

112424



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES EN LOS
GENES IPF-1, HNF-1 α Y GLUCOCINASA EN
PACIENTES CON DIABETES GESTACIONAL
DEL CMN "20 DE NOVIEMBRE"**

ELABORADA POR

DRA. ANTONIA ISIDRO DE LA CRUZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
MEDICINA MATERNO FETAL

ASESOR

DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE



FEBRERO 2004

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ

SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACIÓN
CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE
NOVIEMBRE", ISSSTE



DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE
JEFE DEL SERVICIO DE MEDICINA MATERNO FETAL

PROFESOR TUITLAR

ASESOR



CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE",
ISSSTE



DRA. ANTONIA ISIDRO DE LA CRUZ

SUSTENTANTE

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE
NOVIEMBRE", ISSSTE

AGRADECIMIENTOS

Todo lo Puedo en Cristo que me fortalece.

Gracias Señor, por que si no tuviera confianza en ti, sería imposible alcanzar todas mis metas.

A todos y cada uno de mis maestros del Servicio de Medicina Materno Fetal del CMN "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E. , en especial al Dr. Fernando Escobedo Aguirre, asesor del presente trabajo, por sus invaluable enseñanzas que constituyen un legado para mi vida profesional.

Al Dr. Tito Ramírez Lozada y a la Dra. Margarita Camacho Díaz que fueron para mí los pilares que me sostuvieron para salir adelante. Gracias por todo.

A la Dra. María Teresa Tusié Luna de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", por brindarme la oportunidad de vislumbrar el maravilloso mundo de esta área sorprendente de la ciencia.

A mis abuelitos y a mi madre, por estar pendientes en todo momento de mi persona y por el amor que nos une y sus palabras de aliento que me brindan en todo momento.

Los amo y que Dios los Bendiga siempre.

ÍNDICE

	Pág.
ANTECEDENTES	1
Genética molecular y patología humana	1
Principios de análisis genético	12
Diabetes Mellitus	21
Diabetes Gestacional.....	36
Genes involucrados en formas monogénicas de Diabetes Tipo 2 y vinculados al desarrollo de DG	65
JUSTIFICACIÓN	79
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	82
HIPÓTESIS	82
METAS.....	83
MATERIAL Y MÉTODO.....	84
Tipo de población	84
Tipo de estudio	84
Criterios de inclusión	84
Criterios de exclusión	85
Procedimiento.....	85
RESULTADOS	81
DISCUSIÓN.....	105
REFERENCIAS	112

ANTECEDENTES.

El descubrimiento del ácido desoxirribonucleico (ADN), la transmisión de información del gen a la proteína y el conocimiento de la estructura y acción de proteínas relevantes en vías metabólicas o con función estructural, son avances destacados en el estudio de las bases moleculares de la vida.

En la actualidad, la ingeniería genética ofrece herramientas poderosas para el estudio molecular. Otros avances relevantes incluyen: la transcripción de secuencias del ácido ribonucleico (mARN) mensajero, en ADN complementario (cADN); el empleo de enzimas de restricción; el análisis de Southern; la integración del ADN en vectores y el análisis de la secuencia del ADN.

Con la tecnología ADN recombinante, se aislaron los primeros genes humanos (lactógeno placentario y hemoglobina). A principios de los años ochenta sólo unos veinte genes habían sido clonados. En la actualidad la cifra sobrepasa los 3,000 genes (1).

Genética molecular y patología humana.

Las enzimas de restricción y los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (FRLP), permitieron desarrollar el concepto de *clonación posicional*, empleando marcadores del ADN para localizar genes responsables de enfermedades hereditarias.

Las implicaciones de estos avances se han centrado en la prevención de alteraciones hereditarias. El consejo genético ofrece a familias con defectos hereditarios opciones reproductivas adecuadas, gracias al *diagnóstico prenatal y detección de portadores* (2).

Espectro de la patología genética humana.

Existen más de 6,000 alteraciones heredables de forma dominante, recesiva o ligada al sexo. Las anomalías cromosómicas son la causa de pérdida fetal y malformación congénita mejor definida. La frecuencia de abortos espontáneos en el total de embarazos es del 15%, y en la mitad de los

casos existe asociada una anomalía cromosómica. Las malformaciones congénitas tienen una incidencia entre 2 y 30 de cada 700 nacimientos.

Las enfermedades crónicas con un componente genético variable afectan más del 10% del total de la población adulta. Entre ellas se incluyen: la coronariopatía isquémica, la hipertensión, las enfermedades mentales y la **diabetes**. En muchas de ellas, el componente es probablemente poligénico (3).

Genética molecular y tratamiento.

Existen enormes perspectivas para tratamiento de enfermedades de origen genético. La corrección de trastornos hereditarios mediante sustitución del gen deletéreo por el normal debe permitir el control directo de las enfermedades genéticas en general. Se han obtenido resultados positivos en experimentos con humanos en algunas neoplasias y en el déficit de adenosindesaminasa (ADA).

La obtención de productos proteicos mediante ingeniería genética permite su administración terapéutica, constituyendo el tratamiento idóneo para varias enfermedades. La producción industrial de insulina, factores VIII y IX de la coagulación, hormona del crecimiento, interferones, factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF) y granulocíticas (G-CSF), eritropoyetina, activador tisular del plasminógeno, vacunas, etc., es una realidad.

ADN y medicina preventiva.

Una implicación del conocimiento sobre la estructura de los genes es su aplicación al diagnóstico de la patología humana. A medida que se descifra el mapa del genoma humano, un mayor número de *loci* son accesibles al análisis genotípico, permitiendo estudiar un gran número de enfermedades, la predisposición a ellas, determinar el estado de portador y realizar diagnóstico prenatal y presintomático (2,3).

Información genética.

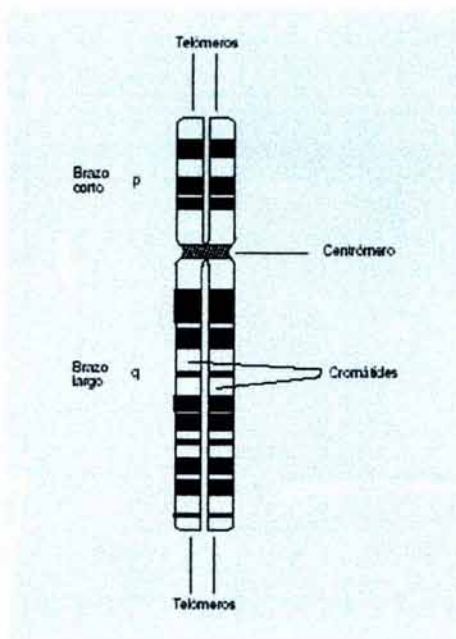
El ADN contiene la información que determina la naturaleza y estructura de las proteínas, así como las instrucciones para el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular.

Las células constituyen la forma más pequeña de vida. Aquellas que contienen un núcleo que almacena al material genético se denominan *eucariotas*. En éstas, el ADN se encuentra en estructuras denominadas **cromosomas**.

Las células tienen la capacidad de dividirse y producen miles de proteínas con distintas funciones.

Las proteínas están formadas por cadenas constituidas por 20 una combinación de aminoácidos distintos, siendo su secuencia y longitud, la base de la diversidad proteica y polipeptídica.

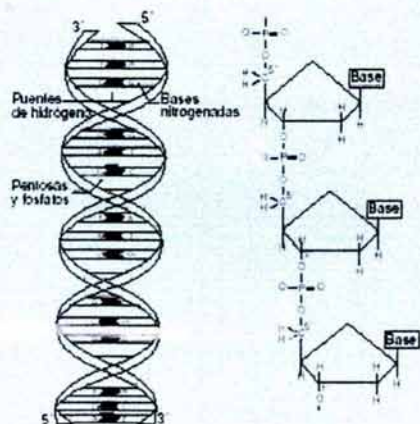
Las características que poseemos los seres vivos las heredamos de nuestros padres. Los experimentos que realizó Mendel (1860) permitieron comprobar que las características de un individuo se encuentran bajo control de dos factores distintos, que conocemos como **genes**, provenientes de cada uno de nuestros padres. Los genes que se bastan por sí solos para la expresión de la característica que determinan se designan **dominantes**, mientras que aquellos que requieren dos copias para su expresión se denominan **recesivos**. Cada célula de nuestro organismo (somática) tiene 46 cromosomas agrupados en 23 pares (3,4).



Cromosoma.

Es una estructura simétrica constituida por dos elementos idénticos, las **cromátidas**, cada una formada por ADN.

Si bien todos los cromosomas tienen la misma organización, su forma y aspecto son distintos, según sean la longitud y disposición del centrómero, el cual determina dos brazos: uno corto y uno largo a los que denominamos **p** y **q**, respectivamente. En 1971 se estableció un sistema para identificar las regiones y subregiones originadas por técnicas de *análisis de bandas*. Éstas representan una parte del cromosoma que puede identificarse de segmentos adyacentes, al aparecer más clara o más oscura que éstos, según el método de tinción empleado. Por ejemplo, 9q34.12 indica cromosoma 9, brazos largos, región 3, banda 4, sub-banda 1-2.



Estructura de los ácidos nucleicos: ADN y ARN.

El ADN es una macromolécula de doble hebra, formada por un gran número de **desoxirribonucleótidos**, cada uno de los cuales contiene una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. Las bases del ADN son las portadoras de la información genética, mientras que los azúcares y grupos fosfato tienen un papel

estructural.

El ARN está formado por una sola cadena de **ribonucleótidos**. El azúcar del ADN es la desoxirribosa, mientras que en el ARN es la ribosa. Las bases nitrogenadas pueden ser púricas o pirimídicas; las púricas son la adenina (A) y la guanina (G), y las pirimídicas, la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U) (3).

ADN y replicación.

Watson y Crick dedujeron la estructura tridimensional del ADN. La molécula ADN está formada por dos cadenas de nucleótidos enrolladas alrededor de un eje. Las bases púricas y pirimídicas

se encuentran en el interior de la hélice, mientras que los grupos fosfato y los azúcares están en la parte externa. Las dos cadenas se unen por puentes de hidrógeno entre los pares de bases.

El modelo de doble hélice sugirió el mecanismo por el cual se produce la **replicación** del ADN, es decir, de cómo se copia el ADN en ADN. El mecanismo consiste en que sólo una de las hebras de cada molécula de ADN hija es sintetizada de **ново**, mientras que la otra es heredada de la molécula original (*replicación semiconservativa*).

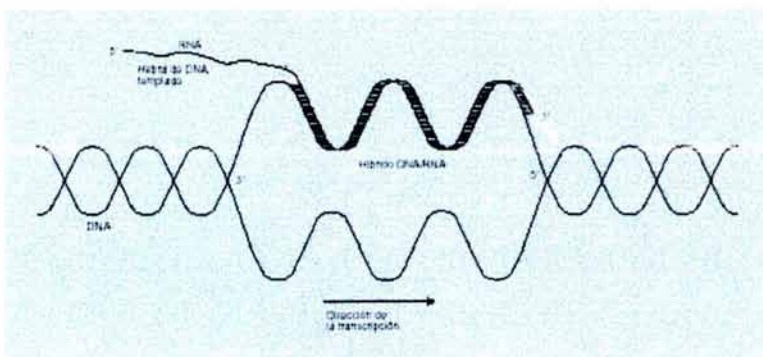
La enzima *ADN-polimerasa I* permite la incorporación de desoxirribonucleótidos a la cadena de ADN existente, la cual ha sido abierta mediante la ADN-polimerasa. Los desoxirribonucleótidos que se incorporen lo harán de forma complementaria a la otra hebra de ADN que actúa como molde (5).

ARN y transcripción.

El ARN mensajero (mARN), transmite información genética para la síntesis proteica. Otras moléculas, como el ARN de transferencia (tARN) y el ARN ribosómico (rARN), están implicadas en el mecanismo de síntesis proteica en el citoplasma. El mARN se sintetiza a partir de ADN mediante las *ARN-polimerasas*. Se define como **transcripción** a la síntesis de mARN a partir de ADN, mientras que la **traducción** es la síntesis proteica a partir del mARN.

El mARN es el molde para la síntesis proteica. Para cada gen que se expresa, se produce una molécula de mARN. El tARN consiste en moléculas que transportan aminoácidos en forma activa hacia el ribosoma para la formación de los péptidos según información proporcionada por el mARN molde. Existe un tARN para cada uno de los 20 aminoácidos distintos. El rARN es el principal componente de los ribosomas.

El ADN contiene regiones denominadas **promotoras** a las que se une la ARN-polimerasa, determinando el lugar donde empieza la transcripción (5,6).



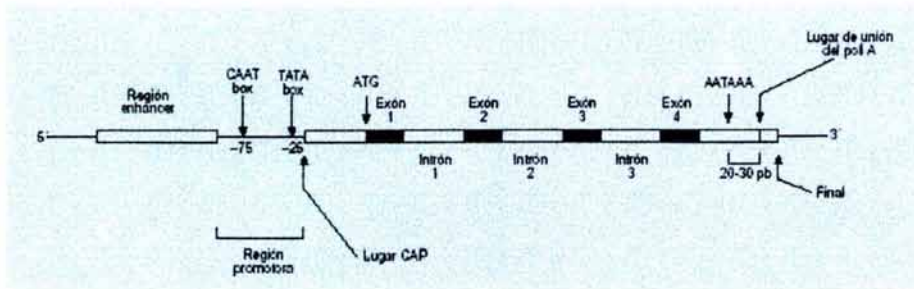
Código genético.

Es la relación entre la secuencia de bases del ADN y la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Cada *codón* contiene tres nucleótidos que definen un aminoácido. La mayoría de los aminoácidos están determinados por más de un codón, y 61 codones de las 64 combinaciones posibles de tres bases codifican los 20 aminoácidos distintos. El código genético no da lugar a ambigüedad, al referirse un codón a un solo aminoácido. Las tres combinaciones que no determinan ningún aminoácido (UAA, UAG y UGA) corresponden a señales para la terminación o "stop" de la cadena proteica (6).

Primera posición (extremo 5')	Segunda posición				Tercera posición (extremo 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Estructura génica: del ADN a la proteína.

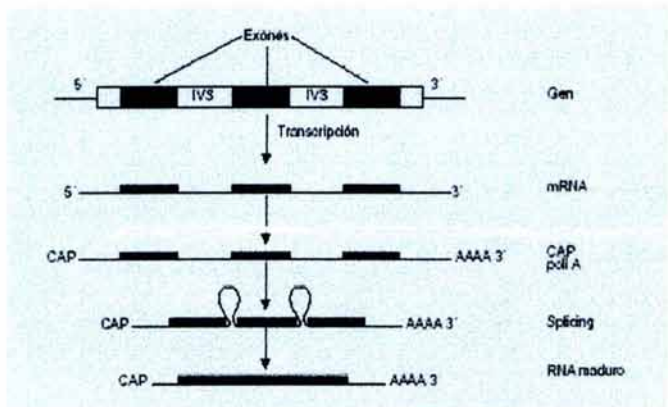
Los genes tienen regiones codificantes (**exones**) interrumpidas por regiones no codificantes (**intrones**).



Los exones contienen secuencias específicas para la cadena polipeptídica. La transcripción origina un mRNA precursor que se corresponde al gen entero. Esta molécula sufre modificaciones en el núcleo antes de pasar al citoplasma. Los intrones son eliminados y los exones se religan

constituyendo un mRNA maduro. Este proceso se denomina "splicing".

El mRNA en el citoplasma actúa de molde para la síntesis proteica. Los distintos tARN presentan especificidad para los



diferentes aminoácidos, teniendo tres bases (*anticodón*) complementarias al codón respectivo del mRNA para cada aminoácido. La síntesis proteica se realiza en los ribosomas y comienza cuando un ribosoma se une a la región en la que existe un codón de iniciación (AUG). Un tARN se une a

éste y seguidamente lo hace otro tARN, formándose un enlace peptídico entre los aminoácidos aportados. El primer tARN se libera y el proceso se repite sucesivamente. La síntesis finaliza cuando se llega a un codón de terminación UAA, UAG o UGA. Posteriormente la cadena peptídica se libera del ribosoma, así como el mRNA (3,5,6).

Herencia y enfermedad.

Existen más de 6,000 defectos genéticos que dependen de un solo gen. Comprenden alteraciones de *herencia dominante, recesiva o ligada al sexo*.

Hay enfermedades frecuentes con susceptibilidad genética. Entre ellas destacan la epilepsia, la diabetes, la enfermedad coronaria y las enfermedades autoinmunes. En muchos casos el componente es probablemente poligénico. Finalmente, la existencia de varios genes responsables de una misma enfermedad, o la presencia de diversas mutaciones en el mismo gen, plantean el tema de heterogeneidad genética y molecular (2).

Enfermedades monogénicas: patrones de herencia.

Las enfermedades de herencia monogénica corresponden a las ocasionadas por la alteración de un solo gen.

El término **locus** se refiere a una posición definida de una secuencia de ADN determinada en un cromosoma. Si la mencionada secuencia corresponde a un gen, hablaremos de **locus genético**. Los organismos *diploides*, poseen dos formas iguales de cada cromosoma autosómico. En éstos, los diferentes **loci** pueden estar ocupados en posiciones equivalentes por secuencias o formas génicas distintas (**alelos**). Un individuo diploide sólo puede presentar dos alelos para cada locus, pero un locus puede presentar varios alelos.

Una combinación de alelos de uno o más loci de un individuo constituye un genotipo, correspondiendo el fenotipo a su expresión en el organismo. Si dos alelos respectivos de ambos

cromosomas homólogos son idénticos, se trata de un genotipo **homocigótico** para dicho locus; si son distintos, es un genotipo **heterocigoto**.

La interacción de los dos alelos (1/2) de un gen o locus para constituir un fenotipo responde a las relaciones mendelianas de dominancia y recesividad. Existe dominancia completa (1 > 2) cuando un fenotipo (1/2) es el mismo de (1/1), pero distinto al de (2/2). Al alelo 1 se le llama dominante, y al 2, recesivo. Si el fenotipo de (1/2) es intermedio al de (1/1) y (2/2) se habla de dominancia incompleta. Si los efectos de 1 y 2 no se mezclan en el heterocigoto y cada alelo contribuye al fenotipo, se trata de herencia codominante. Los alelos de los loci de los cromosomas sexuales presentan el mismo tipo de relaciones de dominancia-recesividad en mujeres (X/X), pero no en varones (X/Y), que sólo presentan un alelo (hemicigotos).

Herencia autosómica dominante.

Se conocen más de 1,500 defectos autosómico dominantes. Los heterocigotos padecen la enfermedad, con lo que la presencia de una sola copia del alelo "enfermo" es suficiente para que la enfermedad se manifieste. Los homocigotos pueden estar gravemente afectados o ser indistinguibles de los heterocigotos.

Los siguientes criterios definen un proceso de herencia dominante: a) individuos enfermos tienen su padre o su madre también afectados por el proceso; b) ambos sexos tienen el mismo riesgo de padecer el defecto genético y transmitirlo a la descendencia; c) cuando un individuo afectado se empareja con uno sano de la población general, tiene un riesgo de 1/2 de tener hijos afectados, y d) los hijos normales de una pareja en la que uno de los miembros padece el defecto, no lo transmitirán a su descendencia (7).

Herencia autosómica recesiva.

Se conocen más de 1,000 defectos autosómico recesivos, en los que únicamente los homocigotos manifiestan la enfermedad y los padres de los individuos enfermos son portadores

heterocigotos, fenotípicamente normales. El 25% de los hijos de una pareja portadora serán genotípicamente (+/+), el 50% (+/d) y el 25% (d/d); es decir, el 75% de ellos serán fenotípicamente sanos y el 25% serán enfermos.

Herencia autosómica codominante.

En la herencia codominante el carácter fenotípico producido por cada alelo tiene su expresión en el heterocigoto. Es el caso de los grupos sanguíneos ABO. La codominancia se da en el genotipo IA/IB, que causa un grupo sanguíneo (fenotipo) "AB".

Herencia ligada al cromosoma X.

Existen más de 200 defectos recesivos ligados al cromosoma X. La enfermedad se transmite mediante una mujer portadora asintomática (X/X) (+/d), en la que la mitad de los hijos varones (X/Y) serán enfermos (hemicigotos) y la mitad de las hijas (X/X) serán portadoras (heterocigotas) sanas.

Herencia poligénica.

Desempeña un papel fundamental en enfermedades que afectan a la población. Éstas incluyen defectos del nacimiento, coronariopatías, diabetes, hipertensión arterial y algunos trastornos psiquiátricos.

Se trata de muchos loci, no necesariamente ligados (segregación independiente) y que contribuyen cada uno de ellos con pequeñas acciones, de forma aditiva en el desarrollo de un fenotipo determinado (7).

Complejo mayor de histocompatibilidad.

Está constituido por proteínas relacionadas con el sistema inmunitario, correspondiendo en su mayor parte a antígenos de membrana de leucocitos. Los genes que codifican dichas proteínas están situados en el cromosoma 6 (6p21.3).

Existen numerosas enfermedades en las cuales la frecuencia de determinados antígenos HLA es significativamente distinta a la correspondiente para individuos de la población general. Dicha asociación se explica por: a) un efecto inmunológico directo debido a la peculiar estructura del antígeno o, b) la proximidad de los loci HLA con loci responsables de algunas enfermedades posibilita la asociación preferente de determinados alelos HLA con alelos deletéreos.

Penetrancia.

Es la probabilidad de que se presente un fenotipo determinado, dado que se posee un genotipo determinado. Un individuo que ha heredado un alelo deletéreo (D) de una enfermedad autosómica dominante, poseerá un genotipo (+/D) para el locus donde asienta el gen responsable de la enfermedad [(+) corresponde al alelo no mutado]; la penetrancia del genotipo (+/D) corresponde a la probabilidad de que dicho individuo desarrolle la enfermedad. Si la probabilidad es 1 (100% de los casos), se habla de penetrancia completa; si es menor que 1, de penetrancia incompleta. Usualmente las enfermedades autosómicas recesivas tienen penetrancia completa, y las dominantes, penetrancia incompleta (7).

PRINCIPIOS DE ANÁLISIS GENÉTICO

Análisis del ADN genómico: Extracción de ácidos nucleicos.

Pocos microgramos (μg) de ADN son suficientes para realizar un análisis genotípico. Una célula contiene aproximadamente 5 picogramos (pg) de ADN. Los estudios de expresión genética requieren análisis del ARN, el cual debe proceder de tejidos en los que el gen que se estudia se encuentre expresado. La extracción de ADN a partir de leucocitos es la más utilizada. Unos 20 ml de sangre periférica, recogidos en presencia de un anticoagulante (EDTA), proporcionan entre 250 y 500 mg de ADN. Las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente hasta 48 horas, debiendo ser procesadas o congeladas hasta que se proceda a la extracción del ADN. Para ello, deben lisarse los hematíes mediante una solución hipotónica, sometiendo los leucocitos a un tratamiento con un detergente (SDS) y una enzima que degrada proteínas (proteínasa K). El ADN liberado del núcleo celular se extrae con fenol y cloroformo, los cuales retienen restos proteicos, dejando indemne el ADN; éste se precipita con etanol absoluto. El ADN se resuspende en una solución con Tris y EDTA, para prevenir roturas en la molécula y asegurar su conservación a 4 °C (3).

Enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción cortan el ADN en secuencias específicas. Se encuentran en bacterias y constituyen un mecanismo de defensa frente a bacteriófagos. Las enzimas de restricción se utilizan para realizar estudios genotípicos y manipular el ADN para la clonación de fragmentos de interés.

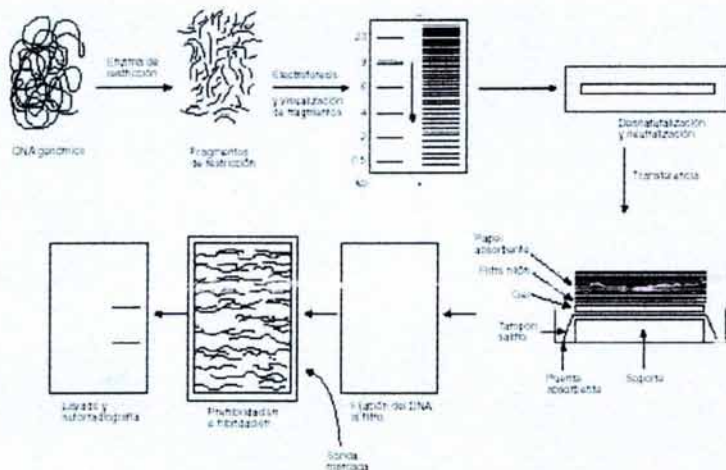


Separación del ADN.

El ADN puede separarse según el tamaño de los fragmentos obtenidos mediante enzimas de restricción. Esta separación se realiza sometiendo el ADN a una electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida, que permite la migración de los fragmentos de ADN en función del tamaño y carga eléctrica. Los geles de agarosa resuelven fragmentos de entre 30 kilobases (kb) y unos 100 pares de bases (pb), mientras que los de poliacrilamida ofrecen separaciones de fragmentos menores, entre 1,500 y 1 pb. La electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE, del inglés, pulsed field gel electrophoresis), permite la separación de fragmentos de ADN de entre 50 y 10,000 kb. La separación consiste en que las moléculas de ADN quedan atrapadas en la red que forma el gel de agarosa, y para poder avanzar, su orientación debe cambiar cada vez que cambia la dirección del campo eléctrico. Cuanto mayor es el peso molecular del fragmento, más tarda en orientarse, y menor su migración a través del gel (1).

Método Southern.

El método Southern se basa en la transferencia de fragmentos de ADN a un soporte sólido, que se hibrida con una sonda marcada. Posteriormente el filtro se lava con soluciones



de mayor a menor salinidad para eliminar la sonda que no ha hibridado con los fragmentos de interés. La exposición a una película de radiografía permite visualizar en la autorradiografía unas bandas, que se corresponden con los tamaños de los fragmentos de ADN estudiados (3).

Sondas moleculares.

El hecho de que las hebras del ADN puedan disociarse y reasociarse in vitro permite la utilización de fragmentos específicos de ADN como sondas o marcadores para complementar la secuencia de ADN que se quiere estudiar.

Sondas génicas.

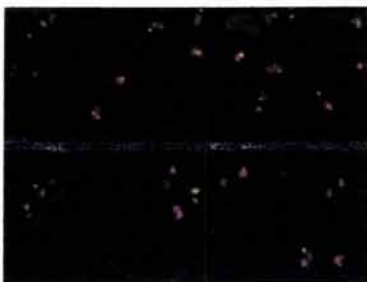
Las sondas génicas pueden ser de tres tipos: genómicas, de ADN complementario (cADN) y de ARN. Las primeras consisten en fragmentos de ADN del genoma, los cuales pueden corresponder a un gen o a una secuencia no codificante. Las sondas de cADN se obtienen a partir de la copia de un mRNA y, por tanto, corresponden a secuencias codificantes de un gen. Las sondas ARN se obtienen in vitro, mediante la síntesis de una cadena complementaria utilizando una ARN-polimerasa.

Oligonucleótidos sintéticos.

La molécula del ADN puede obtenerse de forma sintética. El ADN que se sintetiza (oligonucleótidos) es de cadena sencilla. Los oligonucleótidos pueden ser empleados como sondas para detectar cambios puntuales en la secuencia del ADN, en experimentos de secuenciación o de PCR o bien para analizar mutaciones.

Marcado de sondas.

Las sondas pueden marcarse mediante el uso de isótopos radiactivos. En la actualidad, han aparecido métodos no radiactivos, como la fluorescencia y la quimioluminiscencia (8).



Análisis de la expresión génica.

Existen varios métodos que permiten analizar la expresión génica, entre los cuales debemos destacar el método Northern, los análisis cuantitativos y de transcripción.

Método Northern.

El mRNA puede estudiarse mediante electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes. La transferencia del ARN a un filtro de nylon se realiza del mismo modo que en el método Southern. El ARN transferido al filtro también se hibrida. Este método, denominado Northern, permite confirmar la presencia de ARN determinado en un tejido, conocer su tamaño y apreciar el nivel de expresión de un gen.

Análisis cuantitativos y transcripción.

Mediante dot-blot es posible cuantificar un ARN determinado. El ARN procedente de distintos tejidos se deposita en la superficie de un filtro y, una vez fijado a él, se hibrida con la sonda que se desea analizar. La intensidad de las señales frente a un ARN conocido determina el nivel de expresión del gen en estudio (8).

Clonación y secuenciación.

Clonación molecular.

La clonación se puede realizar introduciendo fragmentos del ADN en un vector y amplificándolos en el interior de *E. coli* o de una levadura. Otro método desarrollado recientemente se basa en la PCR.

El ADN que se desea clonar se digiere con enzimas de restricción, las cuales permitirán introducir los fragmentos obtenidos en un vector. El vector escogido depende de su tamaño. Los bacteriófagos pueden incorporar entre pocas bases y 20 kb de ADN exógeno, mientras que los cósmidos permiten la clonación de fragmentos de entre 35 y 45 kb. Actualmente, el uso de vectores de levaduras (YAC) permite clonación de fragmentos de ADN de hasta 10,000 kb. Debido a la capacidad de estos vectores para aceptar fragmentos grandes de ADN, un solo YAC puede contener un gen entero, que puede ser modificado *in vitro* y expresado en levadura o en células de mamífero, proporcionando información de gran valor sobre la estructura y función de ese gen.

El ADN a clonar se mezcla con el ADN del vector y se ligan los extremos terminales mediante la enzima T4 ADN-ligasa. Posteriormente, se introduce en *E. coli*, en la cápside de un bacteriófago o bien en *Saccharomyces cerevisiae*, donde el ADN se replicará al dividirse las células. No sólo es posible clonar el ADN genómico, sino que el ARN puede copiarse en cADN de doble hebra e introducirse en el vector apropiado.

Secuenciación del ADN.

Existen dos métodos para secuenciar el ADN, uno desarrollado por Maxam y Gilbert y otro por Sanger. Este último es el más empleado. El ADN que se va a secuenciar (ADN templado) puede ser introducido en un vector o bien puede proceder de una amplificación por el método de PCR (1,8).

Faltan páginas

N° 17-19

Mapa genético.

Dos loci se encuentran ligados genéticamente si son heredados juntos en el seno de familias con varios miembros en forma más frecuente que por azar. Los loci que se encuentran ligados están situados en el mismo cromosoma, mientras que la ausencia de ligamiento genético implica que éstos se encuentran lejos el uno del otro en el mismo cromosoma o que están situados en cromosomas distintos. Cuando dos loci se encuentran muy cerca, tienen altas probabilidades de heredarse juntos, por lo que se dice que se encuentran ligados. El sistema para valorar este ligamiento es la cosegregación a través de varias generaciones.

Suponiendo que la recombinación genética es la misma para cualquier parte del genoma y que es por igual en ambos sexos, se puede establecer una correlación entre la distancia genética entre loci y la distancia física. La unidad de medida de la distancia genética es el **morgan** o unidad de recombinación. La distancia relativa entre distintos loci en un cromosoma determinado está relacionada con la frecuencia con la que se producen recombinaciones entre ellos. En los cromosomas humanos existe una media de 52 quiasmas (puntos de entrelazamiento entre cromátides) durante la primera división meiótica en el total de 22 pares de autosomas. Los quiasmas se correlacionan con la recombinación genética, por lo que la longitud genética total del genoma humano haploide es de 26 morgans (30 contando el cromosoma X). Si consideramos que la longitud física del genoma humano es de 3 billones de pb, 1 morgan equivale a 100 millones de pb o, lo que es lo mismo, 1 centimorgan (cM) es 1 millón de pb.

Todos los cromosomas tienen una longitud de, al menos, 50 cM, y casi todos sobrepasan los 100 cM. El cromosoma 1 constituye el 9% del total del genoma haploide, mientras que el cromosoma 21 es menos del 2%. Un cM equivale a 1 Mb, y una banda cromosómica equivale a 5 Mb, pudiendo contener entre 100 y 200 genes (10-12).

DIABETES MELLITUS.

La Diabetes Mellitus (DM) comprende un conjunto de alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos que se caracteriza por hiperglucemia, deficiencia absoluta o relativa de insulina y el desarrollo de complicaciones macrovasculares, microvasculares y neuropáticas. La clasificación clínica de la DM ha evolucionado conforme progresa el conocimiento sobre su patogénesis. Incluso la clasificación más reciente emitida por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) pronto será nuevamente revisada (13).

La clasificación más reciente (2003) considera dos tipos principales de diabetes, con diversas formas menos frecuentes (cuadro 1). El diagnóstico de diabetes se fundamenta en una de tres pruebas cuyo resultado debe confirmarse al día siguiente. Estas pruebas incluyen: a) determinación casual de glucosa plasmática con un valor igual o mayor a 200 mg/dl; b) determinación plasmática de glucosa en ayunas mayor o igual a 126 mg/dl; c) prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (TOG) con 75 gr. V.O. con un valor igual o mayor de 200 mg/dl a las 2 hrs (14).

La conferencia de 1997 reconoció niveles intermedios de intolerancia a la glucosa que incluyen, intolerancia a la glucosa en ayunas definida por un valor de glucosa plasmática en ayunas entre 110 a 125 mg/dl y la intolerancia a la glucosa con un resultado a la dos horas de la TOG con valores plasmáticos entre 140 y 200 mg/dl. A partir del Programa para la Prevención de la Diabetes, estos dos grupos se consideran actualmente como "prediabéticos". En el cuadro 2 se resume la Clasificación de la Diabetes Mellitus emitida por la ADA en 1977, en virtud de que continúa considerándose vigente para fines de diversas investigaciones y en aspectos clínicos (15).

CUADRO 1 . PRINCIPALES TIPOS DE DIABETES

Tipo	Defecto	Genética	Terapéutica
Tipo 1	Destrucción autoinmune de las células β	Riesgo elevado de marcadores genéticos confieren mayor susceptibilidad	Insulina
LADA	Destrucción autoinmune de las células β	Riesgo elevado de marcadores genéticos confieren mayor susceptibilidad	Insulina
MODY Glucocinasa (anteriormente MODY 2)	Alteración en el sensor pancreático de glucosa	Mutación del gen Glucocinasa en el cromosoma 7	Ninguna
MODY Factores de transcripción (anteriormente MODY 1,3,4,5)	Defecto en la secreción de insulina	Mutación de los genes hepático nucleares y en el gen del factor promotor de insulina	Sulfonilurea o Insulina
Tipo 2	Resistencia a la insulina y deficiencia relativa de insulina no debida a destrucción autoinmune de las células β	Poligénica	Sulfonilureas, metformin, inhibidores de la alfa glucosidasa, tiazolidenedionas, insulina
Tipo 1.5	Resistencia a la insulina y deficiencia de insulina debido a destrucción autoinmune de las células β	Desconocida	Se desconoce la mejor terapia aunque todas los fármacos funcionan
Diabetes atípica	Deficiencia no autoinmune de insulina y resistencia a la insulina	Desconocida, probablemente autosómico dominante	Inicialmente requiere de insulina pero luego se controla con hipoglucemiantes orales Insulina
Diabetes pancreática	Deficiencia de insulina y Glucagon	Variable, dependiendo la causa	Insulina
Diabetes lipodistrófica	Severa resistencia a la insulina	Variable, dependiendo si es congénita o adquirida	Sensibilizantes a la insulina, Insulina
Diabetes Tipo 3	Destrucción autoinmune de las células β en la infancia con desarrollo posterior de resistencia a la insulina	Mismos marcadores genéticos de la diabetes tipo 1 con antecedentes familiares de obesidad o diabetes tipo 2	Sensibilizantes de insulina

Desde el punto de vista genético la DM se divide en tres grandes categorías:

Diabetes poligénica. Resulta de la alteración en distintos genes, cada uno con un efecto aditivo.

- Diabetes Tipo 1.- ocasionada por destrucción autoinmune de la célula β del páncreas y asociada a deficiencia absoluta de insulina.
- Diabetes Tipo 2.- Ocasionada por diversas alteraciones en los procesos de síntesis, secreción, acción de la insulina, así como la producción hepática de glucosa. Usualmente existen alteraciones de grado variable en más de uno de estos procesos. La deficiencia de insulina no es absoluta.

Diabetes de herencia mitocondrial. Resultado de mutaciones en el genoma mitocondrial.

Diabetes monogénica. La enfermedad es resultado de la alteración de un único gen.

a) Defectos genéticos que afectan la función de la célula β -pancreática:

- Diabetes Tipo "MODY" (maturity-onset diabetes of the young)
- Diabetes neonatal

b) Defectos genéticos que alteran la acción de la insulina

Cuadro 2 . Clasificación Etiológica de Diabetes Mellitus

I. Diabetes tipo I (disfunción de células β que origina deficiencia absoluta de insulina)

A. Mediada Inmunológicamente

B. Idiopática

II. Diabetes tipo II (Puede variar de resistencia a insulina con deficiencia severa de insulina a un defecto con resistencia a la insulina).

III. Otros tipos Específicos

A. Defectos Genéticos en la función de células β

1. Cromosoma 12, HNF-1 α (anteriormente MODY3)
2. Cromosoma 7, glucokinase (anteriormente MODY2)
3. Cromosoma 20, HNF-4 α (anteriormente MODY1)
4. Mitocondrial DNA
5. Otros

B. Defectos Genéticos en la acción de insulina

1. Resistencia a la Insulina Tipo A
2. Leprecaunismo
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
4. Diabetes Lipoatrófica
5. Otros

C. Diabetes del Páncreas exócrino

1. Pancreatitis
2. Traumatismo/pancreatectomía
3. Neoplasia
4. Fibrosis Quística
5. Hemocromatosis
6. Pancreatopatía Fibrocalculosa
7. Otros

D. Endocrinopatías

1. Acromegalia
2. Síndrome de Cushing
3. Glucagonoma
4. Feocromocitoma
5. Hiperticoidismo
6. Somatostatinaoma
7. Aldosteronoma
8. Otros

Cuadro 2 . Clasificación Etiológica de Diabetes Mellitus

E. Inducida por Químicos o Fármacos

1. Vacor
2. Pentamidina
3. Acido Nicotínico
4. Glucocorticoides
5. Hormona tiroidea
6. Diazoxida
7. Agonistas beta adrenérgicos
8. Tiazidas
9. Dilantin
10. Interferon alfa
11. Otros

F. Infecciones

1. Rubéola congénita
2. Citomegalovirus
3. Otros

G. Formas infrecuentes de diabetes autoinmune

1. Síndrome de "Hombre rígido"
2. Anticuerpos anti-receptor de insulina
3. Otros

H. Otros síndromes genéticos asociados con diabetes

1. Síndrome de Down
2. Síndrome de Klinefelter
3. Síndrome de Turner
4. Síndrome Wolfram
5. Ataxia de Friedreich
6. Corea de Huntington
7. Síndrome Lawrence Moon Beidel
8. Distrofia Miotónica
9. Porfiria
10. Síndrome Prader Willi
11. Otros

IV. Diabetes Mellitus Gestacional (GDM)

Diabetes poligénica.

Diabetes Tipo 1.

La Diabetes Tipo 1 siempre se asocia con una deficiencia absoluta de insulina. La diabetes **Tipo 1 A** (anteriormente denominada Diabetes Mellitus Insulino Dependiente o Diabetes Juvenil) resulta de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas. La evidencia de la autoinmunidad se demuestra por la presencia de uno o más autoanticuerpos para los islotes pancreáticos. Los **anticuerpos para las células de los islotes** (ICAS) fueron descritos por vez primera en los años setenta (citoplasmáticos). En los años ochenta, se descubrieron los **autoanticuerpos para la insulina** (IAAS) y posteriormente se descubrieron los **autoanticuerpos para la descarboxilasa del ácido glutámico** (GADA) y los **autoanticuerpos asociados a insulinoma 2** (IA-ZAS). Actualmente, solo es posible efectuar la determinación de ICAS y GADA en la práctica médica, en virtud de que los IAAS y los IA-2A aún se utilizan únicamente para fines de investigación.

Los anticuerpos contra las células de los islotes (citoplasmáticos) no parecen desempeñar un papel en la etiología de la destrucción de las células β . Al comienzo de la Diabetes Tipo 1, del 70 al 80% de los pacientes son positivos para ICAS. Los anticuerpos contra los islotes frecuentemente declinan después del diagnóstico y no más del 5% al 10% de los pacientes con Diabetes Tipo 1 presenta positividad para ICAS 10 años después. La frecuencia de ICAS en la población general es baja y oscila entre el 0.1% y el 0.3%.

Los autoanticuerpos contra la insulina fueron reportados por vez primera en 1983. Estos anticuerpos deben ser determinados de manera previa a la administración exógena de insulina, debido a que la administración de esta durante cinco a siete días origina resultados positivos. Feeney y cols. comunicaron que los IAAS estuvieron presentes en 90% de niños menores a 5 años de edad, en 71% de niños entre 5 a 10 años de edad, y en el 50% de los 10 a los 15 años de edad.

Los autoanticuerpos para GADA son más persistentes que los ICAS después del diagnóstico.

Los autoanticuerpos asociados a Insulinoma 2 son detectados en aproximadamente 60% o más en casos de Diabetes Tipo 1 recientemente diagnosticada. Su frecuencia en la población general oscila del 2 al 3%.

La presencia de uno o más de estos anticuerpos sugiere de manera significativa un proceso autoinmune que conduce a la deficiencia de células β .

La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas y también guarda relación con factores ambientales aún no completamente definidos. Debe enfatizarse que la presencia de obesidad no excluye el diagnóstico de Diabetes Tipo 1A. Por otra parte, los pacientes con Diabetes Tipo 1, también presentan susceptibilidad para el desarrollo de otros trastornos autoinmunes como la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, enfermedad celiaca, esclerosis múltiple, artritis reumatoide juvenil, síndrome de rubéola congénita y anemia perniciosa.

Algunas formas de Diabetes Tipo 1 no tienen una causa conocida. Corresponde a pacientes que tienen insulinopenia permanente y no tienen anticuerpos contra los islotes pancreáticos. Por ejemplo, únicamente 47% de pacientes de raza negra y Diabetes Tipo 1 de inicio reciente tienen ICAS positivos, lo que sugiere que una considerable proporción de estos pacientes no tienen un componente autoinmune. A este tipo de diabetes se le clasifica como Diabetes Atípica. A esta forma de diabetes se le conoce también como "*diabetes Flatbush*". Estos pacientes usualmente tienen hiperglicemia y cursan con cetoacidosis de manera más frecuente que los pacientes con Diabetes Tipo 2. Este tipo de diabetes al parecer es un trastorno **autosómico dominante**.

Es conveniente señalar que los niveles de insulina sérica (péptido C) no constituyen un buen elemento diagnóstico para la Diabetes Tipo 1. Lo anterior obedece a que en fases iniciales de la Diabetes Tipo 1, especialmente en la Diabetes Autoinmune Latente del Adulto (LADA) existe secreción de insulina endógena y puede ser cuantificada durante meses y ocasionalmente durante años después de haber efectuado el diagnóstico (13-16).

Diabetes Tipo 2.

Los pacientes con Diabetes Tipo 2 presentan tanto resistencia a la insulina como deficiencia relativa de la misma. La terapia con insulina no se requiere para la sobrevivida pero con frecuencia es necesaria para el tratamiento de la hiperglucemia. Existen varias formas de este tipo de diabetes y no existe evidencia de destrucción autoinmune de las células β .

La mayoría de pacientes con Diabetes Tipo 2 presentan resistencia a la insulina relacionada con la obesidad. A pesar de que la cetoacidosis raramente se presenta, puede ocurrir en asociación con otras condiciones que elevan las hormonas contrarreguladoras. Las infecciones y el infarto agudo al miocardio son causas frecuentes de cetoacidosis diabética, especialmente en pacientes añosos.

La Diabetes Tipo 2 se asocia con una fuerte predisposición genética, incluso en mayor grado que la Diabetes Tipo 1. Desafortunadamente, la genética de la diabetes Tipo 2 es compleja y no está completamente definida. Los principales factores de riesgo para la diabetes Tipo 2 incluyen edad avanzada, obesidad y sedentarismo. Es más frecuente en individuos con hipertensión o dislipidemia y es muy frecuente en hispanos, negros, indios americanos y asiático americanos. ***También es más frecuente en mujeres con antecedente de diabetes gestacional o mujeres con antecedente de un producto macrosómico. Es importante señalar que aproximadamente 50% de las mujeres con Diabetes Gestacional, desarrollan Diabetes Tipo 2 en los seis años subsecuentes*** (16).

Diabetes de herencia mitocondrial.

Originada por mutaciones en el genoma mitocondrial y que son heredadas por vía materna. Estas mutaciones se asocian a defectos en la fosforilación oxidativa, derivando en disfunción a nivel tisular y diversa sintomatología que incluye miopatía, encefalopatía, acidosis láctica y diabetes (síndrome MELAS). La mutación más frecuentemente reportada es A \rightarrow G en la posición 3243 del gen del tRNA, que también se asocia a diabetes de transmisión materna y sordera. En esta forma

de diabetes existe un defecto primario en la secreción de insulina y se encuentra en individuos jóvenes asociada a sordera bilateral.

Distintos autores han evaluado la posible participación de alteraciones en el genoma mitocondrial en la Diabetes Tipo 2 y encontraron que la frecuencia de la mutación 3243 A→G oscila entre el 0.5 y el 2.8% de los pacientes diabéticos (16).

Diabetes monogénica

Defectos genéticos que afectan la función de la célula β -pancreática.

Diabetes Tipo "MODY" (Maturity-Onset Diabetes of the Young).

Constituye un grupo heterogéneo de alteraciones hereditarias autosómico dominantes caracterizadas por diabetes no cetogénica, comienzo en la infancia o la adolescencia y un defecto en la función de las células β del páncreas.

Desde el punto de vista clínico algunos pacientes presentan hiperglicemia leve en ayunas durante muchos años, mientras otros pueden presentar diversos grados de intolerancia a la glucosa, antes del comienzo de la hiperglicemia persistente. De manera ocasional existe una progresión rápida a la hiperglicemia persistente (13-16).

Estimaciones recientes señalan que la Diabetes Tipo "MODY" constituye del 1% al 5% de todos los casos de diabetes en los Estados Unidos de Norteamérica y diversos países industrializados.

La diabetes tipo "MODY" además de que se caracteriza por una edad de aparición temprana y un patrón de herencia autosómico dominante, se verifica la afectación de individuos en al menos tres generaciones. La diabetes en estos pacientes ocurre por mutaciones en un solo gen. Se han relacionado con este tipo de diabetes seis genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo y desarrollo de las células β pancreáticas: el Factor Nuclear de Hepatocitos 4 α (HNF-4 α), el Factor Nuclear de Hepatocitos 1 α (HNF-1 α), el Factor Promotor de Insulina 1 (IPF-1), el Factor Nuclear de Hepatocitos 1 β (HNF1 β), el Factor NeuroD1 y el gen de la enzima

glucocinasa (GK). Alteraciones en cualquiera de estos genes causan disminución en la secreción de insulina. La frecuencia reportada para mutaciones en estos genes varía según distintos grupos étnicos.

Por otra parte, existen reportes en donde se señala que entre el 25-45% de familias con Diabetes Tipo MODY tienen alteraciones en genes distintos (aún no identificados) a los seis genes MODY conocidos (Shin & Stoffel, 2002) y agrupan a las familias afectadas en una categoría denominada "MODY X" (17-21).

Los Factores Nucleares de Hepatocitos (HNF's) son factores de transcripción originalmente identificados en el hígado, esenciales en la expresión de distintos genes desde el momento del desarrollo embrionario y durante la vida adulta. El HNF-4 α desempeña un papel importante en el desarrollo, diferenciación celular y el metabolismo del páncreas endocrino e interviene en el funcionamiento normal del intestino, hígado y riñón. Por su parte HNF-1 α es un factor de transcripción de tipo homeodominio expresado también en hígado, intestino, riñón y células β pancreáticas. HNF-1 β y HNF-1 α son proteínas homólogas que funcionan como homo o heterodímeros por lo que tienen una distribución celular muy similar. Sin embargo, la proporción de HNF-1 α /HNF-1 β difiere en los distintos tejidos. Por ejemplo, HNF-1 α es más abundante en hígado y HNF-1 β en el riñón (22).

En términos generales, la Diabetes Tipo MODY no se asocia a obesidad, autoinmunidad o cetoacidosis y algunas características clínicas son más frecuentes en pacientes con mutaciones en algunos de los genes MODY. Por ejemplo, pacientes con mutaciones en el gen GK tienden a presentar hiperglicemia moderada desde el nacimiento, no requieren de hipoglucemiantes orales y ocasionalmente desarrollan complicaciones crónicas. Por el contrario, pacientes con mutaciones en los genes HNF-1 α y HNF-4 α manifiestan hiperglicemia en la niñez o después de la pubertad, presentan deficiencia severa en la secreción de insulina y las complicaciones

ISIDRO A. Genes IPF-1, HNF-1 α y Glucocinasa en Diabetes Gestacional.

microvasculares son frecuentes. La frecuencia de mutaciones identificada en cada uno de los genes MODY y algunas de sus características clínicas asociadas se muestran en el Cuadro 3.

Los pacientes con mutaciones en HNF-1 α , presentan hipersensibilidad a la administración de sulfonilureas, ocasionando con frecuencia hipoglicemia al inicio del tratamiento. Esta característica distingue a los pacientes con mutaciones en HNF-1 α (18-22).

Cuadro 3. Características asociadas con Diabetes Tipo MODY

	MODY1	MODY2	MODY3	MODY4	MODY5	MODY6	MODYX
Región cromosómica	20q	7p	12q	13q	17 cen-q21.3	2	Desconocido
Locus/Gen implicado	HNF-4 ^a	Glucocinasa	HNF-1 ^a	IPF-1	HNF-1B	Neuro D1	Desconocido /mas de uno?
Distribución (% de familias MODY)	Bajo	8-63% ^a	21-64% ^a	Bajo	No se conoce	Bajo	16-45%
Edad de diagnóstico	Postpuberal	En la niñez	Postpuberal	En el adulto joven	Postpuberal	En el adulto joven	Edad variable
Defecto primario	Páncreas/higado	Páncreas/higado	Páncreas/Riñón otro?	Páncreas/otro?	Páncreas/riñón otro?	Páncreas/otro	Páncreas/otros?
Características fenotípicas asociadas		Bajo peso al nacimiento			Quistes renales/malformaciones del aparato genital		
Severidad	Severo	Poco severo	Poco severo?	Poco severo?	Poco Severo/?	No se conoce	Variable
Complicaciones	Con frecuencia	Muy raras	Raras?	Raras?	Raras?	No se conoce	No se conoce

Además de asociarse a la Diabetes Tipo MODY, los genes HNF-1 α , HNF4 α e IPF-1 se han relacionado con la susceptibilidad al desarrollo de la DM2. Por ejemplo, variantes de secuencia en el gen IPF-1 se han descrito en pacientes con DM2 de inicio tardío (Hani *et al.*, 1999, MacFarlane *et al.*, 1999). Algunas de estas mutaciones como la D76N, Q59L, C18R y R197N se asocian a una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Por su parte, **mutaciones en los genes HNF1 α , HNF4 α , IPF-1 y glucocinasa se han identificado en pacientes con diabetes gestacional** (Reis *et al.*, 2000, Hansen *et al.*, 2000, Ellard *et al.*, 2000), mostrando con ello que estos genes participan tanto en las formas monogénicas como poligénicas de la enfermedad (23,24).

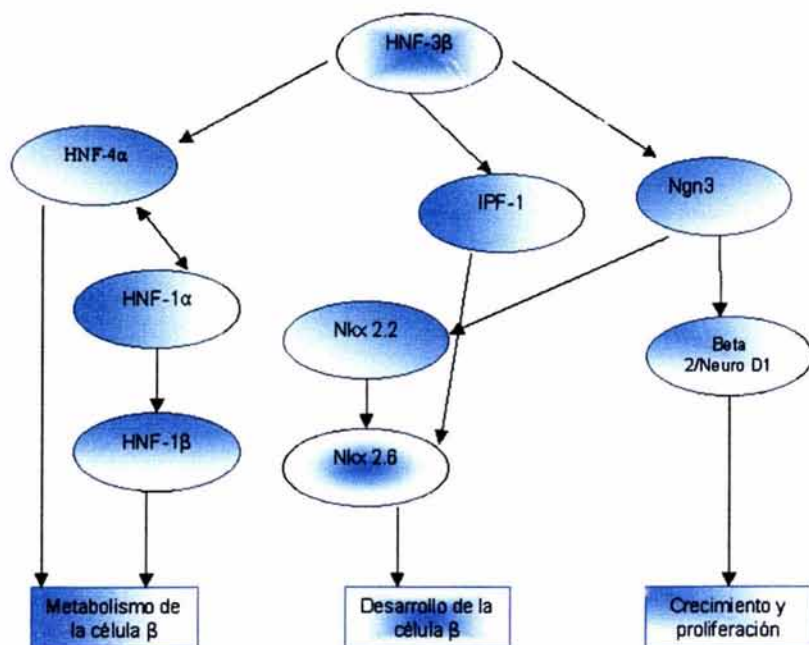


Figura 1. Representación esquemática de la red de factores de transcripción que regulan la fisiología de la célula β pancreática. El HNF-3 α regula la síntesis de HNF-4 α y de otro factor conocido como Ngn3. A su vez, estos factores regulan la producción de otras proteínas como HNF-1 α o β 2/NeuroD1. Por lo tanto, las mutaciones en un factor de transcripción afectarán secundariamente la síntesis de otros factores, explicándose así las múltiples alteraciones metabólicas propias de la diabetes.

Diabetes Neonatal

Diabetes neonatal transitoria.

Es un subtipo de diabetes poco frecuente que ocurre durante las primeras seis semanas de vida en productos a término y que se resuelve alrededor de los 18 meses de edad. Se refiere que estos pacientes presentan un riesgo incrementado para desarrollar Diabetes Tipo 2 en la etapa adulta. Se señala que es resultado de la sobre-expresión de un gen transmitido por vía paterna sujeto a **imprinting**, dentro del locus 6p24. Entre los mecanismos implicados en la génesis de la Diabetes Transitoria Neonatal está la isodisomía uniparental, una duplicación sub-microscópica de un segmento del cromosoma 6 de origen paterno y un defecto de metilación en la región CpG que comprende el exón 1 del gen ZAC/HYMAI (25).

Diabetes neonatal permanente (Síndrome de Wolcott- Rallison)

Representa un padecimiento recesivo poco frecuente causado por mutaciones en el gen EIFAK3 que codifica para el factor de iniciación de la traducción 2- α cinasa 3 localizado en el cromosoma 2p12 (Delepine *et al*, 2000). En casos de autopsia de pacientes con este síndrome encuentra una disminución en el número de células β del páncreas (26,27).

Formas monogénicas que afectan la acción de la insulina (Síndromes de resistencia a la insulina).

Diabetes por mutaciones en el gen del receptor de la insulina.

A la fecha se han descrito más de 60 mutaciones distintas asociadas a resistencia a la insulina y otras condiciones asociadas como acantosis nigricans e hiperandrogenismo. La mayoría de estas mutaciones se heredan de forma dominante y alteran la fosforilación del receptor. Pacientes homocigotos para mutaciones en el receptor de la insulina o heterocigotos compuestos (pacientes portadores de una mutación distinta en cada uno de los alelos del gen) presentan el síndrome de Rabson-Mendelhall con resistencia extrema a la acción de la insulina.

Otra forma de resistencia a la insulina de herencia autosómica dominante es la causada por mutaciones en el gen que codifica para la laminina A y C (LMNA) y esta caracterizado por lipodistrofia parcial de inicio después de la pubertad y un riesgo incrementado a DM2, hipertensión, dislipidemia y enfermedad coronaria prematura.

Se han descrito adicionalmente dos familias con mutaciones en el gen PPAR γ que afectan el dominio de unión al ligando (P476L, V290M). Estas familias tienen un patrón de herencia autosómico dominante y los individuos afectados tienen resistencia severa a la acción de la insulina, con desarrollo de diabetes e hipertensión a una edad temprana. Además presentan niveles elevados de triglicéridos y bajos de HDL-colesterol. Adicionalmente, las mujeres presentan oligomenorrea o amenorrea primaria.

Al igual que para otros genes, distintos grupos han tratado de evidenciar la participación de variantes de secuencia en el gen PPAR γ en la DM2 poligénica. La presencia del alelo Pro12 se ha asociado a resistencia a la insulina, mayor índice de masa corporal y un riesgo incrementado al desarrollo de DM2. Dada la elevada frecuencia del alelo Pro12 en la población general, este sería el primer caso de un alelo frecuente que confiere un riesgo elevado para el desarrollo de la DM2, y donde el riesgo es aparentemente modulado por factores ambientales como el tipo de grasa que se consume en la dieta (28).

Diabetes gestacional.

Definición.

La Diabetes Gestacional (DG) corresponde a la intolerancia a carbohidratos que se detecta por vez primera durante el embarazo, independientemente que se requiera insulina. Esta definición incluye tanto mujeres que desarrollan diabetes durante el embarazo, como aquellas que la padecen desde antes pero que no habían sido diagnosticadas (28). Esta definición engloba aspectos complejos en relación con la glicemia, efectos fisiopatológicos y clínicos para los cuales existen diversas opiniones relacionadas con su detección y manejo clínico.

Existe evidencia de que la hiperglicemia materna leve constituye un factor de riesgo para la morbilidad fetal (29).

Seis semanas después del parto, la paciente debe de ser nuevamente evaluada, ya que la mayoría de las pacientes con DG retornan a sus valores normales de glucosa en sangre; sin embargo, el 30% puede persistir con Diabetes o Intolerancia a la Glucosa.

Epidemiología.

A nivel mundial se reporta una incidencia que oscila entre 1 a 5%. En nuestro país, Forsbach y cols., comunicaron una incidencia del 4.3% en el Estado de Nuevo León. En la Ciudad de México, se reportó una incidencia del 7% en el Hospital "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (30,31)

Clasificación.

Cuando la diabetes y el embarazo coexisten, se puede utilizar el sistema de clasificación de la Dra. White (modificado por Freinkel). Dicho sistema tiene como base la edad de inicio de la enfermedad, su duración y la presencia de alteraciones vasculares, lo que confiere un valor pronóstico al embarazo y además posibilita valorar a la paciente diabética (Cuadro 4).

Lo anterior es importante, ya que en la Third International Workshop Conference on Gestational Diabetes patrocinada por The American Diabetes Association (ADA) en cooperación con The American College of Obstetrician and Gynecologist (ACOG), han hecho la siguiente consideración: Aquellas mujeres que solamente requieren dieta para lograr niveles de euglicemia, tienen una disminución significativa de mortalidad perinatal. En cambio, aquellas pacientes con diabetes gestacional que requieren de insulina para su control (A2), tienen un pobre resultado perinatal (32).

Cuadro 4. Clasificación de WHITE (Modificada por Freinkel)

<p>Diabetes gestacional Curva de glicemia patológica que aparece o se detecta por primera vez durante el embarazo actual. Debe ser reevaluada en en postparto.</p>
<p>Anomalías en el metabolismo de los HCO diagnosticadas antes del embarazo actual.</p>
<p>Clasificación Glucosa basal normal con: DG en embarazos previos o Intolerancia a la glucosa previa al embarazo. Tratamiento con dieta.</p>
<p>Clase B Glucosa basal superior a la normal con: DG en embarazos previos o Intolerancia a la glucosa previa al embarazo o diabetes previa al embarazo. Con o sin insulino terapia. Con duración entre 0 y 9 años. Inicio después de los 20 años. No evidencia clínica de angiopatía.</p>
<p>Clase C Diabetes previa al embarazo. Con insulinoterapia. Inicio entre los 10 y 19 años. Duración entre 10 y 19 años. Sin pruebas clínicas de angiopatía.</p>
<p>Clase D Diabetes previa al embarazo. Con insulinoterapia. Inicio antes de los 10 años. Duración mayor de 20 años. Retinopatía no proliferativa o calcificaciones vasculares.</p>
<p>Clase F Diabetes previa al embarazo. Con insulinoterapia. Con pruebas clínicas de nefropatía.</p>
<p>Clase R Diabetes previa al embarazo. Con insulinoterapia. Con pruebas clínicas de retinopatía proliferativa.</p>
<p>Clase RF Criterios de clase R y F coexistentes.</p>

Metabolismo Energético durante el embarazo y en la DG.

El embarazo incrementa la demanda de energéticos metabólicos que se requieren para el crecimiento y desarrollo fetal y sus estructuras de sostén, que incluyen la placenta y el útero. El costo energético total relacionado con la gestación se calcula en 83, 000 Kcal. Una mujer normal con peso adecuado aumenta aproximadamente trece kilogramos durante un embarazo no complicado. El crecimiento del útero y su contenido contribuyen con casi 6 Kg. Existe un aumento de líquidos corporales de casi 3 Kg y un acúmulo de grasa de casi 4 Kg.

La modificación del gasto energético y la acumulación de grasa ocurren en etapas diferentes durante el embarazo. La tasa metabólica basal materna cambia poco durante las primeras 20 semanas pero se incrementa hasta casi 400 Kcal diarias con respecto a cifras basales pregestacionales en la segunda mitad del embarazo. Por otro lado, el depósito de grasa aumenta en etapas tempranas de la primera mitad del embarazo, alcanzando su máximo antes de la semana 30.

Por tanto, resulta práctico dividir la descripción de los cambios metabólicos que ocurren durante el embarazo en aquellos que se presentan en etapa temprana (1 a 20 semanas) y los que se manifiestan en etapa tardía (21 a 40 semanas) (33).

Metabolismo energético durante el embarazo temprano.

Estudios realizados durante el embarazo en mujeres no diabéticas, ni obesas revelaron mayor sensibilidad que la normal al efecto de disminución de glucosa sanguínea por insulina exógena administrada durante el primer trimestre, en comparación con el segundo y el tercero (34).

Catalano y cols., (35) realizaron estudios prospectivos en seis mujeres no obesas antes y después del embarazo (12-14 semanas) y encontraron un incremento de casi 120% en la respuesta insulínica de primera fase después de la administración intravenosa de glucosa, así como un pequeño incremento en la tasa de desaparición de glucosa en sangre venosa en etapas

tempranas del embarazo. Dichas pacientes tuvieron un aumento de la proporción insulina/glucosa plasmática durante pruebas de TOG que indicaron mayor liberación de insulina. Esto último, pudiera relacionarse con el aumento de la cifra plasmática de estrógenos, ya que sensibilizan la capacidad de respuesta de las células β de los islotes de Langerhans a la glucosa. Mediante la técnica denominada de "pinzamiento euglicémico-hiperinsulinémico", que permite precisar la sensibilidad periférica a la insulina, se encontró que era casi igual antes y durante el embarazo temprano al igual que la capacidad de producción hepática basal de la glucosa determinada con el isótopo $6,6 \text{ }^2\text{H}_2$ glucosa. De manera que estos autores concluyeron que, durante la etapa temprana del embarazo, la respuesta de primera fase de insulina a la glucosa era mayor, la tolerancia a la glucosa era normal o un poco aumentada y la sensibilidad periférica a la insulina así como la producción hepática basal de glucosa eran normales.

La relación entre el aumento de insulina, con sensibilidad tisular normal o aumentada a ella durante el embarazo temprano, produce un medio metabólico que favorece el aumento de la lipogénesis y almacenamiento de grasa como preparación para la mayor necesidad energética de la unidad feto-placentaria en crecimiento durante la segunda mitad del embarazo. Observaciones adicionales apoyaron este concepto tales como la variación en cifras sanguíneas de diversas hormonas que ocurren durante etapas tempranas del embarazo, que incluyen cortisol, estrógenos y progestágenos, que estimulan la acumulación de grasa. De manera particular, se considera que el importante aumento de la concentración plasmática de cortisol contribuye al incremento en la lipogénesis (36).

En conclusión, el embarazo temprano se caracteriza por mayor secreción de insulina en respuesta a la glucosa, sensibilidad periférica a la insulina ligeramente aumentada, tolerancia a la glucosa normal o levemente aumentada y acumulación de grasa materna.

Metabolismo energético durante etapas avanzadas del embarazo.

El embarazo en fase tardía se caracteriza por un crecimiento acelerado del feto, incremento brusco de diversas hormonas diabetógenas que incluyen Lactógeno Placentario Humano (LPH) y estrógenos, así como resistencia creciente a múltiples acciones de la insulina (37).

Catalano y cols., comunicaron un decremento superior al 50% en la sensibilidad periférica a la insulina durante el tercer trimestre, en comparación con el primer trimestre y mujeres no embarazadas. Adicionalmente, reportaron un incremento de casi 30% en la secreción hepática basal de glucosa a pesar de cifras elevadas de insulina sérica, lo cual indica resistencia hepática a la insulina (34).

Otros autores como Ryan y cols., (38) utilizando la técnica de "pinzamiento" señalaron un decremento de casi 33% en la sensibilidad periférica a la insulina en embarazadas durante el tercer trimestre en comparación con mujeres no embarazadas.

Por otra parte, Buchanan y cols., mediante pruebas de tolerancia a la glucosa intravenosa y estimando la sensibilidad a la insulina con la técnica del modelo mínimo de Bergman (39), encontraron menor sensibilidad durante el tercer trimestre en un 33% de lo normal, en tanto que las concentraciones de insulina sérica estaban elevadas casi al triple (33). Las causas de dicha resistencia a la insulina durante etapas avanzadas del embarazo no están totalmente dilucidadas. La aparición concomitante de resistencia a la insulina y el aumento de la cifra sanguínea del LPH, una hormona con intensa actividad lipolítica y antiinsulínica (34) sugiere que el LPH y otras hormonas diabetógenas (cortisol, progesterona y estrógenos) pudieran originar gran parte de la observada resistencia a la insulina (40).

La fase avanzada del embarazo también se caracteriza por aparición de lo que se ha denominado "inanición acelerada" (33) que corresponde a un patrón metabólico derivado de la extracción continua de nutrimentos de la sangre materna por el feto.

En mujeres no embarazadas, el hígado constituye la única fuente de glucosa e inicia su participación aproximadamente seis horas después de la última comida, esto es, cuando termina la absorción de nutrimentos del tubo digestivo. Bajo estas circunstancias, el hígado produce glucosa a una velocidad de casi 2.2 mg/Kg/min, la mayor parte de la cual proviene de glucógeno y el resto de la gluconeogénesis (35). Entre el 50 a 60% (1.1 a 1.3 mg/Kg/min) de la secreción hepática de glucosa es captada y oxidada por el sistema nervioso central y el resto por diversos tejidos que incluyen eritrocitos, leucocitos y médula ósea (40). En éstos, la captación de glucosa no depende de insulina y es mediada por una proteína específica de transporte llamada GLUT 1 (37).

Durante el tercer trimestre del embarazo, la captación de glucosa por el feto se calcula en casi 6 mg/Kg/min (39). Para poder satisfacer este requerimiento, es necesario aumentar la producción de glucosa hepática materna en casi 3 mg/Kg/min, que equivale a un 14%. Calan y cols., informaron el incremento de la tasa basal de producción de glucosa hepática durante etapas avanzadas del embarazo (40) en 16%, en tanto que Catalano y cols., comunicaron 30% (34).

Además de glucosa, el producto obtiene aminoácidos de la circulación materna y como resultado, su concentración permanece relativamente baja, limitando el potencial de gluconeogénesis hepática a partir de estas sustancias. Lo anterior, se resuelve con mayor fragmentación y utilización de grasa. La lipólisis produce glicerol, que es un excelente sustrato para la gluconeogénesis hepática (30), y proporciona ácidos grasos cuya oxidación genera energía necesaria para impulsar la gluconeogénesis y acetil-CoA, que activa la piruvato carboxilasa, enzima limitante en la vía de la gluconeogénesis (35).

Por otra parte, cifras elevadas de ácidos grasos libres inhiben la captación y oxidación de glucosa conservándola para uso del sistema nervioso central y el feto (31). Los cambios metabólicos descritos son semejantes a los que ocurren durante el ayuno prolongado en mujeres no embarazadas, cuando se utilizan ácidos grasos para cubrir casi todas las necesidades de energía corporal y la gluconeogénesis a partir de aminoácidos disminuye a un mínimo para proteger las reservas de proteínas esenciales (33). En el embarazo, el cambio del metabolismo de carbohidratos al de grasas, que durante el ayuno requiere de dos a tres días para manifestarse por completo, se realiza en 14 a 18 horas y se le denomina "inanición acelerada" (41).

El cambio de utilización de carbohidratos al de grasa es regulado por hormonas. La merma de la concentración plasmática de insulina, producida por la concentración decreciente de glucosa, permite que aumente la lipólisis (14), gluconeogénesis y producción hepática de glucosa.

El concepto de inanición acelerada se sustenta por la demostración de que la glucosa y alanina plasmáticas (aminoácido gluconeogénico importante) disminuyen y los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos plasmáticos (productos de la lipólisis y oxidación de las grasas) aumentan horas antes de observar estos cambios en personas sin embarazo.

La resistencia a la insulina en etapas avanzadas del embarazo origina cambios importantes en la cifra posprandial de energéticos metabólicos. Así, en respuesta a comidas ricas en carbohidratos, la concentración de glucosa plasmática aumenta mucho más durante el embarazo. Asimismo, ocurren aumentos similares en triglicéridos plasmáticos, especialmente en lipoproteínas de muy baja densidad (40,41).

En resumen, la etapa avanzada del embarazo se caracteriza por el crecimiento fetal y respuestas maternas a las necesidades crecientes de nutrimentos por el feto, lo que incluye un cambio acelerado de la utilización de carbohidratos a la de grasas, denominado patrón de inanición

acelerada, favorecido por resistencia periférica a la insulina y cifras sanguíneas altas de hormonas lipolíticas.

La DG usualmente ocurre durante la segunda mitad del embarazo aunada a la aparición paralela de resistencia a la insulina. Sin embargo, es poco probable que esta resistencia sea la única causa de DG.

En primer lugar, para producir intolerancia a la glucosa en presencia de un páncreas endocrino sano, dicha resistencia tiene que ser muy intensa, tal como la que se verifica en el síndrome de resistencia extrema a la insulina Tipo B, donde anticuerpos contra el receptor de insulina producen un síndrome similar a la Diabetes Tipo 2. La resistencia encontrada en la DG nunca alcanza el grado que ocurre en el síndrome Tipo B. En segundo lugar, todas las mujeres embarazadas presentan resistencia a la insulina, pero menos del 10% desarrollan DG (30-32). **Lo anterior indica que la resistencia puede no ser el único trastorno responsable y sugiere que las pacientes con DG tienen además un defecto en la secreción de insulina.**

En relación con lo señalado, Buchanan y cols., (42) encontraron que la primera fase de secreción de insulina en respuesta a glucosa intravenosa disminuía mucho en mujeres con DG durante el tercer trimestre, en comparación con mujeres embarazadas no diabéticas. De manera similar, Köhl informó que la respuesta de insulina a la glucosa oral e intravenosa era tardía y estaba disminuida durante etapas avanzadas del embarazo, en comparación con la gestante no diabética.

La DG representa un trastorno heterogéneo en el que la resistencia a la insulina determinada genéticamente, la obesidad y la edad, contribuyen a la intensidad del proceso (40). Por tanto, no es sorprendente que se haya comunicado que tal resistencia es comparable o mayor en la DG que en mujeres embarazadas no diabéticas.

En este tenor, Ryan y cols., comunicaron un aumento del 60% en dicha resistencia durante el segundo trimestre en mujeres con DG en comparación con embarazadas no diabéticas. La

hiperglicemia en pacientes con DG parece ser consecuencia de una mayor producción hepática de glucosa y la citada resistencia a la insulina (38).

Al respecto, Catalano y cols., (33) encontraron que la producción de glucosa hepática responde menos a la supresión por insulina en la DG, lo que sugiere resistencia hepática a la hormona.

Hormonas vinculadas con la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia en el embarazo.

Las hormonas de la reproducción aumentan conforme avanza la gestación. Estas hormonas inducen resistencia periférica a la insulina y contribuyen a alteraciones en la función de células β .

Estrógenos y progesterona.

Los estrógenos y la progesterona aumentan en etapas tempranas del embarazo y se ha señalado a estas hormonas en la modificación del metabolismo de la glucosa materna. En animales tratados con estrógenos, hubo un decremento significativo en la concentración de glucosa después de una prueba de tolerancia al carbohidrato. Este decremento se vinculó con un incremento casi al doble en la concentración de insulina. En adipositos de rata en cultivo, el tratamiento con estrógenos no tuvo efecto sobre el transporte de glucosa, pero sí una unión importante de insulina. Se ha señalado a la progesterona con un vínculo entre 60 a 70% de aumento en la respuesta a la insulina ante una carga de glucosa, pero no disminuyó la tolerancia a ésta. La progesterona disminuyó el transporte máximo de glucosa y la unión a insulina en adipositos de ratas en cultivo. Nelson y cols., calcularon el recambio endógeno de glucosa y la captación del carbohidrato en el modelo de rata con ovariectomía utilizando inyección de un trazador y una pinza de euglicemia. El tratamiento con progesterona no cambió la captación de glucosa mediada por insulina en tejido periférico, pero aminoró la capacidad de la insulina para suprimir la producción endógena de glucosa (42).

Cortisol.

En etapas avanzadas del embarazo su concentración materna es casi 2.5 veces mayor que fuera del embarazo. Rizza y cols., comunicaron que la tasa de producción de glucosa hepática aumentaba y la sensibilidad a la insulina disminuía bajo condiciones experimentales de inyección intravenosa lenta de una gran cantidad de cortisol en 24 horas. *Giorgino y cols., demostraron que el exceso de glucocorticoides en músculo estriado se caracteriza por menor fosforilación de tirosina del receptor de insulina y del contenido del sustrato 1 del receptor de insulina.* Concluyeron que la resistencia a la insulina inducida por glucocorticoides parecía producto de mecanismos posteriores al receptor (43,44).

Lactógeno Placentario Humano.

Se señala al LPH como una de las hormonas principalmente encargadas de la menor sensibilidad a la insulina conforme avanza la gestación. En realidad, la inyección durante doce horas de la noche de LPH produce alteración de la tolerancia a la glucosa que se manifiesta por aumento de la insulina y glicemia en respuesta a una carga de glucosa oral. En adipositos en cultivo, el LPH disminuyó el transporte máximo de glucosa, pero no cambió la unión de insulina. Brejle y cols., informaron que el LPH estimuló directamente la secreción de insulina en células de islotes pancreáticos humanos en cultivo. Se desconoce si tales adaptaciones tienen relación con defectos posteriores al receptor de insulina que causan resistencia a la hormona in vivo (45).

Prolactina.

La concentración de prolactina plasmática aumenta 5 a 10 tantos durante el embarazo. Gustafson y cols. comunicaron que la concentración basal de insulina y la posterior a una carga de glucosa así como la respuesta de insulina eran mayores en mujeres con hiperprolactinemia que en controles durante una curva de tolerancia a la glucosa. Cuando se cultivaron células de los islotes de rata con prolactina, se obtuvo un incremento al triple, dependiente del tiempo, en la secreción

de insulina. En adipocitos de rata en cultivo, la prolactina disminuyó el transporte máximo de glucosa, pero no cambió la unión de insulina. Skouby y cols., utilizaron una curva de tolerancia a la glucosa en 15 embarazadas sin DG y en 15 con DG y después cuantificaron las respuestas de insulina, glucagon y prolactina en el embarazo avanzado y posparto. No hubo diferencias en la concentración basal de prolactina entre los dos grupos durante el embarazo o en el posparto. Las cifras de prolactina no se alteraron durante pruebas de TOG y no se encontró correlación entre el deterioro de la tolerancia a la glucosa y la concentración de prolactina en ningún grupo. Concluyeron que las cifras anormales de prolactina no tienen importancia fisiopatológica para la aparición de la DG, lo que sugiere que se requiere de mayores investigaciones (46).

Factores para el equilibrio energético en el embarazo.

Factor de necrosis tumoral α (TNF α).

Es una citosina producida en monocitos, macrófagos, células T, neutrófilos, fibroblastos y adipocitos. Los animales y seres humanos obesos muestran una correlación positiva entre la concentración de TNF- α y el Índice de Masa Corporal e hiperinsulinemia. La inyección de TNF- α produce aumento de la resistencia a la insulina en la rata y células de músculo estriado humano en cultivo. Aunque la concentración de TNF- α circulante en plasma de pacientes obesas es muy baja en comparación con la que se encuentra en pacientes quemadas y caquéticas, pruebas recientes indican que las células de músculo estriado expresan mRNA para TNF- α y que debiera actuar en forma paracrina. TNF- α parece alterar la insulina, lo que se demuestra por fosforilación creciente de serina *de IRS-1*, que inhibe la actividad de tirosincinasa del receptor de insulina. Aunque la neutralización de TNF- α en ratas obesas y resistentes a la insulina mejora la sensibilidad a la hormona y la autofosforilación de su receptor, la neutralización de TNF- α circulante no mejora la sensibilidad a la insulina en seres humanos. Catalano y cols., informaron que los cambios en la sensibilidad a insulina desde el embarazo temprano (22 a 24 semanas)

hasta el tardío (34 a 36 semanas) tienen relación con TNF- α . Hubo un incremento significativo del 25% en TNF- α que correlacionó con el cambio en porcentaje de grasa corporal de las etapas tempranas a tardías del embarazo. Concluyeron que esos datos apoyan la importancia de TNF- α como factor contribuyente al decremento en la sensibilidad a la insulina en el embarazo (46).

Leptina.

Producto del *gen de la obesidad (ob)*, es una hormona polipeptídica de 167 aminoácidos originalmente identificada por *clonación posicional* en 1994. Se produce y secreta en tejido adiposo, puede inhibir la ingestión de alimentos y aumentar el gasto de energía al actuar sobre hipotálamo. La concentración circulante de leptina en seres humanos tiene un estrecho vínculo con la concentración de insulina en ayuno y el porcentaje de grasa corporal, lo que la hace un marcador de obesidad y del síndrome de resistencia a la insulina. Se encuentran receptores a la leptina no sólo en el hipotálamo (hipotálamo ventromedial, núcleo arqueado) sino también en músculo, hígado, páncreas, adipocitos, útero, placenta, ovario y células linfoides. **En ratones ob/ob (ob mutación en el gen de leptina)** que carecen de leptina, su administración se vinculó con un aumento de la concentración de hormona luteinizante, mayor peso ovárico y uterino y cambios significativos en la histología ovárica y uterina, lo que identifica así potencialmente al péptido como un regulador permisivo de la madurez reproductiva. En la rata, la inyección de leptina aumentó de manera aguda y significativa la velocidad de inyección de glucosa en una pinza de euglicemia-hiperinsulinemia. El tratamiento crónico con leptina disminuye la grasa visceral, inhibe la producción hepática de glucosa y estimula la captación de esta última en el músculo.

La cifra plasmática de leptina se encuentra muy aumentada en embarazadas en comparación con mujeres no embarazadas. Masuzaki y cols., encontraron que la concentración de leptina plasmática estaba muy incrementada durante el segundo trimestre y se mantuvo alta en el tercero. La concentración de leptina plasmática 24 horas después del alumbramiento disminuyó a

menos que la cuantificada durante el primer trimestre. Highman y cols., mostraron que la leptina plasmática materna aumentó mucho durante etapas tempranas del embarazo, antes de cualquier cambio importante en la grasa corporal y la tasa metabólica en reposo, y sugirieron que el embarazo parece ser un estado de resistencia a la leptina. En seres humanos, la mayor concentración de leptina en venas umbilicales que en las arterias correspondientes y el decremento notorio durante el periodo neonatal sugieren que la placenta es una de las principales fuentes de leptina en la circulación fetal. Si bien la concentración plasmática de leptina aumenta durante el embarazo en el ratón y la rata, su *mRNA* no lo hace en esas placentas. Tal vez la producción de leptina puede regularse de modo diferentes en especies diversas durante el embarazo. Las cifras de leptina en sangre del cordón tuvieron correlación positiva con el peso al nacer, el índice ponderal y la talla y circunferencia cefálica. La concentración de leptina en sangre del cordón, no así la de insulina, tuvo relación negativa con el aumento de peso del nacimiento a los cuatro meses. Así, la leptina puede tener un papel importante en el crecimiento fetal y el metabolismo materno de la glucosa (47).

Sistema de señales de la insulina.

La insulina es la principal hormona que regula la concentración de glucosa en sangre. Actúa por estimulación de la entrada de glucosa y su metabolismo en adipocitos y por inhibición de la gluconeogénesis hepática. Aunque definir las moléculas y pasos clave en las señales de la insulina ha sido un reto importante para la investigación bioquímica, se ha logrado gran progreso en la comprensión de los mecanismos de transmisión de señales de insulina, como el descubrimiento de los *sustratos del receptor de insulina*.

La insulina inicia su acción por unión al receptor de la hormona, que se encuentra en todos los tejidos. El número de receptores de insulina varía de tan poco como 40 en eritrocitos circulantes hasta más de 200, 000 en adipocitos y hepatocitos. El receptor de insulina pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento con actividad intrínseca de tirosinasa. Está

constituido por dos subunidades α unidas cada una de ellas a una subunidad β y entre sí por puentes disulfuro. La subunidad β tiene actividad de tirosincinasa. Al unirse, la insulina produce un cambio conformacional en el receptor, que activa a la subunidad β para autofosforilar al menos seis fragmentos de tirosina. La autofosforilación de esas moléculas aumenta la actividad de la tirosincinasa, que lleva a un aumento de la fosforilación de tirosina de sustratos celulares. **En 1991 se purificó y clonó una proteína importante del citosol que participa en las señales de la insulina, denominada sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1).** El IRS-1 y otros sustratos, conocidos como proteínas dique, se unen a los sustratos intracelulares fosforilados y transmiten así la señal descendente. La distribución de los miembros de la familia de proteínas IRS es específica de tejidos. Estudios recientes han indicado que la proteína **IRS-2** es más abundante que la IRS-1 en hígado y páncreas, aunque ambas se expresan ampliamente y son abundantes en músculo. IRS-1 e IRS-2 pueden tener participaciones diferentes en las señales de la insulina. En el ratón con **delección del gen IRS-1** existe retraso del crecimiento y una forma de intolerancia a la glucosa, que incluye disminución del 50% en el transporte de ésta estimulado por insulina en músculo estriado y tejido adiposo, lo que confirma que la vía de IRS-1 tiene un papel importante en la regulación del crecimiento y metabolismo de la glucosa. La **delección del gen de IRS-1** produce resistencia leve a la insulina, pero no diabetes franca, porque la secreción de insulina aumenta para compensar la resistencia. La **inactivación del gen IRS-2** causa resistencia a la insulina en tejidos periféricos e hígado, y los ratones presentan insuficiencia de células β a las 12 semanas de edad, lo que sugiere participación de IRS-2 en páncreas.

La insulina estimula la unión y activación de la enzima cinasa de lípidos, **fosfatidilinositol-3 (PI-3)-cinasa α IRS-1**. La **PI-3 cinasa** está constituida por una subunidad reguladora de 85 kD (p85) que se vincula con la IRS-1 fosforilada y activa a la subunidad catalítica de 110 kD. La formación PI (3,4,5)P3 es necesaria para la acción de la insulina en el transporte de la glucosa. La estimulación de la actividad de la PI-3 cinasa se vincula con el transporte de glucosa estimulado

por insulina en músculo y células grasas, por activación de la translocación de vesículas que contienen transportador de glucosa **GLUT4** a la membrana plasmática.

Se conoce bien que la captación de glucosa estimulada por insulina en células ocurre a través de una familia de proteínas de membrana integrales altamente vinculadas que comparten similitud significativa en su secuencia, denominadas **GLUT1-GLUT4**. La distribución tisular de esos transportadores de glucosa es bastante especial. De ellos, GLUT4, el transportador de glucosa sensible a insulina se expresa de manera exclusiva en músculo estriado, miocardio y tejido adiposo, en tanto que la expresión de GLUT1 es relativamente baja en esos tejidos. En condiciones basales, GLUT4 pasa por ciclos lentamente entre la membrana plasmática y uno o más compartimientos intracelulares, con la mayor parte del transportador ubicado en compartimientos vesiculares del interior de la célula. Después de la estimulación por insulina, aumenta la velocidad de exocitosis de vesículas de GLUT4 y disminuye el proceso de endocitosis. Así, el cambio de las vesículas GLUT4 estimulado por insulina produce un aumento de GLUT4 sobre la superficie celular e incrementa así la captación de glucosa (48).

Sistema de señales de insulina durante el embarazo y la DG.

Unión del receptor de insulina y actividad de cinasa.

Aunque la resistencia a la insulina es un hallazgo universal en el embarazo y la DG, pocos estudios se han dedicado a los mecanismos celulares encargados de la resistencia a la insulina. Casi todos los estudios han señalado que no hay decremento significativo en la unión del receptor de insulina en el embarazo normal y la DG. Estos datos sugieren que la resistencia a la insulina durante el embarazo tal vez es específica de tejidos y puede vincularse con sucesos posteriores al receptor que cambian vías metabólicas para la disposición de glucosa.

La actividad de tirosincinasa del receptor de insulina es una de las posteriores al receptor inmediatas que regulan las señales de la insulina. Estudios con ratas han señalado que el embarazo se vincula con menor actividad de tirosincinasa del receptor de insulina en el hígado,

no así en músculo estriado. En un estudio en músculo estriado humano se informó que la actividad de tirosincinasa del receptor de insulina no cambia en el embarazo. Estudios recientes han señalado que la actividad de tirosincinasa del receptor de insulina en músculo estriado de embarazadas obesas a término disminuyó de 30 a 40% en comparación con el de no embarazadas obesas y esta actividad disminuyó todavía más en mujeres con DG. Además, la autofosforilación del receptor se alteró en sujetos con DG, algo compatible con la mayor resistencia a la insulina en ellas. En la actualidad, no se conocen bien los mecanismos de alteración de la actividad de la tirosincinasa en el receptor de insulina en la DG y la Diabetes Tipo 2. En estudios recientes, se encontró que la sobre-expresión del factor 1 de diferenciación de la membrana plasmática celular (PC-1), una glucoproteína, puede participar en la resistencia a la insulina en sujetos con o sin diabetes no insulino dependiente. Se ha demostrado que PC-1 inhibe la actividad de tirosincinasa del receptor de insulina in vitro . En embarazadas y pacientes con DG, las cifras de PC-1 no fueron significativamente mayores en músculo estriado en comparación con mujeres no embarazadas . Estos datos sugieren que el aumento de PC-1 en músculo estriado pudiera tener participación con una menor actividad de cinasa del receptor de insulina que contribuye a la resistencia a la hormona y DG. Un segundo mecanismo pudiera relacionarse con la fosforilación serina/treonina del receptor de insulina, que se ha demostrado inhibe la actividad de tirosincinasa de dicho receptor (49).

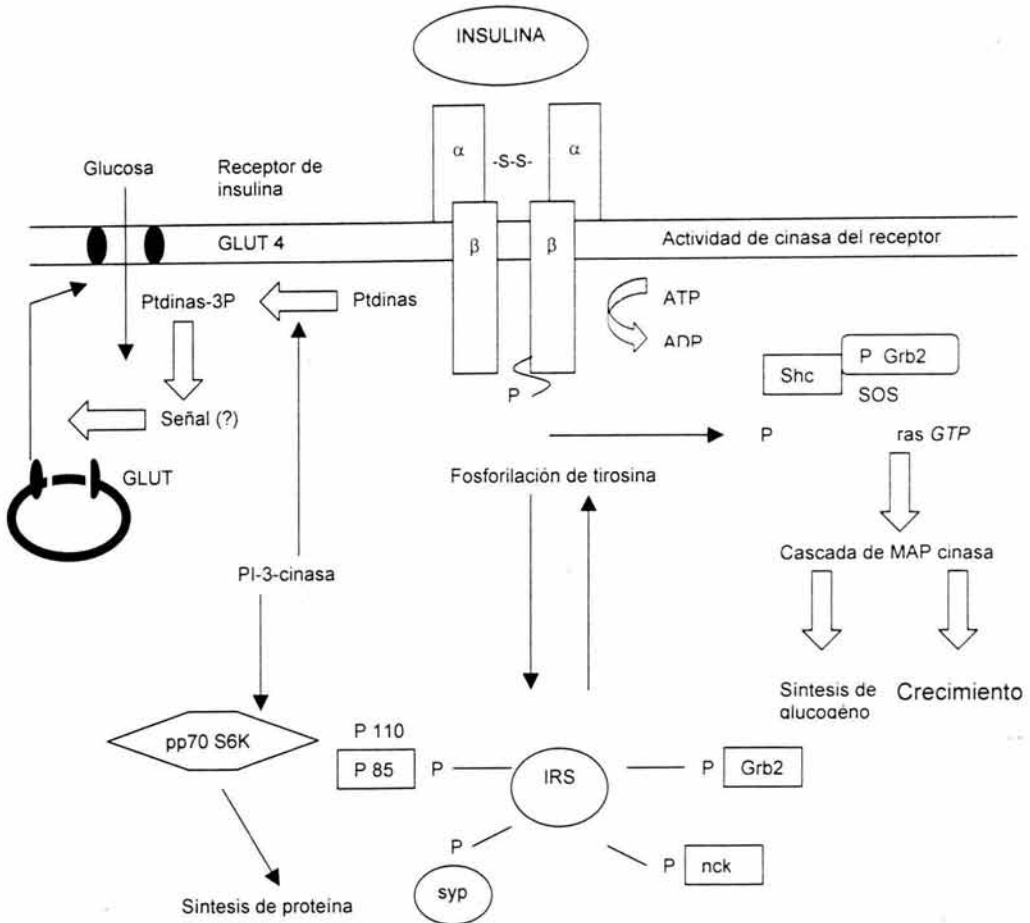


Fig 2. Sistema de Señales de Insulina.

Fosfatasa de tirosina proteínicas.

La fosforilación de tirosina del receptor de insulina y las proteínas IRS es equilibrada por reacciones de desfosforilación realizadas por fosfatasa de tirosina en proteínas unidas a membranas celulares (PTPasas). Se han postulado como factor patogénico en la resistencia a la insulina en obesas y diabéticas no insulín dependientes. En estudios celulares y moleculares, la fosfatasa vinculada con el antígeno de leucocitos (LAR), la PTPasa transmembrana de tipo receptor y la enzima intracelular no receptora **PTP1B** han mostrado tener impacto directo sobre

las señales de insulina en modelos de células íntegras. Puesto que las señales de insulina pueden incrementarse por disminución de la abundancia o actividad de PTPasas específicas, los agentes farmacológicos dirigidos a bloquear la interacción entre PTPasas individuales y el receptor de insulina pueden tener importancia clínica potencial para el tratamiento de estados de resistencia a la insulina como la obesidad y la Diabetes Tipo 2. Datos de músculo estriado de Indios Pima no diabéticos sensibles a la insulina y resistentes a ella mostraron un aumento de 33% en la actividad de PTPasa citosólica basal en sujetos sensibles a hormona, pero no en resistentes a ella. La concentración de *mRNA de PTP1B* aumenta en sujetos resistentes a la insulina, en tanto que se suprimen en sujetos sensibles en un 50% a la insulina. **El ratón transgénico que sobre-expresa PTP1B** mejoró la sensibilidad a la insulina y su concentración plasmática en ratones *PTP-1B^{+/+}*. En este estudio también se encontró que en ratones con **delección en el gen PTP1B**, la fosforilación de tirosina del receptor de insulina estimulado por la hormona aumentó y los ratones eran resistentes al aumento de peso inducido por una dieta abundante en grasas y resistencia a la insulina. Estos datos son compatibles con un papel de PTPasa, en especial PTP1B en la regulación de la sensibilidad a la insulina y el metabolismo energético, que los establecen como blanco terapéutico potencial en el tratamiento de la Diabetes Tipo 2 y obesidad. Además, varios estudios han demostrado que el vanadato, un inhibidor competitivo de la fosfatasa de PTP1B administrado por vía oral normaliza la hiperglucemia en seres humanos y animales diabéticos al incrementar la captación de glucosa por el músculo estriado, tal vez por aumento del estado de fosforilación en el receptor de insulina o las proteínas IRS (50).

Proteínas del sustrato del receptor de insulina.

Los sustratos del receptor de insulina son la primera familia de proteínas señal que se unen al receptor de la hormona y traducen su información en diferentes sustratos por varias cascadas de señales con entrecruzamiento. La concentración de la proteína y la fosforilación de tirosina de

proteínas IRS estimulada por la insulina son indispensables para la sensibilidad a la hormona en tejidos sensibles a ella. En ratones transgénicos con delección, la ausencia de IRS-1 o IRS-2 causa resistencia leve a la insulina o Diabetes Tipo 2, respectivamente. Se ha comunicado que en el músculo de ratas preñadas una **menor expresión de IRS-1**. En una investigación reciente se encontró que la concentración de proteína IRS-1 en músculo estriado humano disminuyó en 22 a 44% durante etapas avanzadas de la gestación o en la DG, respectivamente, en comparación con las cifras de controles no embarazadas pareadas. En ese estudio también se halló que en el músculo estriado de pacientes embarazadas y con DG, la fosforilación de tirosina IRS-1 estimulada por insulina disminuyó de manera significativa, 28 y 41%, respectivamente, en comparación con mujeres no embarazadas. En gestantes y pacientes con DG, la concentración de proteína IRS-2 en músculo está aumentada. **Estos hallazgos sugieren que la resistencia a la insulina durante el embarazo puede ejercerse a través de decrementos en la cascada de señales de la hormona en el ámbito de las proteínas de IRS. El aumento de IRS-2 puede compensar la disminución de IRS-1;** sin embargo, la primera no parece compensar el menor transporte de glucosa estimulado por insulina que ocurre en músculo estriado de embarazadas y pacientes con DG. En un estudio reciente se comunicó que el **gen de IRS-2 humano** tiene un elemento de respuesta primaria a la progesterona, una de las principales hormonas del embarazo, lo que sugiere su importancia fisiológica en la regulación ascendente de IRS-2 podría ser el conservar la función de células hepáticas o β pancreáticas (50).

Fostatidilinositol-3-cinasa.

Es una cinasa doble de proteínas y lípidos. Tiene una subunidad reguladora de 85 kD y una catalítica de 110 kD. Hay muchas pruebas que indican que se requiere de la activación de **PI-3-cinasa** por la insulina para la **translocación de GLUT-4**. La primera prueba de que se requiere PI-3-cinasa para la estimulación insulínica de la captación de glucosa proviene de experimentos que muestran que se abolieron por completo la translocación de GLUT4 estimulada por insulina y

la captación de glucosa por una baja concentración nanomolar de wortmanina y LY 294002 en una variedad de tejidos sensibles a la insulina. No obstante, hay otros estudios que sugieren que aunque necesaria, la activación de PI-3-cinasa no es suficiente para promover la translocación del transportador de glucosa. Se desconoce si hay un cambio en la actividad de PI-3-cinasa en la resistencia a la insulina inducida por el embarazo. Las cifras proteínicas de **p85** en músculo estriado de embarazadas y pacientes con DG fueron inesperadamente más altas en comparación con no embarazadas (49). Hay al menos siete formas alternativas de subunidades reguladoras de PI-3 cinasa y están en estudio sus papeles potenciales en la regulación de la captación de glucosa.

Transportadores de glucosa.

El sistema de transporte de glucosa es importante en la regulación de la captación de glucosa estimulada por insulina en tejidos sensibles a la hormona. A diferencia de lo que se encontró en músculo estriado, estudios de tejido adiposo humano han encontrado que la **expresión de la proteína GLUT4** estaba disminuida en embarazadas y que el decremento era más intenso en mujeres con DG (50). Es más, la insulina indujo translocación de GLUT4 de microsomas de baja densidad a membranas plasmáticas en controles, pero no alteró la distribución subcelular en pacientes con DG. Un estudio reciente encontró que la **sobreexpresión de GLUT4 humana en roedores C57BL6/J Lepr db/+ diabéticas gestacionales espontáneas** mejora las señales de insulina en DG, lo que produce una mayor secreción de insulina estimulada por glucosa y un mejor control de glucemia (50). Los mecanismos para la expresión y distribución alterada de GLUT4 en la resistencia a la insulina inducida por el embarazo no son claros, pero pudieran vincularse con hiperinsulinemia debido a que los sujetos obesos insulinoresistentes muestran cambios similares.

Diagnóstico de la DG.

En el año de 1973, O'Sullivan y cols. (51) valoraron una prueba de glucemia efectuada una hora después de una carga de 50 g de glucosa en sangre venosa entera mediante el método de Somogyi-Nelson. En dicho estudio se encontró que un umbral de 130 mg/dl tenía una sensibilidad de 79% y una especificidad de 87% para DG en un grupo de 752 embarazadas en etapa tardía del segundo trimestre y en el tercer trimestre sometidas a la prueba de detección y al parámetro de curva de TOG.

Las medias y desviaciones estándar se calcularon para cuatro cifras de glucosa en sangre venosa (en ayuno, y una, dos y tres horas después). Así, dichos autores propusieron los umbrales diagnósticos que se muestran a continuación:

Hora	Cifras redondeadas	Umbrales redondeados
Ayuno	90 mg/dl	90 mg/dl
1 Hora	165 mg/dl	165 mg/dl
2 Horas	143 mg/dl	145 mg/dl
3 Horas	127 mg/dl	125 mg/dl

Estos criterios se usaron hasta fines del decenio de los setentas, cuando casi todos los laboratorios que hacían análisis de glucosa cambiaron de sangre entera a plasma o suero. Sin embargo, las cifras de glucosa en plasma o suero son casi 14% mayores en relación con las de sangre venosa entera y en 1979, el National Diabetes Data Group (NDDG) ajustó los criterios de O'Sullivan y Mahan de modo ascendente para compensar dicho cambio (51).

Al parecer, utilizaron cifras redondeadas de O'Sullivan y Mahan e inexplicablemente aumentaron las cifras a las dos horas de 165 a 170 mg/dl antes de aplicar el factor de conversión. La American Diabetes Association y la ACOG (52) recomendaron dichos umbrales, que se muestran a continuación:

Hora	Sangre venosa	Plasma venoso
Ayuno	90 mg/dl	105 mg/dl
1 Hora	170 mg/dl	190 mg/dl
2 Horas	145 mg/dl	165 mg/dl
3 Horas	125 mg/dl	145 mg/dl

Para el año de 1982, se propuso un conjunto alternativo de umbrales diagnósticos, basados también en los criterios de O'Sullivan y Mahan (51). Puesto que en casi todos los laboratorios se había cambiado del método de Somogyi-Nelson de análisis de glucosa, que incluía una pequeña cantidad de azúcares reductores diferentes a la glucosa, a los métodos enzimáticos de análisis, más específicos, **Carpenter y Coustan** (53) restaron primero 5 mg/dl de cada una de las cifras originales no redondeadas de O'Sullivan y Mahan y posteriormente agregaron un 14% para compensar el cambio de la glucosa en sangre venosa entera al nivel plasmático. Las cifras resultantes se redondearon después a los 5 mg/dl más cercanos y se muestran a continuación

Hora	Sangre Entera (Somogyi-Nelson)	Plasma (Glucosa Oxidasa)
Ayuno	90 mg/dl	95 mg/dl
1 Hora	165 mg/dl	180 mg/dl
2 Horas	143 mg/dl	155 mg/dl
3 Horas	127 mg/dl	140 mg/dl

En ese entonces se consideró que la mejor forma de saber cuáles son las adaptaciones más precisas sería repetir la metodología original e implementar los estudios paralelos respectivos (12). Así, Sacks y colaboradores (54) elaboraron tales estudios y encontraron que las

derivaciones del NDDG estaban por arriba de los intervalos de confianza 95%, en tanto que los valores recomendados por Carpenter y Coustan (53) siempre se encontraron dentro de estos límites.

Por lo anterior, en el año de 1998 en la Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes (29) se recomendó la modificación de Carpenter y Coustan de los criterios de O'Sullivan y Mahan con base en los trabajos de Sacks y cols., (44) así como de numerosos estudios clínicos que mostraron tasas de morbilidad perinatal en estudios que emplearon los umbrales más bajos.

Anteriormente, también hubo confusión en cuanto a qué paciente debe someterse a estudio. Antes de 1994 la ACOG recomendaba hacer una prueba de TOG a la hora con carga de 50 g a todas las mujeres de 30 años o mayores y a las más jóvenes cuando tenían factores de riesgo (42). En ese entonces, la ACOG notó que no se habían demostrado los beneficios de las pruebas de detección en la población y modificó su recomendación, de suerte que en algunos grupos con riesgo fuese el examen universal, en tanto que en otros se requieren esquemas diferentes (49). Por ejemplo, un programa de embarazo en adolescentes, en el que todas las pacientes son muy jóvenes, daría tan pocos casos de DG y el estudio basado en el riesgo sería más eficaz en cuanto a costo que el universal. Por el contrario, en la población estadounidense indígena, como la de los indios Pima, la prevalencia de diabetes es tan alta que la posibilidad de DG es mayor que el riesgo vinculado con una prueba de detección positiva, por lo que tal vez sea mejor olvidar ésta y proceder de manera directa a la curva de tolerancia. La ADA aconsejó el muestreo universal durante el embarazo con la carga de 50 g de glucosa una hora después hasta el año de 1977 (41). En ese tiempo, la ADA tomó una posición similar a la de la ACOG, al señalar que parece haber un grupo de bajo riesgo, en quien el estudio no sería eficaz en cuanto a costo (48). Para considerarse en ese grupo de bajo riesgo, la mujer debe ser menor de 24 años con peso corporal normal, sin antecedente de diabetes familiar y no ser miembro de un grupo étnico y racial con alta prevalencia de la enfermedad. Aunque no se señala explícitamente, también sería razonable

agregar que la paciente no debe tener antecedentes de resultados obstétricos adversos, como óbito o macrosomía. Los individuos que cumplen con todos los criterios previos no necesitan estudios. La Fourth International Workshop Conference on Gestational Diabetes llegó a conclusiones similares (55).

Detección de la DG.

El riesgo del feto aumenta de manera continua al incrementarse la glicemia materna. En este rubro no existe un umbral que discrimine entre embarazos de bajo riesgo y embarazos de alto riesgo. Los criterios diagnósticos para la DG pueden establecerse de manera no rigurosa para identificar únicamente gestaciones muy riesgosas (pasando por alto algunos embarazos de riesgo) o de manera rigurosa pero con la consecuencia de incluir casos falso positivos. Después de años de numerosas experiencias y recomendaciones, este último enfoque fue el adoptado por la Cuarta Conferencia Internacional en DG (55).

El procedimiento de detección, identifica mujeres embarazadas quienes presentan un riesgo suficiente para elaborar una prueba diagnóstica, la curva de TOG.

Ha sido recomendado ampliamente realizar la prueba de detección cuantificando la glucosa plasmática en toda mujer embarazada entre la semana 24 y la semana 28 de la gestación. Sin embargo, algunas mujeres presentan características clínicas que indican un riesgo muy bajo para DG que incluso tal detección pudiera omitirse (56). Otras mujeres embarazadas presentan características clínicas consideradas de alto riesgo en quienes la prueba de detección debiera realizarse de manera más temprana. De acuerdo con lo anterior, la detección para la DG incluye la evaluación de las características clínicas de toda mujer embarazada para determinar el riesgo de DG y realizar la prueba de detección de glucosa sérica en mujeres quienes no tienen un perfil de bajo riesgo. La evaluación inicial se realiza en la primer consulta prenatal. Aquellas mujeres con características clínicas de alto riesgo, deben someterse a prueba de detección lo antes posible. Para ello, se recomienda la prueba de la carga oral de 50 g de glucosa seguido por la

curva de TOG si las concentraciones encontradas así lo señalan (57). Por otra parte, si existe sospecha clínica de hiperglicemia (poliuria, polidipsia) la cuantificación de glucosa en ayunas puede ser suficiente para confirmar el diagnóstico.

Las mujeres que presentan un riesgo medio, deben valorarse mediante prueba de detección entre la semana 24 y la semana 28 de la gestación. Las mujeres con bajo riesgo no requieren prueba de detección. A toda mujer con características clínicas de riesgo para desarrollo de DG debe practicarse la prueba de detección.

En la mayoría de los casos se realiza el procedimiento de dos pasos; el paso 1 consiste en la cuantificación de glucosa plasmática una hora después de una carga oral de 50 g de glucosa, y el paso 2 constituye la curva de TOG, que se realiza en mujeres en quienes el primer paso indicó que presentan riesgo de DG. Como cualquier prueba diagnóstica su sensibilidad y especificidad varían según el punto de corte utilizado.

Diagnóstico.

Se basa en los resultados de la curva de TOG, a excepción de mujeres en quienes se encontró una hiperglicemia severa. El enfoque más ampliamente recomendado corresponde al propuesto por la Cuarta Conferencia Internacional en DG (56). Así, durante el Tamizaje, cuando se encuentran valores de 95 mg/dl de glicemia basal y de 180 mg/dl de glicemia a la hora, queda establecido el diagnóstico de DG.

Prueba	Glicemia	Diagnóstico
Glicemia basal en ayuno	80-110 mg/dl	Sano
Glicemia basal en ayuno	110-125 mg/dl	Glicemia anormal en ayuno
Glicemia basal en ayuno x 2	> 126 mg/dl	Diabetes Mellitus
Post-carga 75 g a las 2 horas	140-200 mg/dl	Intolerancia a la glucosa
Post-carga 75 g a las 2 horas	> 200 mg/dl	Diabetes Mellitus
Glicemia casual	> 200 mg/dl	Diabetes Mellitus
HbA1C	> 6.5%	Diabetes Mellitus

Implicaciones prenatales de la DG.

La morbilidad prenatal en mujeres con DG se limita a un aumento en la frecuencia de entidades hipertensivas. Los datos más evidentes se relacionan con la pre-eclampsia (48,49) y existe una asociación más controversial con la hipertensión inducida por el embarazo (49). Por lo cual se recomienda un monitoreo cuidadoso de la presión arterial, la ganancia de peso y la proteinuria, especialmente durante la segunda mitad de la gestación.

El riesgo prenatal principal de la DG se relaciona con el feto. Algunos autores han reportado un aumento importante en la frecuencia de defectos congénitos, pero dicha asociación parece limitarse a productos de madres quienes presentan hiperglicemia severa (glucosa en ayuno mayor a 120 mg/dl).

Históricamente, el óbito representó una importante complicación en las gestaciones de mujeres diabéticas, incluyendo mujeres embarazadas con DG no tratada (53). En consecuencia, se recomienda el monitoreo de los movimientos fetales y la cardiotocografía en embarazos complicados con DG con objeto de detectar fetos con riesgo de muerte intrauterina.

Se han reportado índices variables de asociación con macrosomía, hipoglicemia, ictericia, síndrome de dificultad respiratoria, policitemia e hipocalcemia en productos de mujeres con DG (56).

La macrosomía y las complicaciones intraparto asociadas se consideran como los tipos más importantes de morbilidad. De manera simplista, la macrosomía es consecuencia de un aporte excesivo de glucosa al feto como consecuencia de hiperglicemia materna. De hecho, existe una asociación débil entre el grado de glicemia materna y el peso al nacimiento (57). Otros factores maternos reportados en asociación con macrosomía incluyen obesidad (56) y concentraciones maternas elevadas de aminoácidos y lípidos (57-59).

Estudios genéticos en DG.

Las mutaciones en el gen GK se encuentran aproximadamente en el 3% de mujeres caucásicas con DG y usualmente se verifica en pacientes con hiperglicemia persistente en ayunas, con un pequeño incremento en la TOG y que requieren tratamiento mediante insulina durante el embarazo.

Ellard y cols., estudiaron mujeres caucásicas con DG quienes tenían hiperglicemia en ayunas y que no cumplían con los criterios clínicos para diagnóstico de Diabetes Tipo MODY. Estos autores realizaron un análisis de secuencia directa del gen de glucocinas en 15 pacientes, encontrando 12 de ellas (80%) con mutaciones en dicho gen (24).

Por su parte, Stoffel (año) reportó que de 40 pacientes con DG en dos de ellas se encontraron mutaciones para el gen de glucocinasa, sugiriendo una prevalencia aproximada del 5% (60).

En suecia, Weng y cols., estudiaron 66 pacientes con DG y antecedentes familiares de Diabetes. Estos autores encontraron tres mutaciones : una en el gen de la Glucocinasa; una en el gen HNF-1 α y una en el gen IPF-1. En este mismo estudio, los autores señalan que no encontraron evidencia de anticuerpos GAD ni genotipos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) (61).

Spyer y cols. (2000) reportaron el caso de una mujer con DG en dos embarazos subsecuentes, encontrando la mutación **E40ins21** para el gen de glucocinasa. Estos autores señalaron que el producto del primer embarazo presentó bajo peso al nacimiento (percentil 30). Al cumplir cuatro años de edad, se encontró hiperglicemia en ayuno y se verificó la misma mutación en el gen de glucocinasa en este niño (62).

Hattersly (1998) reportó 58 mujeres con DG encontrando una mutación en el gen de glucocinasa con una reducción media del peso al nacimiento de 533 g (63).

Schwarz y cols., reportaron en un estudio realizado en 58 mujeres alemanas la identificación de nueve mutaciones puntuales heterocigotas en la región codificante del gen HNF-1 α (64).

En dicho estudio, siete de ellas portaban la mutación **AV98** y tenían antecedentes maternos de DG. Una paciente resultó portadora de **Pro1447Leu** y mostraba un familiograma con diabetes en cuatro generaciones consecutivas y por último otra paciente presentó mutación **Glu48Lys**. En ésta se detectaron títulos bajos de anticuerpos GAD y anti-insulina en suero, por lo que fue clasificada como Diabetes Tipo 1. Adicionalmente estos autores encontraron la duplicación de una inserción **TGGGGGT** en la región 5'UTR, concluyendo que estas variaciones de secuencia están relacionadas al desarrollo de DG.

GENES INVOLUCRADOS EN FORMAS MONOGÉNICAS DE DIABETES TIPO 2 Y VINCULADOS AL DESARROLLO DE DG

Factor 1 del Promotor de la Insulina (IPF-1)

El IPF-1 es también conocido como PDX-1 (del inglés, Pancreas-Duodenum Homeobox-1). Este gen codifica para un factor de transcripción con una región tipo homeodominio. En humanos y otras especies, el desarrollo embrionario pancreático depende de la expresión de este gen (65), (66). Durante la etapa adulta, el gen IPF-1 participa en el metabolismo de la célula β pancreática como regulador transcripcional positivo del gen de la insulina (67).

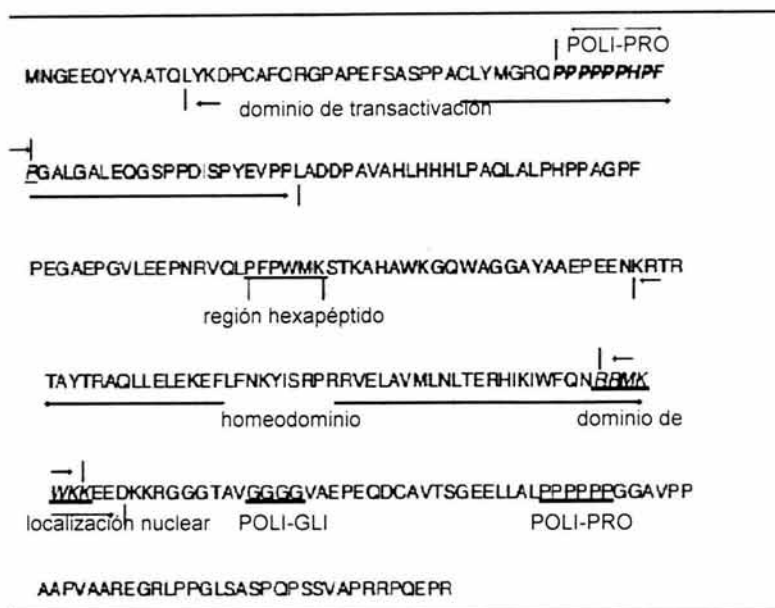
Estructura del gen y de la proteína.

El IPF-1 humano consta de dos exones y comprende una región de aproximadamente 6Kb que se ubica en el cromosoma 13 (banda q12.1). Este gen codifica para una proteína nuclear de 282 aminoácidos que pertenece a la familia de las proteínas de caja homeótica (68). Tiene los siguientes dominios funcionales importantes que incluyen: dominio de transactivación, una región de hexapéptido y un homeodominio (figura 2). El primer dominio se encuentra en la región amino-terminal (aminoácidos 1-79) y a su vez, contiene tres secuencias conocidas como subdominios. El subdominio A se extiende del aminoácido 13 al 22, el B del 32 al 38 y el C del 60 al 73. Estas secuencias se requieren para la **transcripción del gen de la insulina** en forma sinérgica con otros activadores claves, como las **proteínas E47, E2-5 y E2A**.

La región hexapéptido es importante para la heterodimerización del factor IPF-1 con proteínas como PBX y MRG1. La formación del dímero IPF-1/PBX regula la expansión de células progenitoras endocrinas y acinares durante el desarrollo pancreático (69), mientras que la del trímero IPF-1/PBX/MRG1 es requerida para la diferenciación de las células progenitoras hacia un linaje de células acinares, no así para la diferenciación hacia células β pancreáticas (68). Estas interacciones proteicas inducen la expresión de genes involucrados en la neogénesis del islote,

teniendo un papel crítico para la especificación del fenotipo de células pancreáticas durante la embriogénesis.

Figura 3. Dominios de IPF-1



El homeodominio de IPF-1 es necesario para la unión de la proteína al ADN y de manera adicional actúa como un dominio de interacción *proteína-proteína* con otros factores de transcripción como *NEUROD1* y *TCF-3*.

Regulación de la expresión del gen IPF-1.

Resultados derivados de estudios con modelos animales han demostrado que la expresión del gen de IPF-1 es regulada por una *caja E proximal* y un elemento *enhancer* propios de este gen. Su activación se lleva a cabo por la acción cooperativa de factores de transcripción como HNF-3 y BETA2. El factor HNF-3 altera la estructura nucleosomal abriendo la cromatina para proveer

acceso a otros factores de transcripción. Asimismo se sabe que esta proteína actúa durante el desarrollo pancreático embrionario y en la expresión del gen en la edad adulta. En el elemento enhancer localizado río arriba del promotor, se encuentran tres dominios altamente conservados, que son llamados H1, H2 y H3. En el dominio H1 se unen los factores transcripcionales HNF-3 e *IPF-1*, por lo que se propone que este dominio participa en un mecanismo de retroalimentación positiva, además de controlar la expresión de *IPF-1* en diferentes etapas del desarrollo.

En cuanto a su regulación, Stoffers postuló la existencia de una regulación post-transcripcional, en la cual la insulina y la misma glucosa regulan los niveles de *IPF-1* y su translocación nuclear vía *fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3C)*. La exposición de las células β pancreáticas a elevadas concentraciones de glucosa, se traduce en un incremento en la translocación al núcleo de *IPF-1*.

También se ha demostrado que niveles elevados de ácidos grasos alteran la expresión de *IPF-1*. Así, Gremlich y cols., demostraron que la exposición de islotes de Langerhans de rata a ácido palmítico induce un decremento de los niveles del RNAm y de la proteína de *IPF-1* (70).

Durante la organogénesis *IPF-1* se expresa en el páncreas, tanto en las células del componente endocrino como en las del exocrino, mientras que en el adulto su expresión está restringida a las células β y δ pancreáticas. Resulta importante señalar que la región UTR 5' se extiende de 6.5Kb a 4.5Kb y contiene la información necesaria para dirigir la expresión de *IPF-1* en las células del islote.

Función del gen *IPF-1* en el desarrollo pancreático.

IPF-1 actúa como un regulador de genes involucrados en el desarrollo de poblaciones celulares endocrina y exocrina. Se ha detectado su expresión en células embrionarias del endodermo dorsal en ratones de 8.5 días de formación. Durante la embriogénesis su expresión se restringe a células β y δ de los islotes pancreáticos, donde regulan la expresión de los genes de insulina y somatostatina, respectivamente para cada estirpe celular.

Stoffers y cols., (71,72) identificaron en un paciente con agenesia pancreática una deleción homocigota en el codón 63 del gen IPF-1. Esta deleción resulta en un cambio en el marco de lectura con la formación de un codón de paro, y debido a que está ubicada dentro de la región carboxilo-terminal del dominio de transactivación, da como resultado una proteína funcionalmente inactiva. Además el desarrollo pancreático parece depender de ciertos factores de crecimiento, algunos de los cuales se postula están regulados por IPF-1.

Función del gen IPF-1 en la neogénesis de células β .

En el adulto, las células β del páncreas tienen una vida media de aproximadamente 30 días, después de lo cual sufren apoptosis y son reemplazadas por un proceso de proliferación celular. Las nuevas células β derivan de células progenitoras que se ubican en los conductos del páncreas exocrino. Estudios *in vitro* muestran que las células exocrinas se diferencian a células β cuando se estimulan con algunos factores de crecimiento como la Activina A, el factor de crecimiento de hepatocito, la beta-celulina y el Péptido 1 Parecido a Glucagon (GLP-1). El gen IPF-1 está involucrado en la neogénesis de las células β , ya que ocurre un incremento significativo en las concentraciones del mRNA y de la proteína en los conductos pancreáticos de ratas después del tercer ó cuarto día de una pancreatectomía (73) en comparación con ratas no pancreatectomizadas.

Genes blanco del gen IPF-1 específicos de célula β .

Gen de la insulina.

La expresión del gen de la insulina se controla por su promotor mediante la unión de distintos factores de transcripción a elementos específicos de respuesta que incluyen: A3, C1, A2 y E. La unión de IPF-1 y de HNF-1 α a dichos elementos es crítica para la expresión del gen. La transactivación del gen de la insulina es mediada por la secuencia amino-terminal del IPF-1.

Reguladores de la transcripción como RIPE3b1 y A2 reconocen a elementos A1 y C1. Estudios de transfección transitoria indican que estos dominios de unión son necesarios para la activación cooperativa del gen de la insulina.

La región de homeodominio de IPF-1 actúa como un dominio de interacción proteína-proteína que recluta múltiples factores transcripcionales, incluyendo a E47 y **BETA2-NeuroD1**. Esta unión de factores forma un complejo que en conjunto con coactivadores y con la maquinaria basal transcripcional, se unen a una región minienhancer E2-A3/4 del promotor de la insulina y activan la transcripción. La unión de IPF1 y BETA2 parece tener un papel predominante en la actividad transcripcional.

Existe evidencia de que altas concentraciones de la proteína IPF-1 tienen un efecto inhibitorio en la expresión del gen de la insulina. Esta represión puede ocurrir por una interacción proteína-proteína o porque IPF-1 compite con un coactivador presente solo en cantidades limitadas en las células de islote en un adulto normal.

Gen de la glucocinasa (GK).

La enzima glucolítica GK desempeña un papel importante en la secreción de insulina en respuesta a glucosa. La región promotora del gen de GK comprende múltiples elementos que actúan en *cis* incluyendo dos importantes motivos: la estructura palindrómica hPal-1 y un motivo hUPE3. El factor IPF-1 se une a este último para activar la transcripción de GK. Se señala que alelos mutantes del gen de IPF-1 modifican la actividad transcripcional de GK, lo que ocasiona un defecto en la secreción de insulina (68).

Gen del transportador-2 de la Glucosa (GLUT-2).

Se sabe que la disminución en la expresión de IPF-1 ocasiona modificaciones en los niveles intracelulares de GLUT-2. En relación con lo anterior, Waeber y cols (74) postularon que IPF-1 interactúa con una secuencia TATA del promotor del gen de GLUT-2. El control transcripcional de

GLUT-2 es regulado por dos proteínas de unión ADN específicas del islote: IPF-1 y GTIIa. En ratones diabéticos (db/db), la disminución de la expresión del mRNA de GLUT-2, se correlaciona con una disminución de la actividad de unión ADN de la proteína GTIIa como paso inicial la disfunción de célula β . Posteriormente ocurre una desregulación de IPF-1, que ocasiona un mayor grado de disfunción.

Mutaciones en el gen de IPF-1.

Se han descrito siete mutaciones en este gen (tabla 3). Stoffers y cols (28) reportaron la delección de una base que modifica el marco de lectura, encontrada en una niña, quien falleció al decimoctavo día del nacimiento por agenesia pancreática diagnosticada mediante autopsia. Esta niña además de presentar Diabetes Neonatal e insuficiencia exocrina pancreática, tenía antecedentes familiares de Diabetes Tipo 2 compatible con herencia autosómica dominante. En ella se encontró una mutación homocigota (***FS123TER***) **en el gen de IPF-1** y en ocho familiares también se encontró pero de forma heterocigota. En ellos, el promedio de inicio de la Diabetes Tipo 2 fue de 35 años (intervalo, 17 - 67 años). Seis de los ocho familiares afectados fueron tratados con dieta y/o hipoglucemiantes orales. Ninguno presentó cetoacidosis o indicaciones de deficiencia severa de insulina.

Macfarlane y cols., comunicaron tres mutaciones de sustitución en este gen (***C18R, D76N Y R197H***), (75,76) en pacientes caucásicos con Diabetes Tipo 2. Estudios recientes de expresión demostraron disminución en la actividad de unión de IPF-1 a la región promotora del gen de la insulina y disminución en su transcripción en la línea celular β ***Nes2y***. Dichos investigadores estimaron que mutaciones en el gen IPF-1 pudieran estar presentes en el 1% de su población y predisponer al fenotipo diabético.

Por otra parte, Hani y cols., comunicaron diferentes mutaciones identificadas en familias francesas que incluyen: **una sustitución (*Q59L*) y una inserción de una prolina en la posición 243 (*insCCG243*)** (76). Estudios funcionales demostraron una disminución significativa en la

actividad basal del promotor de la insulina. La mutación insCCG243 fue identificada en dos familias con Diabetes Tipo MODY. Las otras dos mutaciones se encontraron en la población general y se asociaron con un riesgo relativo (RR) de desarrollar Diabetes Tipo 2 doce veces mayor en comparación con controles.

Un estudio en 66 mujeres suecas con DG realizado por Weng y cols., describió en una de las pacientes una mutación en IPF-1 (**P239Q**). Dicha variante presentó una reducción del 50% en su habilidad para activar la transcripción del gen de la insulina en células Nesy2 comparada con la proteína silvestre. La paciente requirió de la administración de insulina durante su embarazo (75).

Cuadro 5. Mutaciones identificadas en humanos en el gen IPF-1

Posición	Nucleótido	aa	Fenotipo	Referencia
63	GGGCAGCCCCcGGAC	FS123TER	Agenesia pancreática	Stoffers (28)
59	ATCTCC	Q59L		Hani (33)
243	CAG-CTG	P243	DMT2	Hani (33)
18	3 pb ins (CCG)	C18R	DMT2	Macfarlane
197	TGC-CGC	R197H	DMT2	(32)
76	CGC-CAC	D76N	DMT2	Macfarlane
	GAC-AAC		DMT2	(32)
239		P239Q		Macfarlane
	CCG-CAG		DG	(32)
				Hani (34)
				Weng (34)

aa: aminoácido

Factor Nuclear de Hepatocitos 1-alfa (HNF-1 α).

El factor de transcripción HNF-1 α fue originalmente aislado en el hígado de rata, por lo cual recibe su nombre (del inglés, hepatocyte nuclear factor- α). Sin embargo, técnicas de biología molecular demostraron que no está restringidos a los hepatocitos y su nombre solo describe la estirpe celular en donde fue originalmente purificado.

Mediante estudios de clonación posicional y la hibridación de cromosomas *in situ* se ubicó a este gen en la banda q24.2 del cromosoma 12.

Estructura del gen y de la proteína.

El gen consiste de 10 exones con su correspondiente región promotora. Pertenece a la familia de genes homeodominio y las proteínas que codifica están constituidas por cuatro dominios (figura 3): un dominio POU A (aminoácidos 100-197) y un homeodominio (aminoácidos 198-281), ambos indispensables para la unión al DNA; un dominio de dimerización necesario para la formación de homodímeros o heterodímeros, que se encuentra en el extremo N-terminal (aminoácidos 1-32), y por último la región C-terminal alberga al dominio de transactivación (aminoácidos 282-631), el menos conservado entre ambas proteínas.

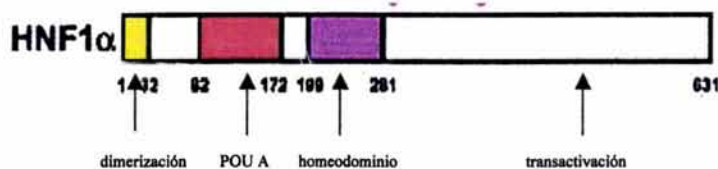


Fig. 4 Estructura de la proteína HNF-1 α humana. Se muestran el dominio de dimerización, y los dominios involucrados en la unión al DNA: el POU A y el Homeodominio. También se observa el dominio de transactivación que se encuentra en la región C-terminal.

Genes blanco de HNF-1 α .

Los genes blanco se han deducido con base a la presencia de sitios de unión en la región promotora o regiones enhancers de ciertos genes o por estudios de expresión génica mediante la introducción o inactivación del gen en diferentes tipos celulares. El sitio de unión para proteínas HNF-1 α es una secuencia palindrómica de 13 pares de bases GTTAATNATTANC.

Pontoglio y colaboradores (77), demostraron que la inactivación de este gen en ratones no es indispensable para la transcripción de genes hepáticos que se creían bajo el control estricto de este factor, ya que la expresión de estos genes solo se observó débilmente afectada en estos ratones. Esto sugiere, que otros factores de transcripción pudieran interactuar con esta secuencia consenso compensando la falta de HNF-1 α . Sin embargo, hay algunas excepciones como en el caso del gen que codifica para la fenilalanina hidroxilasa (PAH), el cual tiene una expresión totalmente nula en animales deficientes del gen HNF-1 α , observándose en ellos fenilcetonuria.

La transcripción del gen que codifica para el transportador de glucosa 6 fosfato es dependiente de este factor. También el gen que codifica para un cotransportador de glucosa/sodio de alta capacidad y alta afinidad (SGLT2) es controlado por HNF-1 α (78), ya que en ratones con Síndrome de Fanconi deficientes de este factor, la expresión de este transportador está disminuida y la reabsorción proximal renal de glucosa es deficiente, presentando entonces glucosuria. Datos similares son observados en pacientes MODY con mutaciones en HNF-1 α , lo que podría explicar porque en estos enfermos el fenotipo diabético no sea tan severo, ya que los niveles de glucosa en sangre disminuyen por la misma glucosuria.

El gen de HNF-4 α también es regulado por HNF-1 α . Diversos estudios identificaron que el gen de HNF-4 α tiene un promotor alternativo (P2) localizado a 46 Kb 5' de otro promotor (P1) previamente identificado. En células β pancreáticas se ha determinado que la transcripción del gen HNF-4 α es regulada principalmente por la unión del factor HNF-1 α al P2. Este promotor alterno

contiene sitios de unión funcionales para HNF-1 β y para IPF-1, que también son importantes para la transcripción del gen (79).

La inactivación del gen de HNF-1 α en líneas celulares de insulinoma (INS-1), demuestra que el factor HNF-1 α es un regulador positivo de los genes que codifican para la insulina y el transportador 2 de glucosa (GLUT-2), además de los que codifican para las enzimas: L-piruvato cinasa, la 3-hidroxi-3-metilglutaril Co A reductasa y la 2-oxo-glutarato mitocondrial (40). Estas proteínas intervienen en el metabolismo de la célula β . Los genes que codifican para cada una de estas proteínas tiene sitios de unión para el HNF-1 α en sus regiones promotoras o regiones enhancers.

Por su parte, Shih y cols (80) demostraron que la inactivación de HNF-1 α en un ratón ocasionaba un defecto en el transporte de ácidos biliares, un incremento en la síntesis de colesterol hepático y ácidos biliares, además de alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (81-83).

Mutaciones en el gen de HNF-1 α .

Se han reportado más de 120 diferentes mutaciones que comprenden: mutaciones puntuales, sin sentido, que alteran el marco de lectura y en el sitio de procesamiento de RNA (84).

Una inserción de una C en la posición 291 (**P291fsinsC**) localizada en el exón 4, donde existe un tracto de poli-Cs, se ha considerado como un punto caliente. La mutación P291fsinsC se ha encontrado en 22 diferentes familias de distintas poblaciones. De los 6 genes que a la fecha se han descrito como responsables de diabetes tipo MODY, la frecuencia más alta de mutaciones la tiene el gen de HNF-1 α , ya que representa cerca del 60% de todos los casos. La gran mayoría de estas mutaciones se han encontrado en regiones conservadas de los dominio de unión a ADN (POU A y homeodominio) y en el dominio de dimerización. En menor proporción se han

encontrado mutaciones en el dominio de transactivación, en la región promotora y la región del 5'UTR.

Existen mutaciones que modifican la estructura y función de la proteína como es el caso de **I128N** y **T620I**. Mediante estudios funcionales se demostró que algunas de éstas originan una capacidad de transactivación disminuida; mientras que otras, provocan una pérdida completa de la función proteica como es el caso de las que ocasionan codones de paro y por lo tanto proteínas truncadas, y algunas otras como la **G20R** y **L12S** provocan modificaciones en la formación de dímeros y tetrámeros con el cofactor DCoH. Gragnoli y cols., reportaron una mutación en la región del promotor referida como -283A-G, la cual mostró una reducción dramática de la unión de HNF-4 α en ensayos de transfección (84).

Existen polimorfismos reportados en este gen, dentro de los que destacan la variante **G319S** encontrada en la población de Oji-Cree en Canadá que se relaciona con Diabetes Tipo 2 (82) y la variante **Ala98Val**, que se correlaciona con una respuesta alterada en la secreción de insulina. Otros autores reportan hallazgos de mutaciones para este gen en mujeres con DG de diferentes poblaciones, como la alemana (61) y la sueca (75). Estos estudios describen las variantes **AV98**, **Prol447Leu**, **Glu48Lys** y una inserción TGGGGGT en la región UTR 5', para la población alemana y la **A203H** en solo una mujer sueca.

Glucocinasa.

La enzima GK tiene un papel preponderante en la regulación del metabolismo de la glucosa. Su función como sensor de la célula β pancreática de los niveles de glucosa en sangre es importante, pues en un estado de hiperglicemia, participa en la secreción de insulina, misma que normaliza las concentraciones de glucosa. Cataliza el primer paso de la glucólisis, que es la transferencia de un fosfato de ATP a la glucosa para generar glucosa-6-fosfato. Como se mencionó alteraciones en este gen ocasionan MODY 2 y a la fecha se han reportado más de 100 mutaciones a lo largo de todo el gen.

Falta página

N° 76

A diferencia de lo observado para el gen HNF-1 α ninguna de estas mutaciones reportadas parece ser más frecuente. El gen consta de 12 exones y su región promotora. Los sujetos que presentan mutaciones en glucocinasa desarrollan un hiperglicemia leve, que no progresa significativamente con la edad. Más del 85% de estas personas son tratadas con dieta únicamente y las complicaciones microvasculares son poco frecuentes. Características del síndrome metabólico generalmente no se observan, la concentración de insulina y de lípidos son normales, por lo cual tienen menor posibilidad de alteraciones cardiovasculares si se comparan con diabéticos con mutaciones en los genes HNF-1 α ó HNF-4 α .

Otros genes MODY

Otros genes involucrados en el fenotipo MODY son el HNF-4 α , HNF-1 β y NeuroD1/BETA2. Mutaciones en estos genes relacionados al fenotipo MODY han sido reportadas, pero con menor frecuencia que las identificadas para los genes HNF-1 α y glucocinasa. El fenotipo causado por mutaciones en el gen HNF-4 α es similar al causado por aquellas presentes en el gen de HNF-1 α , aunque la penetrancia puede ser ligeramente menor. No es posible diferenciar clínicamente a pacientes que presenten mutaciones en uno u otro gen.

Pacientes con alteraciones en el gen de HNF-4 α presentan una falla progresiva de célula β , requieren tratamiento farmacológico y desarrollan frecuentemente complicaciones microvasculares. Por otro lado mutaciones en el gen de HNF-1 β se han relacionado más frecuentemente con problemas renales como son la enfermedad renal quística y defectos en la morfología del riñón. La severidad del fenotipo diabético es semejante a la descrita para enfermos con mutaciones en los genes HNF-1 α y HNF-4 α . Además, sujetos que presentan mutaciones en este gen pueden desarrollar retinopatía proliferativa.

Con lo que respecta a mutaciones en el gen que codifica para el factor de transcripción NEUROD1/BETA2 como causantes del fenotipo MODY, estas son raras, solo se han encontrado en algunos individuos integrantes de familias caucásicas que presentan un patrón de herencia autosómico dominante, estos individuos desarrollaron diabetes antes de los 25 años de edad y requirieron insulino terapia para su control metabólico (85).

JUSTIFICACIÓN.

La Diabetes Mellitus resulta de una combinación de defectos en distintos procesos; tales como la síntesis, secreción y acción de la insulina, así como de alteraciones en la producción hepática de glucosa (13) y es parte del Síndrome Plurimetabólico (SPM).

La ADA (American Diabetes Association) clasifica a la DM en tipo 1, tipo 2, otros tipos específicos y Diabetes Gestacional (DG) (13)

La DM2 es el tipo más frecuente de diabetes en todo el mundo representando más del 95% del total de casos (30).

La DM2 fue considerada por mucho tiempo como una enfermedad con poca importancia epidemiológica, actualmente se ha convertido en un grave problema de salud pública en todo el mundo. En las últimas dos décadas ha habido un gran incremento en el número de casos. Esto es atribuido entre otras cosas a cambios en el estilo de vida como la dieta y el sedentarismo. Se estima que actualmente hay cerca de 150 millones de diabéticos en el mundo, y de acuerdo a ciertas proyecciones, para el 2010 habrá aproximadamente 220 millones, mientras que para el 2025 la cifra será de unos 300 millones (86). La DM2 esta fuertemente relacionada a sedentarismo y obesidad. En niños y adolescentes se ha convertido en un problema de salud pública, por ejemplo, en Japón aproximadamente el 80% del total de casos de diabetes en la niñez se debe a DM2 (87).

La OMS reportó en 1995 que la prevalencia de DM2 en el adulto a nivel mundial era del 4.0%, y estimó que esta cifra incrementará al 5.4% para el año del 2025 (88). La mayor parte de este incremento de prevalencia podría ocurrir en países en vías de desarrollo. Los países con mayor número de casos en el mundo para el 2025 podrían ser la India, China y Estados Unidos. La mayoría de casos se encuentran en el intervalo de edad de los 45 a los 64 años, siendo las mujeres más afectadas que los hombres. En Estados Unidos el número de adultos con DM incrementó un 49% entre 1991 al 2000. De acuerdo con los datos del Centro de Control y Prevención de las Enfermedades en Georgia, Atlanta, este incremento fue a expensas de las

formas tipo 2. El riesgo de padecer DM2 es mayor en ciertas poblaciones del mundo, como es el caso de los Indios Pima en Arizona que tienen la más alta prevalencia: 50% de los adultos tienen la enfermedad. Otro grupo en los Estados Unidos que también tiene una alta prevalencia de DM2 son los afroamericanos con un 13% (89).

En México, la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC) en 1993 reportó una prevalencia de DM2 del 8.2% en la población de 20 a 69 años, mientras que la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) en el 2000 lo hizo en un 10.9% para el mismo intervalo de edad (90). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha estimado que en México la prevalencia general de DM para el año del 2025 será del 12.3% (88).

La ENSA concluyó que existen cerca de 5.1 millones de casos de diabetes, con predominio en el sexo femenino (53%) con respecto al masculino (47%). Además describe que la entidad federativa con la mayor prevalencia es Tamaulipas (13.8%) y la de menor es San Luis Potosí (8.2%). En cuanto a la mortalidad, la misma encuesta describe que la DM2 ha mostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas. En 1997 se reportó una tasa de 15.5 defunciones por 100 000 habitantes, ocupando en ese momento y hasta la fecha la tercera causa de muerte, seguidas de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (90).

Las consecuencias clínicas más importantes en los pacientes con DM2 son el desarrollo de complicaciones crónicas, entre las que destacan la retinopatía y la vasculopatía, que ocasionan incapacidad permanente como ceguera o amputación de miembros inferiores. En algunos casos la muerte es secundaria a insuficiencia renal crónica.

Otro aspecto fundamental en la epidemiología de la DM en México es la proporción de individuos (alrededor del 10%) que desarrollan DM2 antes de los 40 años de edad. Estos sujetos tienen un mayor riesgo para desarrollar complicaciones crónicas, ya que están expuestos a los efectos de la hiperglucemia por periodos más prolongados, comparados con los sujetos que desarrollan la enfermedad después de la quinta o sexta década de la vida. En este sentido, aún no se tiene

datos certeros sobre la prevalencia de formas monogénicas de la enfermedad denominadas MODY (maturity-onset diabetes of the young).

La prevalencia mundial de la diabetes gestacional (DG) oscila entre 1 y 4%, con más de 135,000 casos anualmente (90). En México no hay una cifra general, pero Forsbach y colaboradores reportaron una cifra del 4.3% en la ciudad de Monterrey Nuevo León en 693 embarazadas estudiadas (30). Las mujeres que presentan mayor riesgo de padecer DG son aquellas con algún grado de obesidad, con una edad en el momento del embarazo mayor a los 25 años, aquéllas con historia familiar de alteraciones en el metabolismo de la glucosa o las que pertenecen a un grupo étnico con alta prevalencia de DM. Otros factores que incrementan el riesgo para el desarrollo de la enfermedad son los nutricionales, como las dietas altas en grasas.

En la DG existen complicaciones materno-fetales de importancia que pueden llevar a la muerte a la madre o al feto. En el presente estudio se analiza la participación de dos genes que codifican para factores de transcripción, que regulan positivamente la expresión de genes involucrados en la homeostasis de la glucosa: el del factor nuclear de hepatocito 1- α (HNF-1 α) y el factor promotor de la insulina 1 (IPF-1).

En la población caucásica se ha reportado, que el 65% de las mutaciones causantes de formas monogénicas de diabetes, se encuentran en el gen de HNF-1 α (tabla 1). El gen de IPF-1 tiene una función importante durante el desarrollo pancreático embrionario y en la expresión del gen de la insulina en la edad adulta. Además, portadores de mutaciones heterocigotas en IPF-1 presentan intolerancia a la glucosa (tabla 1), principal característica que presentan las pacientes con DG. Por lo anterior, sugerimos que estos dos genes son obvios para iniciar una línea de trabajo de investigación encaminado a la búsqueda de factores genéticos involucrados en la etiología de la DG en la población mexicana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La DG es una entidad genéticamente heterogénea donde pueden existir pacientes con DM1 de inicio tardío, DM2 de inicio temprano o bien pacientes con diabetes tipo MODY. La identificación de mutaciones en los genes HNF-1 α , IPF-1 y glucocinasa en pacientes con DG en distintas poblaciones, sugiere que mutaciones en estos genes pudieran participar en la etiología del padecimiento en la población mexicana, ya sea como genes dominantes o como genes de susceptibilidad.

El reconocimiento de la participación de estos genes en el desarrollo DG en nuestra población, así como la determinación de la prevalencia de mutaciones en estos genes, permitirá proponer medidas de prevención para reducir riesgos perinatales y gastos de atención médica.

HIPÓTESIS

Dada la función de IPF-1, de HNF-1 α y GK como reguladores de la expresión de genes involucrados en la homeostasis de la glucosa, su participación en formas monogénicas MODY, así como en el desarrollo de DG en otras poblaciones, estos genes también participan en la etiología de la DG en la población mexicana.

METAS.

Objetivo general. Evaluar el papel que desempeñan los genes IPF-1, HNF-1 α y glucocinasa en pacientes con diabetes gestacional

Objetivos específicos

- 1.- Determinar la frecuencia de patrón de herencia monogénica en pacientes con diabetes gestacional.
- 2.- Determinar la frecuencia de mutaciones en los genes IPF-1, HNF-1 α y glucocinasa en pacientes con DG.

MATERIAL Y MÉTODO.

TIPO DE POBLACIÓN (UNIVERSO DEL PROBLEMA).

- a. **Grupo problema (Grupo I).** Setenta y cinco mujeres mexicanas embarazadas con diagnóstico de DG atendidas en el Servicio Materno-infantil del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, en la ciudad de México, durante el periodo comprendido entre octubre de 2002 y septiembre 2003.
- b. **Grupo control (Grupo II).** Setenta y cinco mujeres mexicanas embarazadas, sin antecedentes de DG con una determinación de glucosa en sangre en ayunas normal, atendidas en el Servicio Materno-infantil del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, en la ciudad de México, durante el periodo comprendido entre octubre de 2001 y septiembre 2002.

TIPO DE ESTUDIO.

- a. Experimental
- b. Transversal
- c. Prospectivo
- d. Comparativo

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- a. Pacientes embarazadas con diagnóstico de DG
- b. Que acepten participar en el estudio y firmen la hoja de consentimiento
- c. Pacientes que no presenten trastorno alguno en los carbohidratos durante la gestación y que tengan pruebas de tamiz de glucosa dentro de parámetros normales (grupo control)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- a. Pacientes embarazadas con diagnóstico de Diabetes Tipo 1 y Tipo 2.
- b. Pacientes quienes rechazaran participar en el estudio.

PROCEDIMIENTO.

Tamiz de glucosa 50.

No se requiere preparación de la paciente y consiste en:

Toma de muestra de sangre periférica en ayuno.

Administración de una carga oral de glucosa de 50 g.

Se realiza otra toma de glucemia central 60 minutos después de la toma de glucosa oral.

Si el resultado de la glucosa a la hora es > 140 mg/dl es imperativo realizar la curva de TOG.

Cuando se sobrepasa este resultado es posible detectar 80% de mujeres con DG, pero si se considera como alterado cuando sobrepasa 130 mg/dl se detecta el 90% de pacientes con DG.

Para el diagnóstico confirmatorio de DG o intolerancia a los carbohidratos es necesario realizar la prueba de curva de TOG, la cual requiere de una preparación de tres días previos a la prueba con una dieta que contenga mínimo 150 g de carbohidratos al día (en este Centro Hospitalario se ajusta a 300 calorías por día). En ese tiempo no deben consumirse medicamentos ni tabaco y mantener una actividad física normal. El día de la prueba se toma muestra de sangre periférica en ayuno, se administra una carga oral de 100 g de glucosa y posteriormente se determina glucemia a los 60, 120 y 180 minutos.

Este estudio ha sido llevado como soporte de una línea de investigación interdisciplinaria del Servicio de Medicina Materno Fetal desde hace 6 años, los "Estudios mutacionales de IPF-1 y HNF-1 α desarrollados en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "DR. SALVADOR ZUBIRÁN" bajo la dirección de la Dra. María Teresa Tusié Luna; han sido modificados de acuerdo a resultados como se registra en la Coordinación de Investigación del CMN 20 de Noviembre, teniendo como línea inicial la búsqueda de diabetes tipo MODY, dadas las características de la población obstétrica derechohabiente.

El protocolo inicial ha sufrido cambios de acuerdo a la información recopilada y disponibilidad de tecnología. Tusié y cols., nos proporcionaron la información y asesoría correspondientes al trabajo de análisis genómico y resultados de las muestras obtenidas en pacientes embarazadas en control en el Servicio de Medicina Materno Fetal del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE.

Las muestras sanguíneas de las pacientes seleccionadas y sus controles fueron 20 ml de sangre obtenida que se depositó en viales con EDTA como anticoagulante. El ADN se obtendrá usando la Técnica con Fenol (63). Técnicas de PCR-SSCP (de las siglas en inglés single strand conformation polymorphism) y de secuenciación directa se llevarán a cabo como a continuación se describen.

Técnica de PCR-SSCP.

Este método se ha utilizado para la detección de mutaciones debido a su simplicidad y versatilidad. En este método la región de interés es amplificada por PCR a partir de ADN genómico seguido de una desnaturalización, con la finalidad de formar hebras únicas, para posteriormente analizarlas por corrimiento electrofóretico en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante (91,92). Las mutaciones son detectadas por diferencias de movilidad de las hebras de ADN entre los controles y las muestras a analizar. Esta técnica se utilizará para buscar cambios de migración en algunos de los exones y región exón-intrón del gen HNF-1 α .

Las condiciones para la amplificación por PCR de cada uno de los exones de los genes serán las siguientes: temperatura de desnaturalización 95°C durante 10 minutos y 94°C por 30 segundos, la de elongación 72°C por 30 segundos por 35 ciclos y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos. La temperatura de alineamiento corresponde a cada par de oligonucleótidos utilizados para cada uno de los exones de los genes (cuadro 6 y 7). La mezcla para la PCR en un volumen total de 25 μ l contiene: 2.5 μ l de Buffer 10X, (KCl - Tris-Cl pH 8.3), 0.5 mM MgCl₂, 2.5 mM de cada dNTP (A,T,G), 0.2mM de dCTP , 100 ng de cada oligonucleótido, 1U de Taq polimerasa (Taq Gold-Perkin Elmer), 100 ng de AD genómico y 1 μ Ci de α -³²P-dCTP (Amersham 3000 Ci/mmol, 10mCi/ml).

De los amplicones marcados se tomaron 2 μ l de cada muestra y se mezclan con 48 μ l de una solución de 0.1% de NaDodSO₄ y 10 nM de EDTA (solución desnaturalizante), posteriormente se tomaron 10 μ l de esta dilución para mezclarlas con 10 μ l de una solución de formamida al 95%, 20mM de EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de cianol xileno, las mezclas se desnaturalizan a 95° C durante 5 minutos y se cargan 2 μ l en un gel de poliacrilamida al 5%, con y sin glicerol al 10%, corriéndose con un buffer Tris-Borato-EDTA (TBE-pH 8.3) 1X a 4 y 8 watts respectivamente durante toda la noche y a temperatura ambiente.

Para poder establecer la presencia de cambios de migración se analizarán simultáneamente 20 muestras de individuos controles en el mismo gel. Después de la electroforesis el gel será transferido a un papel Whatman 3M y se secará durante 1 hora en un secador de geles. Se contactará con una placa de Autorradiografía Kodak a -70°C, para permitir la observación indirecta de los productos de PCR desnaturalizados después de 24 horas de exposición. Las muestras en donde se observen migraciones anómalas serán analizadas por secuenciación directa de acuerdo al método descrito en el apartado de secuenciación automatizada de electroforesis capilar Applied Byosystems (3100 Genetic Analyzer) y el cual se detalla a continuación.

Cuadro 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de los exones y regiones intrón-exón del gen IPF-1

exón	oligonucleótido sentido	oligonucleótido antisentido	tamaño*	°C**
1	5'CCATGAACGGCGAG GAGC3'	5'CAGGCTTACCTGCC CACT3'	417 pb	58
2	5'GCCCTGTGTGCGCC GCAG3'	5'TTGAAGCCCCTCAG CCAG3'	496 pb	58

*tamaño del producto en pares de bases

**temperatura de amplificación

Cuadro 7. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de los exones y regiones intrón-exón del gen HNF-1 α

exón	oligonucleótido sentido	oligonucleótido antisentido	tamaño*	°C**
1	5'GGCAGGCAAACGCAAC CCACG3'	5'GAAGGGGGGCTCGTTA GGAGC3'	483	69
2	5'CATGCACAGTCCCCAC CCTCA3'	5'CTTCCAGCCCCACCT ATGAG3'	384	68
3	5'GGGCAAGGTCAGGGG AATGGA3'	5'CAGCCCAGACCAAACC AGCAC3'	306	68
4	5'CAGAACCCTCCCCTTC ATGCC3'	5'GGTGACTGCTGTCAAT GGGAC3'	404	66
5	5'GGCAGACAGGCAGATG GCCTA3'	5'GCCTCCCTAGGGACTG CTCCA3'	347	68
6	5'TGGAGCAGTCCCTAGG GAGGC3'	5'GTTGCCCCATGAGCCT CCCAC3'	320	66
7	5'GGTCTTGGGCAGGGGT GGGAT3'	5'CTGCAATGCCTGCCAG GCACC3'	345	68
8	5'GAGGCCTGGGACTAG GGCTGT3'	5'CTCTGTCACAGGCCGA GGGAG3'	228	69
9	5'CCTGTGACAGAGCCCC TCACC3'	5'CGGACAGCAACAGAAG GGTG3'	286	69
10	5'GTACCCCTAGGGACAG GCAGG3'	5'ACCCCCAAGCAGGCA GTACA3'	247	69

*tamaño del producto en pares de bases

**temperatura de amplificación

Secuenciación automatizada.

Para la secuenciación automatizada primero se realizará una primera amplificación por PCR de la muestras objetivo, las condiciones para ésta son específicas para cada uno de los exones de IPF-1 y HNF-1 α . La temperatura de desnaturalización, de elongación y la de alineamiento serán las mismas que se utilizaron para la PCR utilizada en el análisis PCR-SSCP, al igual que el número de ciclos (Cuadros 6 y 7), con la salvedad que no se utilizará marca radiactiva.

Los productos de la PCR serán purificados con columnas QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kits catálogo No. 28106) como especifica el manual incluido en el producto. Los amplicones purificados se utilizarán para una segunda reacción de PCR, en la cual se incorporan a los nuevos amplicones nucleótidos fluorescentes incluidos en el kit Big Dye (DNA Sequencing Kit BigDye Terminator v3.0). Este reactivo tiene incluida la enzima AmpliTaq.

Los productos serán cargados en el secuenciador, en el cual al ser inducidos por un rayo láser presentan fluorescencia y dependiendo de la estructura química del marcador (R6G para A, ROX para C, R110 para G y TAMRA para T) crean una cierta intensidad medida por el Software de la computadora formando gráficos que darán lugar a un electroferograma. Para esta segunda reacción será necesario incluir el oligonucleótido sentido o antisentido según la hebra que quiera ser secuenciada. Las condiciones de la PCR para la incorporación de los nucleótidos marcados son las siguientes: 2 μ l del reactivo BigDye, 3 μ l de Buffer 5X, 1 μ l del oligonucleótido, 1 μ l del amplicon purificado. y agua c.b.p. 20 μ l. Como último paso se realizará una segunda purificación de los nuevos productos de PCR, para esta purificación se utilizarán columnas CentriSep (Applied Biosystems catalog:CS-901) según instrucciones descritas en el manual del producto. Estos amplicones purificados se secan por 10 minutos en un Speedy Vac y por último se suspenden en una solución de Hi-Di formamida (Applied Biosystems) y se desnaturalizan a 96°C durante 2 minutos cargándose inmediatamente en el secuenciador.

Posterior a esto se realizará el análisis de los electroferogramas de las pacientes comparándolos con las de los controles además de las secuencias de ambos genes obtenidas de la base de

datos del Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se realizará la secuenciación de aquellas muestras que presentaron migración anormal con respecto a los controles en la técnica de PCR-SSCP.

Los exones 4 y 7 de HNF-1 α de las 75 muestras de ADN de las mujeres con DG serán analizados directamente por secuenciación. Lo anterior debido a que en estudios previos, se identificaron mutaciones en estos dos exones en una población mexicana con diabetes de aparición temprana (92). También los dos exones del gen IPF-1 se analizarán por secuenciación directa.

RESULTADOS.

Caracterización clínica y genealógica.

De las 75 mujeres seleccionadas para el estudio, la mayoría de ellas (59% de los casos) están dentro del grupo de edad de 35 a 39 años (cuadro 8), el resto prácticamente son mayores a 35 y menores a 50 años. Sólo en una pequeña proporción (10%) las edades de las pacientes fluctuaron entre los 24 y 34 años. El 61% de estas pacientes presentaron un índice de masa corporal (IMC) normal y el resto presentaba alteraciones en su peso (sobrepeso u obesidad) (cuadro 9). Sesenta y tres de las 75 (84%) fueron tratadas con un plan de alimentación elaborado en el mismo hospital y no requirieron la administración de insulina (cuadro 10).

En nuestro grupo de pacientes solo dos de ellas presentaron preeclampsia, la primera de 38 años de edad a la cual también se le observó mediante una exploración del fondo de ojo una angiopatía angiotónica, enfermedad vascular que altera la retina, esta mujer fue tratada con dieta únicamente. Ella presentó antecedentes heredofamiliares positivos para Diabetes Tipo 2, de los cuales podemos mencionar a su padre que además padeció retinopatía bilateral como complicación de la Diabetes Tipo 2. Por otra parte su recién nacido fue catalogado como de bajo peso al nacimiento (1800 grs) (cuadro 11), por lo cual fue atendido en la unidad de cuidados intensivos neonatales.

Otra de nuestras pacientes también presentó antecedentes de Diabetes Tipo 2, su padre quien murió por un infarto al miocardio, además su abuela paterna quien presentó 2 complicaciones crónicas de la Diabetes: retinopatía y nefropatía. Nuestra paciente fue tratada con dieta e insulina. En ambas enfermas con DG se observó en sus familiogramas herencia de tipo poligénica y sus partos fueron por la vía abdominal (cesárea) (cuadro 11).

El estudio genealógico de las 75 pacientes reveló que el 48% presentan posible patrón de herencia poligénico, el 39% muestran un familiograma compatible con herencia autosómica dominante y el resto son familias sin antecedentes de Diabetes (cuadro 12).

Cuadro 8. Edades en DG.

GRUPO ETÁREO	No. DE PACIENTES	%
24-29	2	2
30-34	6	8
35-39	44	59
40-44	14	19
45-50	9	12
Total	75	100

Fuente: CMN 20 de Noviembre ISSSTE

Cuadro 9. Índice de Masa Corporal y DG

IMC	No. DE PACIENTES	%
< de 25	46	61
de 25 a 30	17	23
> de 30	12	16
TOTAL	75	100

Fuente: CMN 20 de Noviembre ISSSTE

Cuadro 10. Tratamiento en DG

TRATAMIENTO	No. DE PACIENTES	%
Dieta + insulina rápida	8	11
Dieta + I. Intermedia	3	4
Dieta + I. intermedia + I. rápida	1	1
Solo dieta	63	84
TOTAL	75	100

Fuente: Historias clínicas, CMN 20 de Noviembre ISSSTE.

Cuadro 11. Complicaciones

COMPLICACIONES	CASOS	%*
Maternas: Preeclampsia severa	2	3
Fetales: Recién nacido de bajo peso al nacimiento	1	<1

Fuente: CMN 20 de Noviembre ISSSTE

Cuadro 12. Patrones de Herencia

PATRONES DE HERENCIA	CASOS	%
poligénica	36	48
Posible autosómico dominante	29	39
sin antecedentes	10	13
TOTAL	75	100

Fuente: Familiogramas, UBMMG-INCMNSZ: Ago. 2001

Estudio mutacional de IPF-1.

Como se ha mencionado el gen IPF-1 consta de dos exones. El análisis que realizamos para la búsqueda de mutaciones en este gen fue por secuenciación directa como se ha descrito en el apartado de metodología. Se realizó amplificación por PCR de cada uno de estos exones y uniones intrón-exón con los cebadores (primers) que se observan en el cuadro 4. Los productos de esta amplificación se corrieron en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se observaron conjuntamente con un marcador de peso molecular a través de una luz ultravioleta. Posteriormente estos amplicones se purificaron como se describe en la sección de metodología. Lo anterior se realizó para las 75 muestras de DNA de pacientes con DG y los respectivos controles.

Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación automatizada fueron analizados comparándolas con secuencias patrones obtenidas del GenBank y con los electroferogramas de los mismos controles. No se encontró ninguna mutación o polimorfismo a lo largo de la secuencia nucleotídica de ambos exones y región de unión exón-intrón en ninguna de las 75 pacientes con DG.

Estudio mutacional para HNF-1 α .

El análisis de los exones del gen HNF-1 α (excepto el exón 4 y 7) se realizó mediante la técnica de PCR-SSCP, en la cual como se ha descrito, los productos de la PCR de cada uno de los exones y regiones intrón-exón de las muestras de las pacientes, se desnaturalizan y se corren en un gel de poliacrilamida al 6% para observar la migración de las hebras de estos productos y compararlas con muestras de individuos controles que se cargan en el mismo gel.

Las muestras en las que se observaron migraciones diferentes a la de los controles (fig. 6 y 10) fueron secuenciadas. Al analizar el exón 9 observamos una alteración en la migración con respecto a los controles en la muestra número 118 (fig. 7), la secuenciación nos reveló una mutación (**G574S**) (fig. 8 y 9; ver cuadro 13). No hallamos esta mutación en el resto de los casos

ni en los controles. El estudio de segregación de la familia permitió identificar la misma mutación en sus dos hijas, la de 14 y la de 2 años (fig. 23 derecha), no así en el padre de la paciente, en el hermano, en su actual esposo, y en sus primos por rama paterna. A todos ellos se les realizó CTGO para establecer el fenotipo diabético o de intolerancia a la glucosa. No fue posible realizar el estudio en ningún familiar dependiente de la rama materna.

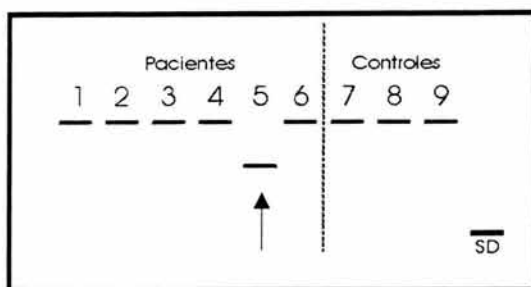


Fig. 6 En el método de PCR SSCP inicialmente mediante una reacción de PCR se amplifica una región de interés del genoma o de cDNA usando un deoxinucleótido marcado radiactivamente (α dCTP), este amplificado posteriormente es desnaturizado con la finalidad de formar hebras únicas que posteriormente serán cargadas en una cámara de electroforesis y corridas en un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Las mutaciones son detectadas por diferencias de movilidad de las hebras de DNA entre los controles y las muestras a analizar indirectamente al exponer el gel a una placa de autorradiografía. Se muestra un dibujo de una radiografía en donde se observa en el paciente No. 5 un corrimiento anormal al compararlo con los pacientes Nos. 1,2,3,4 y 6 y los controles 7,8 y 9. En el último carril abajo se ve una banda nombrada como SD, esta banda se refiere a un control que se coloca en todos los corrimiento correspondiente a una muestra sin desnaturizar (SD).

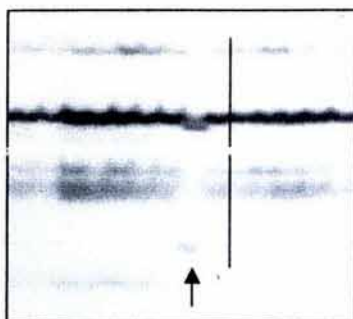


Fig.7 SSCP del exón 9 de HNF1- α , se observa un cambio en la muestra número 118. A la derecha de la línea negra se observa el corrimiento de muestras controles.

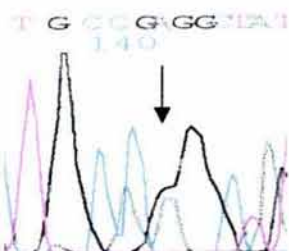


Fig. 8 Electroferograma que muestra la mutación (GGC→AGC) en forma heterocigota. Exón 9 de HNF-1 α .

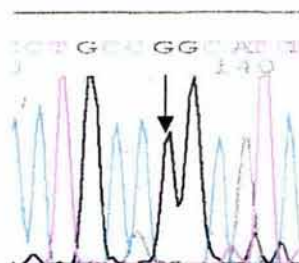


Fig. 9. Secuencia normal AGC en 574. Exón 9 G574S

Identificamos adicionalmente polimorfismos en los fragmentos correspondientes a los exones 1 (L17L), 4 (G288G), 7 (L459L, N487S, IVS7nt+7G>A) y 8 (T515T). Estos cambios de secuencia fueron observados tanto en pacientes como en controles con frecuencias distintas (fig. 11-21, y 22). Todos estos polimorfismos ya han sido reportados en otras poblaciones. En la cuadro 14 se muestran los cambios identificados así como el número de pacientes en que fueron encontrados.

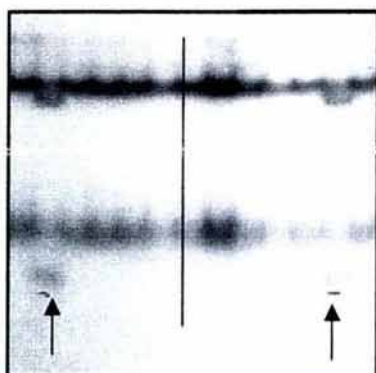


Fig. 10 SSCP del exón 8 de HNF1 - α se observan cambios de migración anormales tanto en pacientes como en controles. A la derecha de la línea negra se observa el corrimiento de muestras controles.

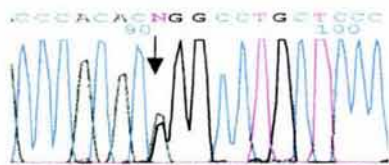


Fig.11.Polimorfismo T515T, cambio heterocigoto en la posición 515 (ACG—ACA/G). Exón 8 del gen de HNF-1 α .

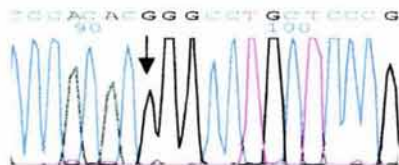
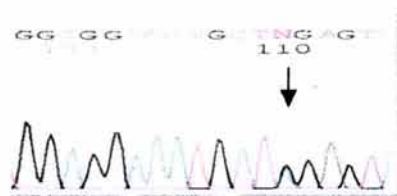
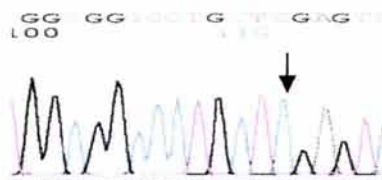


Fig.12. Secuencia normal ACG en la posición 515. Exón 8 del gen de HNF-1 α .

Cuadro. 13 Análisis mutacional del estudio de HNF-1 α en pacientes con DG.

No. DE EXÓN	LOCALIZACIÓN DEL CAMBIO NUCLEOTIDICO	CAMBIO NUCLEOTIDICO	EFECTO	No. DE PACIENTES CON EL CAMBIO	REFERENCIA
1	exón	CTC→CTG	L17L	2	Yamagata 1996
4	exón	GGG→GGC	G288G	11	Yamagata 1996
7	exón exón intrón	CTG →TTG AGC→AAC 1501+7G>A	L459L N487S IVS7nt+7G >A	55 49 49	Yamagata 1996
8	exón	ACG→ACA	T515T	9	Yamagata 1996
9	exón	GGC→AGC	G574S	1	Boutin P 1999

Fig. 13. Electroferograma que muestra el Polimorfismo L17L, cambio heterocigoto en la secuencia CTC→CTG. Exón 1 del gen HNF-1 α Fig. 14. Secuencia normal CTC en la posición 11. Exón 1 del gen de HNF-1 α

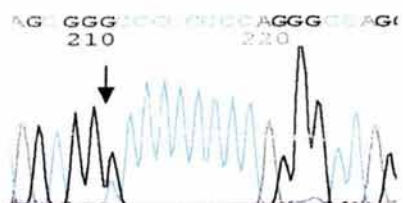


fig. 15 Polimorfismo G288G cambio heterocigoto en la secuencia (GGG→GGG/C), exón 4 del gen de HNF-1 α .

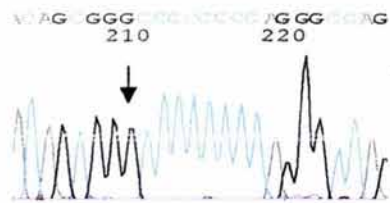


fig.16 Secuencia normal GGC en la posición 288. Exón 4 Del gen de HNF1 α .

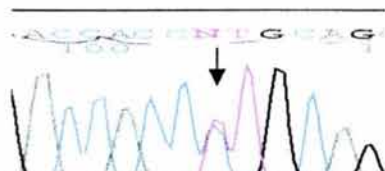


fig. 17 Polimorfismo L459L, cambio heterocigoto en la secuencia (C/TTG → TTG). Exón 7 del gen de HNF-1 α

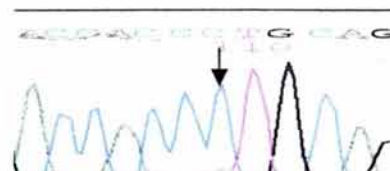


fig. 18 Secuencia normal TTG en la posición 459. Exón 7 del gen de HNF-1 α

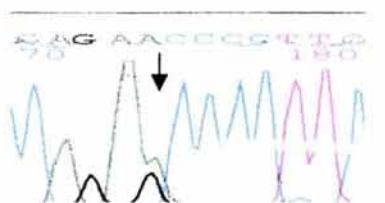


fig. 19 Polimorfismo N487S, cambio heterocigoto en la secuencia A(A/G)C → AAC. Exón 7 del gen de HNF-1 α

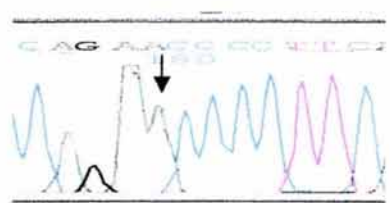


fig. 20 Secuencia normal AAC en la posición 459. Exón 7 de HNF-1 α

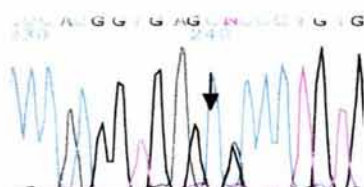


fig. 21 Polimorfismo intrónico IVS7nt+7G>A, cambio-heterocigoto en la posición 1501+7G>A.

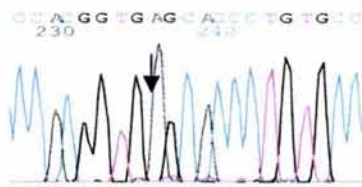


fig. 22 Secuencia normal en la posición 1501+7G>A, del gen de HNF-1 α .

Análisis de los polimorfismos L459L, N487S e IVS7nt+7G>A para valorar su posible contribución al desarrollo DG.

Algunos de los polimorfismos identificados en el gen HNF-1 α podrían estar relacionados a la susceptibilidad para el desarrollo de diabetes, particularmente los encontrados en el exón 7, el cambio N487S que resulta en un cambio de aminoácido o bien el cambio IVS7nt+7G>A presente en la región en donde se unen las proteínas del splicesosoma. Otra posibilidad es que alguno de estos polimorfismos se encontrara cosegregando con otro cambio de secuencia en el mismo gen (e.g. en la región promotora), y por lo tanto sirviera como un marcador de asociación. Esto se conoce como desequilibrio de ligamiento. Por lo tanto se hizo un análisis de la frecuencia alélica de los tres polimorfismos identificados en el exón 7 del gen HNF-1 α , con respecto a un número igual de controles. Un análisis similar se realizó con el número de individuos que presentaron estos polimorfismos de forma homocigota o heterocigota, así como la frecuencia de haplotipos combinados entre los dos grupos.

En la cuadro 14 se describe el número de pacientes y controles con cada uno de los polimorfismos identificados y en el cuadro 15 su frecuencia alélica. Este análisis no mostró una diferencia estadísticamente significativa en el número de pacientes portadoras de los polimorfismo **L459L, N487S e IVS7nt+7G>A** con respecto a los controles ($p=0.2$, $p=0.9$ y $p=0.9$ respectivamente). También el análisis tomando en cuenta la frecuencia alélica no mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.2$, $p=0.9$ y $p=1$ respectivamente). Con lo anterior concluimos que los polimorfismos **L459L, N487S e IVS7nt+7G>A** de forma aislada no parecen participar el desarrollo de la enfermedad (cuadro 15).

Cuadro 14. Análisis de los polimorfismos L459L, N487S e IVS7nt+7G>A del exón 7 de HNF-1 α en muestras de pacientes y controles.

Localización	Cambio nucleotídico	Efecto	No. de pacientes con el cambio	No. de controles con el cambio	P
Codon 459	C/C	L	20	32	0.2
	C/T	L/L	39	31	
	T/T	L	16	12	
Codon 487	G/G	N	26	28	0.9
	A/G	N/S	39	37	
	A/A	S	10	10	
1501+7G>A	G/G	IVS7nt-7G/A	26	27	0.9
	A/G		41	39	
	A/A		8	9	

El análisis estadístico no muestra una diferencia estadísticamente significativa entre las mujeres con DGI que presentan los polimorfismos L459L, N487S y 1501+7G>A con respecto a las controles.

Una posibilidad adicional era que el análisis de dos o más polimorfismos de forma combinada (haplotipos) entre pacientes y controles resultara estadísticamente significativo. Por lo tanto se procedió a determinar la frecuencia de los haplotipos más prevalentes entre pacientes y controles.

Cuadro 15. Frecuencias alélicas en los polimorfismos L459L, N487S e IVS7nt+7G>A del exón 7 de HNF-1 α .

Localización	Cambio nucleotídico	Efecto	Designación	Frecuencia alélica	
				DG	CONTROLES
Codon 459	C/T	L(CTG)>L(TTG)	L459L	T, 0.47	T, 0.37
Codon 487	A/G	N(AAC)>S(GAC)	N487S	A, 0.39	A, 0.38
1501+7G>A	G /A	IVS7ntG/A	1501+7G>A	A, 0.38	A, 0.38

La frecuencia de cada base nucleotídica fue determinada en mujeres con DG (n=75) y en mujeres no relacionadas a la enfermedad (n=75). El diagnóstico de DG se realizó como se especifica en metodología (selección de los sujetos). No existe diferencia significativa en la frecuencia alélica de los polimorfismos L459L, N487S y 1501+7G>A: $p=0.2$, $p=0.9$ y $p=1$, respectivamente.

Establecimos todas las posibles combinaciones (haplotipos) con estos tres polimorfismos. De un total de 27 posibles combinaciones solo 4 se encontraron en más de tres individuos: ***C/T459, G/A487, G/A1501+7G>A***; *C/C459, G/G487, G/G1501+7G>A*; ***T/T459, A/A487, A/A1501+7G>A***; *C/T459, G/G487, G/G1501+7G>A* y ninguno de los haplotipos anteriores mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles ($p > 0.5$, $p=0.1$, $p=0.9$ y $p > 0.5$ respectivamente) (cuadro 15).

Tabla 14. Análisis de los haplotipos más frecuentes en mujeres con DG y controles considerando los polimorfismos L459L, N487S Y 1501+7G>A

HAPLOTIPOS	PACIENTES	CONTROLES	P
C/T459, G/A487, G/A1501+7G>A	30	27	>0.5
C/C459, G/G487, G/G1501+7G>A			
T/T459, A/A487, A/A1501+7G>A	14	24	0.1
C/T459, G/G487, G/G1501+7G>A			0.9
	7	8	>0.5
	5	3	

El análisis estadístico de los haplotipos más frecuentes formados por los polimorfismos L459L, N487S y 1501+7G>A se realizó en 75 mujeres con DG vs 75 mujeres controles. No se observaron resultados estadísticamente significativos.

Adicionalmente, se identificó una mutación heterocigota en el gen de la glucocinasa. Esta mutación (Y215X) ha sido descrita en pacientes con DG en población inglesa.

DISCUSIÓN.

Características clínicas y genealógicas de las pacientes en estudio.

La mayoría de las mujeres de nuestra población (59%) se encuentran en un intervalo de edad de 35 a 39 años. Esto es consistente con lo reportado en la literatura, pues existen reportes de una relación directa entre una edad mayor de 35 años en el momento del embarazo y un mayor riesgo al desarrollo de DG (68). En nuestro estudio, la obesidad no parece ser un factor de riesgo adicional en más del 60% de las pacientes para el desarrollo de DG.

En otras circunstancias, el control de la hiperglicemia con dieta, sin el requerimiento de insulina se observa en 84% de las pacientes, lo cual también es consistente con lo reportado para grupos de pacientes con DG en otras poblaciones (53). Dentro de las complicaciones que se presentaron, la preeclampsia severa la observamos en dos mujeres: la primera de 38 años, tiene antecedentes de DM (el padre padece de retinopatía diabética), también desarrolló retinopatía y su producto tuvo bajo peso al nacimiento (1800 gr). Esta alteración en el peso de recién nacidos de madres con DG se reporta en madres portadoras de mutaciones en el gen de la glucocinasa.

La segunda paciente también cuenta con antecedentes familiares de DM (padre y abuela paterna padecieron y murieron por complicaciones de la enfermedad: infarto al miocardio e insuficiencia renal, respectivamente). Esta mujer se ha embarazado en dos ocasiones, en su primer embarazo el feto murió a la semana 24, luego de lo cual desarrolló insuficiencia renal, por lo que le realizaron un trasplante renal que actualmente la mantiene sin complicaciones. En esta paciente un gen candidato para estudios mutacionales es el gen de HNF-1 β el cual se ha relacionado a diabetes, falla renal y alteraciones estructurales del riñón. Es interesante también que esta paciente requirió de la administración de insulina y un plan de alimentación para el control metabólico durante su embarazo. Todo esto es compatible con una diabetes de difícil control observado en pacientes con mutaciones en HNF-1 β .

Ambas mujeres tienen en su familiograma patrones de herencia de tipo poligénico. Es notorio también el número tan bajo de pacientes con complicaciones materno-fetales comparado con la

frecuencia reportada en la literatura (54). Esto puede deberse a un sesgo en la muestra, ya que todas estas pacientes se atendieron en una clínica de cuidados materno-fetales en un hospital de tercer nivel y la mayoría de ellas recibieron control prenatal.

Sin embargo, a través de entrevistas a las pacientes nos hemos percatado que algunas tienen historias de pérdidas de embarazos previos, así como de hijos con malformaciones congénitas y problemas durante su embarazo, trabajo de parto y en el parto mismo, que no se documentan en los expedientes actuales. Ejemplo de lo anterior son los dos casos presentados arriba y el caso de la mujer portadora de la mutación G574S, que describiremos adelante. Datos como los presentados, hacen pensar que un número considerable de nuestras pacientes padecieron DG en sus embarazos anteriores, pero no fueron diagnosticadas como tal en esos momentos.

La falta de un diagnóstico oportuno se debe a que no hay características clínicas evidentes en esta enfermedad, lo que hace importante la búsqueda de marcadores genéticos que puedan utilizarse para la detección oportuna de mujeres con riesgo a padecer DG, mucho antes de iniciar su vida reproductiva. Los cuidados en la consulta prenatal de estas mujeres además de una adecuada educación para la salud antes y durante de los embarazos permitirá disminuir complicaciones propias de la DG, como es el caso de las muertes perinatales.

Con lo que respecta a la información obtenida de los familiogramas el 87% de las pacientes presentan agregación familiar (un mayor riesgo al desarrollo de la enfermedad en individuos con familiares de primer grado diabéticos), mientras que únicamente el 13% no presentan. De las mujeres con antecedentes de DM, el 48% de los familiogramas presentaban antecedentes familiares de Diabetes Tipo 2 y corresponden a árboles genealógicos con herencia poligénica.

Por otra parte, es interesante el alto porcentaje de mujeres que presentaron un familiograma compatible con herencia autosómica dominante, lo que sugiere la participación de un gen único (formas monogénicas) o bien la intervención de ese gen como gen principal implicado en el desarrollo de la enfermedad.

Aquellas pacientes sin antecedentes heredofamiliares podrían corresponder a DM1 (insulino-dependiente) de aparición tardía, ya que es frecuente la ausencia de agregación familiar en esta variedad de diabetes.

Variantes de secuencia identificadas en el gen HNF-1 α en pacientes mexicanas con DG.

Existen únicamente dos reportes en la literatura donde se analiza la participación del gen HNF-1 α en pacientes con DG. Ambos estudios se realizaron en poblaciones con similar número de pacientes al de las pacientes estudiadas por nosotros. En población alemana la frecuencia de mutaciones en este gen es de aproximadamente 17%, mientras que en población sueca la frecuencia es del 1.5%. En nuestro estudio se identificó una sola paciente con mutación en el gen de HNF-1 α (G574S) lo que corresponde a una frecuencia del 1.3%.

La mutación G574S en HNF-1 α fue reportada originalmente en niños africanos con diabetes de aparición temprana. Estudios subsecuentes han mostrado que este cambio de secuencia no parece ser completamente penetrante, por lo que se propone como una variante que confiere susceptibilidad al desarrollo de diabetes, particularmente en población de origen africano (69,70). Sin embargo faltan estudios funcionales en células β pancreáticas en donde se establezca la función como factor de transcripción de la proteína mutante. Mediante este tipo de estudios podríamos definir la participación de esta variante genética en el desarrollo de la DG.

La paciente portadora de la mutación G574S tiene una historia obstétrica problemática, el primer embarazo finalizó con un óbito, abortó el tercero y en las otras dos ocasiones presentó manifestaciones clínicas de amenaza de aborto, que remitieron con tratamiento. Estos datos son compatibles con el diagnóstico de DG en sus embarazos previos. Muertes intrauterinas y perinatales se reportan como complicaciones frecuentes de la DG (53). En esta paciente es importante el seguimiento con CTOG ya que probablemente desarrolle DM2 en un periodo corto de tiempo. El análisis del estudio de segregación familiar nos permite concluir que la mutación fue

heredada por la madre y que el patrón de herencia en esta familia es poligénico, como lo observamos en el familiograma de la paciente (fig. 22).

Recientes trabajos con los Indios Pima han demostrado que la respuesta a la secreción aguda de la insulina es más baja en individuos quienes sus madres fueron diabéticas durante el embarazo, que en hijos de madres que desarrollaron diabetes de aparición temprana, pero después de su nacimiento (71) Además se ha observado una disfunción de la célula β en los productos de ratas hiperglucémicas (72). Lo anterior conduce a la hipótesis de que la exposición de hiperglucemia in utero afecta la función secretoria de la insulina por la célula β . Todo lo anterior, y dada la resistencia a la insulina que se presenta normalmente durante el embarazo, nos permite sugerir que las 2 niñas portadoras de la mutación G574S en el gen de HNF-1 α (fig. 22), podrían presentar un mayor riesgo de desarrollar diabetes en sus embarazos, lo que incrementaría los riesgos de los efectos negativos que la diabetes gestacional causa sobre los productos de la gestación.

Con lo que respecta a los polimorfismos identificados en el gen HNF-1 α , comprobamos que ninguno de estos participan en la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad no solo de forma individual, sino considerando también los polimorfismos como haplotipos. Estos tres polimorfismos encontrados en el exón 7 se han descrito en población caucásica, y no las han asociado al desarrollo de DM2 (67). Sin embargo, este es el primer trabajo donde se estudia la posible asociación de estos polimorfismos (en forma individual y como haplotipos) en el desarrollo de DG.

Análisis del gen IPF-1 en pacientes mexicanas con DG.

Aunque para el gen de IPF-1 se reporta una frecuencia de mutaciones del 1.5% en pacientes con DG en población suiza, en nuestra población no se identificó ninguna mutación asociada a este gen, por lo menos en la región codificante y las uniones exón-intrón. Con estos resultados, sabemos que la proteína no tiene ningún problema estructural, pero tal vez no exista en cantidad

adecuada para llevar a cabo su función adecuadamente. Por lo anterior será necesario analizar tanto la región promotora proximal como los dominios H1 y H2 del gen. Estas secuencias son vitales para su transcripción, ya que en ellas se unen factores transcripcionales necesarios para la expresión adecuada del gen, como es el caso de HNF-3 β , HNF-1 α y HNF-4 α . El análisis de la región promotora nos permitirá descartar o no a este gen como involucrado con el desarrollo de DG en nuestras pacientes. Particularmente este gen se ha descrito asociado a intolerancia a la glucosa (73), el estado en el que se fundamenta el diagnóstico de DG.

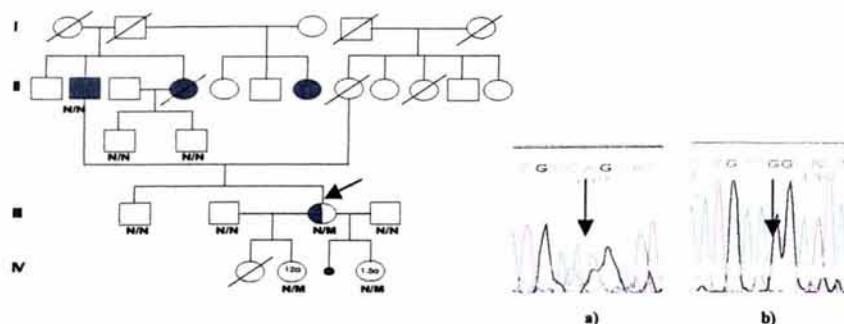


Fig. 22 Izquierda: Familiograma de la paciente No. 118 con DG. Observamos que su padre esta afectado al igual que su tía paterna (fallecida). El patrón de herencia es poligénico, ya que el padre no presenta la mutación G584S (N/N), por lo tanto esta es heredada por la madre (fallecida). Derecha: a) Electroferograma de la hija de 2 años del caso índice, en donde se muestra la mutación G574S. La flecha nos señala el cambio nucleotídico: GGC→AGC. b) Secuencia normal.

Los resultados obtenidos en este estudio nos ofrecen información interesante en tres vertientes:

1. El de la epidemiología molecular de la enfermedad, ya que descartamos totalmente que por lo menos las regiones codificantes de estos dos genes estudiados (IPF-1 y HNF-1 α) no participan de manera significativa en la etiología de la DG en la población mexicana (prevalencia del 1.3%), lo que difiere de lo descrito para la población alemana (17%). Lo anterior es una prueba valiosa

que sustenta la heterogeneidad genética del padecimiento entre distintas poblaciones, y justifica la continuación del estudio que se reporta.

2. En el aspecto de Genética molecular nos permitió con la mutante encontrada G574S, identificada en el gen HNF-1 α , realizar los estudios de segregación en otros miembros de la familia, y proponer realizar la caracterización funcional de la proteína mutante a través de estudio de expresión *in vitro*. Lo anterior ayudará a establecer una correlación funcional y fenotípica, de tal manera que podamos establecer el grado de riesgo que tienen los portadores de la mutación para desarrollar la enfermedad. Además dado el alto porcentaje (39%) de las mujeres que presentaron familiogramas con herencia compatible con transmisión autosómica dominante (MODY) es posible postular que otros genes relacionados al fenotipo MODY como el de la glucocinasa (74), HNF-4 α , HNF-1 β o Beta2/Neuro D1 pudieran participar también en el desarrollo de la DG en nuestra población.

3. La identificación y captación de estas familias será útil para su posterior estudio ya que a través de estrategias de ligamiento genético será posible la identificación de *loci* y genes nuevos implicados en el desarrollo de la DG. Por último en el aspecto clínico, ya que si logramos encontrar marcadores genéticos en algunas regiones de estos genes y definir su participación en el desarrollo de DG podríamos proponer consejería genética en los familiares de mujeres portadoras.

Los resultados del presente trabajo, ratifican la necesidad e importancia de continuar con esta línea de investigación. Es sumamente importante destacar que la DG es la principal alteración metabólica que causa el ingreso a las Unidades de Medicina Materno Fetal, con una elevada morbilidad secundaria a los cambios en el metabolismo de los hidratos de carbono. Asimismo, se acompaña de repercusiones sobre el embrión y el feto tales como abortos, malformaciones

congénitas, muerte fetal, alteraciones en el crecimiento, alteraciones en la madurez pulmonar, complicaciones intraparto y alteraciones metabólicas, entre otras.

Otro aspecto de gran relevancia consiste en que la gestación ofrece la valiosa oportunidad de recolectar el material (ej. ADN) que se requiere para el estudio de la contribución genética en la DG, adicionalmente que existe la probabilidad de recolectar material del "trío" (ADN de la madre, del padre y del producto), para la realización de investigaciones de padecimientos con tendencia familiar. El embarazo es muy importante para realizar investigaciones como la del presente estudio, ya que sirve como un "*sistema único*" para explorar la utilidad y desarrollar métodos para estudios de asociación genética. Además, existe el permanente compromiso de continuar con una "medicina personalizada" en donde las alteraciones y/o variaciones en el ADN, sirvan como una guía para la toma de decisiones en cuanto a métodos diagnósticos, intervenciones terapéuticas, evaluación de perfiles pronósticos y emitir un consejo genético.

REFERENCIAS.

1. Wu R. DNA sequence analysis. *Ann Rev. Biochem* 1978; 47: 607-734
2. Parra I, Windle B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nat Genet* 1993; 5: 17-21
3. Romero R, Kuivaniemi H, Tromp G, et al. The design, execution and interpretation of genetic association studies to decipher complex disease. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1299-312.
4. Butler Pj. A defined structure of the 30 nm chromatin fibre which accommodates different nucleosomal repeat lengths. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J* 1984; 3: 2599-2604
5. Hassan Ab, Cook PR Visualization of replication sites in unfixed human cells. *J. Cell Sci* 1993; 105:
6. Ma. H. Samarabandu J, Deudhar RS, et al. Spatial and temporal Dynamics of DNA replication sites in Mammalian Cells. *J Cell Biol* 1998; 143: 1415-25
7. Abney JR. Cutler B, Fillabach D, et al. Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implication for nuclear structure. *J. Cell Biol* 1997; 137: 1459-68
8. Britten RJ Kohne DE. Repeated sequences in DNA *science* 1997; 161: 529-540
9. Jeffreys AJ. Wilson V, Thein SL. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 1985; 314: 67-73

10. White R. Construction of linkage Maps With DNA markers for human chromosomes. *Nature* 1985; 313: 101-5.
11. Ferreira J, Paoella G, Ramos C. Spatial Organization of Large-Scale Chromatin Domains in the Nucleus: A magnified View of Single chromosome Territories. *J Cell Biol* 1997; 139: 1597-1610.
12. Oliver SG. The Complete DNA Sequence of Yeast Chromosome III. *Nature* 1992; 357: 38-46.
13. Hirsch IB. The changing faces of diabetes. *Prim Care* 2003, 30: 98-104.
14. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2003; 23: 515-20.
15. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-1197.
16. Pietropaolo M, Le Roith D. Pathogenesis of Diabetes: Our Current Understanding. *Clin Cornerstone* 2001; 4: 124-36.
17. Yumagata K. et al (1996) Mutations in the Hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in maturity onset diabetes of the young (MODY 1). *Nature* 384, 458-460.

18. Stoffers D.A., Ferrer J., Clark W.I., and Hebener J.F., Early onset type 2 diabetes mellitus (MODY 4), linked to IPF-1. *Nat. Genet.* 1997, oct. 17 (2):138-9.
19. Horikawa Y., et al (1997). Mutation in Hepatocyte nuclear factor 1-beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* 17, 384-385.
20. Malecki MT, Jhala U., Antonellis A, et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 1999; 23:323-328
21. Froguel P. et al (1992) Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early onset non insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 1992 mar. 12; 356(6365): 162-164.
22. Barrio R, Bellanu -Chantellot C, Moreno JC. Nine Novel Mutations in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) Candidate Genes in 22 Spanish Families. *J clin Endoc Metab* 2002; 2532-39.
23. Hani EH, Stoffers DA, Ch vre JC, Durand E, Stanojevic V, Dina C, Habener JF and Froguel P. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus (rapid publication). *The Journal of Clinical Investigation* 104: R41-R48,1999
24. Ellard S., Beards F., Allen LIS., Shepherd M., Ballantyne E., Harvey R., Hattersley AT.: A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria (2000). *Diabetologia* 43:250-253.

25. Hermann R, Laine A, Johansson C, et al. Transient but Not Permanent Diabetes Mellitus is Associated with Paternal Uniparental Isodisomy of Chromosome 6. *Pediatrics* 2000; 105: 49-52.
26. Metz Ch, Cavé H, Bertrand A, et al. Neonatal diabetes mellitus: Chromosomal analysis in transient and permanent cases. *J Pediatrics* 2002; 141: 483-9.
27. Christian S, Rich B, Loebels Ch, et al. Significance of genetic testing for paternal uniparental disomy of chromosome 6 in neonatal diabetes mellitus. *J Pediatrics* 1999; 134: 42-6.
28. Metzger BE, Coustan DM, Organizing Committee. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21: Suppl 2: B161-B167.
29. Sermer M, Naylor CD, Gare DJ, et al. Impact of increasing carbohydrate intolerance on maternal fetal outcomes in 3637 women without gestational diabetes: The Toronto Tri-Hospital Gestational Diabetes Project. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 146-56.
30. American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of diabetes mellitus in pregnancy. *ACOG Technical Bulletin* 1986; 92: 1-5.
31. Grupo de Estudio Sobre Diabetes Mellitus. Diabetes y Embarazo. Importancia Diagnóstica. *Rev Med IMSS (Mex)* 1992; 30: 35-7.

32. American Diabetes Association. Position statement : Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1980; 9:430-1.
33. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, et al. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol* 1993; 264:E60-E67.
34. Yen SSC. Endocrine regulation of metabolism homeostasis during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1973, 16: 130-147.
35. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, et al. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1667-72.
36. Burke CW, Roulet F. Increased exposure of tissues to cortisol in late pregnancy. *BMJ* 1970; 1: 657-9.
37. Bleicher SK, O'Sullivan JB, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. V. The interrelations of glucose, insulin and free fatty acids in late pregnancy and postpartum. *N Engl J Med* 1964; 271: 866-72.
38. Ryan EA, O'Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin actino during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* 1985; 34: 380-9.
39. Berman RN, Finegood DT, Ader M. Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endoc Rev* 1985; 6: 45-86.

40. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 1981; 30: 100-7.
41. Metzger BE, Ravnikar V, Vileisis RA, et a. Accelerated starvation and the skipped breakfast in late normal pregnancy. *Lancet* 1982; 1: 588-92.
- 42 National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-57.
43. Nelson T, Schulman G, Granger D, et al. Progesterone administration induced impairment of insulin suppression of hepatic glucose production. *Fertil Steril* 1994; 62: 491-6.
44. Gibson M, Tulchinski D. The maternal adrenal. In: Tulchinski D, Ryan KJ, eds. *Maternal-Fetal Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders, 1980, pp129-43.
45. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormone in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol* 1988; 67: 341-7.
46. Peraldi P, Spiegelman B. TNF and insulin resistance: Summary and future prospects. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 169-75.
47. Chehab FF, Mounzich K, Lu R, et al. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 1997; 275: 88-90.

48. White MF, Kahn CR. The insulin signalin system. *J Biol Chem.* 1994; 269: 1-4.
49. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, et al. The structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991, 352: 73-8.
50. Vaben L, Wegryn W, Klein-Hitpass L. Human insulin receptor substrate 21 (IRS-2) is a primary progesterone response gen. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 485-95.
51. O'Sullivan JB, Mahan CM, Charles D, Dandrow RV. Screening criteria for high-risk gestational diabetic patients. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 116: 895-900.
52. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-57.
53. Coustan DR, Nelson C, Carpenter MW, et al. Maternal age and screening for gestational diabetes: a population-based study. *Obstet Gynecol* 1989; 73: 557-61.
54. Sacks DA, Greenspoon JS, Abu-Fadil S, et al. Toward universal criteria for gestational diabetes: the 75-gram glucose tolerance test in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 146-56.
55. Metzger BE. Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* 1991; 40: Suppl 2: 197-201.

56. Langer O, Levy J, Brustam I, et al. Glycemic control in gestational diabetes mellitus –how tight is tight enough: small for gestational age versus large for gestational age?
Am J Obstet Gynecol 1989; 161: 646-53.
57. Naylor CD, Sermer M, Chen F, Farine D. Selective screening for gestational diabetes mellitus.
N Engl J Med 1997; 337: 1591-6.
58. Sacks DA, Abu-Fadil S, Karten GJ, et al. Screening for gestational diabetes with one-hour 50-g glucose test. Obstet Gynecol 1987; 70: 89-93.
59. Cousins I, Baxi L, Chez R, et al. Screening recommendations for gestational diabetes mellitus.
Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 493-6.
60. Stoffel M, Bell KL, Blackburn CL, Powell KL, Seo TS, Takeda J, Vionnet N, Xiang KS, Gidh-Jain M, Pilkis SJ, et al. Identification of Glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. Diabetes 1993, Jun;42(6):937-40
61. Weng J, Ekelund M, Lehto M, Li H, Ekberg G, Frid A, Aberg A., Groop LC and Berntorp K. Screening for MODY Mutations, GAD Antibodies, and Type 1 Diabetes-Associated HLA Genotypes in Women with Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 25 (1):68-71,2002
62. Spyer G, Hattersley A, Sykes J, et al. Influence of maternal and fetal glucokinase mutations in gestational diabetes. Am J Obstet Gynecol 2001; 185: 240-1.
63. Hattersley AT. Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight.
Nat Genet 1998; 19: 268-70.

64. Schwarz, Peter E. H.; Selisko, Thomas; Vcelak, Josef; Rietzsch, Hannes; Bendlova, Bela; ; Schulze, Jan. Identification of mutations in HNF1-Alpha in gestational Diabetes. Diabetes Vol. 50, supplement 2, june 2001: pA247
65. Martin F. Offield, Tom L. Jetton, Patricia A. Labosky, Michael Ray, Roland W. Stein, Mark A. Magnuson, Brigid L. M. Hogan and Cristipher V. E . Wright. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostarl duodenum, Development 122, 983-995 (1996), 983-995.
66. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H: 1994. insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. Nature 371:606-609
67. Helle V. Petersen, Palle Serup, James Leonard, Brigitte K. Michelsen and Ole D. Madsen. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF-1 acting through the CT boxes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, pp 10465-10469, Octubre 1994
68. Hongxiang Hui and Riccardo Perfetti. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. European Journal of Endocrinology (2002) 146, 129-141
69. Sanjoy Dutta, Maureen Gannon, Bernard Peers, Chris Wright, Susan Bonner-Weir and Marc Montminy. PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cell during development. PNAS; volumen 98, Number 3, January 30 2001, 1065-1070.

70. Sandrine Gremlich, Christophe Bonny, Gerard Waeber and Bernanrd Thorens; Fatty Acids Decrease IDX-1 Expression in Rat Pancreatic Islets and Reduce Glut2, Glucokinase, Insulin and Somatostatin Levels. Vol. 272, No. 48, November 1997: 30261-30269
71. Helena Edlund. Pancreatic. Organogenesis developmental mechanisms and implications for therapy. Nature Reviews Genetics; volumen 3, july 2002, 524-532
72. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Panceatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. Nat Genet 1997 Jan; 15(1): 106-10
73. Sarma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S. The homeodomain protein IDX increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration, Diabetes 1999 Mar; 48 (3).507-13
74. Gérard Waeber, Nancy Thompson, Pascal Nicod, and Christophe Bonny. Transcriptional Activation of the GLUT2 Gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 Homeobox Factor, Molecular Endocrinology 1996; 10: 1327-1334.
75. Doris A. Stoffers, Violeta Stanojevic and Joel F. Habener. Insulin Promoter Factor-1 Gene Mutation Linked to Early-Onset Type 2 Diabetes Mellitus Directs Expression of a Dominant Negative Isoprotein. J. Clin. Invest. Volumen 102, Number 1, July 1998, 232-241
76. Wendy M. Macfarlene, Timothy M. Frayling Sian Ellard, Julie C. Evans, Lisa I. S. Allen, Michael P. Bulman, Susan Ayres, Maggie Shepherd, Penny Clark, Ann Millward, Andrew Demaine, Terence Wilkin, Kevin Docherty and Andrew T. Hattersley. Missense mutations in the

insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* Volumen 104: R33-R39 (1999)

77. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C & Yaniv M 1996 Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fancony syndrome. *Cell* 84 575-585.

78. Marco Pontoglio, Dominique Prié, Claire Cheret, Antonia Doyen, Christine Leroy, Philippe Froguel, Gilberto Velho, Moshe Yaniv and Gerard Friedlander. HNF1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man, *European Molecular Biology Organization, Reports* vol.1, No. 4, 2000: 359-365

79. Halke Thomas, Karin Jaschkowitz, Mike Bulman, Timothy M. Frayling, Simon M.S. Michell, Simone Rossen, Anja Lingott-Frieg, Cees J. Tack, Sian Ellard, Gerhart U. Ryffel and Andrew T. Hattersley. A distant upstream promoter of the HNF-4 α gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young, *Human Molecular Genetics*, 2001, Vol. 10, No. 19: 2089-2097

80. David Q. Shih, Markus Bussen, Ephraim Sehayeck, Meenakshisundaram Ananthanarayanan, Benjamin L. Shneider, Frederick J. Suchy, Sarah Shefer, Jaya S. Bollileni, Frank J. Gonzalez. Hepatocyte nuclear factor-1 α is an essential regulator of bileacid and plasma cholesterol metabolism. *Nature genetics*, Vol. 27, april 2001; 375-382.

81. Lise Bjorkhaug, Honggang Ye, Yukio Horikawa, Oddmund Sovik, Anders Molven and Pal mRasmus Njolstad. Mody Associated with two Novel Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Loss-of-

Funtion Mutations (P112I and Q466X). *biochemical and Biophysical Research Communications* 279, 792-798 (2000)

82. Barbara L. Triggs-Raine, Robert D. Kirkpatrick, Sherrie L. Kelly, Lisa D. Norquay, Peter A. Cattini, Kazuya Yamagata, Anthony J.G. Hanley, Bernard Zinman, Stewart B. Harris P. Hugh Barre and Robert A. Hegele. HNF-1 α G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes onset in an Oji-Cree community. *PNAS*, April 2, 2002, Vol. 99, No. 7: 4614-4619

83. Stefan S. Fajans, Graeme I. Bell and Kenneth S. Polonsky. *Molecular Mechanims and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young*. *N Engl J Med*, Vol 345, No. 13: septembre 27, 2001

84. Gagnoli C, Lindner T, Cockburn BN, Kaisaki PJ, Gagnoli F, Marozzi G & Bell GI 1997 Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor- 4 alpha binding site in the in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 46 1648-1651.

85. Tusié Luna MT. *La genética de la diabetes*. *Ciencia* Vol. 53 Núm. 3, Julio-Septiembre 2002 pp 46-53

86. *Secretaría de Salud, Programa de Acción Diabetes Mellitus*. Primera Edición, 2001

87. Carlos A. Aguliar-Salinas, Eduardo Reyes-Rodriguez, Ma. Luisa Ordóñez-Sánchez, Marcelo Arellano Torres, Salvador Ramirez-Jiménez, Aarón Domínguez-López, Juan Ramón Martínez-Francois, Ma. Luisa Velasco-Pérez, Melchor Alpizar, Eduardo García-García, Francisco Gómez-

Pérez, Juan Rull and Maria Teresa Tusié-Luna. Early-Onset Type 2 Diabetes: Metabolic and Genetic Characterization in the Mexican Population, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, No. 1, 220-226

88. World Health Organization. Diabetes mellitus: report of a WHO study group. Geneva: World Health Organization, 1985

89. Moshe Hod. Gestational diabetes mellitus: past, present and future. *International DiabetesMonitor*, Vol. 14, number 1, 2002: 1-7

90. del Bosque-Plata L, Garcia Garcia E, Ramirez-Jimenez S, Cabello-Villegas J, Riba L, Gomez-Leon A, Vega-Hernandez G, Altamirano-Bustamante N, Calzada-Leon R, Robles-Valdes C, Mendoza M F, Curiel Perez O, Tusié-Luna MT. Análisis of the glucokinase gene in Mexican families displaying early onset non-insulin-dependent diabetes mellitus including mody families. *Am J Med Genet* 1997, Nov 12; 72(4):387-93

91. Orita M., Iwahana H., Zanakawa H., Hayashi K., Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis an single-strand conformation polymorphisms. *PNAS*, Vol. 86;:2766-2770, April 1989

92.- Kukita Y, Tahira T, Sommer SS and Hayashi. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Human mutation* 10:400-40, 1997