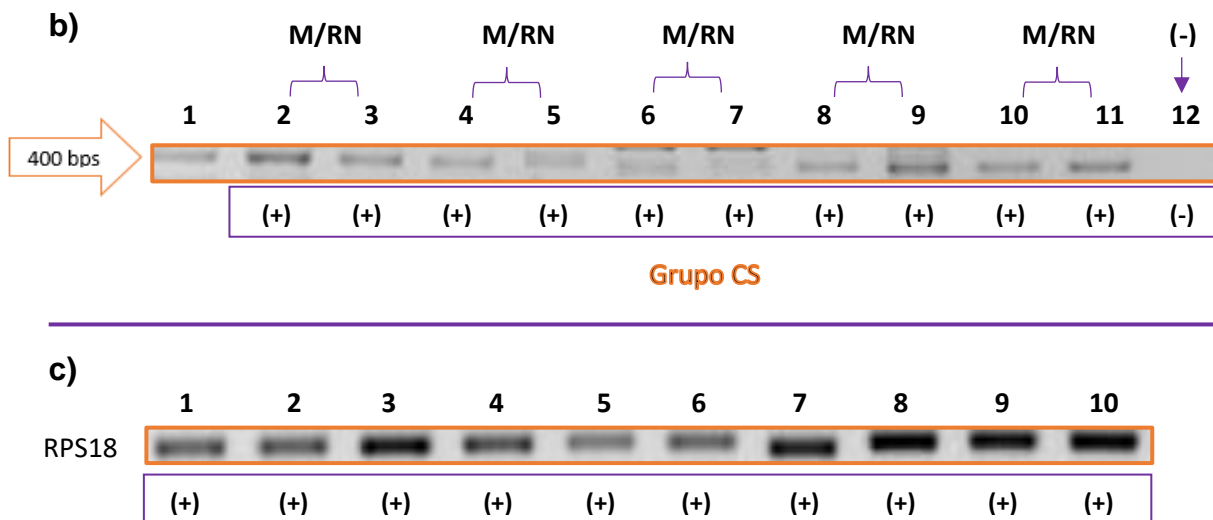
**Figura 12. Productos de la amplificación del DNA de los binomios madre/ recién nacido por PCR de punto final.** Las imágenes corresponden a los resultados en gel de electroforesis al 2% con buffer TBE y teñido con bromuro de etidio. Flecha naranja: Longitud molecular aproximada del fragmento amplificado del gen SLC16A11 en pares de bases (bps). **a), b), c), d), e), f):** DNA materno (M) tratado (T) y no tratado con bisulfito (NT), DNA de su recién nacido (RN) tratado (T) y no tratado con bisulfito (NT), recién nacido gemelar (RNG) controles negativos (-) para DNA T y NT. Cuadro inferior morado: resultados de la prueba de PCR punto final del DNA T y NT con bisulfito, de los binomios M/RN. La presencia de bandas de una longitud molecular aprox. de 400 pares de bases (bp) en cada carril se considera como resultado positivo (+), mientras que la ausencia de bandas con esta longitud molecular se considera como un resultado negativo (-). Abreviaturas: DMG: madre con diagnóstico de diabetes *mellitus* gestacional; CS: madre clínicamente sana, M/RN: Madre/Recién nacido.

Para la evaluación de la expresión génica de SLC16A11 se comprobó la integridad del cDNA mediante espectrofotometría UV/VIS a 260/280. Como control positivo se llevó a cabo la amplificación mediante PCR punto final de un fragmento de SLC16A11 (sin tratamiento con bisulfito) y de un fragmento de cDNA del gen RPS18 como control endógeno obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 13. De las 26 muestras de los binomios M/RN y en los controles positivos se obtuvieron bandas de amplificación de cDNA en el 100% de los casos (resultados positivos).

**Figura 13**







**Figura 13. Productos de la amplificación del cDNA de los binomios madre/ recién nacido por RT-PCR.** Las imágenes corresponden a los resultados en gel de electroforesis al 2% con buffer TBE y teñido con bromuro de etidio. Flecha naranja: Longitud molecular aproximada del fragmento amplificado del gen SLC16A11 en pares de bases (bps). **a)**, carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2-11: binomios de cDNA materno y de recién nacido (M/RN) respectivamente. Carril 12: control negativo. Carril 13: control positivo. **b)**, carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2-11: binomios M/RN de cDNA. Carril 12: control negativo. **c)** bandas de amplificación de un fragmento de cDNA del gen RPS18 (control endógeno). Grupo DMG: Madres diagnosticadas con DMG y sus recién nacidos. Grupo CS: Madres clínicamente sanas y sus recién nacidos.

Las variables somatométricas/ control glucémico fueron analizadas con la prueba *t* de *Student* y las variables de los resultados del estado de metilación y expresión de SLC16A11 fueron analizadas con la prueba exacta de Fisher considerando valores de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos para ambas pruebas. Todos los valores de  $p$  representan pruebas hipótesis de una cola. La edad promedio de las madres fue de  $31.88 \pm 4.25$  años. No se encontraron diferencias significativas entre el índice de masa corporal (IMC) de las madres con diagnóstico de DMG ( $31.91 \pm 4.07$  kg/m<sup>2</sup>) y el grupo de madres CS ( $28.94 \pm 4.26$  kg/m<sup>2</sup>)  $p = 0.085$ , ni entre el control glucémico (HbA1c) del grupo DMG ( $5.33 \pm 1.13$ )

y el grupo de madres CS ( $5.00 \pm 0.87$ ),  $p= 0.26$ . Las mediciones somatométricas de los RN de madres diagnosticadas con DMG (peso:  $2.92 \pm 0.51$  kg, talla:  $47.46 \pm 2.60$  cm) y los RN de madres CS (peso  $3.15 \pm 0.91$  kg, talla:  $48.5 \pm 4.32$ ) no mostraron diferencias significativas ( $p= 0.30$ ). El análisis del estado de metilación de SLC16A11 no mostró diferencias significativas entre el grupo de madres diagnosticadas con DMG, CS y el estado de metilación de SLC16A11 ( $p= 0.33$ ) ni entre el grupo de RN del grupo de madres diagnosticadas con DMG y CS ( $p= 1$ ). El análisis de expresión génica de SLC16A11 no mostró diferencias significativas entre el grupo de madres diagnosticadas con DMG, CS y la expresión de SLC16A11 ( $p= 1$ ), ni entre el grupo de RN del grupo de madres diagnosticadas con DMG y CS ( $p= 1$ )

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluó la expresión génica de SLC16A11 en células de sangre periférica (leucocitos) de madres diagnosticadas con DMG, CS y en células de sangre de cordón umbilical de sus recién nacidos, donde no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la DMG y la expresión de SLC16A11, posiblemente debido a que, como se ha reportado en la literatura, la proteína codificada por SLC16A11 se encuentra relativamente en pocos tejidos, con altos niveles detectados en tiroides, glándulas salivales y hepatocitos (Williams, Jacobs, Moreno-Macías, et. al. 2014). Si bien, la presencia de bandas de amplificación en los controles positivos utilizados en la PCR punto final y el análisis de expresión mediante RT-PCR en el presente trabajo sugieren que SLC16A11 se expresa en los tejidos estudiados, sus funciones en ellos continúan sin dilucidarse. La mayoría de los estudios que evalúan la expresión de la proteína MCT humana se han realizado para MCT1, MCT2, MCT4 y escasamente en MCT11 (SLC16A11). Como mediadores de la translocación acoplada a  $H^+$ , de L-lactato, piruvato y cuerpos cetónicos a través de las membranas celulares, MCT1-MCT4 y MCT11 apoyan el mantenimiento del equilibrio energético y la homeostasis del pH, además

de la cooperación metabólica entre diferentes tejidos con distintos perfiles energéticos (Fisel, Schaeffeler, & Schwab, 2018) por lo cual, la expresión de SLC16A11 en leucocitos podría encontrarse aumentada en procesos de estrés metabólico, inflamatorio (obesidad) y por lo tanto, diabetes. SLC16A11 ha sido categorizado como un transportador acoplado a H<sup>+</sup> de piruvato (Rusu, et al. 2017) y, recientemente, en los estudios de Ainbinder, et. al (2021) se demostró experimentalmente el papel del MCT11 en la regulación de los niveles de lactato en hepatocitos residentes de la zona pericentral (con bajo aporte de oxígeno) de ratones *knockout*-SLC16A11 al observar una reducción significativa de dicho sustrato después de la administración de glucosa oral en ayunas, sugiriendo que MCT11 puede ser el transportador primario responsable del transporte de lactato en esta región hepática (Ainbinder, Zhao, & Glover, 2021). De acuerdo con Schurr (2017) el lactato es el producto final de la glucólisis tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Schurr, 2017) y un importante metabolito utilizado como fuente de energía en una gran variedad de tejidos. Los niveles de lactato en circulación fetal son significativamente más altos que en la circulación materna. Aproximadamente un 25% del CO<sub>2</sub> producido por el feto proviene de la oxidación del lactato en la placenta, lo cual sugiere su importancia como sustrato energético para el desarrollo fetal (Li-Na, Xiao-Bo, Kahindo, et al. 2020). La evidencia actual indica que el lactato actúa también como molécula señalizadora y posee un efecto inmunomodulador, por ejemplo, en la supresión de la respuesta pro-inflamatoria de los macrófagos M1 al promover la polarización a M2, dependiente del transporte de MCT (Caslin, Ababayehu, Pinette, & Ryan, 2021) por lo que la expresión de SLC16A11 en leucocitos durante el embarazo normal y la DMG podría contribuir indirectamente a disminuir la resistencia a la insulina, favoreciendo la liberación de citocinas anti inflamatorias.

De acuerdo con Brooks, (2018) el lactato, como sustrato mitocondrial predominante, aumenta los niveles de acetil coenzima A (acetil-coA) y malonil-CoA, inhibiendo la enzima carnitina palmitoil transferasa (CPT-1) y, por ende, el transporte de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial y la  $\beta$ -oxidación

de estos. Además, el lactato es el principal precursor de la gluconeogénesis, aumentando el nivel de glucosa en sangre e inhibe la lipólisis en tejido adiposo blanco a través de la unión con el receptor GPR81 (Brooks, 2018). Por lo cual, la acumulación intracelular de ácidos grasos y diacilglicerol que inhiben la acción del IRS-1 y contribuyen al aumento de la resistencia a la insulina podrían depender de los niveles de expresión de genes MCT y de los niveles de lactasemia relacionados con la alta demanda energética y la glucólisis durante la gestación. Por otro lado, el transporte de lactato a través de MCT en leucocitos y su actividad como inmunomodulador al favorecer un perfil anti inflamatorio podría justificar la expresión de SLC16A11 en estas células durante la DMG y el embarazo normal. Sin embargo, como se ha reportado en la literatura, las variantes genéticas de riesgo identificadas en el locus de SLC16A11 que contienen cis-eQTL (*locus* de rasgos cuantitativos de expresión) y están asociadas a la subexpresión de SLC16A11 y en la alteración de la interacción con su proteína chaperona (BSG) (Rusu, Hoch, Mercader, et al. 2017) han sido evaluadas en hepatocitos primarios. En los estudios de Zhao, Feng, Zang et al. (2019) en modelos de ratones *knockout* se demostró que la manipulación de los niveles de expresión de SLC16A11 eligiendo como blanco el primer exón de SLC16A11 utilizando los sistemas CRISPR/Cas (por sus siglas en inglés *repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas*) en hepatocitos, no causaban una alteración significativa en la homeostasis del metabolismo en general; mientras que el haplotipo de riesgo causante de las mutaciones en SLC16A11 conllevaba a la regulación positiva de la lipina 1, a una acumulación intracelular excesiva de acilcarnitina y lípidos (diacilgliceroles y triacilgliceroles) y, consecuentemente, resistencia a la insulina, similar a la fisiopatología observada en individuos diagnosticados con DM2 (Zhao et al, 2019), sin embargo, aún se desconoce el mecanismo bioquímico que conecta la función de SLC16A11 con dichos procesos metabólicos. Además, otros miembros de la familia relacionados, incluidos SLC16A1 y SLC16A13 también se expresan en el hígado, lo que plantea la cuestión de por qué la función SLC16A11 es distinta. Una posibilidad es que SLC16A11 posea una afinidad diferente para sustratos

compartidos, lo que sugiere que cada miembro de la familia es dominante bajo diferentes condiciones. Otra posibilidad es que SLC16A11 pueda transportar un sustrato aún no identificado por otros miembros de la familia SLC16. (Rusu, et al., 2017)

Los SNP que crean sitios CpG pueden ser objetivos de modificaciones epigenéticas, así como la pérdida de estos sitios evitará la metilación del DNA. Un ejemplo reportado en la literatura sobre las consecuencias de un polimorfismo que da como resultado un CpG en la región promotora es el gen NDUFB6, el cual ilustra esta intersección entre la regulación genética y epigenética. NDUFB6 es una proteína de cadena respiratoria con expresión disminuida en DMT2. En biopsias musculares de pacientes ancianos, la expresión de NDUFB6 se correlaciona inversamente con el grado de metilación del DNA, lo que sugiere que la presencia de un sitio CpG confiere un mayor riesgo de una disminución en la expresión (y, por lo tanto, riesgo de enfermedad) que no poseer tal sitio. (Handy, Castro, & Loscalzo, 2011).

A pesar de la asociación genética entre la DMG y la DMT2, como se ha estudiado en el trabajo de Huerta Chagoya et. al. (2015), en donde variantes de riesgo de genes tales como TCF7L2 y KCNQ1 se encuentran entre los *loci* más fuertemente asociados en ambas enfermedades y, en los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome Wide Association Studies*) del consorcio de diabetes tipo 2 SIGMA sobre la alta prevalencia del haplotipo de riesgo de 5 SNP de SLC16A11 en el de desarrollo de DMT2 en una población de ascendencia nativo-americana, SLC16A11 no mostró una relación estadísticamente significativa entre los casos de pacientes diagnosticados con DMG y los controles; en consecuencia se observaron frecuencias alélicas similares para las variantes de riesgo de SLC16A11 en dichos estudios. Este hallazgo sugiere que, además de las variantes genéticas comunes de la DMT2, otros factores de riesgo genéticos y ambientales pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la DMG (Huerta-Chagoya, Vázquez-Cárdenas, Moreno-Macías, et al. 2015).

Como ya se mencionó anteriormente, se ha demostrado en estudios previos GWAS que la asociación de la DMT2 en la población nativo-americana está condicionada por la presencia del haplotipo de riesgo en SLC16A11 (y consecuentemente, la pérdida de sus funciones metabólicas) y que no existe evidencia, hasta el momento, de que la supresión de SLC16A11 altere el metabolismo en tejidos con una alta demanda energética y donde dicho gen se encuentra altamente expresado, como lo menciona Zhao et al. en 2019 en modelos de ratones *knockout*. Las limitaciones y contradicciones subyacentes de tales estudios y del presente podrían radicar en los modelos experimentales utilizados. Los estudios de asociación de todo el genoma han descubierto hasta ahora muchos *loci* genéticos fuertemente asociados con DMT2. Sin embargo, continúan habiendo desafíos para traducir estas señales de asociación en mecanismos moleculares debido a la compleja fisiopatología de la DMT2, la DMG y la genética humana. Aunque los estudios que utilizan muestras biológicas humanas proporcionan pistas importantes que implican una participación funcional y un posible mecanismo de las variantes de DNA asociadas a la enfermedad, estos resultados carecen de evidencias experimentales que son capaces de proporcionar causalidad directa, ya que es imposible realizar estudios de ganancia o pérdida de función con seres humanos (Zhao et al, 2019).

Los resultados del análisis con muestras humanas también son complicados por la gran variabilidad individual debido a las perturbaciones de diferentes antecedentes genéticos de la población estudiada. Por lo tanto, en muchos casos, es fundamental aplicar más estudios en animales con una modulación directa de la proteína diana y sus efectos para probar la hipótesis (Zhao et al. 2019). Se hace evidente, por lo tanto, la necesidad de continuar dilucidando la función y los mecanismos de regulación genética y epigenética de SLC16A11 en distintos modelos experimentales y una aproximación científica distinta a la estudiada hasta el momento.

La variabilidad fenotípica a nivel poblacional e individual está determinada en gran medida por variaciones genéticas. Los estudios de variaciones genéticas

utilizando GWAS ha generado una gran cantidad de datos para permitir una mejor comprensión de la variabilidad fenotípica interindividual existente. Sin embargo, la mayoría de estas variaciones no logran obtener una traducción clínica, con pocas excepciones como el glaucoma exfoliativo, la degeneración macular relacionada con la edad y la DMT1. (Manolio, 2013). El problema se ha atribuido frecuentemente a que una gran cantidad de SNP exhiben sus efectos mediante la interacción con mecanismos epigenéticos, que incluyen la metilación del DNA, los factores de transcripción y los micro RNA (miRNA). La interacción de los SNP con estos factores epigenéticos da como resultado la expresión preferencial de 1 alelo, por lo que esto conduce a una expresión génica alelo-específica (Benitez, Cheng, & Deng, 2017).

Sin embargo, los SNP cerca o en sitios CpG pueden crear o suprimir la metilación del sitio CpG, lo que conduce a una alteración en la expresión de los genes. Además, también se ha demostrado que los cambios en la metilación de un sitio CpG pueden influir en los niveles de metilación de los sitios CpG flanqueantes. Se cree que los patrones de segregación y prevalencia de SNP en diferentes grupos étnicos infligen un fenotipo complejo a través de diferentes exposiciones ambientales y modulaciones epigenéticas. Estas interacciones entre los SNP y la susceptibilidad a la enfermedad podrían evaluarse en diferentes grupos étnicos. (Huang, Shu, & Cai, 2015)

Es importante considerar además que, de acuerdo con los estudios de Tan, Hu, You et al. en 2019, en una muestra de pacientes diagnosticadas con DMG y controles de la población china, se encontró que el alelo A de SLC16A11 rs13342232 está asociado con un nivel mayor de glucosa plasmática en ayunas, mayor insulina sérica en ayunas y mayores niveles de HOMA-IR (por sus siglas en inglés, *Evaluación del Modelo Homeostático de Resistencia a la Insulina*) con análisis de regresión lineal (Tan, et al. 2019). Esto contrasta con los datos de control glucémico obtenidos de los pacientes del presente trabajo, donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos de madres diagnosticadas con DMG y CS.



En general, en estudios previos se ha informado de un fenómeno casi universal según el cual el riesgo de DMG aumenta linealmente con la edad, y solo el grado de riesgo de DMG difiere de un estudio a otro. El mecanismo exacto de la asociación entre la edad materna y la DMG no se ha demostrado claramente; el alto nivel de resistencia a la insulina, los altos niveles de adipocinas circulantes y marcadores inflamatorios, así como el estrés oxidativo, pueden explicar en parte este fenómeno. No obstante, se ha documentado que la prevalencia de DMG alcanza su punto máximo en mujeres de 30 a 34 años y luego disminuye después de los 35 años (Yueyi, Xingua, Lilan, et al. 2020). La edad promedio de las madres en el presente trabajo fue de  $31.88 \pm 4.25$  años, por lo cual se infiere que la edad puede ser un factor importante de riesgo en el desarrollo de la DMG y, como se ha estudiado recientemente por Shiau, Wang, Liu, et al. en 2020 en la asociación de perfiles de metilación altos y una aceleración en el envejecimiento prematuro epigenético del DNA en niños de 3-10 años de edad, descendientes de mujeres que desarrollaron DMG; además de presentar un mayor porcentaje de grasa corporal, presión sistólica/ diastólica elevadas y un aumento en la circunferencia abdominal en comparación con niños de cuyas madres fueron clínicamente sanas, de menor edad al momento de la gestación y provenientes de un mejor ambiente socioeconómico (Shiau, et al. 2020). Además, varios estudios clínicos que han investigado la metilación global del DNA en la DMT2 mostraron niveles más altos de metilación global del DNA en diferentes tipos de células sanguíneas periféricas de pacientes diabéticos. El análisis de la metilación global del DNA en leucocitos es un método bien utilizado en estudios epidemiológicos para mostrar asociaciones entre la metilación global del DNA y la enfermedad. Sin embargo, sigue siendo difícil saber si los cambios en la metilación global del DNA de los leucocitos asociados con una alteración metabólica (p. ej., diabetes) también reflejan cambios de metilación en otros tejidos. (Reichetzeder, Dwi Putra, & Pfab, 2016). Es importante considerar futuros estudios donde se consideren distintos tipos celulares, tales como tejido hepático o adiposo con el objetivo de evaluar si existe una regulación epigenética tejido-específica de SLC16A11 en aquellas células cuya demanda



energética es considerablemente mayor. Como lo menciona Agarwal, Morriseau, Kereliuk, et al. (2018), una gran parte del conocimiento reciente acerca de los efectos de la obesidad materna y la diabetes durante el embarazo en la epigenética humana se han derivado del estudio de células nucleadas de sangre periférica debido a su accesibilidad; sin embargo, muchas marcas epigenéticas pueden diferir entre células de forma tejido-específica, siendo relevantes para la salud y el desarrollo de enfermedades Agarwal, Morriseau, Kereliuk, et al. 2018).

Existe también la posibilidad de que el diagnóstico y tratamiento oportuno de la DMG en las pacientes del presente trabajo disminuyeran el riesgo de presentar una alteración en la expresión de SLC16A11, ya que no se observaron diferencias en las variables somatométricas y de control glucémico en los grupos de madres diagnosticadas con DMG, CS y sus recién nacidos. Otras variables a considerar son la modalidad de tratamiento de la DMG (p.ej. dieta e insulina), criterio de diagnóstico, además de factores de riesgo, como el tabaquismo durante el embarazo, las cuales podrían alterar el estado de metilación. Curiosamente, en los estudios de Blazevic, et al. (2017) sobre la alteración de los patrones de metilación del DNA del gen transportador de serotonina fetal (SLC6A4) y la regulación de su expresión en la placenta durante la DMG, se encontró un fenómeno de hipometilación en el grupo de madres diagnosticadas con DMG que corresponden con una regulación positiva de los niveles de mRNA de SLC6A4 placentario, apoyando la noción de una capacidad inherente de la placenta para adaptarse a distintos cambios ambientales (Blazevic, Horvaticsek, Kesic, et al. 2017).

La falta de evidencia de que exista una alteración en la expresión de SLC16A11 y en la regulación epigenética por metilación del DNA, en células de sangre periférica de madres con DMG y en sangre de cordón umbilical de su descendencia, sugiere que no existe relación entre la expresión de SLC16A11 y la DMG en los tejidos estudiados.

## 8. CONCLUSIONES

1. Se realizó la extracción y purificación de DNA y mRNA de las muestras de sangre periférica de madres diagnosticadas con DMG, clínicamente sanas y de sangre de cordón umbilical de sus recién nacidos, sin embargo, se infiere que posiblemente no sean los modelos de estudio más apropiados para el estudio de la expresión de SLC16A11 en el contexto de la DMG
2. Los binomios de madre/recién nacido de ambos grupos (DMG y CS) expresan SLC16A11 en los tejidos estudiados
3. No se observó una alteración en la expresión del gen SLC16A11 en los binomios madre/recién nacidos de ambos grupos (DMG y CS)
4. No se observó metilación del gen SLC16A11 en el 93% los binomios madre/recién nacido de ambos grupos (DMG y CS), por lo cual es posible que este no sea un mecanismo de regulación de la expresión de SLC16A11.
5. No existe relación estadísticamente significativa entre la expresión del gen SLC16A11 y la DMG en los tejidos estudiados.

## 9. PERSPECTIVAS

Se podría considerar en futuros estudios la evaluación de la existencia de otros mecanismos de regulación epigenética que alteren la expresión de SLC16A11 durante la DMG, tales como miRNA y unión a factores de transcripción. Por otra parte, la evaluación del estado de metilación en una población de gran variabilidad genética y fenotípica, los patrones de segregación y prevalencia de los SNP en las poblaciones puede afectar los resultados de expresión de SLC16A11, por lo cual, sería conveniente realizar los estudios en pacientes que pertenezcan a distintos grupos étnicos. También es importante la evaluación de estas interacciones en diferentes tejidos (p.ej. hepatocitos o tejido adiposo) en donde se han demostrado

niveles más altos de expresión de SLC16A11, en cuyo caso, podría demostrar un fenómeno de regulación génica y epigenética tejido-específica en relación con dicho gen, lo cual constituye un campo de investigación de interés para el diagnóstico oportuno, prevención y tratamiento de la DMG.

Se sugiere también realizar futuros estudios donde se compare la expresión y el estado de metilación del gen SLC16A11 en pacientes diagnosticadas con DMG sin control glucémico, pacientes diagnosticadas con DMG con tratamiento oportuno, pacientes CS y sus recién nacidos. Además, podría considerarse un monitoreo y seguimiento continuo de las variables somatométricas, control glucémico y dieta de los recién nacidos.

## 10. REFERENCIAS

- Agarwal, P., Morriseau, T., Kereliuk, S., et al. (2018). Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 23-24.
- Ainbinder, A., Zhao, L., & Glover, P. (2021). Mct11 deficiency alters hepatic glucose metabolism and energy homeostasis. *bioRxiv*, 7-56.
- Ali, N., Pontello, R., & Tavares, A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 1-13.
- American Diabetes Association. (2018). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 42, 13-28.
- American Diabetes Association. (2019). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 41, 13-27.
- Angueira, A., Ludvik, A., Reddy, T., et al. (2015). New Insights Into Gestational Glucose Metabolism: Lessons Learned From 21st Century Approaches. *Diabetes*, 327-334.
- Bártoová, E., Krejčí, J., & Harnicarová, A. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *Cytochem*, 711.
- Baz, B., Jean-Pierre, R., & Jean-François, G. (2016). Gestational diabetes *mellitus*: definition, aetiological and clinical aspects. *Endocrinology of Pregnancy*, 174-176.

- Benitez, J., Cheng, S., & Deng, Q. (2017). Revealing allele-specific gene expression by single-cell transcriptomics. *Int J Biochemistry Cell Biol.*, 155-160.
- Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2020). *FTO alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase [ Homo sapiens (human) ]*. Recuperado el 09 de Febrero de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=79068>
- Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2020). *SLC30A8*. Recuperado el 9 de Febrero de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=169026>
- Blazevic, S., Horvaticek, M., Kesic, M., et al. (2017). Epigenetic adaptation of the placental serotonin transporter gene (SLC6A4) to gestational diabetes *mellitus*. *PLOS One*, 12-16.
- Brooks, G. (2018). The Science and Translation of lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism*, 757-785.
- Caslin, H., Ababayehu, D., Pinette, J., & Ryan, J. (2021). Lactate Is a Metabolic Mediator That Shapes Immune Cell Fate and Function. *Frontiers in Physiology*, 1785.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Chuan-Chen, Y., & Jau Chen, S. (2019). Gene Expression and Phenotypic Traits. *IntechOpen*.
- Dalfrà, M., Burlina, S., Del Vescovo, G., & Lapolla, A. (2020). Genetics and Epigenetics: New Insight on Gestational Diabetes *mellitus*. *Frontiers in Endocrinology*, 11.
- Dereke, J., Palmqvist, S., Nilsson, C., et al. (2016). The prevalence and predictive value of the SLC30A8 R325W polymorphism and zinc transporter 8 autoantibodies in the development of GDM and postpartum type 1 diabetes. *Endocrine*, 53, 740-746.
- Donohue, D., Gautam, A., Miller, S., et al. (2019). Gene expression profiling and whole blood: A comparative assesment of RNA-stabilizing collection methods. *PLoS ONE*, 1-12.
- ENSANUT. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. Recuperado el 22 de Enero de 2020, de <http://www.ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2>
- Fernández-Morera, J., Rodríguez-Rodero, S., Menéndez-Torre, E., et al. (2010). The Possible Role of Epigenetics in Gestational Diabetes: Cause, Consequence, or both. *Obstetrics and Gynecology International*, 2010, 1-7.

- Fisel, P., Schaeffeler, E., & Schwab, M. (2018). Clinical and Functional Relevance of the Monocarboxylate Transporter Family in Disease Pathophysiology and Drug Therapy. *Clinical and Translational Science*, 352-364.
- Frommer, M., McDonald, L., Millar, D., et al. (1991). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academies of Sciences of the United States of America*, 89, 1827-1831.
- García-Rojo, M., & Morillo-Castro, A. (1999). Técnicas de Biología Molecular en el diagnóstico en Dermatología. *Dematología Peruana*, 9, 17-18.
- González-Ruiz, M., Rodríguez-Bandala, C., Salcedo-Vargas, M., et al. (2014). Actualidades en diabetes gestacional. *Revista Sanidad Militar México*, 276-282.
- Görkem, Ü., Küçükler, F., Toğrul, C., et al. (2016). Are adipokines associated with gestational diabetes *mellitus*? *Journal Of The Turkish-German Gynecological Association*, 17, 186-190.
- Handy, D., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *National Institutes of Health*, 123(19), 2145-2156.
- Hernández, H., Yat Tse, M., Pang, S., et al. (2019). Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *Biotechniques*, 55, 181-197.
- Herráez, A. (12 de Febrero de 2012). *Biomodel*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2020, de [http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm#heading\\_toc\\_j\\_7](http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm#heading_toc_j_7)
- Hruskova, Z., & Biswas, S. (2013). A New “Immunological” Role for Adipocytes in Obesity. *Cell Metabolism*, 5, 315-317.
- Huang, T., Shu, Y., & Cai, Y. (2015). Genetic differences among ethnic groups. *Molecular Cell*, 586-597.
- Huerta-Chagoya, A., Vázquez-Cárdenas, P., Moreno-Macías, H., et al. (2015). Genetic Determinants for Gestational Diabetes *mellitus* and Related Metabolic Traits in Mexican Women. *PLOS one*, 1-17.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (14 de Marzo de 2018). *PCR: reacción en cadena de la polimerasa*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2020, de Gobierno de México: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>
- International Diabetes Federation. (2019). *Atlas de la Diabetes de la FID*. FID.
- Jin, B., Li, Y., & Roberston, K. (2011). DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer*, 607-617.

- Joehanes, R., Johnson, A., Barb, J., et al. (2012). Gene expression analysis of whole blood, peripheral blood mononuclear cells, and lymphoblastoid cell lines from the Framingham Heart Study. *Physiological genomics*, 59-75.
- Jung, U., & Myung-Sook, C. (2014). Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 6184-6223.
- Juyi, L., Shan, S., Xiufang, W., et al. (2020). A Missense Mutation in IRS1 is Associated with the Development of Early-Onset Type 2 Diabetes. *International Journal of Endocrinology*, 2020, 1-8.
- Kimura, Y., Kobayashi, M., Asari, M., et al. (2018). Genetic variations in the monocarboxylate transporter genes (SLC16A1, SLC16A3, and SLC16A11) in the Japanese population. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1-4.
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2015). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5, 2-21.
- Lehnen, H., Zechner, U., & Haaf, T. (2013). Epigenetics of gestational diabetes *mellitus* and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Molecular Human Reproduction*, 19, 415-416.
- Leontiou, C., Hadjidaniel, M., Mina, P., et al. (2015). Bisulfite Conversion of DNA: Performance Comparison of Different Kits and Methylation Quantitation of Epigenetic Biomarkers that Have the Potential to Be Used in Non-Invasive Prenatal Testing. *PLoS One*, 10, 1-8.
- Liang, Z., Ying, W., Fang, Q., et al. (2015). Correlations of serum visfatin and metabolisms of glucose and lipid in women with gestational diabetes *mellitus*. *Journal of Diabetes Investigation*, 7.
- Li-Na, M., Xiao-Bo, H., Kahindo, M., et al. (2020). Lactic Acid: A Novel Signaling Molecule In Early Pregnancy? *Frontiers in Immunology*, 11:279.
- Lobo, T., Torloni, M., & Mattar, R. (2019). Adipokine levels in overweight women with early-onset gestational diabetes *mellitus*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 149-156.
- López de la Mora, D., & Sandoval, A. (2016). Biología Molecular. En *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (segunda ed., Vol. 1, págs. 138-140). México, D.F.: McGraw-Hill.
- Manolio, T. (2013). Bringing genome-wide association findings into clinical use. *Nat Rev Genetics*, 549-558.

- Martínez-Frías, M. (2010). Can our understanding of epigenetics assist with primary prevention of congenital defects? *Genetics*, 73-80.
- McIntyre, D., Catalano, P., Cuilin, Z., et al. (2019). Gestational diabetes *mellitus*. *Nature Reviews*, 1-19.
- Nakao, M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 25-31.
- Gene Expression. National Center for Biotechnology Information (NCBI). (12 de Noviembre de 2020). *NCBI*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/applpression/>
- Newbern, D., & Freemark, M. (2011). Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 409-416.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Informe Mundial Sobre la Diabetes*. Recuperado el 22 de Enero de 2020, de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO\\_NMH\\_NVI\\_16.3\\_spa.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf?sequence=1)
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Diabetes Action Online*. Recuperado el 2020 de Enero de 26, de [https://www.who.int/diabetes/action\\_online/basics/es/index1.html](https://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/index1.html)
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. (2012). *La diabetes muestra una tendencia ascendente en*. Recuperado el 23 de Enero de 2020, de [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_c](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_c)
- Pantham, P., Aye, I., & Powe, T. (2015). Inflammation in Maternal Obesity and Gestational Diabetes *Mellitus*. *Placenta*, 709-715.
- Papadopoulou, A., Lynch, F., Shaat, N., et al. (2011). Gestational diabetes *mellitus* is associated with TCF7L2 gene polymorphisms independent of HLA-DQB1\*0602 genotypes and islet cell autoantibodies. *Diabetic Medicine*, 28, 1018-1027.
- Parodi, K., & Jose, S. (2016). Diabetes y embarazo. *Revista Facultad de Ciencias Médicas*, 27-35.
- Patterson, K., Molloy, L., Wenjia, Q., et al. (2011). DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *Journal of Visualized Experiments*. Recuperado el 7 de abril de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3227193/>
- Plows, J., Stanley, J., Baker, P., et al. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes *mellitus*. *Internatinal Journal of Molecular Sciences* , 2-21.
- Quintero-Medrano, S., García-Benavente, D., Valle-Leal, J., et al. (2018). Conocimientos sobre diabetes gestacional en embarazadas de un Hospital Público del Noroeste de México. Resultados de una encuesta. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*.



- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., & Tovilla-Zárate, C. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*, 149-152.
- Ramírez-Clavijo, S., & Montoya-Ortiz, G. (2013). Gene expression and regulation. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*, 15-16.
- Reichetzeder, C., Dwi Putra, E., & Pfab, T. (2016). Increased global placental DNA methylation levels are associated with gestational diabetes. *Clinical Epigenetics*, 36-38.
- Reinders, J., & Paszkowski, J. (2010). Bisulfite methylation profiling of large genomes. *Epigenomics*, 2, 209-220.
- Robert, F., & Pelletier, J. (2018). Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Frontiers in Genetics*, 1-2.
- Robledo, G. (2010). El adipocito y la respuesta inmune. *Revista Facultad de Medicina UNAM*, 53, 43-44.
- Rosik, J., Szostak, B., Machaj, F., et al. (2019). The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of gestational diabetes *mellitus*. *Annals of human genetics*, 1-11.
- Rusu, V., Hoch, E., Mercader, J., et al. (2017). Type 2 Diabetes Variants Disrupt Function of SLC16A11 through Two Distinct Mechanisms. *Cell Press*, 170, 199-212.
- Saucedo, R., Valencia, J., Guiterrez, C., et al. (2017). Gene variants in the FTO gene are associated with adiponectin and TNF-alpha levels in gestational diabetes *mellitus*. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 9, 1-7.
- Schurr, A. (2017). Lactate, Not Pyruvate, Is the End Product of Glucose Metabolism. *InterchOpen*.
- Shiau, S. (2020). Prenatal gestational diabetes *mellitus* exposure and accelerated offspring DNA methylation age in early childhood. *Epigenetics*, 9-11.
- SIGMA Type 2 Diabetes Consortium. (2014). Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*, 2014, 97-101.
- Šimják, P., Cinkajzlová, A., Anderlová, K., et al. (2018). The role of obesity and adipose tissue dysfunction in gestational diabetes *mellitus*. *Journal of Endocrinology*, 23-28.
- Świrska, J., Zwolak, A., Dudzińska, M., et al. (2018). Gestational diabetes *mellitus* — literature review on selected cytokines and hormones of confirmed or possible role in its pathogenesis. *Ginekologia Polska*, 89, 522-527.
- Tamay de Dios, L., & Ibarra, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.



- Tan, Yi-Xiong, et al. (2019). Replication of previous genome-wide association studies of HKDC1, BACE2, SLC16A11 and TMEM163 SNPs in a gestational diabetes *mellitus* case-control sample from Han Chinese population. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 12, 983-989.
- Tarnowski, M., Malinowski, D., Pawlak, K., et al. (2017). GCK, GCKR, FADS1, DGKB/TMEM195 and CDKAL1 Gene Polymorphisms in Women with Gestational Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, 41, 372-379.
- Valdes, P., Bello-Chavolla, O., Martagon, A., et al. (2019). The SLC16A11 risk haplotype is associated with decreased insulin action, higher transaminases and large-size adipocytes. *European Journal of Endocrinology*, 180, 99-107.
- Weedon, M. (2007). The importance of TCFL2. *Diabetic Medicine*, 24, 1062-1066.
- Wieczorek, A., Safranow, K., Tarnowski, M., et al. (2018). Associations between glucokinase and glucokinase regulatory protein gene polymorphisms and clinical parameters in pregnant women. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 64, 25-28.
- Williams, A., Jacobs, S., Moreno-Macías, H., et al. (2014). Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*, 97-101.
- Winkler LTDA. (20 de Abril de 2017). *Purificación de RNA, DNA y Proteínas con la Solución de Chomczynski con Fenol*. Recuperado el 24 de febrero de 2020, de winklerltda: <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/Solucion-de-Chomczynski-DNA-con-fenol.pdf>
- World Health Organization. (2019). *Classification of diabetes mellitus*. Recuperado el 10 de Febrero de 2020, de <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1233344/retrieve>
- Young, J., Jeong, Y., Ham, M., et al. (2014). Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation in Obesity. *Molecules and Cells*, 37, 365-371.
- Yueyi, L., Xingua, R., Lilan, H., et al. (2020). Maternal age and the risk of gestational diabetes *mellitus*: A systematic review and meta-analysis of over 120 million participants. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 9-11.
- Zajdenverg, L., & Negrato, C. (2017). Gestational diabetes *mellitus* and type 2 diabetes: same disease in a different moment of life? Maybe not. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 61-63.
- Zhang, H., Zhang, J., Pope, C., et al. (2010). Gestational Diabetes *mellitus* Resulting From Impaired  $\beta$ -Cell Compensation in the Absence of FoxM1, a Novel Downstream Effector of Placental Lactogen. *Diabetes*, 143-152.
- Zhao, Y., Feng, Z., & Zhang, Y. (2019). Gain-of-Function Mutations of SLC16A11 Contributed to the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Cell Press*, 884-892.

- Zhiying, H., Yaping, T., & Mei, H. (2020). Urinary Peptides Associated Closely with Gestational Diabetes *mellitus*. *Hindawi Disease Markers*, 1-11.
- Zhou, Y., Park, S., Su, J., et al. (2014). TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing . *Human Molecular Genetics*, 6419-6431.
- Zhu, J., & Paul, W. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112, 1557-1569.