

112424



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

SERVICIO DE MEDICINA MATERNO FETAL

PARTICIPACIÓN DE LOS GENES CALPAINA 10 (POLIMORFISMOS SNP19, 43, 44, 63 Y 110) Y PPAR GAMMA (POLIMORFISMO P12A) COMO GENES DE SUSCEPTIBILIDAD PARA DIABETES GESTACIONAL EN POBLACIÓN MEXICANA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
E S P E C I A L I S T A E N
M E D I C I N A M A T E R N O F E T A L
P R E S E N T A :
DRA. BERTHA LILIANA BETANZOS ALEMÁN



ASESOR DE TESIS:
DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE
DRA. MARÍA TERESA TUSIE LUNA

MÉXICO, D.F., OCTUBRE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

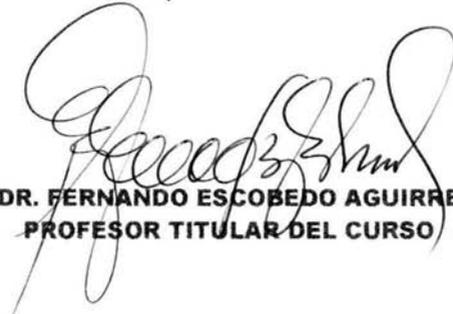
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DR. MAURICIO D. SILVIO LOPEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
CMN "20 DE NOVIEMBRE"



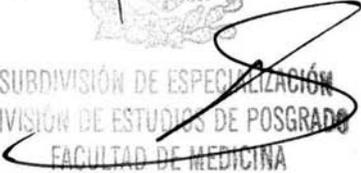
DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE
PROFESOR TITULAR DEL CURSO



DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE
ASESOR DE TESIS



DRA. BERTHA LILIANA BETANZOS ALEMAN
AUTOR DE TESIS



SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

INDICE

1. Antecedentes	1
1.1 Genética molecular y patología humana	1
1.2 Herencia y enfermedad	3
1.3 Análisis genético	5
1.4 Diabetes Mellitus	8
1.5 Diabetes gestacional	17
1.6 Genes involucrados en la Diabetes gestacional	33
1.6.1 PPAR gamma	35
1.6.2 Calpaina	36
2. Justificación	37
3. Planteamiento del problema	38
4. Hipotesis	39
5. Metas	39
5.1 Objetivo general	39
5.2 Objetivos específicos	39
6. Material y método	40
6.1 Universo del problema	40
6.2 Tipo de estudio	40
6.3 Criterios de inclusión	40
6.4 Criterios de exclusión	41
6.5 Procedimiento	41
7. Resultados	43
8. Discusión	49
9. Referencias	51

PARTICIPACION DE LOS GENES CALPAÏNA-10 (POLIMORFISMOS SNP 19,43,44,63 Y 110) y PPAR- γ (POLIMORFISMO P12A) COMO GENES DE SUSCEPTIBILIDAD PARA DIABETES GESTACIONAL EN POBLACION MEXICANA.

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: el conocimiento detallado de la maquinaria de transcripción para la formación del ácido ribonucleico (mARN) mensajero, la posibilidad de sintetizar in vitro ADN complementario (cADN) y el empleo de enzimas de restricción.

Con la tecnología de 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.

El empleo de enzimas de restricción y el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP), permitieron desarrollar la **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 la 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 una anomalía cromosómica asociada. 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 mellitus**. En muchas de ellas, el componente es de origen 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 la deficiencia de la enzima adenosindesaminasa (ADA). Sin embargo estas aplicaciones se restringen mayoritariamente a enfermedades mendelianas donde participa un único gen.

La obtención de productos protéicos mediante ingeniería genética permite su administración terapéutica, constituyendo el tratamiento idóneo para distintas 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 (3).

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 su participación en un gran número de enfermedades (2,3).

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 para 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" en la síntesis de la cadena protéica (6).

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. 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" o procesamiento del mensajero.

El mRNA en el citoplasma actúa como 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 se originan por defectos o mutaciones de un solo gen. Estos comprenden alteraciones de *herencia dominante, recesiva o ligada al sexo*.

Hay enfermedades frecuentes con susceptibilidad genética. Entre ellas destacan la epilepsia, la diabetes mellitus, la enfermedad coronaria y las enfermedades autoinmunes.

En muchos casos el componente es de origen poligénico. La heterogeneidad genética se refiere a la existencia de varios genes responsables de una misma enfermedad, o la presencia de diversas mutaciones en el mismo gen (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 copias 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) (6).

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 con el mismo padecimiento; b) ambos sexos tienen el mismo riesgo de padecer el defecto genético y transmitirlo a la descendencia; c) cuando un individuo afectado tiene descendencia con uno sano de la población general, este tiene un riesgo de 50% de probabilidades 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 (7).

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" (7).

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 (hemisigotos) y la mitad de las hijas (X/X) serán portadoras (heterocigotas) sanas (7).

Herencia poligénica.

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

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

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 reside 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).

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 hematies 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 para eliminar restos proteicos y precipitar el ADN 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 después de su digestión con 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 la carga eléctrica. Los gels 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 gels 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).

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 para la amplificación específica de fragmentos del genoma a través de PCR.

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).

Amplificación del DNA (PCR). En los últimos años se ha desarrollado una tecnología que facilita los estudios moleculares y se basa en la amplificación de secuencias

específicas del ADN. Dicha tecnología se conoce como **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR, del inglés, polymerase chain reaction).

La PCR constituye un método para la clonación in vitro de cualquier segmento de ADN.

El principio se basa en la utilización de secuencias cortas de oligonucleótidos ó **primers**, que hibridan de forma específica con las dos hebras complementarias de ADN, las cuales flanquean la región de interés. La amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en la **desnaturalización del ADN molde**, la **hibridación de los primers con el molde** y la **síntesis del ADN mediante la acción de la enzima DNA-polimerasa** (3).

Polimorfismos del ADN.

Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.

Dentro de la semejanza entre individuos de una misma especie, existen variaciones en la secuencia de la información genética, la mayoría de las cuales son neutras, sin efecto alguno sobre la información hereditaria. La mayoría de los cambios en el ADN se producen en los intrones. Se estima que uno de cada 200 nucleótidos varía entre los distintos individuos, por lo que se calcula que existen más de 10 millones de sitios polimórficos en nuestro ADN (8).

Minisatélites y microsatélites.

Existe un tipo de polimorfismos que presentan gran variedad de alelos: son los minisatélites o número variable de secuencias repetidas en tándem (VNTR, del inglés, variable number of tandem repeats) y los microsatélites (STRP, del inglés, short tandem repeat polymorphisms). Ambos son repeticiones en tándem de un número específico de nucleótidos, denominándose microsatélites cuando el núcleo repetitivo es inferior a 6 nucleótidos, y minisatélites cuando es superior. Su empleo es fundamental en estudios de mapeo para enfermedades monogénicas o poligénicas (9).

Diagnóstico genotípico.

Análisis indirecto.

Para muchas enfermedades hereditarias monogénicas la detección de portadores y el diagnóstico prenatal sólo son posibles analizando **polimorfismos del ADN ligados** a los genes responsables de estos procesos, es decir, mediante el estudio de polimorfismos y el seguimiento de su herencia en una familia determinada.

Análisis directo.

En enfermedades para las que es conocido el gen, es posible utilizar técnicas que permiten detectar las mutaciones responsables de esa enfermedad. En la mayoría se usa la amplificación por PCR (9).

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 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 cromátidas) 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).

CUADRO 1 . PRINCIPALES TIPOS DE DIABETES

Tipo	Defecto	Genética	Terapéutica
Tipo 1	Destrucción auto inmune de las células β	Marcadores genéticos confieren mayor susceptibilidad	Insulina
LADA	Destrucción auto inmune de las células β	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 HNF-1 α , HNF-4 α , HNF-1 β , Beta2/NeuroD1 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 auto inmune 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 auto inmune de las células β	Desconocida	Se desconoce la mejor terapia aunque todas los fármacos funcionan
Diabetes atípica	Deficiencia no auto inmune de insulina y resistencia a la insulina	Desconocida, probablemente autosómico dominante	Inicialmente requiere de insulina pero luego se controla con hipoglucemiantes orales
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 auto inmune 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

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 las 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 "pre-diabéticos". 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 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 Especificos	
A. Defectos Genéticos en la función de células β	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Cromosoma 12, HNF-1alpha (anteriormente MODY3) 2. Cromosoma 7, glucokinase (anteriormente MODY2) 3. Cromosoma 20, HNF-4alpha (anteriormente MODY1) 4. Mitocondrial ADN 5. Otros 	
B. Defectos Genéticos en la acción de insulina	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Resistencia a la Insulina Tipo A 2. Leprecaunismo 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall 4. Diabetes Lipoatrófica 5. Otros 	
C. Diabetes del Páncreas exócrino	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pancreatitis 2. Traumatismo / pancreatectomía 3. Neoplasia 4. Fibrosis Quística 5. Hemocromatosis 6. Pancreatopatía Fibrocalculosa 7. Otros 	
D. Endocrinopatías	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Feocromocitoma 5. Hipercoidismo 6. Somatostatinaoma 	

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)

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 auto inmune 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

Diabetes Poligénica.

Diabetes Tipo 1.

La Diabetes Tipo 1 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 auto inmune de las células β del páncreas. La evidencia de la autoinmunidad se demuestra por la presencia de uno o más auto anticuerpos para los islotes pancreáticos. Los **anticuerpos dirigidos contra las células de los islotes** (ICAS) fueron descritos por vez primera en los años setenta. 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 GADs 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 GAD son más persistentes que los ICAS después del diagnóstico.

Los autoanticuerpos asociados a insulinooma 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 auto inmune que conduce a la deficiencia de células β .

La destrucción autoinmune de las células β tiene predisposición genética determinada por distintos loci y también guarda relación con factores ambientales no completamente conocidos. 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. Algunos pacientes que tienen insulinopenia permanente no presentan 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.

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 sobrevivencia pero con frecuencia es necesaria para el control 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 presencia de obesidad. A pesar de que la cetoacidosis raramente se presenta, puede ocurrir en asociación con otras condiciones que elevan las hormonas contra reguladoras. Las infecciones y el infarto agudo al miocardio son causas frecuentes de cetoacidosis diabética, especialmente en pacientes mayores.

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 asiáticos 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.

Este subtipo de diabetes es originada por mutaciones en el genoma mitocondrial las cuales son heredadas exclusivamente por vía materna. Estas mutaciones se asocian a defectos en la fosforilación oxidativa, derivando en disfunción a nivel tisular y la sintomatología incluye miopatía, encefalopatía, acidosis láctica y diabetes (síndrome MELAS). La mutación más frecuentemente reportada es A→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 autosómicas 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, 14, 15, 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 (la presencia de individuos afectados en al menos tres generaciones). A pesar de que este tipo diabetes ocurre por mutaciones en un solo gen, se han relacionado con este tipo de diabetes seis distintos genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo y desarrollo de las células β pancreáticas: el Factor Nuclear de Hepatocitos 4α (HNF- 4α), el Factor Nuclear de Hepatocitos 1α (HNF- 1α), el Factor Promotor de Insulina 1 (IPF-1), el Factor Nuclear de Hepatocitos 1β (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" (17,18,19,20,21,22).

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).

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 (23).

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

Participación del polimorfismo común P12A en el gen de PPAR gamma en la etiología de la diabetes

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

Diabetes gestacional.

Definición.

La Diabetes Gestacional (DG) corresponde a la alteración en el metabolismo de los carbohidratos que se detecta por vez primera durante el embarazo, independientemente que se requiera y administre insulina (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 (29).

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.

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 Obstetritian 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).

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 (34).

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 depuración 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 (35).

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" mostraron 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 resistencia a la insulina observada (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 nutrientes 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 nutrientes 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% (35).

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 (37), 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" (33, 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 mujeres no embarazadas.

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 las distintas respuestas maternas a las necesidades crecientes de nutrimentos por el feto que incluyen un cambio acelerado de la utilización de carbohidratos a grasas, favorecido por la resistencia periférica a la insulina y las 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 sucede 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, Kühl 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, así como un posible defecto secretorio de insulina contribuyen a la manifestación de la enfermedad (40).

Ryan y cols., reportaron un aumento del 60% en la resistencia a la insulina 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 alterar la función de células β pancreáticas.

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 adipocitos 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 adipocitos 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 relacionadas a 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 adipocitos en cultivo, el LPH disminuyó el transporte máximo de glucosa, pero no cambió la unión de insulina. Brelje 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 veces 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 (45).

Factores involucrados en el equilibrio energético durante 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, estudios recientes indican que las células de músculo estriado expresan mRNA para TNF- α y que este actúa en forma paracrina. TNF- α antagoniza la función de la insulina, lo que se demuestra por fosforilación creciente de serina de IRS-1, que inhibe la actividad de tirosinasa 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 $TNF-\alpha$. Hubo un incremento significativo del 25% en $TNF-\alpha$ 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 $TNF-\alpha$ 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 lo 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 (47).

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. 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, a través del 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 tirosincinasa. 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 (48). 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 **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 (48).

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 su 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 pudiera ser específica de ciertos tejidos y puede vincularse con sucesos posteriores al receptor que cambian vías metabólicas para la disponibilidad de glucosa.

La actividad de tirosincinasa del receptor de insulina es una de las vías de señalización posterior a la unión de insulina a su receptor . 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 mujeres 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 otros 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, lo 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).

Fosfatasa de tirosina.

La fosforilación de tirosina del receptor de insulina y las proteínas IRS se realiza a través de reacciones de desfosforilación mediadas por fosfatasa de tirosina unidas a membranas celulares (PTPasas). Se han postulado como factor patogénico en la resistencia a la insulina en obesas y diabéticas no insulino-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 **PTP1B** han mostrado tener impacto directo sobre las señales de insulina en modelos de células integras. 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 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** aumento en sujetos resistentes a la insulina, en tanto que los niveles disminuyen en sujetos sensibles a la insulina en un 50%. **En los ratones transgénicos que sobre-expresa PTP1B se mejora la sensibilidad a la insulina y su concentración plasmática.** 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 relaciona como potenciales blancos terapéuticos 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, mediado probablemente 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 una familia de proteínas que se unen al receptor de la insulina y traducen su información a diferentes sustratos a través de cascadas de señalización. 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 reportado que en el músculo de ratas preñadas existe una **menor expresión de IRS-1**. En una investigación reciente se encontró que la concentración de proteína IRS-1 en músculo estriado humano disminuyó de 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 encontró 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 mediados por 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 de IRS-2 en la función de células hepáticas o β pancreáticas (50).

Fostatidilinositol-3-cinasa.

Es una cinasa que 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 mujeres no embarazadas (49). Hay al menos siete formas alternativas de subunidades reguladoras de PI-3 cinasa y actualmente se estudia su papel en la regulación de la captación de glucosa en distintos tejidos.

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). Adicionalmente, 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 demostró 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 la 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 total 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.

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** (52, 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 Total (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). Asimismo, numerosos estudios clínicos 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 tal manera 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 se sugiere 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 la realización de 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 (57).

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 complicación importante 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. La macrosomía se considera es consecuencia de un aporte excesivo de glucosa al feto como resultado de la 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 (57,58,59).

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 (1993) reportó que de 40 pacientes con DG en dos de ellas se encontraron mutaciones en 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 el niño (62).

En el mismo estudio, siete de las pacientes portaban la mutación **AV98** y tenían antecedentes maternos de DG. Una paciente resultó portadora de **ProI447Leu** y mostraba un familiograma con diabetes en cuatro generaciones consecutivas y por último otra paciente presentó la mutación **Glu48Lys**. En ésta última paciente se detectaron también 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 (61).

GENES INVOLUCRADOS EN DIABETES TIPO MODY Y LA DIABETES TIPO 2 Y VINCULADOS AL DESARROLLO DE DIABETES GESTACIONAL.

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).

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**.

Gen de la glucocinasa (GK).

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. La GK cataliza el primer paso de la glucólisis, 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.

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 .

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 hPa-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 al 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 (68).

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 (69).

PPAR- γ

En el cromosoma 3 se ubica un gen un receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ).(89). Los PPARs son miembros de la superfamilia de factores de transcripción de receptores de hormonas nucleares. Los PPARs forman heterodímeros con receptores retinoides X, y regulan la transcripción de múltiples genes. Hay tres tipos de PPARs , alfa, delta y gamma (PPAR γ). El gen de PPAR γ humano abarca alrededor de 100 kb y está compuesto de 9 exones el cual da lugar a los RNAs mensajeros PPAR γ 1 y PPAR γ 2 mediante el uso de promotores diferentes y splicing alternativo en el extremo 5' del gen. PPAR γ 2 se expresa abundantemente en el tejido adiposo (88). La estructura de la proteína PPAR γ consiste de un dominio central de unión a DNA, un dominio de activación en el amino terminal, y un dominio de unión a ligando en el carboxilo terminal (89) Esta proteína está involucrada en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, el transporte de ácidos grasos y la diferenciación celular. (90) PPAR γ se expresa en los tejidos blanco de la insulina y su activación regula el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos (91).

Variantes genéticas de PPAR γ

Se han asociado diferentes variantes del gen de PPAR γ con la susceptibilidad a la diabetes y a la resistencia a la insulina. La variante P115Q ha sido asociada con obesidad, mientras que las variantes V290M y P467L se han asociado con resistencia severa a la insulina y diabetes. PPAR γ mejora la señalización de la insulina mediante las drogas tiazolidinedionas (TZD) que actúan como ligandos (90). El alelo A12 es asociado con la reducción de la adipogénesis inducida por TZD (92). Mientras que el alelo P12 se

asoció con una disminución de la sensibilidad a la insulina, obesidad y diabetes tipo 2 en poblaciones japonesa y finlandesa. (88) En población caucásica se asoció a diabetes mellitus tipo 2 (93).

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 (28,94).

CALPAÍNA-10

El gen de la calpaína -10 se identificó recientemente como el primer gen de susceptibilidad para la diabetes tipo 2 en el brazo largo del cromosoma 2q 37.3 a través de clonación posicional (76). Este gen parece tener un papel muy importante en la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes tipo 2 particularmente en la población mexicano-americana y mestiza mexicana aunque se ha demostrado también su participación en distintas poblaciones de origen Europeo y en Africano- americanos donde su contribución a la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad es menor (77,78).

Un haplotipo constituido por los polimorfismos SNP-43 (single nucleotide polymorphism) localizados en el intrón 3, un polimorfismo de delección -inserción conocido como SNP-19 en el intrón 6 y el SNP-63 localizado en el intrón 13 del gen de la calpaína-10 (CAPN10) incrementa el riesgo al desarrollo de la diabetes tipo 2 en un 14% en la población Mexicano-americana (79). En un estudio mas reciente publicado por el grupo de la Dra. Tusié en colaboración con el Dr. Graeme Bell de la Universidad de Chicago se demostró la participación de un haplotipo distinto del gen CAPN10 en la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes tipo 2 de inicio tardío en la población mestiza mexicana. Este haplotipo está constituido por los SNPs 44, 43 y 110. y confiere un riesgo del 22% al desarrollo de la enfermedad en nuestra población (Del Bosque et al, 2004).

Por lo tanto en este estudio planteamos el análisis de los 5 polimorfismos descritos para el gen de la calpaína-10 asociados al riesgo de manifestar la enfermedad en población Mexico-americana o en la población mestiza mexicana. Este sería el primer análisis para un subtipo de diabetes de inicio temprano en nuestra población.

Después de la ubicación de este gen y la demostración de distintas variantes génicas involucradas en la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, han aparecido distintos estudios tratando de dilucidar el papel de estas variantes en la etiopatología de la DM2. El gen calpaína 10 codifica una proteína calcio dependiente que esta presente de forma ubicua en todos los tejidos humanos y se han descrito a la fecha al menos 8 isoformas las cuales pudieran tener expresión restringida a ciertos tipos celulares. El tratamiento con diferentes inhibidores de calpaína resulta en un aumento en la secreción de insulina

inducida por la glucosa en los islotes pancreáticos así como disminución de la misma en músculo y adipositos. Estos resultados proveen tentativamente un mecanismo molecular para explicar la asociación entre la variabilidad de CAPN10 y diabetes tipo 2. (85)

La diabetes gestacional así como la no insulino dependiente es una enfermedad multifactorial poligénica en donde participan un conjunto de genes de susceptibilidad que pudieran estar involucrados en distintos procesos incluyendo la síntesis y secreción de insulina, la incorporación de glucosa en los distintos órganos y tejidos así como la producción hepática de glucosa.

En este estudio se plantea el análisis de los polimorfismos conocidos de dos de los genes involucrados en algunos de estos procesos CAPN10 y PPAR- γ .

JUSTIFICACIÓN.

La DM2 es el tipo más frecuente de diabetes en todo el mundo representando más del 95% del total de casos (30). 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 OMS reportó en 1995 que la prevalencia de DM2 en el adulto a nivel mundial era del 4%, 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. 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. 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).

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.

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 se han reportado cifras de 4.3% (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, aquellas con historia familiar de alteraciones en el metabolismo de la glucosa o las que pertenecen a un grupo étnico con alta prevalencia de DM.

Datos epidemiológicos y fisiopatológicos sugieren un vínculo estrecho de esta entidad con la diabetes mellitus no insulino dependiente. Se han identificado diversos polimorfismos en nucleótidos del gen de la calpaina 10 y en el polimorfismo de P12A en el gen PPAR γ como de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus no insulino dependiente, por lo que se examinará la presencia de dichos polimorfismos en estos genes en mujeres con diabetes gestacional.

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

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La diabetes gestacional al igual que la diabetes no insulino dependiente es una enfermedad multifactorial poligénica. Los genes que participan en el desarrollo de la diabetes tienen efecto parcial, donde ninguno de ellos es suficiente para que esta se desarrolle. Sin embargo el efecto combinado y aditivo de distintos genes aunados a la presencia de factores ambientales como el sedentarismo, la obesidad o la dieta alta en grasas favorece el desarrollo de la enfermedad. Recientemente se identificó a la calpaina 10 como el primer gen de susceptibilidad para diabetes tipo 2 así como la participación importante del polimorfismo PA12 en el gen PPAR γ vinculada al riesgo de manifestar la enfermedad. Polimorfismos o variantes genéticas particulares en estos dos genes pudieran participar también en la etiología de la diabetes gestacional en la población mexicana.

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

HIPÓTESIS

Conociendo la participación de distintos polimorfismos en los genes de la calpaina 10 (SNP 19,43, 44,63 y 110) y PPAR γ (P12A) en la etiología de la diabetes mellitus no insulino dependiente y de la semejanza epidemiológica y fisiopatológica con la diabetes gestacional, estos genes pudieran participar también en la etiología de la Diabetes Gestacional en población mexicana.

METAS

Objetivo general.

Estudiar la participación de distintas variantes genéticas o polimorfismos de los genes de la Calpaina 10 (SNP 19, 43, 44,63 y 110) y del PPAR gamma (P12A) como posibles alelos de de susceptibilidad para el desarrollo de la diabetes gestacional en una muestra de la población mexicana.

Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia con la que se presentan los polimorfismos de calpaina SNP 19, 43, 44, 63 y 110 (de forma aislada y como haplotipo) en pacientes con diabetes gestacional y en grupo control.
2. Determinar la frecuencia con la que se presenta el polimorfismo Pro12Ala de PPAR gamma 2 en pacientes con diabetes gestacional y en grupo control.
3. Establecer si las frecuencias genéticas mantienen el equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos de estudio.
4. Establecer si existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas o genotípicas de estos polimorfismos de manera aislada o como haplotipos entre pacientes y controles.

MATERIAL Y MÉTODO.

TIPO DE POBLACIÓN (UNIVERSO DEL PROBLEMA).

- a. **Grupo problema (Grupo I).** Se estudiaron 124 mujeres mexicanas embarazadas con diagnóstico de DG atendidas en el Servicio Materno-fetal del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, en la ciudad de México.

- b. **Grupo control (Grupo II).** 100 mujeres mexicanas no relacionadas, sin antecedentes heredofamiliares de diabetes mellitus en primer grado o de DG con una determinación de glucosa en sangre en ayunas normal (80-110mg/dl) y mayores de 40 años.

TIPO DE ESTUDIO.

- a. Experimental

- b. Comparativo

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- a. Pacientes embarazadas con diagnóstico de DG

- b. Que acepten participar en el estudio y firmen la hoja de consentimiento informado.

- c. Para el grupo control se incluirán mujeres mayores de 40 años con glicemia de ayuno normal sin antecedentes heredofamiliares de primer grado de diabetes mellitus o antecedentes de diabetes gestacional.

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 igual o mayor a 130 mg/dl se realiza curva de tolerancia a la glucosa oral.

Curva de tolerancia a la glucosa oral

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 ajusto a 3000 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.

El análisis genotípico se llevó a cabo con la participación interdisciplinaria del Servicio de Medicina Materno Fetal del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE y 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. Maria Teresa Tusié Luna.

Extracción de DNA

Se obtuvieron 20 ml de sangre total con EDTA como anticoagulante de las pacientes seleccionadas y los controles.

La extracción de ADN se llevará a cabo por medio de lisis hipotónica de eritrocitos a partir de sangre total por digestión de linfocitos con proteinasa K, seguido con fenol-cloroformo,

se homogeniza por 30 segundos y se centrifuga a 12000 rpm/2min. Se decanta todo el sobrenadante y al pellet se le adiciona 180ml de buffer TE y se incuba a 55° por 10 min, se adiciona 20 ml de NaCl 5M y se mezcla vigorosamente antes de agregar 1 ml de etanol absoluto frio. Se mezcla y centrifuga a 12000 rpm/ 1min, se decanta el sobrenadante y el paquete de ADN se seca en el speedvac por 20 min. Finalmente el pellet se resuspende en 200 ml de buffer TE y se incuba a 55°C toda la noche agitando periódicamente para disolver el ADN. Para conocer la concentración del ADN, tomar una alícuota de 4 ml ADN recién disuelto y disolverlo en 996 ml de agua y leer en espectro a 260nm.

Genotificación de los SNPs

La genotificación de los SNPs 43 y 44 se realizará por PCR tiempo real, para lo cual se diseñaron las sondas Taq man y los primers específicos para cada uno de los SNPs (7000, Applied Biosystems Inc.) el análisis se realizará de acuerdo a las indicaciones del manual de Applied Biosystems. El polimorfismo denominado SNP 19, polimorfismo de inserción-delección será genotificado por PCR mutagénicamente separada (MS_PCR). El método usa un primer sentido 5'GTT TGG TTC TCT TCA GCG TGG AG-3' y el antisentido 5' CTA GAA CCC TGG CAG GGT AG-3'. La PCR se llevará a cabo en un volumen de 10 uL conteniendo 1.5 mmol de MgCl₂/L, 5% dimetil sulfoxido, 250 nmol de cada primer/L, 0.25 U de Ampli Taq Gold y 40 ng de DNA genómico. Las condiciones son 94°C por 12 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 10 min. Los productos de PCR se separan en gel de agarosa al 3%: alelo 1 (2 repeticiones de secuencias de 32pb) es de 155pb y el alelo 2 (3 repeticiones) es de 187pb.

Los SNP 110 y 63 se analizarán por secuenciación directa o a través de análisis de hibridación utilizando microarreglos.

Amplificación de la región de interés del gen PPAR α a través de PCR

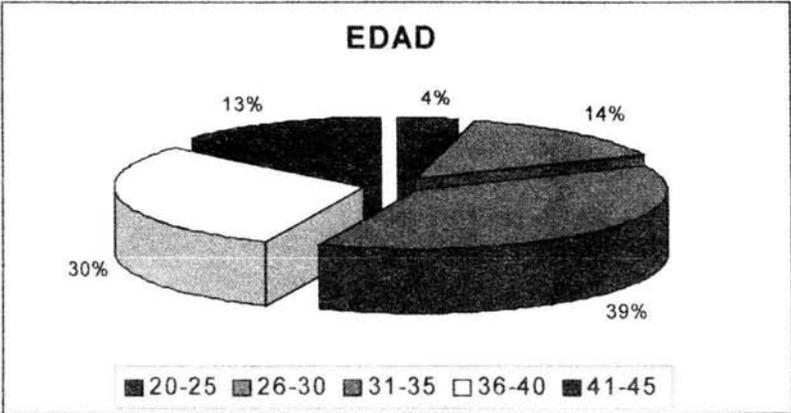
Un fragmento de 270 pb del gen PPAR α 2 abarcando el sitio de el polimorfismo se amplifica a partir de DNA genómico por PCR usando el primer (sentido) 5'-GCC AAT TCA AGC CCA GTC-3' y el primer (antisentido) mutagénico 5' GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCCG- 3' el cual introduce un sitio de restricción (CGIICG) para BstU-I solo cuando está presente la sustitución C-G en el nucleótido 34. La reacción se corre en presencia de 1.5 mM de cloruro de magnesio, y con una temperatura de alineamiento de 60°C.

Análisis de restricción para identificación del polimorfismo (P12A).

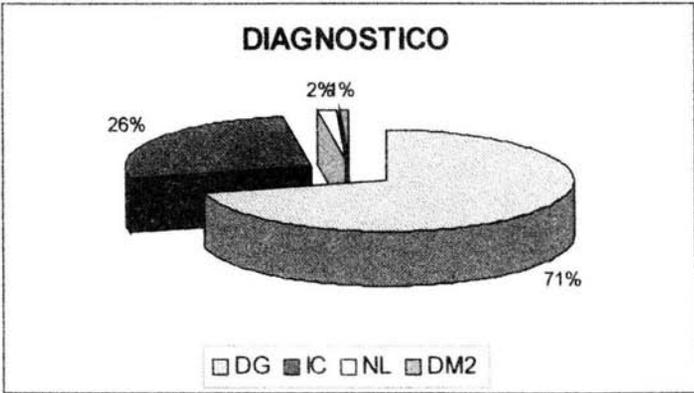
Los pesos de los productos esperados después de la digestión con BstU-I son de 270 pb del homocigoto P12, de 227 pb y de 43 pb del homocigoto A12, y de 270 pb, de 227 pb y de 43 pb de los heterocigotos. Estos genotipos fueron confirmados por secuenciación directa en muestras tomadas al azar.

RESULTADOS

Se estudiaron 126 pacientes de entre 21 y 45 años de edad con una media de 33 años y un promedio de 34.7 años. De estas el 43.6% se consideraron como de edad materna avanzada ya que tenían 36 o más años, no hubo adolescentes en este estudio.

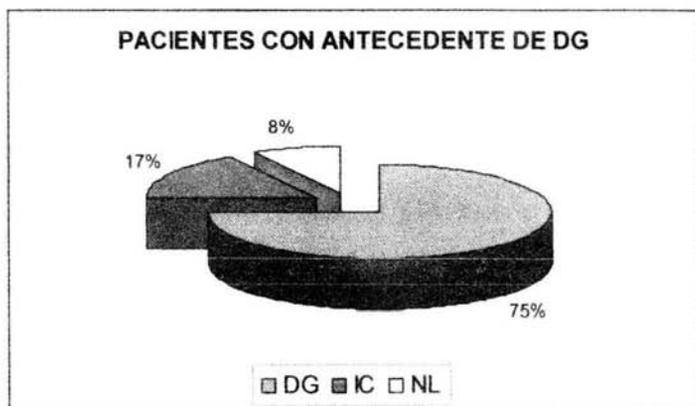


En cuanto a los resultados de tamiz y curva de tolerancia se obtuvieron como diagnósticos en 90 pacientes (71.4%) diabetes gestacional, en 33 pacientes (26.1%) intolerancia a carbohidratos en 2 pacientes (1.58%) normales y una paciente con DM2 (0.79%). Para fines de estudio genético los individuos con intolerancia a carbohidratos se consideran como afectados.



En 96 pacientes se obtuvo un tamiz alterado (76.1%) de las cuales 63 (65.6%) tuvieron diabetes gestacional, 30 (31.25%) intolerancia a carbohidratos, 2 (2.08%) no se les realizó CTGO y una (1.04%) tuvo un resultado normal.

En 18 pacientes se obtuvo tamiz diagnóstico (ambos valores alterados, con el segundo valor por arriba de 200mg/dl), de los cuales 27.7% (5 pacientes) se les realizó CTGO clasificandose también como diabeticas gestacionales en el 100% de los casos. Tuvimos un caso en el que el tamiz fue normal con una ctgo que clasificaba para diabetes gestacional (tres valores alterados).

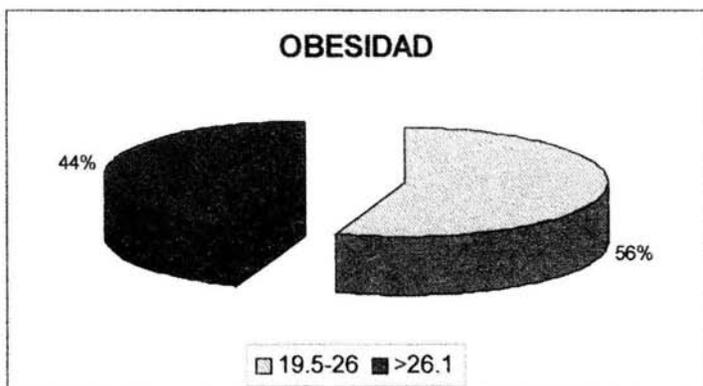


A las pacientes con antecedente de diabetes gestacional en embarazos previos (12) se les realizó directamente la CTGO encontrando diabetes gestacional en 9 (75%), 2 (16.6%) con intolerancia a carbohidratos y en un caso (8.3%) la CTGO fue normal.

En 46.1% de las pacientes se realizaron CTGO de reclasificación encontrando en 4 casos (6.8%) una curva alterada quedando clasificadas como diabeticas tipo 2.



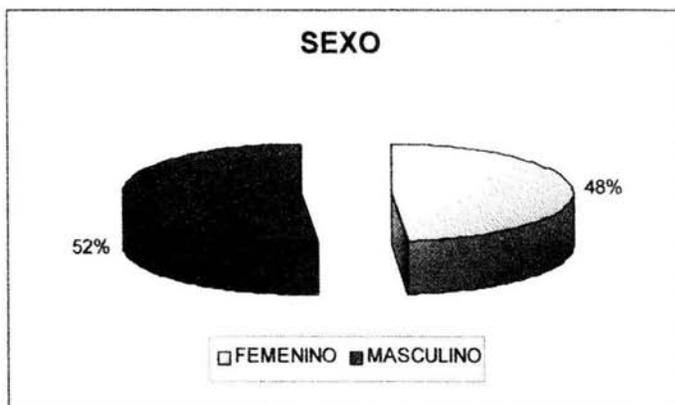
Se obtuvieron índices de masa corporal (IMC) con peso previo al embarazo, tomándose como obesidad posterior a 26 de IMC. Encontramos obesidad previa al embarazo en 44.4% de nuestras pacientes.

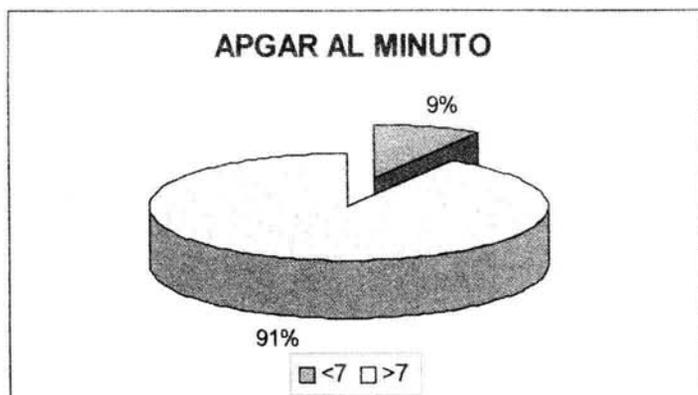


En cuanto a los antecedentes familiares de diabetes se encontraron que 81 pacientes (64.2%) tenían por lo menos un familiar en línea directa con diabetes.



Se obtuvieron 132 productos (hubo 6 embarazos gemelares) de los cuales 64 fueron mujeres (48.4%) y 68 fueron varones (51.6%). La edad al nacimiento en 26 productos fue menor de 37 semanas. No hubo productos macrosómicos, el de mayor peso fue de 3980 grs, el de menor fue de 1150 grs. Solo 11 de los productos presentaron un apgar menor de 7 al minuto.





En cuanto al análisis genotípico se han analizado el polimorfismo de inserción SNP-19 del gen de la calpaína-10 en 123 pacientes con DG y en un grupo control de 68 mujeres. Para el polimorfismo de PPAR- γ se han analizado un total de 75 pacientes y 68 sujetos control. En la fig. 1 se muestra un ejemplo del análisis para obtener el genotipo correspondiente para el polimorfismo P12A del gen PPAR- γ .

FIG.1

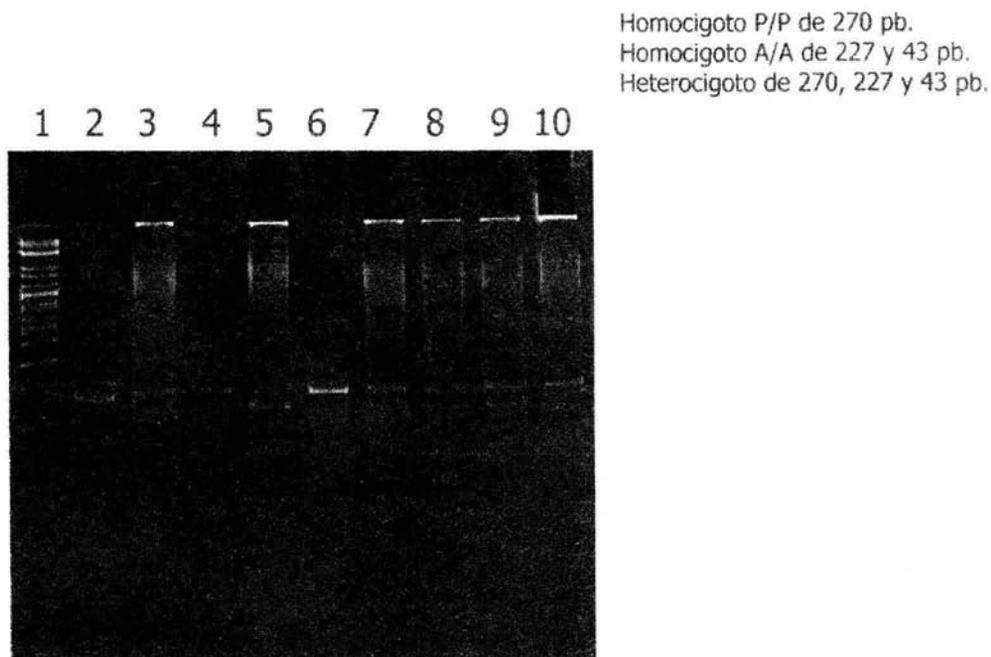


Fig. 1. Análisis de genotipos para el polimorfismo P12A del gen PPAR- γ en distintas muestras. El carril 1 corresponde a un marcador de peso molecular de DNA de doble cadena. Las muestras de los carriles 2, 4 6 y 10 corresponden a individuos homocigotos PP, la muestra del carril 5 corresponde a un individuo homocigoto AA y los carriles 3, 8 y 9 a individuos heterocigotos PA.

Fig. 2

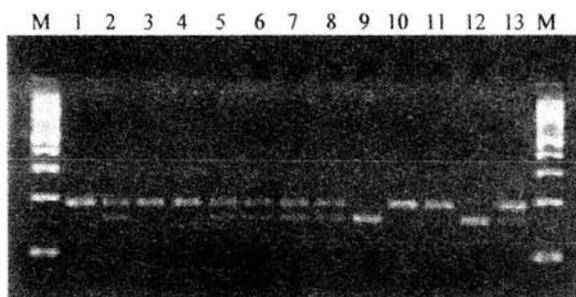


Fig.2. Análisis de genotipos para el polimorfismo de inserción-delección SNP-19 del gen de la calpaína-10 en distintas muestras. Los carriles marcados con M corresponden al marcador de peso molecular de DNA de doble cadena. Las muestras de los carriles 1, 3, 4, 10 y 11 corresponden a individuos con el genotipo 2/2, los carriles 2, 5, 6, 7, 8 y 13 corresponden a muestras con el genotipo heterocigoto 1/2 y los carriles 9 y 12 a individuos homocigotos para el alelo 1/1.

Para ambos polimorfismos tanto el grupo de pacientes como el control mostraron mantener el equilibrio de Hardy-Weinberg lo que sugiere que no existen errores de genotipificación o sesgo en la conformación de ambos grupos.

En la Tabla 1 se muestra las frecuencias genotípicas obtenidas para el SNP-19 en el grupo de pacientes de DG y el grupo control así como el estimado de OR (odds ratio) con los intervalos de confianza y los valores de significancia obtenidos.

En la Tabla 2 se muestran las frecuencias genotípicas obtenidas para el polimorfismo P12A en el gen PPAR- γ en los dos grupos de estudio, el estimado de OD con los intervalos de confianza obtenidos así como los valores de significancia.

TABLA 1. Frecuencias genotípicas obtenidas para el SNP-19 del gen de la calpaina-10

Genotipo	DG	Controles	OR	p
2R/2R	13/123	31/68	1.66 (0.4-6.8)	0.47
2R/3R	70/123	32/68	1.53 (0.7-3.34)	0.28
3R/3R	40/123	5/68	0.53 (0.24-1.19)	0.12

Tabla 2. Frecuencias genotípicas obtenidas para el polimorfismo P12A del gen PPAR- γ

Genotipo	DG	Controles	OR	p
PP	7/75	8/68	0.72 (0.28-1.88)	0.5
PA	42/75	37/68	1.04 (0.58-1.89)	0.87
AA	26/75	23/68	1.08 (0.58-2.01)	0.79

DISCUSIÓN.

Un porcentaje importante de nuestras pacientes está considerado como de edad materna avanzada (43.6%), así como con obesidad (44.4%), ambos factores mencionados en la literatura como de riesgo para el desarrollo de diabetes gestacional.

Se sabe también de la importancia de contar con el antecedente de uno a más familiares en línea directa que presenten diabetes mellitus como factor de riesgo para desarrollar diabetes gestacional. En nuestras pacientes encontramos que el 64.2% tiene, al menos, un familiar en línea directa con diabetes mellitus tipo 2 ya diagnosticado.

El diagnóstico realizado tanto por tamiz como por curva de tolerancia a la glucosa oral coincide también con los porcentajes mencionados en la literatura internacional, basándonos en los valores de Carpenter.

En cuanto a la curva de reclasificación se encontró que en un 6.8% de las pacientes estuvo alterada, por lo que se clasificaron como diabéticas tipo 2, cifra que coincide con lo que marca la literatura mundial.

Una observación muy importante es que en nuestras pacientes no se presentaron complicaciones fetales como macrosomía o membrana hialina, muy probablemente por la detección temprana y la vigilancia estrecha que se les brindó a las mismas.

Ninguno de los polimorfismos analizados parecen estar asociados al desarrollo de la DG en la muestra de pacientes incluidas en este estudio. Cabe mencionar que el proyecto plantea la búsqueda de asociación a polimorfismos específicos o bien asociación a haplotipos particulares en el caso del gen de la calpaina-10. En este sentido, en la mayoría de los estudios donde se ha mostrado asociación de la calpaina -10 con el riesgo a manifestar DM2, esta asociación se ha demostrado a través de analizar haplotipos conjuntos. Por lo tanto es posible que el SNP-19 en conjunto con algún o algunos otros polimorfismos muestre asociación significativa a la DG en nuestro estudio.

Por su parte, el polimorfismo de PPAR- γ , P12A vinculado previamente al riesgo a manifestar DM2 y obesidad en distintas poblaciones de origen caucásico, no muestra asociación significativa en nuestro grupo de estudio. En este sentido es importante señalar que debido a que aún no se completa la tipificación del total de las muestras (pacientes y controles) no es posible analizar los datos en cuanto al riesgo a manifestar DM2 en pacientes con y sin obesidad o sobrepeso. De no confirmarse asociación, este sería el primer estudio en población mestiza donde el polimorfismo P12A de PPAR- γ no parece contribuir a la susceptibilidad al desarrollo de obesidad y tampoco al riesgo a manifestar DG. En este sentido no existen todavía datos en la literatura donde se analice específicamente el papel del gen PPAR- γ y del polimorfismo P12A en la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes de inicio temprano o en relación a la diabetes gestacional.

Los datos preliminares mostrados en este trabajo hacen evidente la heterogeneidad genética subyacente a los distintos subtipos de diabetes tipo 2 así como los determinantes genéticos de susceptibilidad a esta patología en las distintas poblaciones.

La caracterización clínica de un grupo de estudio como el presentado en este trabajo es fundamental para emprender trabajos de genética/genómica-molecular donde será posible evidenciar el papel de distintos genes y su contribución relativa al riesgo a manifestar DG en mujeres de la población mexicana. Este tipo de esfuerzos colaborativos inter-institucionales es valioso en la búsqueda de marcadores moleculares de riesgo para esta patología en nuestra población.

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, Fillbach D, et al. Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implication for nuclear structure. *J. Cell Biol* 1997; 137: 1459-68
8. Britten RJ Kohhne 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, Paoletta 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; 1357; 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 Heberer J.F., Early onset type 2 diabetes mellitus (MODY 4), linked to IPF-1. *Natural 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, Bellanué-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, Chèvre 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 chromomome 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, Ravnkar V, Vileisis RA, et al. 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 Cristopher V. E. Wright. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral 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, Octobre 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. Tusié Luna MT. La genética de la diabetes. *Ciencia Vol. 53 Núm. 3, Julio-Septiembre 2002 pp 46-53*
70. Secretaría de Salud, Programa de Acción Diabetes Mellitus. Primera Edición, 2001
71. Carlos A. Aguiar-Salinas, Eduardo Reyes-Rodríguez, Ma. Luisa Ordóñez-Sánchez, Marcelo Arellano Torres, Salvador Ramírez-Jiménez, Aarón Domínguez-López, Juan Ramón Martínez-Francois, Ma. Luisa Velasco-Pérez, Melchor Alpizar, Eduardo García-García, Francisco Gómez-Pérez, Juan Rull and María 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
72. World Health Organization, Diabetes mellitus: report of a WHO study group. Geneva; World Health Organization, 1985
73. Moshe Hod. Gestational diabetes mellitus: past, present and future. *International Diabetes Monitor, Vol. 14, number 1, 2002: 1-7*

74. 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. Analisis 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
75. Leibold H. Et al.: Calpain-10 haplotype combination and association with gestational diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology*, 103(6): 1235-40, Jun, 2004.
76. Carisson E., et al, Variation in the Calpain-10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*. 89(7): 3601-5, Jul. 2004.
77. Horikawa Y., et al, Genetic variations in calpain 10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88(1): 244-7, Ene., 2003.
78. Rasmussen SK. Et al, Variants within the calpain 10 gene on chromosome 2q37 (NIDDM1) and relationships to type 2 diabetes , insulin resistance, and impaired acute insulin secretion among Scandinavian Caucasians. *Diabetes*, 51(12): 3561-7, Dic. 2002.
79. McIntyre EA, Walker M, Genetics of type 2 Diabetes and insulin resistance: knowledge from human studies. *Clinical Endocrinology*, 57(3) 303-11, Sep. 2002.
80. Orho. Melander M., et al, Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes*, 51(8): 2658-64, ago. 2002.
81. Fingerlin TE, et al, Variation in three single nucleotide polymorphism in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort, *Diabetes* 51(5): 1644-8, Mayo 2002.
82. Cassell P G, et al, Haplotype combinations of calpain 10 gene polymorphisms associate with increased risk of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in South Indians *Diabetes* 51(5): 1622-8, Mayo 2002.
83. Elbein SC. Et al, Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*. 87 (2): 650-4, Feb 2002.
84. Garant MJ, SNP43 of CAPN 10 and the risk of type 2 Diabetes in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes* , 51 (1): 231-7, Ene., 2002.
85. Stumvoll M. Et al, Functional significance of the UCSNP-43 polymorphism in the CAPN10 gene for proinsulin processing and insulin secretion in nondiabetic Germans. *Diabetes* , 50(9): 2161-3. Sep. 2001.
86. Hegele RA, Absence of association of type 2 diabetes with CAPN 10 and PC-1 polymorphisms in Oji-Cree. *Diabetes Care* 24(8): 1498-9, Ago., 2001.
87. Permutt MA, et al, Calpain -10: the first positional cloning of a gene for type 2 diabetes?. *Journal of Clinical Investigation*. 106(7): 819-21, Oct. 2000.
88. Johan G. Eriksson, et al. The effects of the ProA Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated Receptor γ 2 gene on insulin sensitivity and insulin metabolism interact with size at birth. *Diabetes*, vol. 51 2321-2324, julio 2002.
89. Robert A Hegele, et al, Peroxisome Proliferator- Activated Receptor γ 2 PIA2 and Type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *The Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 85, (5) 2014-2019, jan 2000.
90. J. Barroso et al, Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402(30) 880-883, dec. 1999.

91. Francesco P. Manani, et al, Pro 12 Ala. Substitution in the peroxisome proliferator Activated Receptor γ 2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 1466-1468, jul 1999.
92. Virpil, Lindi, etal, Association of the Pro12 Ala, polymorphism in the PPAR γ 2 with 3 year incidence of type 2 diabetes and body weight change in the finnish diabetes prevention study.
93. David Aitshuler, et al, The common PPAR γ Pro 12 Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes . *Nature genetics*, Vol. 26, 76-80. Sept. 2000.
94. Juleen R Zierath, et al. Role of skeletal muscle in thiazolidione insulin sensitizer (PPAR γ agonist) Action, *Endocrinology*, 139(12) 5034-5041, 1996.