

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DEL GEN DE LA GLUCOCINASA EN PACIENTES MEXICANAS CON DIABETES GESTACIONAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARÍA TERESA GUERRA GARCÍA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA
México, D. F., Junio del 2005

M. 345953



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

- Jurado asignado:

Presidente	Profa. Bertha Resendiz Vázquez
Vocal	Prof. Elpidio García Ramírez
Secretario	Prof. Siraam R. Cabrera Vázquez
1 ^{er} . Suplente	Prof. Luis Tonatihut Sánchez Linares
2 ^o . Suplente	Profa. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

- Sitio donde se desarrolló el tema:

Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM-INCMNSZ


- Asesor del tema:

M en C. Siraam Ramiro Cabrera Vázquez



- Sustentante:

María Teresa Guerra García



*Infeliz el hombre que no se conforma con la salud, la riqueza y sabiduría
que sus propios medios le pueden proveer; y en lugar de ello construye
barrotes de odio, envidia y frustración para su alma.
Sus ojos jamás reconocerán la verdad y su espíritu nunca será libre.*

Rebeca Estrada

*En los vastos confines orientales
Del azul palidecen los planetas,
El alquimista piensa en las secretas
Leyes que unen planetas y metales.*

*Y mientras cree tocar enardecido
El oro aquél que matará la Muerte.
Dios, que sabe de alquimia, lo convierte
En polvo, en nadie, en nada y en olvido*

Jorge Luis Borges

A todas las pacientes y sus familiares, por su participación y apoyo; sin su cooperación no hubiese sido posible la realización de este estudio.

A todos los revolucionarios, cuya lucha social culmino en la creación de la UNAM, gracias por darme la oportunidad de enriquecer mi conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todos los beneficios que sin merecer he recibido y permitirme culminar esta etapa de mi vida profesional.

Muy especialmente a la Dra. Teresa Tusié Luna por su apoyo y la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Al M. en C. Siraam Ramiro Cabrera Vázquez, mi mentor; gracias por haberme ayudado a pesar de mi enorme rebeldía.

A Maribel Rodríguez y Salvador Ramírez por su gran apoyo técnico

Al Dr. Fernando Escobedo Aguirre, los residentes y el equipo que labora en el Servicio de medicina Materno- Infantil del Centro Medico Nacional 20 de Noviembre, por su participación en la selección de las pacientes estudiadas.

A los profesores Bertha Resendiz Vázquez y Elpidio García Ramírez de la facultad de Química de la UNAM, por sus comentarios y sugerencias en la realización de la prueba escrita.

A todos los miembros de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica; todos ellos han sido mis tutores, gracias por compartirme su experiencia.

A la UNAM, mi Alma Mater y todos los profesores que colaboraron en mi formación profesional.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre, gracias por tu ejemplo y tus consejos

A mi madre por el amor y la confianza incondicionales que en mí has depositado

A mis hermanos: Rosy, Felisa, Rafa, Salvador, Martha, Lucy, Isabel, Francis, Juan; pero especialmente a Carmen quien ha sido mi alma gemela y ha compartido todos los momentos de mi vida.

A mis hermosos sobrinos: Pablo, Came, Montse, Andrea, Ale, July, Levi, Eddy, Ariana y Uriel

A mis cuñados: Pilar, Alejandro, Pablo, Javier y Carlos gracias por su apoyo y formar parte de la familia.

A mis amigos con quienes un día abordé el barco de la vida universitaria: Maura, Juan Pablo, Ramón, Itzel, Fernanda y Liz.

Especialmente a Samia y Montse, quienes me apoyaron en los momento más difíciles.

A mis amigas: Diana, Sonia y Blanca; quienes siempre están pendientes de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
DEFINICIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS	2
I) Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)	2
II) Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)	3
III) Otros tipos específicos de diabetes	4
a) Diabetes tipo MODY	4
b) Mutaciones puntuales en el DNA mitocondrial	5
IV) Diabetes gestacional	6
EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL	8
FISIOLOGÍA DEL EMBARAZO	8
I) Gasto energético y modificación del metabolismo de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos	8
II) Transporte de glucosa, aminoácidos y lípidos a través de la placenta	11
LA INSULINA COMO UN FACTOR DE CRECIMIENTO	12
ASPECTOS MOLECULARES EN LA ACCIÓN DE LA INSULINA	12
FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL	14
FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE DG	16
COMPONENTE GENÉTICO DE LA DIABETES GESTACIONAL	18
LA ENZIMA GLUCOCINASA	23
I) Estructura del gen de glucocinasa	24
II) Regulación de la expresión del gen de Glucocinasa	25
III) La enzima Glucocinasa como un sensor de los niveles de glucosa en célula β pancreática y su participación en la secreción de la insulina	27
IV) Aspectos moleculares y la regulación de la actividad de Glucocinasa	29
COMPLICACIONES MATERNAS Y EN EL PRODUCTO DE LA GESTACIÓN ASOCIADAS CON LA DIABETES GESTACIONAL	31
DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES GESTACIONAL	34
TRATAMIENTO PARA LA DIABETES GESTACIONAL	37
I) Dieta	37
II) Insulina	38
III) Hipoglucemiantes orales	39

JUSTIFICACIÓN	41
HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS	43
METODOLOGÍA	44
SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES.....	44
I) Pacientes	44
a) Estudios clínicos.....	44
b) Criterios de exclusión	45
II) Controles	45
ESTUDIO GENÓMICO DEL GEN DE LA GLUCOCINASA	46
I) Toma de muestra	46
II) Obtención del DNA genómico	46
a) Integridad y cuantificación del DNA.....	47
III) Técnica de PCR-SSCP	47
a) Fundamento.....	47
b) Condiciones experimentales para la técnica de PCR-SSCP.....	48
IV) Técnica de secuenciación automatizada de DNA	49
a) Fundamento.....	49
b) Condiciones experimentales.....	50
V) Análisis estadísticos	51
RESULTADOS	53
CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENEALÓGICA DE LAS PACIENTES CON DG.....	53
ESTUDIO GENÓMICO DEL GEN DE LA GLUCOCINASA	55
I) Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg	59
II) Estudio de asociación Caso-Control	60
DISCUSIÓN	63
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y GENEALÓGICAS DE LAS PACIENTES EN ESTUDIO	63
ESTUDIO DEL GEN DE LA GCK	65
I) Variantes alélicas identificadas en el gen de la GCK en pacientes mexicanas con DG	65
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS	71

INDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Estructura del gen de la glucocinasa.....	25
Figura 2. Factores de transcripción asociados con el fenotipo MODY y sus genes blanco.....	26
Figura 3. Papel de la glucocinasa en la secreción de insulina.....	29
Figura 4. Modelo de la estructura tridimensional de la glucocinasa	30
Figura 5. Autorradiografía de los productos del exón 6 de la GCK.....	56
Figura 6. Autorradiografía de los productos del exón 1c de la GCK	56
Figura 7. Autorradiografía de los productos del exón 10 de la GCK	56
Figura 8. Electroferograma de una paciente con el polimorfismo Y215Y.....	57
Figura 9. Electroferograma con la secuencia normal del codón 215 del gen de la GCK.....	57
Figura 10. Electroferograma del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en forma homocigota.....	57
Figura 11. Electroferograma del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en forma heterocigota.....	57
Figura 12. Electroferograma de la secuencia común del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T.....	57
Figura 13. Electroferograma del polimorfismo (-30) G>A, en forma homocigota.....	58
Figura 14. Electroferograma del polimorfismo (-30) G>A en forma heterocigota.....	58
Figura 15. Electroferograma de la secuencia común del polimorfismo (-30) G>A.....	58

Gráficas

Gráfica 1. Valores promedio de las curvas de tolerancia oral a glucosa en las pacientes.....	53
Gráfica 2. Frecuencia alélica del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T del gen de la GCK.....	61
Gráfica 3. Frecuencia genotípica del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T del gen de la GCK.....	61
Gráfica 4. Frecuencia alélica del polimorfismo (-30) G> A del gen de la GCK.....	61
Gráfica 5. Frecuencia genotípica del polimorfismo (-30) G> A del gen de la GCK.....	61

Tablas

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.....	7
Tabla 2. Características de la glucocinasa.....	24
Tabla 3. Diagnóstico de DG después de una carga de 100 g de Glucosa.....	35
Tabla 4. Diagnóstico de DG después de una carga de 75 g de Glucosa.....	36
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para el estudio genómico de la GCK.....	48
Tabla 6. Grupos por edades de las pacientes con DG.....	54
Tabla 7. Índice de masa corporal pregestaciona de las pacientes con DG.....	54
Tabla 8. Tratamientos utilizados para el control de la DG.....	54
Tabla 9. Complicaciones maternas y fetales.....	55
Tabla 10. Patrones de herencia en las pacientes con DG.....	55
Tabla 11. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en las pacientes	59
Tabla 12. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en controles....	59
Tabla 13. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo (-30) G> A en las pacientes.....	60
Tabla 14. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo (-30) G> A en controles.....	60
Tabla 15. Estudio de asociación caso-control del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T	61
Tabla 16. Estudio de asociación caso-control del polimorfismo (-30) G> A	62

RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) se ha convertido en un grave problema de salud pública en todo el mundo; en México su prevalencia supera la mundial, además de que es la principal causa de muerte. Se estima que en los próximos años, la DM será uno de los principales problemas de salud que enfrentará nuestro país.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es el tipo más frecuente, ya que representa más del 90% de los casos, por otro lado se considera que la diabetes gestacional (DG) es una manifestación temprana de la DMT2. La DG afecta del 1-14% de las gestantes y las poblaciones con una alta prevalencia de DMT2 presentan a su vez un elevado número de casos de DG. El estudio de este padecimiento es de suma importancia debido a que durante el curso de la enfermedad se pueden presentar complicaciones que afectan tanto la salud de la madre como la del feto.

Se ha hecho, evidente que parte de la fisiopatología de la DG comprende una falla en la respuesta compensatoria de las células β para superar la resistencia a la insulina fisiológica que se desarrolla durante el embarazo. Por lo tanto, los esfuerzos por conocer la participación del componente genético en el desarrollo de esta enfermedad incluyen el estudio de genes que participan en la secreción de insulina, así como aquellos relacionados con la respuesta a esta hormona en sus células blanco.

Uno de los genes que se han asociado con el desarrollo de DG es el de la glucocinasa (GCK), la enzima codificada por este gen tiene un papel muy importante en la secreción de insulina. En otras poblaciones se han identificado variantes alélicas tanto en pacientes con DG como DMT2.

Por lo tanto en este estudio se buscaron variantes alélicas en el gen de la GCK y se evaluó si alguno de ellas participaba en la susceptibilidad genética para el desarrollo de la DG en una muestra de pacientes mexicanas.

Se identificaron tres polimorfismos en este gen mediante la técnica de PCR-SSCP y secuenciación directa, el primero de ellos se localizó solo en una de las 75 pacientes estudiadas. Esta variante no se traduce en un cambio de aminoácido (Tyr215Tyr), y al parecer al igual que en otras poblaciones este polimorfismo no se relaciona con el desarrollo de DG (polimorfismo neutral).

Los otros dos polimorfismos identificados en el gen de la GCK son: el polimorfismo intrónico IVS9 +nt8 C>T y el polimorfismo en región promotora de célula β (-30) G>A. Estos son variantes alélicas comunes en la población mexicana que se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, y de acuerdo al estudio de asociación caso control que se realizó no se relacionan con el desarrollo de la DG.

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) se ha convertido en un grave problema de salud pública en todo el mundo, ya que en las últimas dos décadas ha habido un gran incremento en el número de casos. En el año 2000 la cifra mundial de diabéticos era de 177 millones, de acuerdo a la estimación hecha por la Organización Mundial de la Salud para el 2030 el número de casos aumentará hasta 370 millones (Zimmet y cols., 2003).

En México la prevalencia de DM en adultos mayores de 20 años en el 2000 fue del 7.5%. El número de los casos de DM han aumentado más de treinta veces en los últimos 50 años (Hernández y cols., 2002). Además, la DM se considera como una de las tres principales causas de muerte junto con las enfermedades del corazón y los tumores malignos (SSA, 2000). De acuerdo con la estadística de mortalidad en el 2001, la DM fue la primer causa de muerte, registrándose 49,833 muertes (SSA, 2002). De los individuos con diabetes, solo el 77.3% conoce que padece la enfermedad (Olaiz y cols., 2003). El aumento de pacientes con DM será sin duda uno de los problemas más importantes que enfrentará México en los próximos años.

La ADA (American Diabetes Association) clasifica a la DM en 4 tipos: Diabetes tipo 1 (DMT1), diabetes tipo 2 (DMT2), otros tipos específicos de diabetes y diabetes gestacional (DG). La DMT2 es el tipo más frecuente de diabetes en todo el mundo, ya que representa del 90 al 95% del total de casos (ADA, 2004). Por otro lado, se ha considerado que la DG es una manifestación temprana de algunos casos de DMT2 (Cheung y Byth, 2003; Buchanan y Catalano, 1995). La DG afecta del 1-14% de las gestantes dependiendo de la población estudiada. Las poblaciones con una mayor prevalencia de DMT2 presentan a su vez una elevada prevalencia de DG (Rodrigues y cols., 1999). El estudio de este padecimiento es de suma importancia debido a que durante el curso de la enfermedad se pueden presentar complicaciones que afectan tanto la salud de la madre como la del feto (ADA, 2004).

Existe evidencia de que la DG tiene un componente genético (McLellan y cols., 1995). Esta observación ha incrementado el número de estudios de genética molecular relacionados con la DG, con el fin de conocer la participación de las variantes alélicas de algunos genes en la etiología de la

enfermedad. Dentro de ellos destacan estudios que han relacionado al gen de la glucocinasa (GCK) con el desarrollo de la DG (Velho y cols., 2000; Hattersley y cols., 1998; Zaidi y cols., 1997; Kousta y cols., 2001; Saker y cols., 1996; Ellard y cols., 2000).

Este gen codifica para una enzima citosólica (GCK), que tiene un papel importante en la secreción de la insulina (Matschinsky y cols., 1993). Dada la importancia de esta enzima en la homeostasis de la glucosa, además de los estudios genéticos en otras poblaciones que demuestran la participación del gen de la GCK en el desarrollo de la DG, nosotros estudiamos la posible participación de este gen en una muestra de pacientes mexicanas con este padecimiento.

DEFINICIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

El término de diabetes mellitus (DM) conjunta un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizadas por hiperglucemia (elevación de la glucosa sanguínea con valores > 110 mg/dL en ayunas), que resulta por defectos en la síntesis, secreción y/o acción de la insulina, así como alteraciones en la producción hepática de glucosa (ADA, 2004).

Como ya se había mencionado antes, La ADA clasifica a la DM en cuatro tipos (tabla 1): diabetes tipo 1 (DMT1), diabetes tipo 2 (DMT2), otros tipos específicos de diabetes y diabetes gestacional (ADA, 2004). Una proporción alta de los pacientes con DMT1 manifiestan un defecto severo en la síntesis y secreción de insulina, debido a la destrucción autoinmune de la célula β pancreática. Por su parte, los pacientes con DMT2 no demuestran autoinmunidad. En los pacientes con DMT2, la deficiente acción de la insulina en sus tejidos blanco es una de las causas de las anomalías en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas (ADA, 2004).

I) Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)

La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) se desarrolla por una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, los pacientes por lo tanto presentan insulinoopenia permanente. Los anticuerpos

descritos que median la destrucción autoinmune de las células β del páncreas son: anticuerpos contra células del islote pancreático, la hormona insulina y la enzima ácido glutámico descarboxilasa (ICAs, IAAs y GAD, por sus siglas en inglés); además de los anticuerpos contra fosfatasas de tirosina (Banerji y Lebovitz, 1989). Uno o más de estos anticuerpos están presentes en el 85-90% de los pacientes con DMT1, cuando la hiperglucemia en ayunas es detectada por primera vez. Se ha descrito un componente poligénico en el desarrollo de la DMT1. Es decir la DMT1 tiene predisposición genética múltiple, ya que varios genes interactúan entre sí para generar la enfermedad. El 50% de los casos pueden asociarse con algunos haplotipos de los genes HLA-DR/DQ (ADA, 2004).

El grado de destrucción de las células β pancreáticas es variable; presenta una evolución rápida en algunos niños pero en adultos el proceso suele ser lento (ADA, 2004). Algunos pacientes particularmente niños y adolescentes pueden presentar cetoacidosis como la primera manifestación de la enfermedad, otros en cambio presentan hiperglucemia moderada en ayunas que puede rápidamente cambiar a severa (ADA, 2004). La obesidad en estos pacientes es poco frecuente (Pocio y McDermott, 2002).

Existe también la DMT1 idiopática, su etiología es desconocida. La DMT1 idiopática es hereditaria; los pacientes presentan grados variables de deficiencia de insulina, son propensos a cetoacidosis y la mayoría son de origen africano o asiático (ADA, 2004). Sin embargo en estos pacientes no se han identificado haplotipos de riesgo para DMT1 en los genes del HLA ni los anticuerpos que se relacionan con la destrucción autoinmune del páncreas (Banerji y Lebovitz, 1989).

II) Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

La DMT2, anteriormente conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente o diabetes del adulto se caracteriza por insulinoresistencia, deterioro de la función secretora de las células β pancreáticas e incremento en la producción hepática de glucosa. Desde el inicio y frecuentemente a lo largo del desarrollo de la enfermedad los individuos no requieren insulina para el tratamiento y control de la hiperglucemia (ADA, 2004).

La DMT2 es un padecimiento complejo y multifactorial; es decir, hay probablemente muchas causas diferentes para el desarrollo de la enfermedad, pero la etiología específica no es conocida y no se asocia con la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Muchos de estos pacientes son obesos, y se conoce que la obesidad aumenta la resistencia a la acción de la insulina (Diamond, 2003).

Las concentraciones de insulina en estos pacientes pueden estar normales o elevadas. Algunos pacientes con DMT2 pueden permanecer asintomáticos por muchos años, para posteriormente desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares. Sin embargo hay algunos otros pacientes que desarrollan las complicaciones en forma más temprana (Reaveny y cols., 1976; Umpierrez y cols., 1995). Además, existen variaciones en el desarrollo de las complicaciones dependiendo de cada individuo. Lo anterior habla de la gran heterogeneidad clínica que tiene la DMT2.

La biosíntesis de la insulina en estos pacientes puede estar disminuida debido a defectos en el procesamiento de la proinsulina, que es la forma inactiva de la insulina (Bano y cols., 2001). La proinsulina es biotransformada a insulina gracias a la acción de dos endoproteasas; la PC2 y PC1 que producen 2 rupturas proteolíticas liberando el péptido C y la insulina madura. En algunos pacientes con este tipo de diabetes los niveles de proinsulina están muy elevados tanto en condiciones basales como después de la estimulación con una carga de glucosa (ADA, 2004).

III) Otros tipos específicos de diabetes

a) Diabetes tipo MODY

Este tipo de diabetes se caracteriza por presentar un patrón de herencia autosómico dominante y un inicio del padecimiento antes de los 25 años. Se le conoce como diabetes tipo MODY por sus siglas en inglés: Maturity-onset diabetes of the young. Los pacientes MODY presentan diabetes mellitus no cetónica y disminución en la secreción de la insulina. En algunos pacientes también se han identificado defectos mínimos en la acción de insulina (Fajans y cols., 2001).

Los pacientes con diabetes tipo MODY presentan un defecto primario en la función de las células β del páncreas, esto puede resultar por mutaciones en uno de al menos seis genes diferentes. Uno de ellos codifica para la enzima glucolítica glucocinasa (hexocinasa IV, MODY 2) y los otros cinco codifican para factores de transcripción: factor nuclear del hepatocito 4α o HNF4 α (MODY 1), factor nuclear del hepatocito 1α o HNF-1 α , (MODY 3), factor nuclear del hepatocito 1β o HNF 1β (MODY 5), factor promotor de insulina 1 o IPF1 (MODY4), y el factor de diferenciación neurogénica 1 o Neuro D1/BETA2 (MODY 6) [Fajans y cols., 2001; Owen y Hattersley, 2001; Gómez y Roopa, 2003].

b) Mutaciones puntuales en el DNA mitocondrial

Algunas mutaciones en el DNA mitocondrial han sido asociadas con diabetes mellitus (Gerbitz y Gempel, 1996; Ohkubo y cols., 2001). La mutación más común ocurre en la posición 3243 del gen que codifica para el RNAt de la leucina (A3243G) [Gerbitz y Gempel, 1996]. Esta mutación genera dos fenotipos distintos; el síndrome MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, y apoplejía) y el síndrome MIDD (diabetes y sordera de herencia materna). Los pacientes que desarrollan alguno de estos síndromes presentan disminución en la síntesis de proteínas que participan en la respiración mitocondrial (Gerbitz y Gempel, 1996). La mutación ha sido reportado en el 80% de los casos de MELAS y en el 1-3% de los pacientes con diabetes tipo 2 en población japonesa, que tienen historia familiar de diabetes (Choo-Kang y cols., 2002).

Otros tipos específicos de diabetes también incluyen diabetes por causas primarias como son defectos genéticos en la acción de la insulina y diabetes por causas secundarias como son las enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por medicamentos o sustancias químicas, infecciones, etcétera (tabla 1). Los casos observados de estos tipos secundarios de diabetes son raros, sin embargo hay que tomarlos en cuenta por sus repercusiones en la salud de los pacientes (ADA, 2004).

IV) Diabetes gestacional

La diabetes gestacional (DG), se caracteriza por intolerancia a la glucosa de severidad variable que se detecta por primera vez durante el embarazo, abarca incluso aquellos casos que requieren insulina para su tratamiento y los que persisten aún después del parto (ADA, 2004; Jovanovic y Pettitt, 2001). Por lo tanto existe la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa pueda anteceder al embarazo como un síntoma no detectado (ADA, 2004).

De acuerdo a lo anterior el término diabetes gestacional incorpora no solo la diabetes gestacional verdadera desarrollada en el segundo y tercer trimestre del embarazo sino también la intolerancia a la glucosa pregestacional no diagnosticada, y la diabetes tipo 1 y tipo 2 subclínica (Tamás y Kerényi, 2001). Sin embargo, el porcentaje de mujeres con diabetes gestacional debido a destrucción autoinmune de célula β suele ser muy bajo (Petersen y cols., 2004).

La DG puede remitir o continuar después del parto, dependiendo de la presencia de factores que alteran la función de la célula β , tales como obesidad y predisposición genética a la enfermedad. Existen datos publicados de que un 61% de mujeres con DG pueden desarrollar intolerancia a la glucosa o DMT2 a los 11 años después del parto (McLellan y cols., 1995). De tal manera que es importante reconocer y tratar antes del parto a estas pacientes; tanto para evitar la morbilidad fetal como para disminuir en la madre el riesgo de desarrollar DMT2 (Kjos y Buchanan, 1999).

Tabla I. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus. Diabetes Care 2004; 27 (Suppl. 1) S5-10.

<p>I. Diabetes tipo 1*</p> <p>A. Mediada Inmunológicamente</p> <p>B. Idiopática</p> <p>II. Diabetes tipo 2*</p> <p>III. Otros tipos específicos</p> <p>A. Defectos genéticos en la función de célula β</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cromosoma 12, HNF-1α (MODY3) 2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY2) 3. Cromosoma 20, HNF-4α (MODY1) 4. Cromosoma 13, IPF-1 (MODY 4) 5. Cromosoma 17, HNF-1β (MODY 5) 6. Cromosoma 2, Neuro D1 (MODY 6) 7. DNA mitocondrial 8. Otros <p>B. Defectos genéticos en la acción de la insulina</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Resistencia a la insulina tipo A 2. Leprechaunismo 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall 4. Diabetes lipotrófica 5. Otros <p>C. Enfermedades del páncreas exocrino</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pancreatitis 2. Pancreatectomía y/o traumatismo 3. Neoplasia 4. Fibrosis quística 5. Hemocromatosis 6. Pancreatopatía fibrocalculosa 7. Otros <p>D. Endocrinopatías</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Feocromocitoma 5. Hipertiroidismo 6. Somatostatina 7. Aldosteronoma 8. Otros 	<p>E. Inducida por medicamentos o sustancias químicas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Vacor 2. Pentamidina 3. Ácido nicotínico 4. Glucocorticoides 5. Hormona tiroidea 6. Diazóxido 7. Agonista β adrenérgicos 8. Tiazidas 9. Dilantín 10. Interferón α 11. Otros <p>F. Infecciones</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Rubeola congénita 2. Citomegalovirus 3. Otros <p>G. Causas poco comunes de DM mediada inmunologicamente</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de "hombre rígido" 2. Anticuerpos anti- receptor de insulina 3. Otros <p>H. Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con diabetes</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de Down 2. Síndrome de Klinefelter 3. Síndrome de Turner 4. Síndrome de Wolfram 5. Ataxia de Friedreich 6. Corea de Huntington 7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl 8. Distrofia miotónica 9. Porfiria 10. Síndrome de Prader-Willi 11. Otros <p>IV. Diabetes mellitus gestacional (DG)</p>
--	--

EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL

La prevalencia mundial de la diabetes gestacional (DG) es del 1-14% dependiendo de la población en estudio, presentándose más de 200,000 casos anualmente (ADA, 2004). En México la prevalencia en la población general se desconoce, pero en 1998, Forsbach y colaboradores reportaron una cifra del 4.3% en la ciudad de Monterrey Nuevo León en 693 embarazadas estudiadas (Forsbach y cols., 1998). En 1992 en la ciudad de México, se reportó una incidencia del 7% en el Hospital “Luis Castelazo Ayala” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) [Grupo de estudio sobre Diabetes Mellitus, 1992]. Los Ángeles California, una ciudad de los Estados Unidos con un elevado porcentaje de población latina presenta una de las prevalencias más altas de DG (12.3 %) [Mestman y cols., 1980].

FISIOLOGÍA DEL EMBARAZO

Durante el embarazo ocurren distintas adaptaciones metabólicas maternas en las diferentes etapas de la gestación. Estos cambios preparan a la madre y al feto para obtener los requerimientos nutricionales y mantener una homeostasis durante todo el desarrollo del embarazo, un proceso muy complejo.

I) Gasto energético y modificación del metabolismo de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos

El gasto energético total de la gestación se calcula en 84,300 Kcal. Una mujer normal aumenta aproximadamente 12.5 kilogramos durante un embarazo no complicado (Van Raaij, 1995; Butte y cols., 2004). De esta cifra, el crecimiento del útero y el producto contribuyen con aproximadamente 6 Kg, en tanto que el aumento de peso por líquidos corporales es de aproximadamente 3 Kg y el resto es dado por la acumulación de la grasa corporal (Butte y cols., 2004)

La etapa temprana del embarazo comprende desde el día de la concepción hasta la semana 20. En este estadio del embarazo, debido a un incremento en la ingesta de calorías se presenta también un

incremento en la secreción de insulina por la célula β pancreática (Knoop y cols., 1981; Catalano y cols., 1991), lo que resulta en un aumento en la captación de glucosa en los tejidos periféricos. En los adipocitos, la utilización preferente de la glucosa como fuente de energía puede favorecer la inhibición de la oxidación de lípidos y por lo tanto su acumulación en el citosol (Randle y cols., 1963). Existe por tanto un aumento de las reservas lipídicas que alcanzan su máximo antes de la semana 30. Estas reservas son utilizadas en la etapa tardía, cuando la tasa metabólica basal se modifica considerablemente gracias al crecimiento y desarrollo de la placenta, el útero y el feto (Catalano y cols., 1991; Van Raaij, 1995).

La sensibilidad a insulina en la etapa temprana del embarazo puede ser normal (Spellacy y cols., 1965), o estar levemente aumentada (Kalkoff y cols., 1979). Esta variación en la sensibilidad a esta hormona puede deberse a que el compartimento feto-placentario captura por lo menos la tercera parte de la glucosa total sin depender de insulina (ver transporte de glucosa a través de la placenta). Por lo tanto cuando se observa un aumento en la sensibilidad a insulina, este aumento es aparente (Spellacy y cols., 1965).

En la etapa tardía del embarazo ocurren cambios en las células β pancreáticas que contribuyen al incremento en la secreción de la insulina: 1) disminución del umbral de glucosa para estimular la secreción de insulina, 2) incremento en la proliferación de las células β pancreáticas, 3) aumento de las uniones estrechas entre las células β pancreáticas, y 4) elevación del metabolismo de glucosa y adenosil monofosfato cíclico (AMPc) [Sorenson y Brelje, 1997]. Todas las modificaciones anteriores pueden ser producidas por la acción de hormonas como la prolactina, estrógenos, y progesterona. Estas hormonas son producidas en la madre, pero durante este estadio del embarazo la fracción placentaria es la que contribuye más al aumento de los niveles en plasma materno (Brelje y cols., 1993 y 1994).

La secreción de insulina en la etapa tardía por lo tanto es mucho mayor que en la etapa temprana, sin embargo existe un incremento del 20-30% en la producción de glucosa endógena; siendo la gluconeogénesis la vía de mayor contribución (Catalano y cols., 1991; Kalhan y cols., 1997). La acción de las hormonas lipolíticas favorece el catabolismo de lípidos en la etapa tardía. Esto eleva los niveles circulantes de ácidos grasos libres; sobre todo en el ayuno, cuando las concentraciones de

hidratos de carbono se ven disminuidas. A este fenómeno se le conoce como “inanición acelerada”. La elevación en los ácidos grasos es una de las principales causas de insulinoresistencia en la etapa tardía (Buchanan, 1990; Sivan, 1998).

La exposición tanto aguda como crónica a los ácidos grasos libres provoca que estos se acumulen en el músculo. Los ácidos grasos inducen una disminución de la captación de glucosa estimulada por la insulina, debido a un decremento en la síntesis de glucógeno y una elevación de triacilgliceroles y ésteres de coenzima A de ácidos grasos de cadena larga (Kraegen y cols., 2001). El incremento en la concentración intramitocondrial de acetilCoA/ CoA y NADH/NAD⁺ y la subsecuente inactivación de la piruvato deshidrogenasa afectan la captación de glucosa (Kraegen y cols., 2001).

Además, el embarazo se caracteriza por hipoaminoacidemia y aminoaciduria (Kalhan y Devapatla, 1999). En el primer trimestre se estima que la cantidad de proteínas sintetizadas es muy similar a la que existe en condiciones no grávidas. Sin embargo, esta se incrementa un 15% y 25% en el segundo y tercer trimestre del embarazo respectivamente. Los aminoácidos no solo son utilizados para la síntesis de proteínas, también pueden oxidarse para obtener energía. Una disminución en la captación y desaminación hepática de leucina, así como disminución en la tasa de síntesis de urea se observan desde la etapa temprana de la gestación. Se especula que la disminución anaplerótica del flujo de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, como consecuencia de la insulinoresistencia fisiológica podría disminuir la transaminación de leucina durante el embarazo (Catalano y cols., 1996; Kalhan y Devapatla, 1999).

La incapacidad para utilizar la glucosa permite adaptar el metabolismo a otras fuentes de energía. En el ayuno, durante el embarazo también se puede presentar una reducción rápida y pronunciada de los aminoácidos gluconeogénicos, particularmente de la alanina. La reducción de la alanina limita la gluconeogénesis hepática, contribuyendo a la hipoglucemia en el ayuno. (Feling y cols., 1972; Cetin y cols., 2004).

II) Transporte de glucosa, aminoácidos y lípidos a través de la placenta

La glucosa es el sustrato energético principal que utiliza el feto, su transporte a través de la placenta es por difusión facilitada, a través de 2 transportadores independientes de sodio: GLUT3 y GLUT1, cuya expresión no es dependiente de la insulina. Sin embargo, la expresión de GLUT4, un transportador cuya expresión si es dependiente de la insulina, también se ha observado en las células estromales intravellosas placentarias, aunque su función en estas células aún se desconoce. Por lo tanto la cantidad de glucosa transportada hacia el feto a través de la placenta es proporcional a la concentración de glucosa en sangre materna (Xing, 1998; Gaither y cols., 1999). Parte de la glucosa que atraviesa las vellosidades de la placenta puede ser metabolizada en este compartimiento, oxidándose hasta lactato, que puede también ser utilizado por el feto (Hay, 1994).

El GLUT1 es el principal transportador transplacentario, su actividad y expresión en la membrana basal (cara fetal) aumentan hasta en un 50% en el segundo trimestre (Illsley, 2000). El GLUT3 se encuentra sólo en el endotelio vascular arterial; su papel es transportar la glucosa de la circulación arterial umbilical hacia el feto (Illsley, 2000).

La concentración de aminoácidos en la circulación fetal suele ser mucho mayor que en la sangre materna. Estos se transportan a través de 10 transportadores de aminoácidos dependientes de sodio (Regnault y cols., 2005). Muchos de los aminoácidos se pueden metabolizar en la placenta antes de pasar a circulación fetal. Un ejemplo de esto es la serina que se biotransforma a glicina (Regnault y cols., 2005).

Los lípidos son obtenidos por el feto a través de la placenta que posee receptores para las lipoproteínas que provienen de la circulación materna, de aquí pueden difundir hacia el feto por transportadores específicos o por difusión simple. Los triacilgliceroles no pueden difundir por la placenta, pero el hígado fetal puede sintetizarlos a partir de los ácidos grasos libres maternos, que si difunden. Las concentraciones de ácidos grasos y otros lípidos en plasma fetal son muy similares a las observadas en plasma materno (Hay, 1994).

LA INSULINA COMO UN FACTOR DE CRECIMIENTO

En el feto humano la insulina puede ser detectada en el páncreas el día 70 después de la concepción, y en el plasma el día 84. Los receptores de insulina están presentes en los tejidos blanco fetales a partir del día 105 (Fowden, 1989). La insulina es considerada como una hormona clave en la regulación del crecimiento fetal, sobretodo durante el primer estadio debido a sus efectos del anabolismo tisular. Estimula la síntesis proteica, la síntesis de glucógeno y regula la lipólisis (Le Roith y Zick, 2001).

El crecimiento de los tejidos fetales parece ser dependiente tanto de la secreción como de la acción de la insulina. En situaciones de hipoinsulinemia crónica se ha observado un retraso en el crecimiento; tal es el caso de la agenesia pancreática, el leprechaunismo y la diabetes neonatal transitoria. Lo contrario ocurre en las situaciones de hiperinsulinemia fetal crónica, ya que debido a la incorporación de glucosa y ácidos libres se incrementa la masa corporal y puede observarse macrosomía fetal (De Fronzo y cols., 1992). Un exceso de crecimiento relacionado fundamentalmente con incremento en el tejido adiposo se presenta en hijos de madres diabéticas mal controladas y en el síndrome de Beckwith-Wiedemann (Giudice y cols., 1996).

ASPECTOS MOLECULARES EN LA ACCIÓN DE INSULINA

La insulina es una hormona endocrina de naturaleza peptídica que es secretada por las células β del páncreas. Sus células blanco poseen el receptor para la insulina (RI), este receptor membranar tiene actividad cinasa de tirosina (Tyr). Este es una proteína transmembranar que se expresa como un tetrámero con la configuración $2\alpha 2\beta$. La unión de 1 molécula de insulina a cada una de las subunidades α provoca un cambio de conformación en el receptor que conduce a la autofosforilación de dos residuos de Tyr en la posición 1158 y 1162. Lo anterior activa la función cinasa de tirosina (TRK) del receptor. Los sustratos del RI son los IRSs (sustratos del receptor de insulina, por sus siglas en inglés), Gab-1 y Shc. Las proteínas IRS poseen un dominio PTB (phosphate-Tyr binding) que funciona como sitio de unión al motivo NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) del RI y permite las interacciones entre el IR y los IRSs.

En la región carboxilo terminal los IRSs contienen múltiples motivos con Tyr que pueden ser fosforiladas; estos dominios sirven como sitios de acoplamiento para proteínas como son: Grb2, Nck, Crk, Fyn, SHP-2 y la subunidad regulatoria p85 α de la cinasa 3 de fosfatidilinositol (PI3-K), entre otras. Estas proteínas median las funciones de la insulina regulando el metabolismo y crecimiento en las células blanco. La señalización del receptor de insulina comprende 2 grandes vías: la vía de la proteína activada por mitógenos (MAP; mitogen-activated protein) y la de PI3-K; las cuales a su vez están interconectadas.

La vía de la cinasa MAP es activada por la unión de las proteínas fosforiladas: Grb2, Shc o IRS. Grb2 previamente se une a una proteína que cataliza la fosforilación del GDP a GTP; lo anterior resulta en la activación de Ras. Ras interactúa con Raf, y desplaza a la proteína 14-3-3 que están unidas a Raf, permitiendo de esta manera que pueda ser fosforilado por cinasas de Ser/Thr, lo anterior activa la función catalítica de Raf. Raf fosforila a la cinasa MEK1 en 2 serinas (Ser) regulatorias y la activa. MEK1 a su vez activa a 2 cinasas: ERK-1 y ERK-2 (extracelular signal regulated kinase). La activación de estas ERKs median los efectos de la insulina para promover el crecimiento debido a la fosforilación de factores de transcripción como Elk-1, y permiten la expresión de algunos genes.

Por otro lado la respuesta metabólica de la insulina es mediada principalmente por la vía de PI3-K. La asociación del complejo p85/p110 de PI3-K con las moléculas IRS resulta en la activación de PI3-K y la consiguiente síntesis de fosfatidilinositol 3, 4, 5 fosfato (PIP₃). El PIP₃ se une a al dominio PH de la cinasa dependiente de PI3-K (PDK-1) y Akt. Esto provoca la activación de PKD-1 que fosforila y activa a Akt. La fosforilación de Akt, se relaciona con la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana plasmática del miocito y adipocito. Las isoformas ζ y λ de la proteína cinasa C también se han relacionado con la translocación de GLUT4, en este caso son activadas tanto por PDK-1 como por PI3-K.

La estimulación de la síntesis de glucógeno es otro de los efectos metabólicos de la insulina. La cinasa de la glucógeno sintasa 3 (GSK-3) regula en parte la síntesis de glucógeno y de proteínas ya que inactiva al factor de iniciación de la traducción eucariote 2B (eIF-2B) y a la glucógeno sintasa. La activación de Akt resulta en la fosforilación e inactivación de GSK-3; de esta manera se impide

la inhibición de la glucógeno sintasa y del factor de iniciación eIF-2B. Otra forma en que la insulina puede activar la síntesis de proteínas también a nivel de traducción es mediante la fosforilación de la cinasa p70S6 y 4E-BP1 vía la cinasa mTOR. La fosforilación de 4E-BP provoca que se disocie su unión con el factor de iniciación de la traducción eucariote eIF-2B, favoreciendo la síntesis de proteínas (Le Roith y Zick, 2001).

FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES GESTACIONAL

El catabolismo de la insulina por algunas enzimas con actividad de insulinasas como la oxitocinasa, histaminasa y fosfatasa alcalina contribuye al menos en parte con el efecto diabetogénico de la gestación (Tamás y Kerényi, 2001; Buchanan y Xian, 2005); se sabe además que varias de las hormonas que se producen solo durante el embarazo, y otras que aumentan su concentración durante este periodo son capaces de inducir resistencia periférica a la insulina. Entre ellas tenemos a los estrógenos, progesterona (Pepe y Albrecht, 1995; Ryan y Enns, 1988; Nelson y cols., 1994), cortisol (Xiao y cols., 2002; Burke y Roulet, 1970; Giorgino, 1993), lactógeno placentario humano (Ryan y Enns, 1988), prolactina (Skouby y cols., 1986) y glucagon (Unger y cols., 1970; Grigorakis y cols., 2000).

Normalmente un incremento en la secreción de la insulina en las mujeres embarazadas supera la resistencia a la insulina durante este periodo. Sin embargo, el 1-14% de las gestantes desarrollan DG durante el embarazo (Dornhorst y Rossi, 1998; ADA, 2004).

La resistencia a la insulina es un estado patológico en el cual las células blanco de la insulina no responden adecuadamente a esta hormona. Existe por tanto disminución en la captación de glucosa por el músculo, tejido adiposo e hígado, así como disminución en la supresión de la producción de glucosa hepática. Las manifestaciones de estas anomalías en el metabolismo de glucosa se evidencian clínicamente cuando la secreción de la insulina es insuficiente (Ryan y cols., 1985).

Las mujeres con DG presentan una mayor elevación de los ácidos grasos libres durante todo su embarazo. Esto a su vez, incrementa la resistencia fisiológica a la insulina que se presenta durante

este periodo (Sivan y cols., 1998). Por esta razón, las mujeres que son obesas son el grupo en mayor riesgo de desarrollar DG (Buchanan y cols., 1990).

Las alteraciones en las señales paracrinas de la insulina en sus órganos blanco puede ser dividida en 2 categorías: defectos en la sensibilidad y defectos en la respuesta. Defectos en la sensibilidad a la insulina se refiere a una disminución en la acción de la insulina a concentraciones fisiológicas, requiriéndose concentraciones elevadas para una respuesta celular adecuada. Mientras que los defectos en la respuesta, impiden una acción adecuada de la hormona aún a concentraciones elevadas (Ryan y cols., 1985).

En la DG también se pueden llegar a observar problemas de respuesta, ya que no existe una acción adecuada de esta hormona aún cuando sus concentraciones pueden estar elevadas. Sin embargo, los defectos posreceptor en la acción de insulina son más comunes (Grigorescu y cols., 1986). Ensayos in vitro con eritrocitos de mujeres embarazadas demostraron que no existe una disminución en la unión a insulina a su receptor, por lo cual se especula que los problemas de respuesta en la DG pudieran ser preferentemente a nivel posreceptor (Ryan y cols., 1985). Además, la resistencia a la insulina se ha relacionado en algunos casos con la sobre-expresión de la glucoproteína-1 de membrana celular (PC-1), la cual inhibe la actividad cinasa de tirosina del receptor de insulina al interactuar directamente con una región específica de su subunidad α (Maddux y cols., 2000), además de bloquear la cascada de señalización en un sitio posreceptor aún no identificado (Kumakura y cols., 1998).

En mujeres con DG la producción endógena de glucosa en la etapa tardía es mayor y la respuesta de primera fase de secreción de insulina es menor que en embarazadas normoglucémicas (Catalano y cols., 1993). Incluso también la respuesta de segunda fase de secreción de insulina puede estar disminuida (Buchanan y cols., 1990). De tal manera que una disminución en la respuesta compensatoria de las células β para secretar la insulina y no solo la exacerbación de la resistencia a la insulina durante el embarazo pudiera ser parte de la fisiopatología de la DG (Prentice y Goldberg, 2000; Yen y cols., 1971; Kuhl y Holst, 1976; Fisher y cols., 1980; Freinkel y Metzger, 1985; Buchanan y cols., 2001).

En tejido adiposo de mujeres obesas con DG y niveles elevados de ácidos grasos libres existe una disminución de los niveles de IRS-1 y PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) pero como un mecanismo tal vez compensatorio los niveles de la subunidad p85 α de la PI3-K están aumentados (Catalano y cols., 2002; ver aspectos moleculares en la acción de insulina).

La translocación del GLUT4 y la fosforilación del receptor de insulina en músculo esquelético y tejido adiposo también están disminuidos (Shao y cols., 2000; Friedman y cols., 1999; Tomazic y cols., 2002). De tal manera que los ácidos grasos no sólo disminuyen la utilización de glucosa en el citosol, sino que además impiden que este hidrato de carbono pueda entrar a las células blanco de la insulina.

FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE DIABETES GESTACIONAL

Existen factores que favorecen el desarrollo de DG; dentro de los más importantes están: obesidad, falta de ejercicio, edad mayor a 25 años al momento del embarazo (Jovanovic y Pettitt, 2001), estatura corta, etnicidad (pertenecer a un grupo étnico con alta prevalencia de DMT2), embarazos múltiples e historia familiar de diabetes (Rodrigues y cols., 1999). Estos factores pueden estar interactuando de forma sinérgica, aditiva o por si solos ser causa suficiente para que la DG se presente. Un gran porcentaje de mujeres con alguno de estos factores de riesgo desarrollan DG (Savona y cols., 2000).

La mayoría de mujeres con DG tienen elevados índices de masa corporal, existe una relación entre obesidad y resistencia a la insulina, pero sobre todo esta asociación es más estrecha con la obesidad central que se caracteriza por la acumulación de grasa abdominal (Carey y cols., 1996). Se ha sugerido que probablemente la grasa abdominal es más sensible a estímulos adrenérgicos que la grasa periférica y por lo tanto contribuye más al aumento de ácidos grasos en plasma (Richelsen y cols., 1991). Las mujeres con un aumento de peso gestacional mayor al recomendado, retienen una gran cantidad de grasa en el posparto, situación que favorece la remisión de la enfermedad (Butte y cols., 2004; Bleicher y cols., 1964).

Mujeres con alto consumo en grasas saturadas están más propensas a desarrollar DG o intolerancia a hidratos de carbono durante el embarazo, independientemente de la presencia de sobrepeso (Bo y cols., 2001). Sin embargo la ingesta de grasas insaturadas disminuye la incidencia de intolerancia a la glucosa durante el embarazo (Wang y cols., 2000)

Una alta prevalencia de DG ha sido reportada en mujeres de varios grupos nativos de norte América, negros, hispanos y asiáticos; aunque la posibilidad de que desarrollen la enfermedad aumenta dramáticamente cuando son obesas (Rodrigues y cols., 1999). La distribución étnica de la diabetes mellitus y otras enfermedades metabólicas complejas que afectan el equilibrio energético apoya la teoría de los genes ahorradores. Esta teoría postula que individuos que estuvieron sometidos a una baja ingesta calórica, ajustaron mediante cambios evolutivos sus sistemas metabólicos para ahorrar el máximo de energía. Si la progenie de estos individuos eleva la ingesta calórica original, pueden presentarse alteraciones metabólicas como obesidad, síndrome metabólico y DMT2 entre otros (Diamond, 2003; Marx, 2002).

Algunos síndromes relacionados con insulinoresistencia como el síndrome de ovario poliquístico (SOP) pueden ocasionar DG (Kousta y cols., 2001; Sallam y cols., 2001; Carol y Dunaif, 1999). Un buen porcentaje de mujeres con SOP padecen DG; además, después del embarazo estas pacientes presentan niveles elevados de VLDL, triacilglicérols, y colesterol; así como acumulación de grasa abdominal (Holte y cols., 1998).

Hay una correlación entre el grado de intolerancia a la glucosa y la estatura materna. Las mujeres brasileñas tienen un riesgo del 60% de padecer DG cuando tienen una estatura dentro del primer cuartil en la distribución de estaturas (valores entre -2DE y -1DE; DE = desviación estándar) [Anastasiou y cols., 1998; Branchtein y cols., 2000]. Es decir mujeres de estaturas bajas tienen un riesgo mayor de desarrollar DG.

En embarazos múltiples, los niveles incrementados de hormonas como lactógeno placentario humano, estrógenos y progesterona aumentan la frecuencia de DG, debido a sus efectos contra reguladores de estas hormonas sobre la acción de la insulina. (Schwartz y cols., 1999; Pepe y

Albrecht, 1995; Ryan y Enns, 1988; Nelson y cols., 1994; Grumbach y cols., 1973; Desoye y cols., 1987; Parsons y cols., 1992).

COMPONENTE GENÉTICO DE LA DIABETES GESTACIONAL

El 61% de un grupo de mujeres con DG desarrollaron a los 11 años intolerancia a la glucosa o DMT2. Al analizar la segregación de estas dos condiciones se vio que un buen número de ellas tenían padres que no estaban afectados por ninguna de las dos condiciones. Lo anterior sugiere que la DG tiene herencia poligénica (McLellan y cols., 1995). Es decir el fenotipo se presenta gracias a la contribución de varios genes y la participación del medio ambiente. Se sabe además que el hecho de presentar familiares con diabetes mellitus es un factor de riesgo para el desarrollo de DG (Rodrigues y cols., 1999; Savona y cols., 2000) y que el patrón de herencia de esta enfermedad no se limita a herencia poligénica, aunque este tipo de herencia es el más común en las pacientes.

A este respecto varios estudios se han realizado con el fin de conocer los genes y las variables alélicas específicas que se relacionan con el desarrollo de esta enfermedad. Algunos de los genes que se han estudiado son genes de susceptibilidad para la DMT2. Dentro de los genes que se han estudiado encontramos: el gen de la calpaina, el gen SUR1 (codifica para el receptor 1 de sulfonilurea), los genes MODY; el gen de la GCK, el gen HNF1- α , e IPF-1, también los genes mitocondriales; el gen del RNAt de la leucina y el gen de la NADH deshidrogenasa 1 (ND1).

El gen de IPF-1 codifica para un factor de transcripción; entre otras funciones tiene una importante participación en el desarrollo y metabolismo de célula β pancreática. Es un regulador transcripcional positivo del gen de la insulina, glucocinasa y GLUT2 (Petersen y cols., 1994). Mutaciones en este gen se han localizado en pacientes con DMT2 en población caucásica; dentro de estas tenemos: C18R, D76N y R197H (Macfarlane y col., 1999). Weng y colaboradores estudiaron a un grupo de 66 mujeres suecas con DG y encontraron una mutación (P239Q) en el gen de IPF-1 en una de sus pacientes. La proteína IPF-1 con esta mutación se relacionó con una reducción del 50% de la transcripción del gen de la insulina en células Nesy2 comparada con la proteína silvestre (Weng y cols., 2002).

El gen de HNF-1 α codifica para un factor de transcripción que se expresa en hígado y páncreas. Posee 4 dominios: 2 indispensables para la unión al DNA; el dominio POU A y un homeodominio, un dominio de dimerización necesario para la formación de homodímeros o heterodímeros, y el dominio de transactivación. Este factor de transcripción forma dímeros con otro factor de transcripción que es el HNF1- β (Rhee y cols., 1997).

En células β pancreáticas se ha determinado que la transcripción del gen HNF-4 α es regulada principalmente por la unión del factor HNF-1 α a su promotor alternativo P2. (Thomas y cols., 2001). La inactivación del gen de HNF-1 α en líneas celulares de insulinoma (INS-1), demuestra que el factor HNF-1 α es un regulador positivo de los genes que codifican para la insulina y el transportador 2 de glucosa (GLUT-2), además de los que codifican para las enzimas: L-piruvato cinasa, la 3-hidroxi-3-metilglutaril Co A reductasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa mitocondrial (Shih y cols., 2001). Otros de los genes cuya transcripción depende de este factor es el gen que codifica para el transportador de glucosa 6 fosfato y el gen del cotransportador de glucosa/sodio de alta capacidad y alta afinidad (SGLT2) que se expresa en el riñón [Pontoglio y cols., 2001].

Mutaciones en este gen son causa de diabetes tipo MODY. Schwarz y colaboradores, en 58 mujeres alemanas con DG identificaron mutaciones puntuales heterocigotas en la región codificante del gen HNF-1 α . Siete de estas mujeres portaban la mutación Ala98Val y tenían una historia materna de DG, otra de ellas resultó portadora de la mutación Pro1447Leu y tenía historia familiar de diabetes, también se observó la mutación Glu48Lys en una paciente con títulos bajos de anticuerpos anti-GAD y anti-insulina en suero, por lo que fue clasificada como paciente con DM1. Asimismo, encontraron una inserción TGGGGGT en la región UTR 5' (untranslation region). Por lo tanto aproximadamente el 17% de estas pacientes fueron portadoras de mutaciones en este gen (Schwarz y cols., 2001).

En las 66 mujeres suecas con DG estudiadas por Weng y colaboradores se identificó en una mujer la mutación A203H en HNF-1 α , la paciente desarrolló DM2 un año después del parto (Weng y cols., 2002). Se sabe que portadores de mutaciones en este gen tiene una edad de aparición más temprana de la diabetes cuando sus madres presentan hiperglucemia durante el embarazo (Stride y cols., 2002).

El gen de la calpaina codifica para una proteasa de cisteína no lisosomal estimulada por calcio. Es de expresión ubicua y se han localizado 8 isoformas de expresión tejido específica. Participa en la diferenciación de adipocitos, la regulación de IRS-1 y en el mecanismo de apoptosis mediado por el receptor de rianodina en la célula β pancreática. Inhibidores de esta proteasa afectan la secreción y sensibilidad a la insulina así como síntesis de glucógeno, aunque los mecanismos mediante los cuales la calpaina regula estas funciones no son conocidos (Haddad y cols., 2002).

El haplotipo 112/121 (1 designa al alelo común y 2 es el alelo menos frecuente) generado a partir de las combinaciones específicas de los polimorfismos 43, 19 y 63 del gen de calpaina han sido relacionadas con el desarrollo de DMT2 en varias poblaciones; incluidos mexicanos, mexicano-americanos, británicos y polacos (del Bosque y cols., 2004). La combinación 1112/1121 que incluye el haplotipo anterior más el polimorfismo 44 del gen de la calpaina confiere riesgo de desarrollar intolerancia a la glucosa y DMT2 en individuos del sur de la India (Cassell y cols., 2002). En descendientes de europeos del Norte el polimorfismo 19 y 63 se ha relacionado con resistencia a la insulina (Elbein y cols., 2002).

Las pacientes con síndrome de ovario poliquístico tiene un riesgo del 84% de desarrollar diabetes cuando presentan el haplotipo 112/121 del gen de la calpaina (Haddad y cols., 2002). En 40 pacientes con DG de la ciudad de Viena el 20% de ellas presentaban el haplotipo 112/121, mientras que en los controles este haplotipo no fue hallado (Leipold y cols., 2004). Sin embargo tanto en finlandeses, japoneses y chinos no se ha visto asociación de este gen con el desarrollo de DMT2, sin embargo en el caso de los chinos el polimorfismo 112/121 se ha relacionado con niveles elevados de colesterol (Fingerlin y cols., 2002; Horikawa y cols., 2003; Wu y cols., 2005).

El gen SUR1 (receptor 1 de sulfonilurea) codifica para una proteína muy importante en la regulación de la secreción de insulina, ya que forma parte de un canal de potasio que se expresa en célula β pancreática. En población finlandesa se observó que el polimorfismo R1273R (AGA/AGG) en la región codificante, así como el polimorfismo intrónico cagGCC/tagGCC en el intrón 15 estaban relacionados con el desarrollo de DG y DMT2. Estos autores proponen que este resultado apoya la idea de que tanto la DG como la DMT2 presentan predisposición genética similar (Rissanen y cols., 2000).

Mutaciones en el genoma mitocondrial ocasionan DMT2. La mutación puntual en el nucleótido A3243G del DNA mitocondrial RNAt de la leucina esta relacionada con inhibición progresiva de la fosforilación oxidativa y disminución en la secreción de insulina (Gerbitz y Gempel, 1996). La heteroplasmia de esta mutación (porcentaje de copias de DNA mitocondrial que presentan la mutación) y la edad de inicio de diabetes presentan una relación inversa. En pacientes con DMT2 también se han observado las mutaciones A3156G (localizada cerca de la región 3' del RNAr 16S), G3357A, C3375A y T3394C (esta última en la región codificante de la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa) [Ohkubo y cols., 2001].

De 137 pacientes con DG de Singapur, 15 (10.9%) tenían mutaciones en el genoma mitocondrial. La mutación heteroplásmica T3398C, en la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa, fue identificada en 2.9% de las pacientes con DG pero no en controles; esta mutación ha sido reportada en diabetes familiar. En este mismo codón, una paciente presentaba la mutación en forma homoplásmica A3399T; esta mutación no había sido reportada hasta este estudio. Otra nueva mutación fue C3254A; localizada en el brazo de dihidrouridina del RNAt de la leucina, afectando de esta manera su estructura secundaria; esta se encontró de forma heteroplásmica y solo en una paciente. También se observaron con mayor frecuencia que en controles los polimorfismos G3316A y T3394 (en el gen ND1), asociados también a DMT2. (Chen y cols., 2000). La mutación A3243G se asoció con abortos espontáneos en mujeres japonesas con DG o diabetes mellitus no insulino dependiente (Yanagisawa y cols., 1995).

Mutaciones en el gen de la GCK han sido relacionadas con el desarrollo de DG. Las mutaciones en la región codificante de glucocinasa con ganancia de función causan hipoglucemia hiperinsulinémica de la infancia (PHHI), debido a una hipersecreción de insulina por parte de las células β pancreáticas (Glaser y cols., 1998; Cuesta y cols., 2004). Por otro lado mutaciones con pérdida de función causan síndromes relacionados con hiperglucemia (Gloyn y cols., 2003).

Mutaciones homocigotas en el gen de GCK con pérdida de función (hasta hoy solo se han reportado 2: M210K y T228M) están asociadas con un fenotipo severo que se presenta desde el nacimiento y se relaciona con ausencia de insulina basal; esta condición es conocida como diabetes neonatal permanente (PNDM) [Njolstad y cols., 2001].

Un gran porcentaje (más del 90%) de las mutaciones en el gen de la GCK confieren pérdida de función y causan el fenotipo MODY2, este síndrome se caracteriza por presentar hiperglucemia moderada. Mutaciones que son causa del fenotipo MODY o DMT2 se han encontrado en varias poblaciones: franceses, británicos, suizos, italianos, japoneses, africo-americanos y puertorriqueños (Stoffel y cols., 1993; Velho y cols., 1997; Gloyn y cols., 2005).

Mujeres inglesas con diabetes gestacional recurrente, hiperglucemia en el ayuno posparto e historia familiar de diabetes tipo 2, presentaron una prevalencia alta de mutaciones en GCK. Dentro de los cambios de secuencia que se observaron estaban las mutaciones ya reportadas para pacientes MODY y/o DMT2: K161 + 2del15, F150S, A259T, A384T, R403fsdelC, E40ins21 o las mutaciones no reportadas hasta entonces N180K, R191W, Y215X y L288-1G →A. La mutación L288-1G →A altera el sitio aceptor de splicing del intrón 7. Las mutaciones que dieron cambio de aminoácido cosegregaban con niveles elevados de glucosa en ayuno y se encontraban en regiones muy conservadas de la proteína en otras especies (Ellard y cols., 2000).

En la ciudad de Oxford otro grupo identificó la mutación G299R en tres pacientes (n= 50) con DG, localizada en exón 8. Se considera que posiblemente esta mutación tiene efecto fundador, las pacientes con esta mutación presentan hiperglucemia en el ayuno. (Saker y cols., 1996). Esta mutación al igual que la mutación S131P se ha relacionan con una disminución en la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima y un aumento en la K_M para la glucosa (Stoffel y cols., 1993). La variante de secuencia T228M que cosegrega con DMT2 también se reporto en una paciente con DG de origen europeo (Kousta y cols., 2001). En ingleses la causa más común de DMT2 y diabetes tipo MODY es debido a mutaciones en el gen de la GCK.

El polimorfismo (-30) G>A, en el promotor de célula β pancreática se ha relacionado en algunas poblaciones con disminución en la secreción de insulina en respuesta a una carga de glucosa oral. En pacientes embarazadas que presentaban la variante A en forma homocigota, la respuesta de primera fase de secreción de insulina esta disminuida (Zaidi y cols., 1997).

Durante el embarazo existe una alteración en la secreción de la insulina fetal debido a mutaciones en el gen de glucocinasa en la madre o en el feto. El peso al nacimiento esta disminuido cuando el

feto presenta alguna mutación en el gen de la GCK y la madre no porta la mutación, cuando la madre presenta la mutación en este gen y el hijo es normal; el resultado es que el hijo nace macrosómico. Los efectos son además aditivos y por lo tanto se observan pesos similares cuando ambos son normales o ambos presentan la mutación (Velho y cols., 2000). Los hijos con mutaciones en el gen de la GCK presentan una disminución de peso de hasta 500g cuando las madres son normales. Por lo tanto las mutaciones fetales en GCK y el ambiente intrauterino, pueden alterar el peso al nacimiento (Hattersley y cols., 1998; ver la insulina como un factor de crecimiento).

En los pacientes con diabetes tipo MODY2 la hiperglucemia puede presentarse desde etapas tempranas, es no progresiva y puede ser tratada solo con dieta (Froguel y cols., 1993). Solo un pequeño porcentaje (2%) requiere insulina para abatir la hiperglucemia (Velho y cols., 1996), y la presencia de complicaciones asociadas con este tipo de diabetes son poco frecuentes (Velho y cols., 1997). Se considera que menos del 50% de los portadores de mutaciones en el gen de la GCK desarrollan diabetes franca (Velho y cols., 1997).

La función de célula β pancreática y la producción neta de glucógeno están disminuidas, pero la gluconeogénesis hepática esta aumentada en pacientes con diabetes tipo MODY2 (Byrne y cols., 1994; Heimberg y cols., 1996; Velho y cols., 1996). La curva dosis-respuesta que relaciona la cantidad de glucosa administrada vía intravenosa y la secreción de insulina en estos pacientes esta desplazada hacia la derecha, lo cual revela que el umbral para la estimulación de secreción de insulina esta aumentado (Bell y cols., 1996).

LA ENZIMA GLUCOCINASA

La enzima glucolítica glucocinasa (ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1.) cataliza la reacción de fosforilación en el carbono seis de la glucosa; reacción que es el primer paso de la glucólisis. La hexocinasa IV o glucocinasa (GCK) se expresa en el hígado, y algunas células neuroendocrinas del cerebro, intestino y páncreas de los mamíferos (Jetton, 1994). La GCK muestra una cinética sigmoidal (es una enzima alostérica), y su actividad no se afecta por las

concentraciones fisiológicas de la glucosa-6-fosfato (G6P) [Nishi y cols., 1988]. A diferencia de esta, las hexocinasas I y III tienen afinidades relativamente altas para diferentes hexosas pero son inhibidas por concentraciones fisiológicas de la G6P.

La GCK presenta una elevada constante de Michaelis-Menten aparente (5.3-7.7 mM), por lo tanto la tasa metabólica de glucosa en el hígado y en el páncreas está en función de la actividad de esta enzima. En el hígado la GCK ejerce una fuerte influencia sobre la utilización de la glucosa y la síntesis de glucógeno (Middleton, 1990; Matschinsky, 1990). Como se puede apreciar en la tabla 2, otras hexosas también pueden ser los aceptores del grupo fosfato y el donador de este grupo pueden ser el ITP y el ATP.

2.7.1.1	
Nombre	Hexocinasa IV.
Nombres Alternativos	Glucocinasa. Hexocinasa tipo IV.
Reacción	ATP + D-hexosa = ADP + D-hexosa 6-fosfato.
	* D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, sorbitol y D-glucosamina pueden ser receptores * ITP y dATP son los donadores.

Tabla 2. Características de la glucocinasa <http://www.expasy.org/cgi-bin/nicczyme.pl?2.7.1.1>

I) Estructura del gen de la Glucocinasa

El gen se localiza en el cromosoma 7, brazo p, entre las bandas 15 y 14 (7p15-p14) (Mishra, 1992). Existe una copia única del gen; 2 promotores tejido específico y el splicing alternativo dan como resultado 3 isoformas. El gen consta de 12 exones. El primer exón de cada una de las isoformas codifica para el codón de inicio de la traducción y 14 aminoácidos (aa) adicionales que se unen por splicing alternativo a 9 exones comunes (Stoffel y cols., 1992). Los exones 1a y 2-10 codifican el RNAm de la isoforma pancreática; mientras que en hígado se han identificado dos transcritos; el primero y más abundante codificado por los exones 1b y 2-10, el segundo por los exones 1b, 1c, 2-10 (fig. 1) (Magnuson, 1990).

Los transcritos de la isoforma pancreática y las isoformas hepáticas 1b y 1c se traducen en proteínas de 465, 466 y 464 aa respectivamente, las cuales difieren en los 15 aa ubicados en el extremo amino terminal. El promotor río arriba es activo en la célula β pancreática, mientras que el promotor río abajo es activo en los hepatocitos. Los dos promotores están separados por al menos 26 kb. El primer exón de la isoforma pancreática antecede al promotor activo en el hepatocito (Stoffel y cols., 1992).

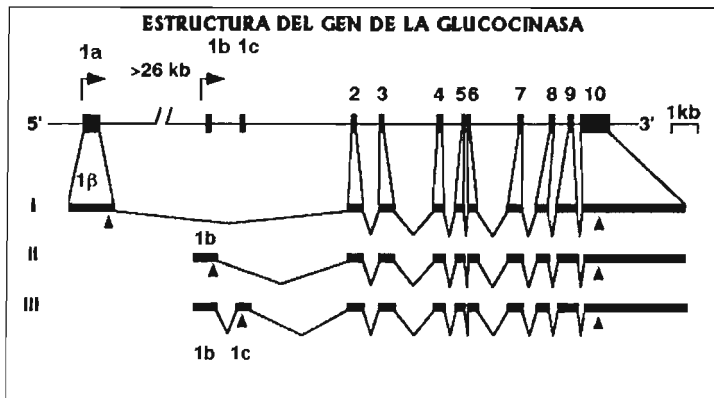


Figura 1. Estructura del gen de la Glucocinasa. Modificada de Diabetes 1996; 45 (2): 223-241

II) Regulación de la expresión del gen de Glucocinasa

La regulación de la transcripción del gen de la GCK ocurre a diferentes niveles y es tejido específico. En el hepatocito la expresión del gen es afectada por varias hormonas que son a su vez reguladas por los niveles de glucosa y otros nutrientes (Iynedjian y cols., 1988; Magnuson y cols., 1989). En contraste, la expresión del gen en la célula β pancreática no se afecta significativamente por cambios agudos en el estado nutricional (Magnuson y cols., 1989).

En el hígado la biotina, la triyodotironina y la insulina estimulan la expresión de GCK, mientras que el glucagón vía la activación del AMPc inhibe la transcripción del gen, además de que disminuye la vida media de su RNAm (Iynedjian y cols., 1989). La insulina induce los factores transcripción Stat 5b y ADD1/SREBP-1c; Stat5b se une a su elemento de respuesta en el sitio -1368/-1360 del

promotor de la isoforma hepática. Existe un posible elemento de respuesta para SREBP en el promotor de la isoforma hepática que se encontraría en -91/-81 y en 2 motivos caja E (E box motifs) en -810/-800 y -597/-587 (Sawka y cols., 2000).

Las células neuroendocrinas que expresan la GCK utilizan el promotor río arriba, pero los factores de transcripción que participan en la expresión del gen son diferentes a los de la célula β pancreática (Moates y cols., 1996). El análisis minucioso de la fusión al gen de los elementos responsables de la transcripción en células de insulinoma demuestra que múltiples porciones en la región proximal de -280 a +14 del promotor de la célula β pancreática son necesarias. Dentro de este fragmento existen tres copias de un elemento de respuesta con la secuencia (CAT(T/C)nA(C/G)n) [Shelton y cols., 1992]. En esta región se observa la secuencia UPE-3 que es una secuencia rica en AT y a la cual se une el factor de transcripción IPF-1 (MODY4). La expresión de este factor de transcripción es a su vez regulada por otros tres factores de transcripción HNF1 α , Beta2/NeuroD1 y HNF-3 β (fig.2). Esta red de factores de transcripción regulan positivamente la expresión de otros genes que participan en la homeostasis de la glucosa: el gen de la insulina y el gen del GLUT-2 (fig.2) [Hui y Perfetti, 2002].

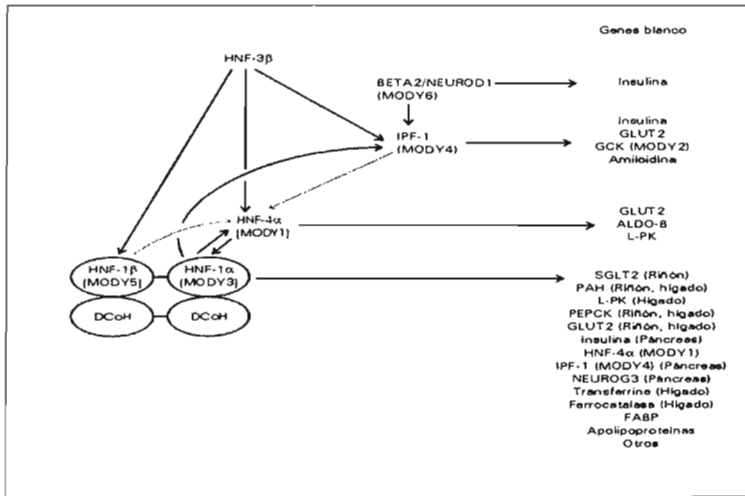


Figura 2. Factores de transcripción asociados con el fenotipo MODY y sus genes blanco.

La prolactina favorece la translocación de Stat5b para que se una al elemento de respuesta GAS cuya secuencia es TTCNNGAA. Esta secuencia se observa en el promotor de la GCK y en el

promotor de la insulina (Weinhaus, 2001). También se ha localizado en la célula β la secuencia palindrómica hPal-1 en la posición -181/-176. A estas secuencias se unen factores de transcripción de la superfamilia de los receptores nucleares. Un factor de transcripción candidato para este elemento es el IPF-1 (Moates, 1996). La presencia de los mismos elementos tanto en los promotores de insulina y GCK, que se unen a factores nucleares específicos de célula β sugieren que por lo menos en ciertos aspectos la expresión de genes en la célula β pancreática esta regulada coordinadamente (Liang y cols., 1992; Iynedjian y cols., 1989; Shelton y cols., 1992).

La transcripción de la isoforma hepática en la rata es activada por el heterodímero PPAR γ / RXR α (receptor α del retinoide X), que posee un elemento de respuesta en la posición -116/-104 de su promotor (Kim y cols., 2004). El ácido retinoico es el ligando para el RXR α ; este derivado de la vitamina A incrementa la expresión del gen de la GCK en las células β pancreáticas de rata adulta y fetal (Cabrera, 1999). También en la rata el promotor de la isoforma pancreática posee un elemento de respuesta para este factor de transcripción en la posición +47/+80. En el humano una secuencia homóloga en la posición +80/+101 podría ser el elemento de respuesta para este factor (Kim y cols., 2002).

En la rata se ha observado que la transcripción del gen de la insulina así como el de la GCK son activadas en presencia de glucosa a través de la cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina (CaMKIV) [Yoshitaka., 2002]. En estos mismos animales se ha observado que a diferencia de la isoforma hepática el AMPc eleva los niveles del RNAm de la isoforma pancreática aunque los mecanismos a través de los cuales ejerce su acción aún no son conocidos (Fernández y cols., 2001).

III) La enzima Glucocinasa como un sensor de los niveles de glucosa en célula β pancreática y su participación en la secreción de la insulina

El rango estrecho de concentraciones de glucosa en el plasma (4-8 mM) es regulado principalmente por la capacidad secretoria de las células β y α del páncreas (Matschinsky y Bedoya, 1989). La GCK actúa como un sensor de glucosa en las células β pancreáticas. Tanto en la célula β como en

hepatocito, la tasa metabólica de glucosa esta determinada por la cantidad de glucosa que es fosforilada en el citoplasma por la GCK (Matschinsky y cols., 1993).

Las células β pancreáticas contienen el transportador GLUT2, una proteína de membrana celular que transporta hexosas, posee una elevada K_M (15-20 mM) y una gran capacidad para transportar glucosa al interior de la célula. Su expresión en la membrana no depende de insulina, por lo tanto es una proteína constitutiva (Johnson y cols., 1990). Estas características en el transporte de glucosa favorecen que rápidamente se logre el equilibrio entre la glucosa intracelular en la célula β y su concentración extracelular. Por lo tanto podemos decir que la concentración extracelular de glucosa es monitoreada por la GCK pancreática (Matschinsky y cols., 1993).

La señalización para la secreción de insulina en las células β pancreáticas incluye la degradación de glucosa en el citosol, mejor conocida como glucólisis. En las células que no expresan la enzima glucocinasa, el paso limitante de la glucólisis es la reacción catalizada por la fosfofructocinasa-1; pero en las células β pancreáticas así como en otras células que expresan la GCK el paso limitante es catalizado por esta hexocinasa. El piruvato producto de esta vía va a pasar a la mitocondria para generar intermediarios reducidos. El papel metabólico de la mitocondria en este proceso incluye el ciclo del ácido cítrico, cadena de electrones y la fosforilación oxidativa (Matschinsky y cols., 1998).

El ATP generado en la mitocondria gracias a la F_0F_1 ATP sintasa se transporta al citosol de la célula β . El ATP es un regulador alostérico negativo de la subunidad Kir6.2 de un canal de potasio que se expresa solo en algunas células neuroendocrinas (canal de potasio sensible a ATP). La unión del ATP a esta subunidad provoca que el canal de potasio se cierre; la disminución del flujo pasivo de estos iones hacia el exterior provoca la despolarización de la membrana plasmática; lo que conduce a un cambio en el potencial de acción en las células β pancreáticas y la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Nichols y cols., 1996; Ashcroft y cols., 1994). Las sulfonilureas (hipoglucemiantes orales utilizados para el tratamiento de la diabetes) provocan el mismo efecto que el ATP en este canal de potasio, solo que estas se unen a la subunidad SUR1.

El Ca^{2+} citosólico es el segundo mensajero que inicia las señales para la secreción de la insulina; esta hormona se encuentra en vesículas secretorias listas para ser excitadas (fig. 3) [Ashcroft y

cols., 1994]. La ausencia o niveles bajos de la expresión de otras hexocinasas en la célula β pancreática permite que a concentraciones menores a 2.5 mM los niveles de ATP/ADP sean bajos y por lo tanto se mantenga una secreción de insulina basal baja (Schuit y cols., 1997; Detimary y cols., 1988). El diseño bioquímico de estas células sugiere que los genes que participan en esta vía son genes candidato para la búsqueda de variantes alélicas y mutaciones relacionadas con el desarrollo de la DMT2 y DG.

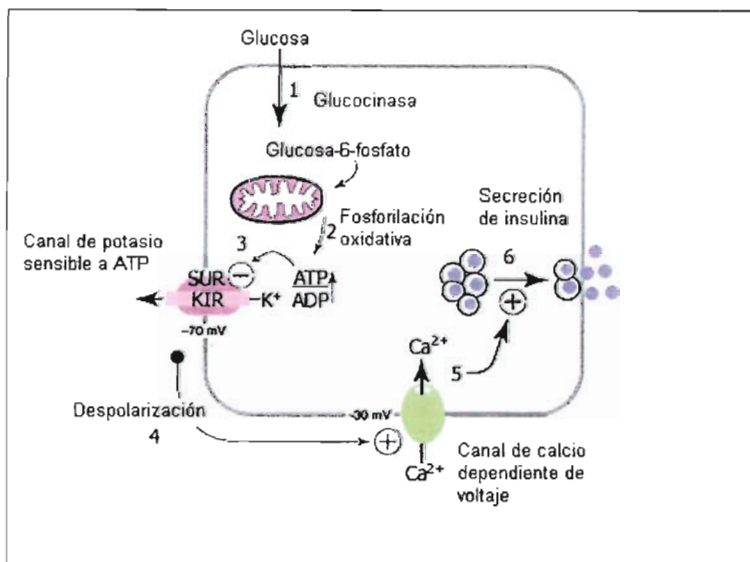


Figura 3. Papel de glucocinasa en la secreción de insulina. Modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=diabetes.section.621>

IV) Aspectos moleculares y la regulación de la actividad de Glucocinasa

La estructura de la hexocinasa B de la levadura revela que existen aminoácidos que son cruciales para su función, pues algunos de ellos interactúan con los hidroxilos de la glucosa: Asn204 (OH 3 y 4), Asp205 (OH 4), Gly229 (OH 6), Glu290 (OH 1), Glu256 (OH2 y 3), y Asn231 (OH4). Estos seis aminoácidos son también el sitio de unión de la glucosa en la enzima humana (Pilkisy col., 1994). El Sitio de unión al ATP de la GCK humana lo conforman los residuos Asp78, Thr82, Gly227, Thr228, y Ser336 (Marotta y cols., 2005).

La enzima glucocinasa utiliza Mg^{2+} como cofactor por lo cual muchos autores consideran que los 2 sustratos de la GCK son glucosa y el Mg^{2+}/ATP (fig. 4). Se sabe que los acil-coA de cadena larga se unen a un sitio alostérico, el cual parece ser que también es sitio de unión para la proteína reguladora dependiente de fructosa-6-fosfato. Ambos incrementan la K_M de la GCK para la glucosa en presencia de fructosa-6-fosfato con un pequeño cambio en la V_{submax} . Mientras que la fructosa-1-fosfato inhibe su acción regulatoria (Warner y cols., 1995). El efecto de la proteína reguladora y palmitil-CoA son competitivos, ambos impiden que la GCK sufra el cambio conformacional necesario para que lleve a cabo su actividad catalítica (Van Schaftingen, 1993).

Recientemente se ha reportado que una pequeña molécula orgánica sintética se une en un sitio alostérico de la GCK y es capaz de activarla, el efecto se ha observado en la isoforma pancreática como hepática. Esta molécula exógena es capaz de estimular la secreción de insulina y el metabolismo hepático de glucosa (Leighton y cols., 2005).

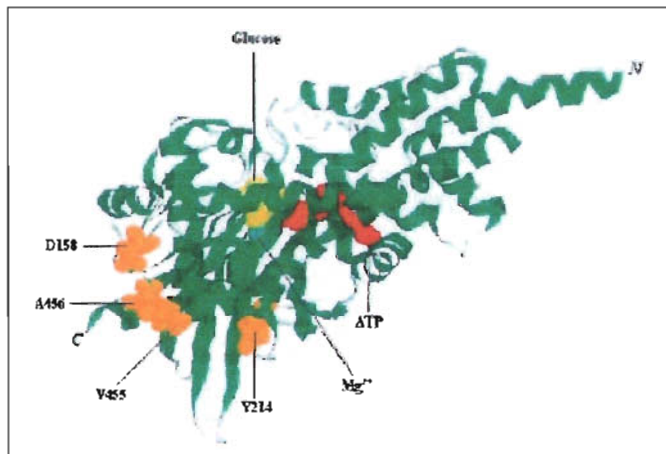


Figura 4. Modelo de la estructura tridimensional de Glucocinasa Diabetes 2002: 51:1240–1246.

COMPLICACIONES MATERNAS Y EN EL PRODUCTO DE LA GESTACIÓN ASOCIADAS CON LA DIABETES GESTACIONAL

Las mujeres con DG tienen riesgo de padecer preclamsia, sobre todo aquellas que presentan una mayor resistencia a la insulina (Paradisi y cols., 2002; Caruso y cols., 1999). La preclamsia se define como la elevación de la presión arterial durante el embarazo y suele acompañarse de albuminuria y edema de manos, pies y cara. Los casos no tratados pueden progresar a eclampsia. La preclamsia es una complicación que incrementa la frecuencia de admisión de neonatos a la unidad de cuidados intensivos y la frecuencia de complicaciones maternas y fetales (Sibai y cols., 2000).

La disfunción endotelial vascular ocasionada por los elevados niveles de glucosa y triacilgliceroles en la madre tienen un papel importante en la patogénesis de la preclamsia (Paradisi y cols., 2002). El endotelio vascular de estas pacientes se dilata menos ocasionando elevación en la presión arterial; las alteraciones endoteliales se pueden observar incluso a nivel microvascular (Hannemann y cols., 2002). El aumento en los niveles plasmáticos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL; transportan una gran cantidad de triacilgliceroles) afecta también la función endotelial. La disminución de las LDL en las pacientes que han padecido DG mejora considerablemente la función del endotelio vascular (Bergholm y cols., 2003).

La disfunción endotelial provoca una baja en el flujo sanguíneo uteroplacentario y la tensión de oxígeno en circulación fetal (hipoxia fetal), esto causa un incremento en la producción de eritropoyetina y un aumento del hematocrito por arriba del 65% en el feto (policitemia fetal). La policitemia se observa en el 5 % de los hijos de madres con DG. La hiperviscosidad sanguínea provocada por la policitemia, favorece la formación de microtrombos en múltiples órganos: pulmones, riñones y glándulas adrenales. Por otro lado, la hiperbilirrubinemia es una consecuencia del elevado metabolismo de la hemoglobina en estos productos, pero también puede estar relacionada con la formación de hematomas y la destrucción de glóbulos rojos por trauma secundario en productos macrosómicos (Jones., 2001).

La hipocalcemia y la hipomagnesemia son alteraciones transitorias poco frecuentes en los neonatos de un embarazo complicado por DG. Estas alteraciones están relacionadas con un deterioro en la función renal fetal causado por la glucosuria (Jones., 2001).

La hiperglucemia materna es un estímulo constante que provoca que los islotes fetales sufran hipertrofia e hiperplasia (Holemans y cols., 2003). La hiperinsulinemia fetal producto de estas alteraciones en el páncreas y el estímulo constante de la hiperglucemia ocasionan un crecimiento exagerado del producto. Cuando el peso del recién nacido esta por arriba de la percentila 90 (peso mayor a 4000 g) se dice que existe macrosomia (Holemans y cols., 2003). La macrosomia de estos recién nacidos es asimétrica, pues la circunferencia torácica y abdominal están aumentadas con respecto a la circunferencia de la cabeza (Van Assche y cols., 2001).

En estos recién nacidos, el hígado y el tejido adiposo que son órganos blanco de la insulina aumentan su masa preferentemente durante el desarrollo fetal. En la vida adulta el aumento en la producción de glucosa hepática, y la concentración plasmática elevada de los ácidos grasos serán un estímulo persistente para que las células β fetales aumenten la secreción de insulina. Posteriormente estas células β fetales presentan una reducción en la secreción de esta hormona, debido a un deterioro en su función fisiológica (Hales y Barrer, 1992; Tamemoto y cols., 1994; Robinson y cols., 1992).

La expresión incrementada del transportador de glucosa GLUT1 en la membrana basal de la placenta, observada en algunas madres con DG, puede contribuir a la hiperglucemia fetal (Xing, 1998; Gaither y cols., 1999; Illsley, 2000). El crecimiento fetal acelerado, y por lo tanto un aumento del líquido amniótico (polihidramnios) pueden ocasionar problemas en el trabajo de parto, un incremento en la frecuencia de la operación cesárea y complicaciones severas asociadas con partos prematuros (Nobile de Santis y cols., 2004).

Por el contrario la disminución en el flujo sanguíneo uteroplacentario se asocia con un flujo menor de nutrientes, retraso en el desarrollo de las células β fetales y una secreción baja de insulina fetal, que en conjunto ocasionan un crecimiento intrauterino retardado y un bajo peso al nacimiento (peso menor a 2500g) [Vicens y cols., 2002]. Estas alteraciones son comunes sobre todo en hijos de

mujeres con vasculopatía y nefropatía. El deficiente número de las células β favorece que en la vida adulta se presenten alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Hernández y Zárate, 2001). Los productos con retraso en el crecimiento intrauterino han sido señalados como una población en riesgo de desarrollar síndrome metabólico en la edad adulta (Vicens y cols., 2002).

En ratas se ha visto que el retraso en el crecimiento intrauterino ocasiona intolerancia a la glucosa y se relaciona con una disminución del 50% de las células β pancreáticas (Simmons y cols., 2001). Cuando el producto de la rata es macrosómico puede desarrollar diabetes a la semana 26, debido a defectos en la secreción de insulina. (Boloker y cols., 2002; Gauguier y cols., 1990). En humanos la prevalencia de diabetes tipo 2 en los productos que presentan bajo peso al nacimiento es del 13-25% y cuando son macrosómicos es del 8-18%. En la vida adulta estos productos pueden presentar también alteraciones como hipertensión arterial y obesidad (Silverman y cols., 1995).

Es posible que las alteraciones metabólicas anteriormente mencionadas induzcan cambios permanentes en la homeostasis de la glucosa después del nacimiento, caracterizados por alteraciones permanentes en la función endocrina del páncreas, que se hacen presentes en la vida adulta; favoreciendo el desarrollo de Diabetes tipo 2 (Pettitt y cols., 1988).

La hipoglucemia fetal se puede presentar debido a los efectos del tratamiento hipoglucemiante de la madre en la última mitad del embarazo. La hipoglucemia neonatal transitoria es producto del bajo umbral de estímulo para la secreción de insulina por la célula β fetal y la hipertrofia pancreática.

Las concentraciones maternas anormales de glucosa, lípidos y aminoácidos perjudican el desarrollo del feto; esto es debido a que estas moléculas o sus productos metabólicos son tóxicos, y pueden afectar la expresión génica de algunas células pluripotenciales e incrementar la presencia de teratogénesis (Kuhl y cols., 1982; Farrel y cols., 2002). Sólo los fetos de mujeres con DG e hiperglucemia en el ayuno o hiperglucemia severa tienen riesgo de desarrollar malformaciones congénitas, alteraciones en sistema nervioso central y en el desarrollo psicomotor (Sheffield y cols., 2002; Schaefer y cols., 1997; Kowalczyk y cols., 2002).

En México la prevalencia de malformaciones por DG es del 9.8% (n= 112). Dentro de las malformaciones más frecuentes se encuentran: hidrocefalia, cardiopatía, dismorfias faciales, hipoplasia pectoral unilateral, pezón supernumerario entre otras (Lazalde y cols., 2001).

Mujeres que han padecido DG desarrollan DMT2 (Buchanan y cols., 1999), el factor principal para el desarrollo de DMT2 es la falla compensatoria de la célula β para secretar la insulina durante la insulinoresistencia; por lo tanto la DMT2 y la DG son ambas manifestaciones del mismo proceso fisiopatológico (Buchanan y Catalano, 1995). Los mismos factores (ver factores de riesgo para el desarrollo de DG) que predicen el desarrollo de DG se relacionan con el desarrollo de DMT2 (Pendegross y cols., 1995; Benjamin y cols., 1993).

La prevalencia de DMT2 en distintas poblaciones es proporcional a la prevalencia de DG (MacNeill y cols., 2001). El 31% de las mujeres con DG pueden desarrollar alteraciones en el metabolismo de la glucosa después de un año; favoreciendo la recurrencia del padecimiento (Åberg y cols., 2002). Después de 3-11 años el 5-30% de mujeres que han padecido DG desarrollan DMT2; este porcentaje además del tiempo de seguimiento depende mucho del grupo étnico, la presencia de obesidad en las pacientes y la severidad de la hiperglucemia (Cheung y Byth, 2003; Paradisi y cols., 2002; Dalfrà y cols., 2001). El estudio con un mayor seguimiento (22-28 años) es el O'Sullivan, la prevalencia DMT2 es del 36.4% en las mujeres con DG de su cohorte original (O'Sullivan, 1991).

DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES GESTACIONAL

El diagnóstico de DG se basa en los resultados de una curva de tolerancia oral a la glucosa. En 1964, O'Sullivan y Mahan propusieron los valores límite en embarazadas para la concentración de glucosa en sangre después de la administración oral de 100 g de este hidrato de carbono. Basándose en un estudio en 752 mujeres gestantes en el segundo o tercer trimestre del embarazo, estimaron los valores de glucosa en plasma para cuatro tiempos: en ayuno, a la hora, a las dos horas, y a las tres horas (O'Sullivan y Mahan, 1964).

Algunos valores límite coincidían con el valor a las dos desviaciones estándar arriba de la media de este grupo, pero en otros casos el límite establecido excedía dicho valor. Estos valores habían sido ajustados de acuerdo a la presencia de morbilidad perinatal o presencia de DMT2 en 1013 mujeres que se habían evaluado 5 a 10 años antes. Si uno o más valores igualaban o excedían los valores límite se confirmaba el diagnóstico de DG (O'Sullivan y Mahan, 1964).

En 1979 estos criterios se modificaron puesto que la valoración de glucosa ya no se realizó en sangre entera sino en plasma ó en suero. El grupo nacional de datos sobre diabetes (The National Diabetes Data Group) una organización de los Estados Unidos de Norteamérica tomó en cuenta que los valores de glucosa en plasma ó suero son 14% mayores en relación con las cifras en sangre entera, ajustando de acuerdo a esto las cifras propuestas por O'Sullivan. (National Diabetes Data Group, 1979).

En 1982, se propuso un conjunto nuevo de umbrales diagnósticos; debido a que para la determinación glucosa se empezaba a utilizar el método enzimático de glucosa oxidasa. El antiguo método de Somogyi-Nelson era menos específico ya que cuantificaba glucosa y otros azúcares reductores, dando cifras de glucosa por arriba de lo real. Carpenter y Coustan restaron primero 5 mg/dL a cada una de las cifras originales no redondeadas de O'Sullivan y después agregaron un 14% para compensar el cambio de glucosa en sangre entera a glucosa en plasma. Estas cifras se redondearon a los valores múltiplos de 5mg/dL y se muestran en la tabla 3 (Carpenter y Coustan, 1982).

TIEMPO	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN PLASMA (Glucosa oxidasa, mg/dL)
en ayuno	95
1 hora	180
2 horas	155
3 horas	140

Tabla 3. Diagnóstico de DG después de una carga de 100 g de Glucosa

Con base en estudios clínicos se determinó que los criterios de Carpenter y Coustan están dentro de un intervalo de confianza del 95% para diagnosticar DG; por lo cual “la cuarta conferencia internacional sobre diabetes gestacional” aceptó la modificación de Carpenter y Coustan a los criterios de O’Sullivan (Coustan y cols., 1989; Sacksy cols., 1995).

La curva de tolerancia oral a la glucosa para establecer el diagnóstico de DG se realiza entre la semana 24-28 de la gestación; donde al menos 3 días antes del estudio se prescribe una dieta de 150g de hidratos de carbono y una actividad física regular (Metzger y Coustan, 1998).

Algunos Centros Europeos avalan también el uso de una carga de 75g de glucosa y mediciones al minuto 0, 60 y 120; como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 1985). De acuerdo a estudios clínicos se ha observado que los criterios anteriores al igual que los de Carpenter y Coustan también son adecuados para hacer el diagnóstico de DG. Los valores límites después de esta carga se presentan en la tabla 4 y también el diagnóstico de DG se confirma con el incremento de dos determinaciones (Li y cols., 1987; Cheng y Salmon, 1993; Schmidt y cols., 2001).

TIEMPO	GLUCOSA EN PLASMA (Glucosa oxidasa, mg/dL)
en ayuno	95
1 hora	180
2 horas	155

Tabla 4. Diagnóstico de DG después de una carga de 75 g de Glucosa

La cuarta conferencia internacional sobre diabetes gestacional recomienda que la prueba diagnóstica se realice sobretodo en mujeres con riesgo elevado de padecer DG (ver factores de riesgo para el desarrollo de DG) [Metzger y Coustan, 1998].

Las mujeres con DG en embarazos previos y metabolismo anormal de glucosa en embarazos subsecuentes deben ser consideradas diabéticas y no diabéticas gestacionales recurrentes; a menos que se demuestre que los valores de glucosa en plasma son normales después del parto. Una

concentración de glucosa en plasma a cualquier hora del día ≥ 200 mg/dL ó en ayuno ≥ 126 mg sugieren que la paciente es diabética y no diabética gestacional (Metzger y Coustan, 1998; Buchanan y Xian, 2005).

TRATAMIENTO PARA LA DIABETES GESTACIONAL

I) Dieta

La prescripción de una dieta adecuada proveerá las necesidades energéticas y nutricionales para sustentar el embarazo, evitando la presencia de hiperglucemia postprandial. A pesar de que no se conoce con precisión el umbral de glucosa materna al cual se presentan daños al feto, las estrategias nutricionales están enfocadas a mantener las concentraciones de glucosa en plasma en el rango adecuado para el embarazo. La ADA propone, que la ingesta diaria de calorías para una mujer con peso normal en la segunda mitad del embarazo debe ser de 30-32 kilocalorías por kilogramo de peso; en mujeres con sobrepeso la ingesta calórica debe disminuir hasta 24 kilocalorías por kilogramo de peso y en mujeres con obesidad mórbida hasta 12 kilocalorías/ por kilogramo (Carr y Gabbe, 1998).

El porcentaje que representen los hidratos de carbono en cada una de las 3 comidas debe ser el siguiente: para el desayuno $\leq 45\%$, para la comida de medio día $\leq 55\%$ y $< 50\%$ en la cena. Este porcentaje se debe disminuir gradualmente hasta un 33, 45, y 40% respectivamente. Un estudio, demostró que mujeres que consumían sólo 40% de hidratos de carbono del total de la ingesta calórica tuvieron hijos con un peso menor y pocos casos de cesárea respecto a mujeres con una ingesta alta en hidratos de carbono. A pesar que ha sido reportado que del 75-80% de las mujeres que utilizan únicamente dieta en su tratamiento pueden alcanzar valores de euglucemia; existe controversia con respecto a la efectividad del tratamiento que incluya solo la dieta (Carr y Gabbe, 1998).

Una dieta demasiado restrictiva puede resultar contraproducente. En animales, se ha observado que una disminución exagerada en la ingesta calórica durante el embarazo resulta en una disminución

del total de células β pancreáticas en la progenie, favoreciendo el desarrollo de diabetes en los productos (Jovanovic y Pettitt, 2001). En poblaciones con una elevada prevalencia de malnutrición y retardo en el crecimiento intrauterino existe una alta incidencia de diabetes. La inanición durante el embarazo resulta desfavorable, ya que se asocia con cetonemia, y esta puede afectar el desarrollo del feto. Mujeres con DG que estuvieron bajo una dieta de 1200 kcal por día desarrollaron cetoacidosis después de una semana (Jovanovic y Pettitt, 2001).

En pacientes con DG el consumo de grasas insaturadas mejora las presiones sanguíneas; los ácidos grasos omega 3 disminuyen además la reserva citosólica de lípidos (Lauszus y cols., 2001). La ADA recomienda que en conjunto con el tratamiento se practique ejercicio regularmente. La actividad física moderada no sólo disminuye los niveles de glucosa en sangre, sino que además es la clave para mantener un peso adecuado y mejorar la sensibilidad a la insulina (Kjos y Buchanan, 1999).

II) Insulina

Las mujeres que durante el embarazo no mejoran su estado de hiperglucemia con dieta y ejercicio son tratadas con insulina. La ACOG (The American College of Obstetricians and Gynecologist) estableció los criterios para el inicio de tratamiento con insulina. Estos incluyen un nivel de glucosa en plasma en ayuno ≥ 105 mg/dL y una glucosa postprandial a las dos horas ≥ 120 mg/dL. El tipo de insulina a elegir y la dosis deben basarse en las anomalías en el metabolismo de la glucosa observadas. La prescripción médica debe estar encaminada a disminuir los niveles basales y postprandiales de glucosa. Se espera que los valores de glucosa en las mujeres bajo tratamiento se encuentren de la siguiente manera: en el ayuno de 60-90 mg/dL, a los 60 minutos después de los alimentos entre 130-140 mg/dL y a las 2 horas menores a 120 mg/dL (ACOG, 1994; Glueck y cols., 2002).

La hiperglucemia postprandial se debe tratar con insulina de acción rápida, la cual es de absorción rápida. Esta mimetiza los efectos fisiológicos de la primera fase de secreción de insulina y da como resultado niveles bajos de glucosa postprandial. Mujeres que padecían DG candidatas a tratamiento

con insulina de acción rápida, disminuyeron sus niveles de glucosa sin presentar hipoglucemia (Jovanovic y cols., 1999). Los reportes indican que el tratamiento con insulina disminuye la frecuencia de macrosomía; pero no así la frecuencia de cesárea.

III) Hipoglucemiantes orales

Las sulfonilureas de primera generación traspasan la barrera placentaria, además de que pueden causar hiperinsulinemia e hipoglucemia fetales. Estudios in vitro, sugieren que las sulfonilureas de segunda generación probablemente no atraviesen dicha barrera. La seguridad de la gliburida, un agente de segunda generación, ha sido confirmada en varios estudios clínicos. Langer y colaboradores realizaron estudios en los que compararon el tratamiento con gliburida contra el tratamiento con insulina en 404 mujeres con DG que requerían tratamiento, durante las semanas 11-33. Entre los dos tratamientos no hubo diferencias en los niveles de glucosa plasmática en estas mujeres y en las complicaciones observadas en infantes. Concluyendo que la gliburida es una alternativa clínicamente efectiva al tratamiento con insulina (Langer y cols., 1987 y 2004). En un estudio similar realizado por Dornhorst (2001) no se observaron diferencias en la incidencia de hiperinsulinemia o hipoglucemia fetales entre los dos tratamientos.

Sin embargo otros autores han reportado que el tratamiento con gliburida puede estar relacionado con la presencia de hipoglucemia severa (glucosa plasmática <40 mg/ dL), al menos en un pequeño porcentaje (8%) de las pacientes en tratamiento (Yogev y cols., 2004). La metformina, también es otro hipoglucemiante oral que se ha prescrito en el tratamiento de DG. El uso de este fármaco aparentemente no representa peligro de anomalías en la estatura y el peso del producto, además de que se considera como no teratogénico. De acuerdo a estudios in vitro de células embrionarias la metformina no representa riesgos de malformaciones mayores o anomalías en el crecimiento.

Las Tiazolidinedionas (TZD's) son fármacos que incrementan la sensibilidad a insulina ya que se unen directamente a PPAR γ y lo activan promoviendo el uso de glucosa en músculo e hígado, además de que disminuyen la reserva de lípidos en los tejidos blanco de esta hormona. Las TZD's disminuyen la gluconeogénesis, además de que estimulan la secreción de insulina estimulada por

glucosa. En modelos animales; se observó que se excretaban en leche materna. En mujeres hispánicas con historia de DG (Estudio TRIPOD; troglitazona en la prevención de diabetes) la troglitazona preservó la función de la célula β pancreática y previno la aparición de DMT2 (Buchanan y cols., 2002).

JUSTIFICACIÓN

La Diabetes Gestacional es una entidad clínica heterogénea que afecta una buena porción de mujeres durante la gravidez. La mayor parte de los casos presentan un patrón de herencia poligénica y su expresión esta muy influenciada por el medio ambiente al igual que la DMT2.

Se ha hecho evidente que parte de la fisiopatología de la enfermedad comprende una falla en la respuesta compensatoria de las células β para superar la resistencia a la insulina fisiológica que se desarrolla durante el embarazo.

Por lo tanto esfuerzos por conocer las bases moleculares en el desarrollo de esta enfermedad incluyen el estudio de genes que participan en la secreción de insulina así como aquellos relacionados con la respuesta a esta hormona en sus células blanco.

HIPÓTESIS

Dada la participación del gen de la enzima GCK en el desarrollo de DG en otras poblaciones y el papel primario de esta enzima en la secreción de insulina; podría ser el gen de la GCK un gen de susceptibilidad para el desarrollo de DG en población mexicana.

OBJETIVO GENERAL

Buscar variantes alélicas en el gen de la GCK y evaluar si alguno de ellas participa en la susceptibilidad genética para el desarrollo de la DG en una muestra de pacientes mexicanas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Mediante la técnica de PCR-SSCP y secuenciación automatizada, analizar si existen mutaciones y/o polimorfismos en los exones, en las regiones intrón-exón y en el promotor de célula β del gen de la GCK que pudieran influenciar el desarrollo de DG en la muestra en estudio.
2. Comparar si existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas y/o genotípicas de las variantes alélicas entre la muestra de pacientes con DG y un grupo control.

METODOLOGÍA

SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES

I) Pacientes

Se seleccionaron setenta y cinco mujeres mexicanas con diagnóstico de DG que fueron captadas a través del Servicio Materno-infantil del Centro Médico Nacional (CMN) 20 de Noviembre del ISSSTE, en la ciudad de México. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Médica del mismo hospital. Se obtuvo la historia clínica completa de cada paciente con especial interés en los antecedentes heredo-familiares, con la finalidad de elaborar sus respectivos árboles genealógicos (filiogramas) para establecer posibles patrones de herencia en cada una de las familias.

a) Estudios clínicos

El diagnóstico de DG se realizó de acuerdo con los criterios de Carpenter y Coustan; todas las pacientes se sometieron a una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de 3 horas con 100 g de glucosa, entre la semana 24 y 28 de gestación (Carpenter y Coustan, 1982). Para completar los filiogramas de las pacientes con DG, e identificar los patrones de herencia de cada familia, se les realizó a algunos familiares de las mismas pacientes una CTOG de 2 horas con 75 g de glucosa. Esta prueba de laboratorio se llevó a cabo en el departamento de Diabetes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ); de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1985). La CTOG permite clasificar a las personas como normales, intolerantes a la glucosa o diabéticas.

En la historia clínica de las pacientes en estudio se recabaron los datos de edad, tensión arterial, factores de riesgo para el desarrollo de DG, tipo de tratamiento para el control de la hiperglucemia, complicaciones durante la gestación y el parto, además de peso y talla pregestacionales. También se obtuvo información del producto como su peso, presencia de malformaciones congénitas, o muerte perinatal.

b) Criterios de exclusión

Mujeres con previo diagnóstico DMT2 y/o aquellas con escasa información de datos para su registro y localización.

II) Controles

Setenta y cinco mujeres con una edad mayor a 39 años, paridad previa y sin antecedentes de DG. A cada una de ellas se les realizó una determinación de glucosa en plasma en ayunas, la cual se encontró dentro de los parámetros normales.

ESTUDIO GENÓMICO DEL GEN DE LA GLUCOCINASA

I) Toma de muestra

Se tomo una muestra de 20 mL de sangre periférica de las pacientes y controles que se seleccionaron. El anticoagulante utilizado fue EDTA y cada muestra permaneció a -20 °C antes de la extracción de DNA.

II) Obtención del DNA genómico

Se realizó extracción de DNA mediante la técnica modificada con fenol a partir de sangre total descongelada a temperatura ambiente (Sambrook y cols., 1989). Cada muestra se homogeneizo perfectamente y se transfirió 1 mL de sangre a un tubo de 2 mL, adicionándole 1 volumen del buffer de lisis de glóbulos rojos (5 mM de MgCl₂, 10 mM Tris HCl pH 7.6, 10 mM de NaCl), se mezclaron las muestras en el tubo para después ser centrifugadas por 10 min a 5, 000 rpm y una temperatura de 4 °C. Después de la centrifugación se elimino el sobrenadante.

Al botón de células se le agregó 380 µL de amortiguador para lisis de células blancas (10 mM de Tris HCl pH 7.6, 50 mM de NaCl, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0.2% de SDS, 200 µg/mL de proteinasa K), y se incubó a 55 °C por 30 minutos. Después de la incubación se extrajo el DNA; al tubo anterior se la añadieron 200 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vortex, y se centrifugó a 12,000 rpm en microcentrifuga a temperatura ambiente por 1 min. La fase superior (acuosa) se paso a un tubo limpio y se le adicionó 10 µL de NaCl 5 mM y 1 mL de etanol frío (-20 °C). Se mezcló suavemente por inversión hasta que el DNA precipitó. Se centrifugo a 12,000 rpm, se tiro el sobrenadante y se lavo el botón con 1mL de etanol frío al 70%. El botón se seco y se resuspendió en agua estéril. Para la solubilización completa del DNA, el tubo se dejó a 50 °C durante toda la noche.

a) Integridad y cuantificación del DNA

Se analizó el DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 0.7 μL de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en bufferr TBE (Tris base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 pH 8), el corrimiento se realizó a 100 volts por 20 minutos. Después de la electroforesis se analizó el gel en un transiluminador de luz UV para ver que el DNA estuviese integro.

El DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y también se midió la absorbancia a 280 nm. Se calculo la relación de absorbancias 260 nm/280 nm para saber si nuestras muestras de DNA no contenían muchas proteínas que pudieran interferir en la reacción de PCR.

III) Técnica de PCR-SSCP

a) Fundamento

La técnica de PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism, por sus siglas en inglés) se utiliza para la detección de variantes alélicas debido a su simplicidad y versatilidad. En este método la región de interés es amplificada por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir de DNA. El nucleótido citosina (dCTP) que se utiliza en la mezcla para la reacción está marcado con fósforo radiactivo (α - ^{32}P -dCTP). Los productos de la PCR se diluyen en solución desnaturalizante y se calientan a 95 °C para después enfriarse rápidamente y lograr separar las dos cadenas de DNA de cada uno de los alelos. Las cadenas sencillas forman puentes de hidrógeno intracatenarios después del choque térmico en condiciones desnaturalizantes y adquieren por tanto una conformación específica dependiendo de su secuencia de bases.

Los productos de la PCR de los casos en estudio y de los controles ya desnaturalizados se cargan en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 5% y se someten a electroforesis, para que las cadenas se separen de acuerdo a su conformación. El gel se transfiere a una hoja de papel Whatman y se pone en contacto con una placa radiográfica. Al revelar la placa se observa un bandeo en cada una de las muestras; cada banda corresponde a un cadena única de DNA. Si la región amplificada es polimórfica y bialélica (con dos formas alternativas en la secuencia de bases), se podrán observar hasta cuatro bandas distintas y tres patrones de bandeo en la autoradiografía: uno corresponderá al

genotipo homocigoto con la variante común y presentará 2 bandas, el segundo genotipo homocigoto para la variante no común también presentará 2 bandas y por último el genotipo heterocigoto presentará las cuatro bandas.

El método tiene la sensibilidad de detectar diferencias en los alelos debido a variaciones en la secuencia de un solo nucleótido (mejor conocidos como polimorfismos de un solo nucleótido o SNP). Por lo tanto la técnica de PCR-SSCP nos permitirá identificar desde mutaciones puntuales hasta cambios en secuencias que impliquen alteraciones en varias bases (Orita y cols., 1989; Kukita y cols., 1997).

b) Condiciones experimentales para la técnica de PCR-SSCP

La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95 °C durante 10 minutos; se siguieron 35 ciclos que incluían cada uno 3 temperaturas: temperatura de desnaturalización a 94 °C, temperatura de alineamiento específica para cada reacción y temperatura de elongación a 72 °C. Las 3 temperaturas anteriores se mantuvieron por 30 segundos; y finalmente una temperatura de elongación de 72 °C por 10 minutos. Las temperaturas específicas de alineamiento se muestran en la tabla 5. Los oligonucleótidos se sintetizaron en base a las secuencias ya publicadas por Stoffel, en este trabajo se utiliza la técnica de PCR-SSCP para realizar la búsqueda de mutaciones en el gen de la GCK en pacientes MODY (Stoffel y cols.,1992). Estos oligonucleótidos se unen a secuencias intrónicas, por lo tanto nos permitirán también el estudio de las regiones intrón-exón.

secuencia	oligonucleótido sentido	oligonucleótido antisentido	Tamaño pb	Temperatura °C
Exón 1a	TCCACTTCAGAAGCCTACTG	TCAGCTTCTGAGGCTCAAAC	195	58
Exón 1b	AGCAGGCAGGAGCATCTCTG	GCTGCTCTCCAGTGCAAAG	149	67
Exón 1c	CCAGACTCTCCTCTGAACTC	GAAGAAGAGGTTCCATCTGA	145	58
Exón 2	TGCAGATGCCTGGTGACAGC	CACAGCTGCTTCTGGATGAG	290	67
Exón 3	TAATATCCGGCTCAGTCACC	CTGAGATCCTGCATGCCCTTG	295	60
Exón 4	TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG	TGAAGGCAGAGTTCCTCTGG	272	65
Exón 5	GCAGCCACGAGGCCATATCTC	GAGAAAGGCAGGCAGTGCTG	195	62
Exón 6	CCAGCACTGCAGCTTCTGTG	GAGCCTC.GGCAGTCTGGAAG	176	60
Exón 7	AGTGCACTCTCGCTGACAG	CATCTGCCGCTGCACCAGAG	285	65
Exón 8	TGCCTGCTGATGTAATGGTC	TGAGACCAAGTCTGCAGTGC	263	62
Exón 9	ACTGTCCGAGCGCACTCAG	CTTGGAGCTTGGGAACCGCA	367	64
Exón 10	GTCGACTGCGTGCAAGGGCGC	TGTGGCATCCTCCCTGCGCT	263	68
Región promotora	GACTGTGTCTCTCACATCCTAGCC	CAAGGCGCTTGAGTGGTCACCATG	257	60

Tabla 5 oligonucleótidos utilizados para el estudio genómico de la Glucocinasa

El volumen total de reacción de la mezcla para la PCR fue de 15 μ l y contenía: 1.5 μ l de Buffer 10X (Tris-HCl 150 mM pH 8, KCl 500 mM), 0.9 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1.2 μ l de una mezcla equimolar al 2.5mM de los nucleótidos adenina, timina, y guanina (A,T,G), 1.2 μ l del nucleótido citosina al 0.2 mM, 50 ng de cada oligonucleótido, 1 U de Taq polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), 50 ng de DNA genómico, 1 μ Ci de α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/mL, Amersham) y agua c.b.p. 15 μ l.

De los amplificadores marcados con α -³²P-dCTP se tomaron 2 μ l de cada muestra y se mezclaron con 48 μ l de una solución al 0.1% de SDS y 10 mM de EDTA (solución desnaturizante). A 10 μ l de la mezcla anterior se le agregaron 10 μ l de una solución que contiene: formamida al 95%, 20 mM de EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de cianol de xileno. Las mezclas se desnaturizaron a 95° C durante 5 minutos y se cargaron 2 μ l en un gel de poliacrilamida al 5%, con glicerol al 10%. La electroforesis se corrió con el buffer Tris-Borato-EDTA (TBE-pH 8.3) 1X a 8 watts durante toda la noche y a temperatura ambiente.

Después de la electroforesis el gel fue transferido a un papel Whatman 3M y se colocó en un secador de geles durante 1 hora. El gel ya seco se puso en contacto con una placa para radiografía Kodak a -70°C por 24 horas.

IV) Técnica de secuenciación automatizada de DNA

a) Fundamento

Durante la electroforesis capilar del DNA, uno a uno los nucleótidos marcados con un fluoróforo pasan por una ventana donde un rayo láser los excita y emiten fluorescencia. La longitud de onda de emisión dependerá de la estructura química del fluoróforo, con el que este marca cada nucleótido (R6G para A, ROX para C, R110 para G y TAMRA para T). La longitud de onda de emisión así como su intensidad son detectadas por un mecanismo sensible a fluorescencia. Esta información es transferida a la computadora conectada al secuenciador, un software la transforma para que se pueda interpretar fácilmente. Finalmente lo que se obtiene es un registro gráfico en 4 colores (cada uno identifica la presencia de una de las cuatro bases nitrogenadas de DNA) llamado

electroferograma. Este registro muestra la secuencia de los nucleótidos de la región genómica amplificada por una PCR. Las señales registradas se presentan como picos de colores, cada pico presenta un solo color y este corresponde al nucleótido que fue detectado en la ventana.

b) Condiciones experimentales

Para la secuenciación automatizada primero se realiza una amplificación por PCR de las muestras de interés, las condiciones de esta son las mismas que en la técnica de PCR-SSCP, con la excepción de que no se utiliza marca radiactiva y por lo tanto la mezcla equimolar de nucleótidos al 2.5 mM que se utiliza también incluye a la citosina.

Los productos de esta primera reacción se purifican en columnas QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit). Las etapas para la purificación incluyen: unión del DNA a la matriz de la columna, lavado del DNA con un buffer, secado del DNA y elusión con agua purificada libre de DNAsas. Una vez purificados los productos se utilizan como DNA templado para una segunda reacción de PCR. Durante la reacción se incorporan nucleótidos fluorescentes (DNA Sequencing Kit BigDye Terminator v 3.0, Applied Biosystems) y sólo se amplifica una de las cadenas de cada alelo para evitar interferencia de las cadenas complementarias en el momento de la electroforesis. Por lo tanto la mezcla de reacción para PCR solo incluye el oligonucleótido sentido o antisentido.

Las condiciones de la PCR para la incorporación de los nucleótidos fluorescentes son las siguientes: 2 µl del reactivo BigDye, 3 µl de Buffer 5X, 50 ng del oligonucleótido, 100 ng del DNA templado purificado y agua c.b.p. 20 µl. La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95 °C durante 3 minutos; para la amplificación se utilizaron 25 ciclos que incluían cada uno 3 temperaturas: temperatura de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, temperatura de alineamiento de 52 °C por 10 segundos y temperatura de elongación a 60 °C por 4 minutos; y finalmente se utilizó una temperatura de elongación de 60 °C por 7 minutos.

Los productos de la reacción de incorporación se purifican en columnas de sephadex G50 hidratado (CentriSep, Applied Biosystems), el producto ya purificado se secó a temperatura ambiente por 20 minutos en un secador a vacío. Una vez secos los productos se resuspenden en una solución de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), y se colocan en una placa de 96 pozos.

Los productos de la PCR se desnaturalizan por 2 minutos a 95°C y se pasan a hielo. La placa con las muestras se coloca en el secuenciador; aquí cada una de las muestras se somete a electroforesis capilar utilizando el buffer TBE 1X y una matriz de acrilamida (POP6 de Applied Biosystems).

El exón 9 de glucocinasa se estudio en todas las pacientes por el método de secuenciación automatizada, ya que el fragmento excede las 300 pares de bases, y de acuerdo a los fundamentos de la técnica de SSCP cuando el fragmento es mayor a las 300 pb la sensibilidad del método es menor al 99%. También el promotor de la isoforma de célula β pancreática se estudio por la técnica de secuenciación automatizada, ya que no existía evidencia de que este par de oligonucleótidos se hubieran utilizado antes para la técnica de PCR-SSCP.

V) Análisis estadísticos

Los métodos estadísticos fueron utilizados para el estudio de asociación caso control. Una vez que se genotificaron los pacientes y controles, se registraron las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de los polimorfismos; esto con el fin de analizar en cada grupo si los genotipos se encontraban en equilibrio de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg. Esta ley define que en una población en equilibrio las frecuencias genotípicas están definidas por las frecuencias alélicas. Si en una población se observan 2 alelos, por ejemplo p y q, estos dan origen a tres genotipos pp, pq, y qq; si la frecuencia del alelo p = a y la frecuencia del alelo q = b, entonces las frecuencias genotípicas quedan definidas por el binomio cuadrado perfecto:

$$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$$

Donde la frecuencia genotípica de pp = a^2

la frecuencia genotípica de pq = $2ab$

y la frecuencia del genotipo qq = b^2

Las frecuencias alélicas de $q + p = 1$; del mismo modo la suma de las frecuencias de los genotipos pp , qq , y pq también es igual a la unidad

(<http://www.woodrow.org/teachers/bi/1994/equilibrium.html>).

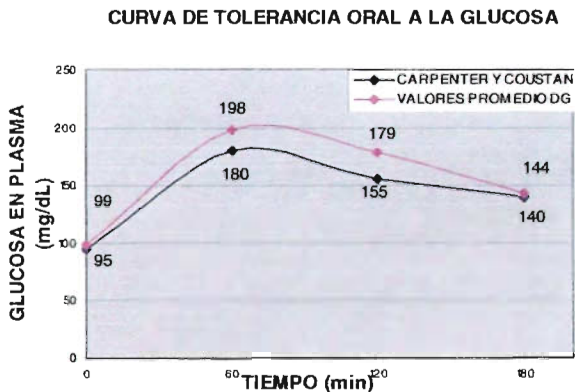
Para saber si nuestra población a analizar mediante estudio de asociación caso control estaba en equilibrio, se obtuvieron primero las frecuencias alélicas de cada polimorfismo en cada grupo (pacientes y controles) por separado. Las frecuencias genotípicas esperadas para cada uno de los polimorfismos se calcularon utilizando un programa de cómputo diseñado en nuestro laboratorio. Este programa resuelve el binomio cuadrado perfecto para obtener las frecuencias genotípicas esperadas en una población en equilibrio, y las compara con las frecuencias genotípicas observadas utilizando la prueba de Chi-cuadrada (X^2). Si en uno de los grupos (pacientes o controles) las frecuencias genotípicas son estadísticamente diferentes con respecto a las frecuencias esperadas, entonces no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Es posible que la muestra que se selecciono se encuentre sesgada y por lo tanto al realizar el estudio de asociación caso-control los resultados puedan darnos una asociación falsa.

Con la muestra de pacientes y la muestra de controles en equilibrio de Hardy-Weinberg, se procedió a analizar si existían diferencias significativas en las frecuencias de un alelo en particular o alguno de los genotipos entre pacientes y controles. Para esto utilizamos la prueba de X^2 , también se calculó el OR (Odds Ratio o razón de momios), y el intervalo de confianza.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENEALÓGICA DE LAS PACIENTES CON DG

En la gráfica 1 se observa el promedio de las curvas de la prueba de tolerancia oral a la glucosa de las 75 pacientes con DG. Todas las pacientes fueron estudiadas entre la semana 24-28 y presentaron al menos dos valores de glucosa en plasma por arriba de los valores límite establecidos en los criterios de Carpenter y Coustan. Los dos valores de glucosa en plasma que en general estaban más alterados en estas pacientes fueron el valor a la hora y las dos horas, sólo una minoría de pacientes presentaron valores de glucosa en plasma alterados en el ayuno y a las tres horas.



Gráfica 1. Valores promedio de las curvas de tolerancia oral a glucosa en pacientes. Historias clínicas, CMN 20 de Noviembre ISSSTE.

De las 75 mujeres seleccionadas para el estudio, la mayoría de ellas (71% de los casos) están dentro del grupo de edad de 35 a 39 años (tabla 6), el resto prácticamente son mayores a 40 y menores a 44 años (19%). Solo en una pequeña proporción (10%) tienen edades entre los 24 y 34 años. El 61% de estas pacientes presentaron un índice de masa corporal pregestacional (IMCP) normal y el resto presentan sobrepeso u obesidad (tabla 7). Sesenta y tres de las 75 pacientes (84%) fueron tratadas con un plan de alimentación elaborado en el CMN 20 de noviembre y no requirieron la administración de insulina para el control de la hiperglucemia (tabla 8).

EADAES		
Grupo etario (años)	no. de pacientes	porcentaje
24-29	2	2
30-34	6	8
35-39	53	71
40-44	14	19
Total	75	100

Tabla 6. Grupos por edades. Historias clínicas, CMN 20 de Noviembre ISSSTE

INDICE DE MASA CORPORAL PREGESTACIONAL		
IMCP Kg/m ²	no. de pacientes	porcentaje
<25	46	61
25-30	17	23
>30	12	16
Total	75	100

Tabla 7. Índice de masa corporal pregestacional. Historias clínicas, CMN 20 de Noviembre ISSSTE

TRATAMIENTO		
Tratamiento	no. de pacientes	porcentaje
Dieta + insulina rápida e insulina intermedia	1	1
Dieta + insulina rápida	8	11
Dieta + insulina intermedia	3	4
Solo dieta	63	84
total	75	100

Tabla 8. Tratamientos utilizados para el control de la DG. Historias clínicas, CMN 20 de Noviembre ISSSTE

Solo dos de las pacientes presentaron preclamsia como complicación, la primera de 38 años de edad tenía también angiopatía angiotónica, una enfermedad vascular que altera la retina. Esta mujer fue tratada con dieta únicamente. Ella presentó antecedentes heredo familiares de DMT2; su padre padeció retinopatía bilateral como complicación de la DMT2. El producto de esta paciente fue de bajo peso al nacimiento; solo peso 1800 gramos (tabla 9) y fue atendido en la unidad de cuidados intensivos neonatales.

La otra paciente con preclamsia también tenía antecedentes familiares de DMT2; su padre murió por un infarto al miocardio y su abuela paterna presentó 2 complicaciones crónicas de la DM: retinopatía y nefropatía. Esta paciente fue tratada con dieta e insulina. Los familiogramas de ambas pacientes sugieren un patrón de herencia poligénica y sus partos fueron por la vía abdominal (cesárea).

El estudio genealógico de las 75 pacientes reveló que el 48% de las mujeres presentan un patrón de herencia poligénico, el 39% muestran un familiograma compatible con herencia autosómica dominante y el resto (13%) pertenecen a familias sin antecedentes de DM (tabla 10).

COMPLICACIONES		
Complicación	no. de pacientes	porcentaje
Materna; preclamsia severa	2	3
Fetal; bajo peso al nacimiento	1	1
Total	3	4

Tabla 9. Complicaciones maternas y fetales. Historias clínicas, CMN 20 de Noviembre ISSSTE

PATRÓN DE HERENCIA		
Patrón de herencia	no. de pacientes	porcentaje
Poligénica	36	48
Posible autosómico dominante	29	39
Sin antecedentes	10	13
Total	75	100

Tabla 10. Patrones de herencia en pacientes con DG. Familiogramas, INCMNSZ

ESTUDIO GENÓMICO DEL GEN DE LA GLUCOCINASA

Once de los doce exones del gen de la glucocinasa se estudiaron por medio de la técnica de PCR-SSCP. La autorradiografía del exón 6 de la GCK (figura 5) fue la única que tuvo una muestra con un patrón de corrimiento diferente al común; se realizó la secuenciación de esta muestra para ver cual era el cambio de secuencia que se relacionaba con este patrón de corrimiento. También se secuencio una muestra con corrimiento normal. Las figuras 6 y 7 muestran como ejemplo dos autorradiografías donde la migración de los productos de la PCR fue idéntica en todas las muestras.



Figura 5. Autorradiografía de los productos del exón 6 de la GCK obtenida mediante la técnica de PCR-SSCP. Observamos una muestra que presenta un patrón de corrimiento diferente (flecha).

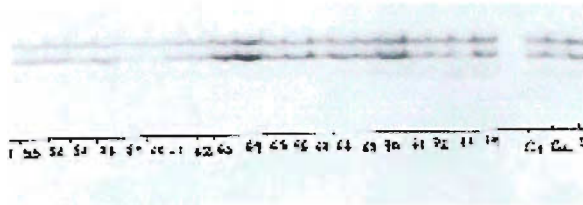


Figura 6. Autorradiografía de los productos del exón 1c obtenida mediante la técnica de PCR-SSCP. Cada una de las bandas se localizaron a la misma distancia en todos los carriles de pacientes y controles (últimas 3 bandas).



Figura 7. Autorradiografía de los productos del exón 10 obtenida mediante la técnica de PCR-SSCP. El patrón de corrimiento es idéntico en cada una de las muestras.

La secuenciación de la muestra que tenía corrimiento diferente al común en la autorradiografía del exón 6, nos permitió identificar el polimorfismo TAC→TAT en el codón 215 del gen de la GCK; este cambio de secuencia en el tercer nucleótido de este codón no está relacionado con un cambio de aminoácido (Tyr215Tyr). La modificación en la secuencia de DNA se encontró en forma heterocigota en la paciente y puede observarse en el electroferograma de la figura 8. La figura 9 por su parte, muestra el electroferograma con la secuencia normal.

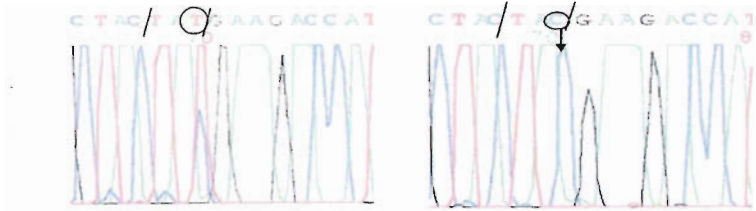


Figura 8. Electroferograma de la paciente con el polimorfismo Y215Y en el exón 6 del gen de la GCK, en forma heterocigota TAC→TAT.

Figura 9. Electroferograma que muestra la secuencia normal (común) TAC, del codón 215 del exón 6 del gen de la GCK.

El fragmento del exón 9 como ya se comentó se amplificó por PCR para realizar secuenciación automatizada. El análisis de los electroferogramas de las pacientes nos permitió la identificación del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T (IVS; intronic variance sequence). Para determinar si este polimorfismo intrónico confiere susceptibilidad para el desarrollo de DG en nuestra población, se secuenciaron también las muestras de las 75 mujeres que se utilizaron como controles. Las figuras 10, 11 y 12 muestran los electroferogramas con el polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en forma homocigota, en forma heterocigota y la secuencia normal respectivamente.

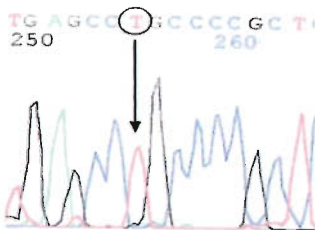


Figura 10. Electroferograma que muestra el polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en el intrón 9 del gen de la GCK en forma homocigota. Solo se observa bajo la flecha una T (T/T)

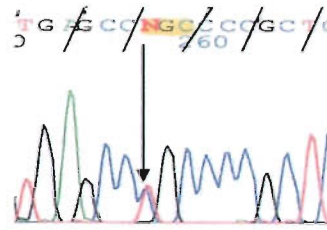


Figura 11. Electroferograma que muestra el polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en el intrón 9 del gen de la GCK en forma heterocigota. Se observa bajo la flecha dos alelos distintos C/T

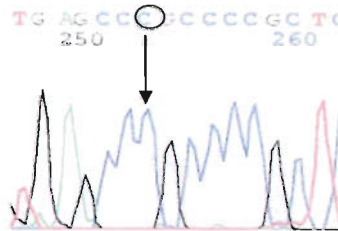


Figura 12. Electroferograma de la secuencia común del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en el intrón 9 del gen de la GCK. Bajo la flecha se observa el alelo C en forma homocigota (C/C).

También en el promotor de la isoforma de la célula β pancreática de la GCK se localizó un polimorfismo de un solo nucleótido en la posición -30 [(-30) G>A] tanto en pacientes como en controles. La secuencia se realizó utilizando el oligonucleótido antisentido, los electroferogramas por lo tanto muestran la secuencia complementaria de este promotor. Se eligió este oligonucleótido porque la secuencia con el oligonucleótido sentido no era clara para su interpretación. En las figuras 13, 14 y 15 se observa el polimorfismo (-30) G>A del promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK en forma homocigota, heterocigota, y la variante de secuencia común respectivamente.

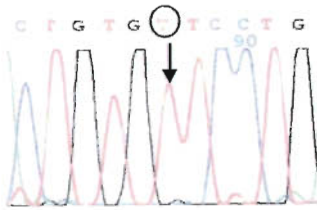


Figura 13. Electroferograma que muestra el polimorfismo (-30) G>A, en el promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK en forma homocigota. Bajo la flecha se observa solo el alelo T, este equivale al alelo A en forma homocigota, ya que se utilizó el oligonucleótido antisentido.

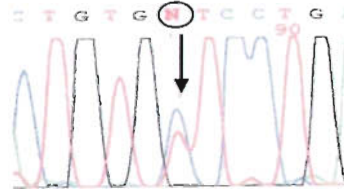


Figura 14. Electroferograma que muestra el polimorfismo (-30) G>A, en el promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK en forma heterocigota. Bajo la flecha se observan dos alelos C/T, estos equivalen a los alelos G/A, ya que se utilizó el oligonucleótido antisentido.

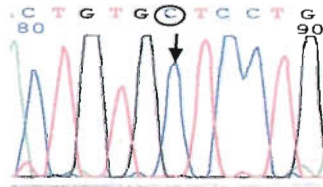


Figura 15. Electroferograma que muestra la secuencia común del polimorfismo (-30) G>A, del promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK. Bajo la flecha se observa solo una C que equivale al alelo G en forma homocigota, ya que se utilizó el oligonucleótido antisentido.

I) Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg

Mediante un programa que utiliza la ecuación de Hardy-Weinberg calculamos la frecuencia esperada de cada uno de los tres genotipos para los dos polimorfismos IVS9 +nt8 C>T y (-30) G>A del gen de la GCK. En la columna H-W de las tablas 11, 12, 13 y 14, están registrados los valores de cada una de las frecuencias genotípicas esperadas; estas se compararon con las frecuencias genotípicas observadas utilizando la prueba de X^2 . Este análisis reveló que no existen diferencias significativas estadísticamente entre las frecuencias genotípicas en cada uno de los grupos. El polimorfismo en intrón 9: IVS9 +nt8 C>T y el polimorfismo (-30) G>A en promotor de célula β pancreática se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en pacientes como en controles.

PACIENTES IVS9 +nt8 C>T				
frecuencias		alelos	observadas	H-W
Alélica	T	61	0,407	
	C	89	0,593	
	Total	150	1,000	
		pacientes		
Genotípica	TT	10	0,133	0.165
	CT	41	0,547	0.483
	CC	24	0,320	0.352
	Total	75	1,000	p=0.247

Tabla 11. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T del gen de la GCK en las pacientes. Fuente electroferogramas INCMNSZ

CONTROLES IVS9 +nt8 C>T				
Frecuencias		alelos	observadas	H-W
Alélica	T	51	0,340	
	C	99	0,660	
	Total	150	1,000	
		pacientes		
Genotípica	TT	11	0,146	0.166
	CT	29	0,387	0.449
	CC	35	0,467	0.436
	Total	75	1,000	p=0.234

Tabla 12. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T del gen de la GCK en controles. Fuente electroferogramas INCMNSZ

PACIENTES (-30) G > A				
Frecuencias		alelos	observadas	H-W
Alélica	A	24	0,160	
	G	126	0,840	
Total		150	1,000	
		pacientes		
Genotípica	AA	1	0,013	0.026
	GA	22	0,293	0.269
	GG	52	0,693	0.706
	Total	75	1,000	p=0.397

Tabla 13. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo (-30) G > A en el promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK en las pacientes. Fuente electroferogramas INCMNSZ

CONTROLES (-30) G > A				
Frecuencias		alelos	observadas	H-W
Alélica	A	22	0,147	
	G	128	0,853	
Total		150	1,000	
		pacientes		
Genotípica	AA	2	0,027	0.022
	GA	18	0,24	0.250
	GG	55	0,73	0.728
	Total	75	1,00	p=0.727

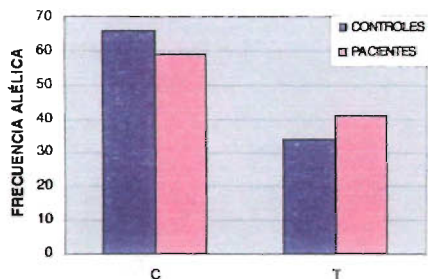
Tabla 14. Equilibrio de Hardy-Weinberg del polimorfismo (-30) G > A en el promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK en controles. Fuente electroferogramas INCMNSZ

II) Estudio de asociación Caso-Control

En las gráficas 2 y 3 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T de la GCK, en pacientes y controles. Las frecuencias alélicas en ambos grupos son muy similares, sólo se observa una pequeña diferencia en la distribución del alelo C en sus dos genotipos; el genotipo CC es más frecuente en los controles, mientras que el genotipo CT es más común en las pacientes.

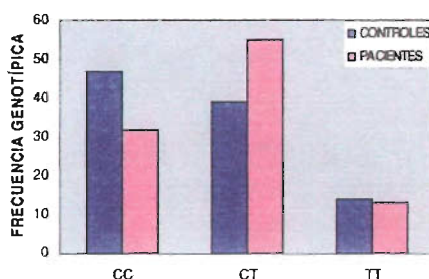
Por otro lado, las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo (-30) G>A del promotor de la isoforma β pancreática se observan en las gráficas 4 y 5. Tanto las frecuencias alélicas como genotípicas en pacientes y controles son muy similares.

POLIMORFISMO IVS9 +8nt C>T GCK



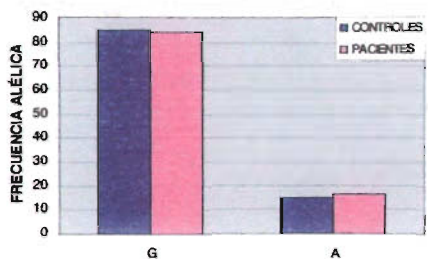
Gráfica 2. Frecuencia alélica del polimorfismo IVS9 +8nt C>T del gen de la GCK.

POLIMORFISMO IVS9 +8nt C>T GCK



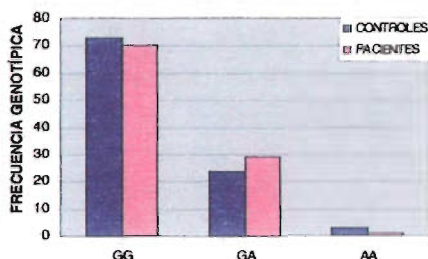
Gráfica 3. Frecuencia genotípica del polimorfismo IVS9 +8nt C>T del gen de la GCK.

POLIMORFISMO (-30) G>A GCK



Gráfica 4. Frecuencia alélica del polimorfismo (-30) G>A del promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK.

POLIMORFISMO (-30) G>A GCK



Gráfica 5. Frecuencia genotípica del polimorfismo (-30) G>A del promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK.

Se utilizó la prueba de X^2 , para analizar si existían diferencia significativa en las frecuencias alélicas y/o genotípicas entre ambos grupos. En las tablas 15 y 16 se muestran el valor de p para cada una de las comparaciones, la razón de momios (OR), y el intervalo de confianza (IC).

IVS9 +nt8 C>T					
ALELO	Pacientes	Controles	p	OR	IC (95%)
T	61	51	0.23	1.33	0.83-2.12
C	89	99	0.23	0.75	0.47-1.20
GENOTIPO					
GENOTIPO	Pacientes	Controles	p	OR	IC (95%)
TT	10	11	0.81	0.89	0.35-2.25
CT	41	29	0.049	1.91	0.99-3.66
CC	24	35	0.06	0.53	0.27-1.04

Tabla 15. Estudio de asociación caso-control del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T en el gen de la GCK

(-30) G>A					
ALELO	Pacientes	Controles	p	OR	IC (95%)
A	24	22	0.74	1.11	0.59-2.07
G	126	128	0.74	0.90	0.48-1.69
GENOTIPO	Pacientes	Controles	p	OR	IC (95%)
AA	1	2	0.34	0.49	0.04-5.55
GA	22	18	0.46	1.31	0.63-2.72
GG	52	55	0.58	0.82	0.40-1.67

Tabla 16. Estudio de asociación caso-control del polimorfismo (-30) G> A en el promotor de la isoforma β pancreática del gen de la GCK.

Como se puede apreciar tanto el alelo C como el T del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T del gen de la GCK no muestran diferencias significativas en sus frecuencias en los dos grupos estudiados. Sólo el genotipo CT presenta una frecuencia significativamente mayor en los pacientes.

Por otro lado el polimorfismo (-30) G>A del promotor de célula β pancreática presenta una distribución muy similar en pacientes y controles, las frecuencias genotípicas y alélicas de esta variante no muestran diferencias significativas entre pacientes y controles.

DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y GENEALÓGICAS DE LAS PACIENTES EN ESTUDIO

En el presente estudio, el 90% de las pacientes presentaron una edad mayor a 35 años al momento del embarazo. Este hallazgo es congruente con algunos reportes de la literatura donde se documenta que el tener una edad mayor a 35 años en el momento del embarazo implica un riesgo relativo del 2.8 de padecer DG (Savona y col., 2000). Por otra parte, el 61 % de las mujeres estudiadas presentaron un índice de masa corporal pregestacional normal ($\leq 25 \text{ kg/m}^2$), y solo un 39 % presentan sobrepeso y obesidad. Existen datos epidemiológicos que demuestran que las mujeres que pertenecen a un grupo étnico con una elevada prevalencia de DMT2 tienen un riesgo elevado de desarrollar DG, independientemente de la presencia de obesidad (Rodríguez y cols., 1999).

En nuestro estudio el 84% de las pacientes controlaron la hiperglucemia solo con dieta, mientras que el resto (16%) utilizaron combinaciones de insulina y dieta, pero ninguna de ellas utilizó hipoglucemiantes orales para su tratamiento. Estos porcentajes van de acuerdo a lo reportado por otros autores donde el control de la glucemia se logra en la mayoría de las pacientes únicamente con un plan de alimentación adecuado (Carr y Gabbe, 1998). En cuanto a la presencia de complicaciones, únicamente dos mujeres presentaron preclamsia severa; esta entidad se ha señalado como la complicación materna más frecuente en las mujeres con DG (Paradisi y cols., 2002; Caruso y cols., 1999).

El recién nacido de una de las mujeres con preclamsia presentó bajo peso al nacimiento. Es posible que este bajo peso al nacimiento se relacione con una disminución del flujo uteroplacentario que ocurre en la preclamsia (Vicens-Calvet y cols., 2002). La otra paciente con preclamsia tiene antecedentes de dos embarazos previos, en su primer embarazo el feto falleció a la semana 24 de la gestación, mientras que el segundo embarazo dio como resultado a un recién nacido aparentemente sano. Esta paciente requirió de la administración de insulina y un plan de alimentación para el control de la DG.

Ninguno de los recién nacidos de nuestras pacientes con DG presento malformaciones congénitas. Algunos reportes describen que solo los productos de madres con hiperglucemia severa tienen riesgo de presentar malformaciones congénitas (Sheffield y cols., 2002; Schaefer y cols., 1997; Kowalczyk y cols., 2002). En un estudio de 112 mujeres mexicanas con DG las malformaciones en los recién nacidos tenían una prevalencia del 9.8 % (Lazalde y cols., 2001). Por lo tanto, es posible que el tratamiento oportuno de nuestras pacientes y un buen control de su hiperglucemia hayan prevenido el desarrollo de malformaciones en los recién nacidos.

En cuanto al patrón de segregación de DMT2 o diabetes gestacional entre las pacientes estudiadas, es importante el hecho de que el 87% de las mujeres presentaron datos de agregación familiar. En este sentido se ha demostrado que existe un mayor riesgo de desarrollar la DG si las pacientes tienen familiares de primer grado diabéticos (Metzger y Constan, 1998). De las mujeres con antecedentes familiares de diabetes, el 48 % de los familiogramas parecen corresponder a árboles genealógicos con herencia poligénica. Por otra parte, observamos un alto porcentaje de mujeres que presentaron un familiograma compatible con herencia autosómica dominante (39 %). Lo anterior sugiere la participación de un gen único (herencia monogénica) para la presentación de la enfermedad o bien que varios genes interactúan de forma sinérgica o aditiva para generar la enfermedad (herencia poligénica), pero que uno de ellos tiene una contribución mayoritaria y por lo tanto aparenta herencia monogénica.

Las pacientes sin antecedentes heredo-familiares de diabetes (13%) podrían ser casos de DMT1 de aparición tardía, ya que es frecuente la ausencia de agregación familiar en esta variedad de diabetes.

Aunque en el presente estudio no fue posible evaluar la presencia de sedentarismo y el consumo de grasas saturadas en las pacientes, es posible que el aumento en la frecuencia de estos dos factores en los estilos de vida actual estén favoreciendo la presencia de DG independientemente de la agregación familiar (Bo y cols., 2001). Se ha documentado que estos dos factores son importantes para el desarrollo de DG y DMT2 (Savona y cols., 2000).

ESTUDIO DEL GEN DE LA GCK

I) Variantes alélicas identificadas en el gen de la GCK en pacientes mexicanas con DG

Se identificaron 3 variantes alélicas en el gen de la GCK. En una de las 75 pacientes se localizó la variante TAC→TAT de forma heterocigota en el codón 215 de glucocinasa, que no se traduce en un cambio de aminoácido (Y215Y). Este cambio de secuencia no se identificó en controles. Laakso y colaboradores localizaron en población finlandesa esta misma variante en un paciente con DMT2 (n=36) y en 2 pacientes con intolerancia a la glucosa (n=40). Sus resultados demostraron que esta variante alélica tiene una frecuencia muy baja en la población y no lograron demostrar asociación con el fenotipo diabético (Laakso y cols., 1995).

Se identificaron también dos polimorfismos adicionales: un polimorfismo intrónico IVS9 +nt8 C>T y otro en la región promotora de la célula β pancreática (-30) G>A. Ambos polimorfismos se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en pacientes como en controles.

Las frecuencias alélicas del polimorfismo IVS9 +nt8 C>T no presentaban diferencias significativas entre ambos grupos (pacientes vs controles); pero el genotipo CT es más frecuente en pacientes con una significancia estadística límite ($p=0.049$) y una razón de momios (OR) igual a 1.91. Este polimorfismo se ha descrito en otras poblaciones: italianos, chinos, finlandeses, y afroamericanos (Gagnoli y cols., 2001; Liu y col., 2003; Laakso y cols., 1995; Chiu y cols., 1993). Las frecuencias alélicas y genotípicas que reportan en pacientes y controles en estos estudios son muy similares a las identificadas en nuestra población. En ninguna de las poblaciones anteriores se ha relacionado este polimorfismo al desarrollo de la DG o la DMT2, de aquí que en algunos estudios se le reconozca como polimorfismo neutral. Por lo tanto es posible que presentar el genotipo CT no sea una condicionante para el desarrollo de la DG en nuestra población.

En la región promotora de la célula β pancreática identificamos el polimorfismo (-30) G>A que se ha reportado como un polimorfismo relacionado con el desarrollo de DMT2 en otras poblaciones. Pero en nuestro estudio esta variante no mostró asociación significativa con el desarrollo de DG. En un estudio en Dinamarca, este polimorfismo tampoco se relacionó con el desarrollo de DMT2

(Urhammer y cols., 1998). Sin embargo, otros autores han mostrado que el alelo A en forma homocigota se relaciona con el desarrollo de la DG. Por su parte, Zaidi y colaboradores en un estudio de 47 mujeres con DG no encontraron mutaciones en la región codificante del gen de la GCK, pero ellos encontraron 2 mujeres con la variante A en forma homocigota. Estas dos mujeres presentaron una disminución en la secreción de insulina después de una carga oral de glucosa (Zaidi y col., 1996). También en Japoneses, el polimorfismo en forma homocigota está relacionado con intolerancia a la glucosa (Yamada y cols., 1997); estudios funcionales sugieren que esta variante puede disminuir la transcripción del gen de la GCK (Matsutani y cols., 1993).

Al momento existen varios reportes en diferentes poblaciones que asocian al gen de la GCK con el desarrollo de la DG (Ellard y cols., 2000; Kousta y cols., 2001; Saker y cols., 1996). Llama particularmente la atención el reporte en población británica donde se muestra una prevalencia de mutaciones mayor al 70% en el gen de la glucocinasa en pacientes con DG. Sin embargo debemos mencionar que muchos de los casos de diabetes en esta población son debidos a mutaciones en glucocinasa y se han identificado también mutaciones con efecto fundador. En otras palabras, un gen de contribución mayor para el desarrollo de DMT2 y/o DG en alguna población no necesariamente tiene que ser el mismo en otras poblaciones.

En nuestro estudio analizamos por completo la región codificante del gen de la glucocinasa y no se identificó ninguna variante alélica que pudiera tener efecto funcional en las pacientes con DG. Estos resultados se suman a dos estudios previos en nuestro laboratorio donde no se han identificado mutaciones en el gen de la glucocinasa en pacientes con DMT2. En 22 familias mexicanas con diabetes tipo MODY y DMT2 de inicio temprano (edad de inicio de la enfermedad entre 20-40 años), no se encontraron mutaciones en los 12 exones y las regiones exón-intrón del gen de la GCK (del Bosque y cols., 1997). El mismo resultado se obtuvo cuando se analizaron los exones 4 y 7 del gen de la GCK en 40 pacientes mexicanos con DMT2 de inicio temprano y alteración en la secreción de insulina (Aguilar y cols., 2001).

También en población mexico-americana los resultados han sido muy parecidos; mediante estudios de estudios de ligamiento genético en 50 familias se determinó que el gen de glucocinasa no es un gen que contribuya al desarrollo de DMT2 (Stern y cols., 1996). Los datos anteriores en conjunto

con este trabajo sugieren que el gen glucocinasa no participa en el desarrollo de la DMT2 en nuestra población, ni parece ser un gen de susceptibilidad para la DG.

Debido a los resultados obtenidos, es de considerable importancia el estudio de otros genes candidato que pudieran estar relacionados con el desarrollo de DG en población mexicana, sobre todo aquellos que participan como genes principales en el desarrollo de Diabetes tipo MODY y DMT2.

Recientemente en nuestro laboratorio se estudiaron otros genes tipo MODY tratando de buscar asociación con el desarrollo de la DG: el gen de HNF-1 α y el gen de IPF-1. Ambos genes codifican para factores de transcripción que regulan la expresión de genes que participan en la homeostasis de la glucosa como el gen de la insulina, el gen del GLUT-2 y el gen de la GCK entre otros. Este estudio demostró que no existen alteraciones en la región codificante de estos genes relacionados al desarrollo de la DG (datos no publicados).

Otro de los genes candidatos a estudiar es el de la calpaina; a este gen lo han relacionado con el desarrollo de la DMT2 en población mexicana y mexico-americana. El haplotipo 112/121 del gen de la calpaina se ha asociado con riesgo de desarrollar DMT2 en mexico-americanos (Horikawa y cols; 2000). También el SNP-44, que se encuentra en perfecto desequilibrio de ligamiento con la mutación T504A, se ha asociado con riesgo de DMT2 en mexico-americanos y británicos (del Bosque-Plata y cols., 2003; Evans y cols., 2001).

Experimentalmente, se ha demostrado que la isoforma 10 de calpaina (calpaina 10) tiene un doble papel en la regulación de la homeostasis de glucosa. En líneas celulares de adipocito se ha visto que calpaina 10 participa en la translocación del GLUT4 hacia la membrana plasmática (Paul y cols., 2003), y en la célula β pancreática participa en la exocitosis de los gránulos de la insulina (Sreenan y cols., 2001; Zhou y cols., 2003). De tal manera que calpaina 10 no sólo participa en la secreción de insulina, sino que además favorece la respuesta de esta hormona en sus células blanco.

Como ya hemos descrito, en la DG existe una disminución tanto en la secreción de la insulina como en la sensibilidad de la hormona; por lo que consideramos que el estudio del gen de la calpaina puede ser de gran interés para definir el componente genético de la DG.

CONCLUSIONES

- Se localizó el cambio de secuencia TAC→TAT, en la región codificante del gen de la GCK, en una paciente con DG, esta modificación no se traduce en un cambio de aminoácido (Tyr215Tyr).
- Los polimorfismos del gen de la GCK: IVS9 +nt8 C>T y (-30) G>A son variantes alélicas comunes en la población mexicana.
- Estos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, pero no se relacionan con el desarrollo de la DG.
- El gen de la GCK no participa como gen de susceptibilidad para el desarrollo de DG en la población mexicana.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la contribución de genes de susceptibilidad para la DMT2 en el desarrollo de la DG en nuestra población.
- Analizar inicialmente la participación del SNP-44 del gen de la calpaina en el desarrollo de la DG.
- Evaluar si el haplotipo 112/121 del gen de la calpaina, generado a partir de los polimorfismos 43, 19 y 63, es un haplotipo de riesgo para el desarrollo de DG en la muestra seleccionada.

REFERENCIAS

- 1) Åberg A E B, Jonsson E K, Eskilsson , Ladin-Olsson M and Frid A H. Predictive factors of developing diabetes mellitus in women with gestational diabetes *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 2002; 81: 11–6.
- 2) Aguilar S C A, Reyes R E, Ordóñez S M L, Arellano T M, Ramírez J S, Domínguez L A, Martínez F J R, Velasco P M L, Alpizar M, García G E, Gómez P F, Rull J, and Tusié L M T. Early-Onset Type 2 Diabetes: Metabolic and Genetic Characterization in the Mexican Population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 220 – 6.
- 3) American College of Obstetricians and Gynecologists: Diabetes and Pregnancy. ACOG Technical Bulletin 1994; 200.
- 4) American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27 (Suppl. 1) S5-10.
- 5) American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27 (suppl. 1) S88-90.
- 6) Anastasiou E, Alevizaki M, Grigorakis S. J, Philippou G, Kyprianou M, Souvatzoglou A. Decreased stature in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 1998; 41: 997-1001.
- 7) Ashcroft F M, Proks P, Smith P A, Ammala C, Bokvist K, Rorsman P. Stimulus-secretion coupling in pancreatic [beta]-cells. *Journal of Cell Biochemistry* 1994; 55 (Suppl. 1):54-65.
- 8) Banerji M, Lebovitz H: Insulin sensitive and insulin resistant variants in IDDM. *Diabetes* 1989; 38: 784–92.
- 9) Bano G, Rodin D A, White A, O'Rahilly S, and Nussey S S. Is the defect in pro-hormone processing in Type 2 diabetes mellitus restricted to the b cell? *Diabetic Medicine* 2001; 18: 17-21.
- 10) Bell G I, Pilakis S J, Weber I T, Polonsky K S. Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annual Review of Physiology* 1996; 58: 171-86.
- 11) Benjamin E, Winters D, Mayfield J and Gohdes D. Diabetes in pregnancy in Zuni Indian women. Prevalence and subsequent development of clinical diabetes after gestational diabetes *Diabetes Care* 1993; 16: 1231- 35.
- 12) Bergholm R, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Tamminen M, Teramo K, Rissanen A, Yki-Jarvinen H. Lowering of LDL Cholesterol Rather Than Moderate Weight Loss Improves

Endothelium-Dependent Vasodilatation in Obese Women With Previous Gestational Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:1667–172.

- 13) Bo S, Menato G, Lezo A, Signorile A, Bardelli C, Michieli F, De Massobrio M, Pagano G. Dietary fat and gestational hyperglycaemia. *Diabetologia* 2001; 44: 972-8.
- 14) Boloker J, Gertz S J, Simmons R A. Gestational Diabetes leads to the development of diabetes in Adulthood in the Rat. *Diabetes* 2002; 51: 1499-506.
- 15) Branchtein L, Schmidt M. I, Matos M.C.G, Yamashita T, Pousada J.M.D.C, Duncan B.B. Short stature and gestational diabetes in Brazil. *Diabetologia* 2000; 43: 848-51.
- 16) Brelje T C, Parsons J A, and Sorenso R L. Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets *Diabetes* 1994; 43: 263 - 73.
- 17) Brelje T C, Scharp D W, Lacy P E, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen H G, Sorenson R L. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 1993; 132: 879–87.
- 18) Buchanan T A and Xian A H. Gestational Diabetes mellitus. *Science in medicine. The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115 (3) 485-91.
- 19) Buchanan T A, Metzger B E and Freinkel N. Accelerated starvation in late pregnancy: a comparison between obese women with and without gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990; 162(4): 1015-20.
- 20) Buchanan T A, Metzger B E, Freinkel N, and Bergman R N. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990; 162(4): 1008-14
- 21) Buchanan T A, Xiang A H, Kjos S L, Trigo E, Lee W P, Peters R K. Antepartum Predictors of the Development of Type 2 Diabetes in Latino Women 11-26 Months After Pregnancies Complicated by Gestational Diabetes [Pathophysiology]. *Diabetes* 1999; 48 (12) 2430-6.
- 22) Buchanan T A, Xiang A H, Tan S, Peters R, Trigo E., Kjos S L, Lee W P, Azen S, Comparison of Antepartum and Early Postpartum Characteristics as Predictors of Type 2 Diabetes Following Gestational Diabetes in Latino Women. *Diabetes* 1999; 48 (Suppl 1) A65.

- 23) Buchanan T A, Xiang A H, Peters R K. Preservation of pancreatic β cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistant in high risk Hispanic women. *Diabetes* 2002; 51: 2796-803.
- 24) Buchanan T A. Pancreatic B-Cell Defects in Gestational Diabetes: Implications for the Pathogenesis and Prevention of Type 2 Diabetes *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86 (3) 989-93.
- 25) Buchanan T, Catalano P. The pathogenesis of GDM: implication for diabetes after pregnancy. *Diabetes Reviews* 1995; 3: 584-601.
- 26) Burke CW and Roulet F. Increased exposure of tissues to cortisol in late pregnancy. *British Medical Journal* 1970; 1 (697) 657-9.
- 27) Butte N F, Wong W W, Treuth M S, Ellis K J and Smith E O'Brian. Energy requirements during pregnancy based on total energy expenditure and energy deposition^{1, 2, 3, 4}. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79:1078-87.
- 28) Byrne M M, Sturis J, Clement K, Vionnet N, Pueyo M E, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Cohen D, Bell G I, Velho G, Froguel P, Polonsky K. S. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93: 1120-30.
- 29) Cabrera G; German M S, Matschinsky M. F, Wang J; Fernandez-Mejia C. Effect of Retinoic Acid on Glucokinase Activity and Gene Expression and on Insulin Secretion in Primary Cultures of Pancreatic Islets. *Endocrinology* 1999; 140 (7) 3091-6.
- 30) Carey D G, Jenkins A b, Campbell L V, Freund J, Chisholm D J: Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women- direct measurements reveal a strong relationship in subjects at low and high risk of NIDDM. *Diabetes* 1996; 45: 633-9.
- 31) Carol-Beth Book and Andrea Dunaif. Selective Insulin Resistance in the Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 3110 - 6.
- 32) Carpenter M W, Coustan D R. Criteria for screening test for gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1982; 144: 763-73.
- 33) Carr D B, Gabbe S. Gestational diabetes: detection, management, and implications. *Clinical Diabetes* 1998; 13 (1) 187-94.

- 34) Caruso A, Ferrazzani S, De Carolis S, Lucchese A, Lazone A, and Paradisi G. Carbohydrate Metabolism in Gestational Diabetes: Effect of Chronic Hypertension. *Obstetrics & Gynecology* 1999; 94: 556–61
- 35) Catalano P M, Nizielski S E, Shao J, Preston L, Qiao L and Friedman J E. Downregulated IRS-1 and PPAR γ in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2002; 282: E522–33.
- 36) Catalano P M, Tyzbir E D, Roman N M, Amini S B, Sims E A H. Longitudinal changes in insulin resistance in nonobese pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1991; 165: 1667-72.
- 37) Catalano P M, Tyzbir E D, Wolfe R R, Calles J, Roman N M, Amini S B, and Sims E A. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational. *American Journal Physiology-Endocrinology and Metabolims* 1993; 264: 60 - 7.
- 38) Catalano P, Drago N, Highman T, Huston L, and Kalhan S. Longitudinal changes in amino acid insulin sensitivity during pregnancy. *Journal of Society Gynecology Investigation*. 1996; 3 (Suppl, 2). Abstract 145: 131A.
- 39) Cetin I, Nobile de Santis M S, Taricco E, Radaelli T, Teng C, Ronzodi S, Spada E, Milani S, Pardi G. Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; 192: 610-7.
- 40) Chen Y, Liao W X, Roy A C, Loganath A, Ng S C. Mitochondrial gene mutations in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2000; 48: 29–35.
- 41) Cheng L C, and Salmon Y M. Are the WHO (1980) criteria for the 75 g oral glucose tolerance test appropriate for pregnant women? *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1993; 100 (7): 645-8.
- 42) Cheung N W, Bytn K. Population Health Significance of Gestational Diabetes. *Diabetes Care*; 2003 26: 2005-9.
- 43) Chiu KC, Tanizawa Y, Permutt MA. Glucokinase gene variants in the common form of NIDDM. *Diabetes*. 1993; 42 (4): 579-82.
- 44) Choo-Kang A.T.W, Lynn S, Taylor G. A, Daly M E, Sihota S.S, Wardell T, Chinnery P.F, Turnbull D. M, Walker M. Defining the importance of Mitochondrial Gene Defects in

- Maternally Inherited Diabetes by sequencing the Entire Mitochondrial Genome. *Diabetes* 2002; 51: 2317-20.
- 45) Coustan D R, Nelson C, Carpenter M W, Carr S R, Rotondo L, and Widness J A. Maternal age and screening for gestational diabetes: a population-based study. *Obstetrics & Gynecology* 1989; 73: 557-61.
 - 46) Cuesta A L, Huopio H, Otonkoski T, Gomez-Zumaquero J M, Nanto-Salonen K, Rahier J, Lopez S, Garcia M A, Sanz P, Soriguer F C, Laakso M. Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes*. 2004 Aug; 53 (8): 2164-8.
 - 47) Dalfrà MG, Lapolla A, Masin M, Giglia G, Dalla Barba B, Toniato R, Fedele D. Antepartum and early postpartum predictors of type 2 diabetes development in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism* 2001; 27 (6) 675-80.
 - 48) DeFronzo R A, Bonadonna R C, Ferrannini E, Pathogenesis of NIDDM. *Diabetes Care* 1992; 15: 318-68.
 - 49) Del Bosque P L, García G E, Ramírez J S, Cabello V J, Riba L, Gómez LA, Vega J G, Altamirano B N, Calzada L R, Robles V C, Mendoza M F, Curiel P O, Tusié L M T. Analysis of Glucokinase Gene in Mexican Families Displaying Early-Onset Non-Insulin-Dependent-Diabetes Mellitus Including MODY Families. *American Journal of Medical Genetics* 1997; 72: 387-93.
 - 50) del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas C A, Tusié-Luna M T, Ramirez-Jimenez S, Rodriguez-Torres M, Auron-Gomez M, Ramirez E, Velasco-Perez M L, Ramirez-Silva A, Gomez-Perez F, Hanis C L, Tsuchiya T, Yoshiuchi I, Cox N J, and Bell G I. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004; 81(2): 122-6.
 - 51) Desoye G, Schweditsch M O, Pfeiffer K P, Zechner R and Kostner GM. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1987; 64: 704-12.
 - 52) Detimary P, Dejonghe S, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F, Henquin JC: The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in [beta]-cells but not in [alpha]-cells, and are also observed in human islets. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 33905-8.
 - 53) Diamond J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003; 423 599-602.

- 54) Dorhorst A. Acomparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2001; 18 (suppl 3) 12-4.
- 55) Dornhorst A., Rossi M. Risk and Prevention of Diabetes in Womem with Gestational Diabetes (1998). *Diabetes Care* (Suppl. 298) B43.
- 56) Dunaif A, Xia J, Book C B, Schenker E, Tang Z. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle: a potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96: 801-10.
- 57) Elbein S C, Chu W, Ren Q, Henphill C, Schay J, Cox N J, Hanis C L, Hasstedt S J. Role of Calpain-10 Gene Variants in Familial Type 2 Diabetes in Caucasians. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 650-4.
- 58) Ellard S, Beards F, Allen L I S, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R, Hattersley AT. A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria *Diabetologia* 2000 43: 250-3.
- 59) Evans J C, Frayling T M, Cassell P G, Saker P J, Hitman G A, Walker M, Levy J C, O'Rahilly S, Rao P V, Bennett A J, Jones EC, Menzel S, Prestwich P, Simecek N, Wishart M, Dhillon R, Fletcher C, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Ellard S, McCarthy MI, Hattersley AT. Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *American Journal of Human Genetics*. 2001; 69 (3): 544-52.
- 60) Fajans S S, Bell G I. and Polonsky K S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of Maturity-onset diabetes of the young. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345 (13) 971-9.
- 61) Farrel T, Neale L and Cundy T. Congenital anomalies in offspring of women with Type 1, Type 2 and gestational diabetes. *Diabetic Medicine* 2002; 19: 322-6.
- 62) Feling P, kin Y C, Lynch V, Hendler R. Amino acid metabolism during starvation in human pregnancy: *journal of clinical investigation* 1972; 51: 1195-98.
- 63) Fernandez C, Vega J, Rojas A, Rodríguez M, Romero G, Matschinsky F M, Wang J, German M S. Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Increases Pancreatic Glucokinase Activity and Gene Expression. *Endocrinology* 2001; 142: 1448-52

- 64) Fingerlin T E, Erdos M R, Watanabe R M, Wiles K E, Stringham H M, Mohlke K L, Silander K, Valle T T, Buchanan T A, Tuomilehto J, Bergman R N, Boehnke M, and Collins F S. Variation in Three Single Nucleotide Polymorphisms in the Calpain-10 Gene Not Associated With Type 2 Diabetes in a Large Finnish Cohort. *Diabetes* 2002; 51: 1644–8.
- 65) Fisher PM, Sutherland HW, Bewsher PD. Insulin response to glucoseinfusion in gestational diabetes. *Diabetologia* 1980; 19: 10–4.
- 66) Forsbach G, Contreras J J, Fong G, Flores G, Moreno O. Prevalence of gestational diabetes and macrosomic newborns in a Mexican population. *Diabetes Care* 1988; 11 (3) 235-8.
- 67) Fowden A L. The role of insulin in prenatal growth. *Journal of Development Physiology* 1989; 12: 173-82.
- 68) Freinkel N, Metzger BE, Phelps RL, et al. Gestational diabetes mellitus: heterogeneity of maternal age, weight, insulin secretion, HLA antigens, and islet cell antibodies and the impact of maternal metabolism on pancreatic B-cell function and somatic growth in the offspring. *Diabetes*. 1985 34 (Suppl 2) 1–7.
- 69) Friedman J E, Ishizuka T, Huston L, Highman T, Shao JH, Catalano P,: Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1807-14.
- 70) Gaither K, Quraishi A N, Illsley N P. Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999; 84: 695–701.
- 71) Gauguier D, Bihoreau M T, Ktorza A, Berthault M F and Picon L. Inheritance of Diabetes Mellitus as Consequence of gestational Hyperglycemia in Rats. *Diabetes* 1990; 39: 734-9.
- 72) Gerbitz K D, Gempel K. Mitochondria and diabetes: Genetic Biochemical and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 1996; 45: 113-26.
- 73) Giorgino F, Almahfouz A, Goodyear LJ, and RJ Smith. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. *Journal of Clinical. Investigation* 1993; 91(5): 2020-30.
- 74) Girman D. The use of PCR-based single-stranded conformation polymorphism analysis (SSCP-PCR) in conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, 1996 (eds Smith T B, Wayne R K), Oxford University Press, Oxford. pp. 167-82.

- 75) Giudice L C, Zegher F, Gargosky S E, Dsupin B A, et all. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 80: 1548-55.
- 76) Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, M.D, Buchs A, Stanley C A, Thornton P S, Permutt M A, Matschinsky F M, and Herold K C. Familial Hyperinsulinism Caused by an Activating Glucokinase Mutation. *New England Journal of Medicine* 1998; 338 (49) 226-30.
- 77) Gloyn A L, Noordam K, Willemsen M, Ellard S, Lam W, Campbell I W, Midgley P, Shiota C, Buettger C, Magnuson M A, Matschinsky F M, Hattersley A T. Insights Into the Biochemical and Genetic Basis of Glucokinase Activation From Naturally Occurring Hypoglycemia Mutations. *Diabetes* 2003; 52: 2433-40.
- 78) Gloyn A L, Odili S, Zelent D, Buettger C, Castleden H A, Steele A M, Stride A, Shiota C, Magnuson M A, Lorini R, d'Annunzio G, Stanley C A, Kwagh J, van Schaftingen E, Veigada-Cunha M, Barbetti F, Dunten P, Han Y, Grimsby J, Taub R, Ellard S, Hattersley A T, Matschinsky F M. Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (14): 14105-13.
- 79) Gloyn A L. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: Maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Human Mutation* 2003; 22 (5) 353 -62.
- 80) Glueck C J, Goldenberg N, Streicher P, Wang P. The contentious nature of gestational diabetes: diet, insulin, glyburide and metformin. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2002; 3 (11) 1557-68.
- 81) Gómez P, Roopa M. Genetic of beta cell function: (MODY) Application of Molecular Biology to Clinical Medicine. *Revista de Investigación Clínica* 2003; 55 (2) 172-6.
- 82) Goodarzi M O, Taylor K D, Guo X, Quiñones M J, Cui J, Li Y, Saad M J, Yang H, Hsueh W A, Hodis H N, and Rotter J I. Association of the Diabetes Gene Calpain-10 With Subclinical Atherosclerosis: The Mexican-American Coronary Artery Disease Study. *Diabetes* 2005; 54: 1228 - 32.

- 83) Gragnoli C, Cockburn B N, Chiaramonte F, Gorini A, Marietti G, Marozzi G, Signorini A M. Early-onset Type II diabetes mellitus in Italian families due to mutations in the genes encoding hepatic nuclear factor 1 alpha and glucokinase. *Diabetologia*. 2001; 44(10):1326-9.
- 84) Grigorakis S I, Alevizaki M, Beis C, Anastasiou E, Alevizaki CC, and Souvatzoglou A, Grigorescu F, Flier J S, Kahn C R. Characterization of binding and phosphorylation of erythrocyte IRs in type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 1986; 35: 127-38.
- 85) Grumbach M. M, Kaplan S. L, Vinik A. hCS physiology: hormonal effects. In: Berson, S. A.; Yalow, R. S. *Peptide Hormones*. New York: Elsevier/North Holland (pub.) 2B 1973. Pp. 797-819.
- 86) Grupo de estudio sobre Diabetes Mellitus. Diabetes y Embarazo. Importancia Diagnóstica. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS* 1992; 30: 35-9.
- 87) Haddad L, Evans J C, Gharani N, Robertson C, Rush K, Wiltshire S, Frayling T M, Wilkin T J, Demaine A, Millward A, Hattersley A T, Conway G, Cox N J, Bell G I, Franks S, and McCarthy M I. Variation within the Type 2 Diabetes Susceptibility Gene Calpain-10 and Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 2606–10.
- 88) Hales C N, Barker D J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35: 595-601.
- 89) Hannemann M. M, Liddell W. G, Shore A. C, Clark P. M, Tooke J. E. Vascular Function in Women with Previous Gestational Diabetes mellitus. *Journal of Vascular Research* 2002; 39: 311–19.
- 90) Hattersley A T, Beards F, Ballantyne E, Appleton M, Harvey R, Ellard S. Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. *Nature Genetics* 1998; 19 : 268-70.
- 91) Hay W W. Placental transport of nutrients to the fetus. *Hormone Research* 1994; 42: 215-22.
- 92) Heimberg H, De Vos A, Moens K, Quartier E, Bouwens L, Pipeleers D, Van Schaftingen E, Madsen O, Schuit F. The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing alpha-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 7036-41.
- 93) Hernández A. M, Olaíz F. G. La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública. *Ciencia* 2002; 53 (3) 8-17.

- 94) Hernández M y Zárate A. El peso fetal al nacimiento como factor de riesgo predisponerte para diabetes tipo 2 en la vida adulta. *Ginecología y Obstetricia de México* 2001; 69: 390-8.
- 95) Holemans K, Aerts L, Van Assche F A. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *Journal of Physiology* 2003; 547.1: 11-20.
- 96) Holte J, Gennarelli G, Wide L, Lithell H, and Berne C. High Prevalence of Polycystic Ovaries and Associated Clinical, Endocrine, and Metabolic Features in Women with Previous Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 1143-50.
- 97) Horikawa Y, Oda N, Cox N J, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner T H, Mashima H, Schwarz P E H, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier L J, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis C L, Bell GI 2000 Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 2000; 26:163-75.
- 98) Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y Itoh M, and Takeda J. 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* 2003; 88: 244-7.
- 99) Hormonal parameters in gestational diabetes mellitus during the third trimester: high glucagon levels. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2000; 49 (2) 106-9
- 100) Illsley N P. Placental Glucose Transport in Diabetic Pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2000; 43 (1) 116-26.
- 101) Iynedjian P B, Jotterand D, Nouspikel T, Asfari M. , and Pilot P R. Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 21824-9.
- 102) Iynedjian P, Gjinovci A, and Renold A E. Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263: 740-4.
- 103) Jetton T L, Liang Y, Pettepher C C, Zimmerman E C, Cox F G, Horvath K, Matchinsky F M, Magnuson M A. Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase In rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 3641-54.
- 104) Johnson J. H, Newgard C B, Milburn J L, Lodish H F, and Thorens B. The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of

- liver and has an identical primary sequence. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 6548-51.
- 105) Jones C W. Gestational diabetes and its impact on the neonate. *Neonatal Network* 2001; 20 (6) 17-22.
- 106) Jovanovic L, Ilic S, Pettitt D, et al. The metabolic and immunologic effects of insulin lispro. *Diabetes Care*. 1999; 22: 1422-7.
- 107) Jovanovic L, Pettitt D J. Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of American Medical Association* 2001; 286 (20) 2516-18.
- 108) Kalhan S C, Devapatla S. Pregnancy, insulin resistance and nitrogen accretion. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 1999; 2 (5) 359-363.
- 109) Kalhan S, Rossi K, Gruca L, Burkett E, and O'Brien A. Glucose Turnover and Gluconeogenesis in Human Pregnancy. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100(7) 1775-1781.
- 110) Kalkoff R H, Kissedah A H, Kim H J. Carbohydrate and lipid metabolism during normal pregnancy: relationship to gestational hormonal action. In: Merkatz I R, Adam P A y cols. *The diabetic pregnancy a perinatal perspectiva*. New Cork: Grune & Stratton, 1979: 3-21.
- 111) Kim H, Cha J Y, Kim S Y, Kim J, Roh K J, Seong J K, Lee N M, Choi K Y, Kim K S, Ahn Y. Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor- γ Upregulates Glucokinase Gene Expression in β -Cells *Diabetes* 2002; 51:676-85.
- 112) Kim S Y, Kim H I, Park S K, Im S S, Li T, Cheon H G, Ahn Y H. Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1:S66-70.
- 113) Kjos S L, Buchanan T A. Gestational Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341 (23) 1749-56.
- 114) Knoop R H, Montes A, Childs M, Li J R. Metabolic adjustments in normal and diabetic pregnancy : *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1981; 24: 21-49.
- 115) Kousta E, Cela E, Lawrence N J, Penny A, Millauer B A, White D M, Wilson H, Robinson S, Johnston D G, McCarthy M I, Franks S. The Prevalence of Polycystic Ovaries in Women With a History of Gestational Diabetes. *Obstetrical & Gynecological survey* 2001; 56 (3) 150-1.

- 116) Kousta E, Ellard S, Allen L I S, Saker P J, Huxtable S J, Hattersley A T, McCarthy M L. Glucokinase mutations in a phenotypically selected multiethnic group of women with a history of gestational diabetes. *Diabetes. Diabetic Medicine* 2001; 18: 683-7.
- 117) Kowalczyk M, Ircha G, Zawodniak M, Cypryk K, Wilczynski. Psicomotor Development in Children of Mothers with type I Diabetes Mellitus or Gestational Diabetes mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2002; 15: 277-81.
- 118) Kraegen E W, Cooney G J, Ye J M, Thompson A L, Furler S M. The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity. *Endocrinology and diabetes* 2001; 109 (Supl 2) S189-201.
- 119) Kuhl C, Andersen G E, Hertel J, Molsted L. Metabolic events in infants of diabetic mothers during first 24 hours after birth. *Acta Paediatr Scand* 1982; 71: 19-25.
- 120) Kuhl C, Holst JJ. Plasma glucagon and the insulin: glucagon ratio in gestational diabetes. *Diabetes* 1976; 25: 16 -23.
- 121) Kukita Y, Tahira T, Sommer SS and Hayashi. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Human mutation* 1997; 10: 400-40.
- 122) Kumakura S, Maddux B A, Sung C K: Overexpression of membrane glycoprotein PC-1 can influence insulin action at a post-receptor site. *Journal of Cell Biochemistry* 1998; 68: 366-77.
- 123) Kusari J, Kenner K A, Suh K I, Hill D E, Henry R R. Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase activity and tyrosine phosphatase 1B protein content are associated with insulin action and resistance. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 1156-62.
- 124) Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, Kuusisto J, Mykkanen L, Deeb SS. Glucokinase gene variants in subjects with late-onset NIDDM and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 1995; 18 (3): 398-400.
- 125) Langer O, Brustman L, Anaegbunam A, Mazze R. The significance of one abnormal glucose tolerance test value on adverse outcome in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1987; 157: 758-63.
- 126) Langer O, Yogeve Y, Xenakis E and Rosenn B. Insulin and glyburide therapy: Dosage, severity level of gestational diabetes, and pregnancy outcome. *American journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; 192: 134-9.

- 127) Lauszus FF, Rasmussen OW, Henriksen JE, Klebe JG, Jensen L, Lauszus KS and Hermansen K. Effect of a high monounsaturated fatty acid diet on blood pressure and glucose metabolism in women with gestational diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Nutrition* 2001; 55: 436-43.
- 128) Lazalde B, Sánchez R, García J E, Ramírez M L. Diabetes mellitus gestacional y malformaciones congénitas. *Ginecología y obstetricia de México* 2001; 69: 399-405.
- 129) Le Roith D and Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001; 24 (3) 71-82
- 130) Leighton B, Atkinson A, Coghlan MP. Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33 (Pt 2) 371-4.
- 131) Leipold H, Knöfler M, Gruber C, Haslinger P, Bancher-Todesca D, and Worda C. Calpain-10 Haplotype Combination and Association With Gestational Diabetes Mellitus. *Obstetrics and Gynecology* 2004; 103: 1235 – 40.
- 132) Li D F, Wong V C, O'Hoy K M, and Ma H K. Evaluation of the WHO criteria for 75 g oral glucose tolerance test in pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1987; 94 (9): 847-50.
- 133) Liu Z, Deng H, Tang W L. Mutation of GCK gene of Chinese patients with late-onset type 2 diabetes *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2003; 28 (2): 99-101.
- 134) Macfarlane W M, Frayling T M; Ellard S, Evans J C, Allen L I S, Bulman M P, Ayres S, Shepherd M, Clark P, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Docherty K and Hattersley A T. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104: R33-R39.
- 135) Macneill S, Dodds L, Hamilton D C, Armson B A, Vandenhof M Rates and Risk Factors for Recurrence of Gestational Diabetes. *Diabetes Care*; 2001 24: 659–62.
- 136) Maddux B A, Goldfine I D. Membrane Glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 2000; 49: 13-9
- 137) Magnuson M A, Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* 1990; 39 (5) 523-7.
- 138) Magnuson M. A, Andreone T L, Printz R L, Koch S, and Granner D K. Rat glucokinase gene: Structure and regulation by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86: 4838-42.

- 139) Marotta D E, Anand G R, Anderson T A, Miller S P, Okar D A, Levitt D G, Lange A J. Identification and characterization of the ATP-binding site in human pancreatic glucokinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005; 436 (1): 23-31.
- 140) Marx J. The puzzle of complex diseases. Untraveling the causes of Diabetes. *Science* 2002; 296 686-9.
- 141) Maternal serum, amniotic fluid and cord leptin levels at term: their correlations with fetal weight *Journal of Perinatal Medicine* 2004; 32: 266–71.
- 142) Matschinsky F M, and Bedoya. F. Metabolism of pancreatic islets and regulation of insulin glucagon secretion. *Endocrinology* 1989; 2: 12990-13003.
- 143) Matschinsky F; Liang Y; Kesavan P, Wang L, Froguel P Velho G, Cohen D, Permutt M A, Tanizawa Y, Jetton T L, Niswender K, Magnuson M. A Glucokinase as Pancreatic Beta Cell Glucose Sensor and Diabetes Gene. *Clinical Investigation* 1993; 92(5):2092-8.
- 144) Matschinsky M F; Glaser B, Magnuson M. A Pancreatic beta-Cell Glucokinase: Closing the Gap Between Theoretical Concepts and Experimental Realities. *Diabetes* 1998; 47 (3) 307-15.
- 145) McLellan JAS, Barrow B A, Levy J C, Hammersley M S, Hattersley A T, Gillmer MDG, Turner R C: Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in parents of women with gestational diabetes. *Diabetologia* 1995; 38: 693-8.
- 146) Mestman J H: Outcome of diabetes screening in pregnancy and perinatal morbidity in infants of mothers with mild impairment in glucose tolerance. *Diabetes Care* 1980; 3:447-52.
- 147) Metzger B E, Coustan D R. Summary and Recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21 (Suppl.2) 161B-7B.
- 148) Metzger BE. Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes* 1991; 40 (suppl 2) 197-201.
- 149) Mishra S K, Helms C, Dorsey, D, Permutt M A, Donis-Keller H. A 2-cM genetic linkage map of human chromosome 7p that includes 47 loci. *Genomics* 1992; 12: 326-34.
- 150) Moates J M, Shelton K D, and Magnuson M A. Characterization of the Pal Motifs in the Upstream Glucokinase Promoter: Binding of a Cell Type-Specific Protein Complex Correlates with Transcriptional Activation. *Molecular Endocrinology* 1996 10: 723-31.

- 151) National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039 -57.
- 152) Nelson T, Schulman G, Granger D, et al. Progesterone administration induced impairment of insulin suppression of hepatic glucose production. *Fertility and Sterility* 1994; 62: 491-6.
- 153) Nichols C G, Shyng S L, Nestorowicz A, Glaser B, Clement J P 4th, Gonzales G, Aguilar-Bryan L, Permutt M A, Bryan J. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 1996; 272: 1785-7.
- 154) Njolstad P R, Sovik O, Cuesta-Munoz A, Bjorkhaug L, Massa O, Barbetti F, Undlien D E, Shiota C, Magnuson M A, Molven A, Matschinsky F M, Bell G I. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *New England Journal of Medicine* 2001; 344: 1588-92.
- 155) Nobile de Santis MS, Radaelli T, Taricco E, Bertini S, and Cetin I. Excess of amniotic fluid: pathophysiology, correlated diseases and clinical management. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 2004; 75 (Suppl 1) 53-5.
- 156) O'Sullivan J B. Diabetes mellitus after GDM. *Diabetes* 1991 ; 40 (Suppl. 2) 131-5.
- 157) O'Sullivan J, Mahan C. Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes* 1964; 13: 278-85.
- 158) Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiyama R, Asano T, Urae A, and Ono J. Mitochondrial Gene Mutations in the tRNA^{Leu(UUR)} Region and Diabetes: Prevalence and Clinical Phenotypes in Japan. *Clinical Chemistry* 2001; 47 (9) 1641-8.
- 159) Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, López P, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto Nacional de Salud Pública, 2003.
- 160) Orita M, Iwahana H, Zanakawa H, Hayashi K, Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis an single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86: 2766-70.
- 161) Owen K, Hattersley A. Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 15 (3) 309-23.

- 162) Paradisi G, Biaggi A, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy. Association with endothelial dysfunction. *Diabetes Care* 2002; 25: 560-64.
- 163) Parsons J A, Brelje T C, and Sorenson R L. Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: Increased Islet Cell Proliferation and Insulin Secretion Correlates with the Onset of Placental Lactogen Secretion. *Endocrinology* 1992; 130 (3) 1459-66.
- 164) Paul D S, Harmon A W, Winston C P, Patel Y M: Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochemical Journal* 2003; 376:625–32.
- 165) Paul Zimmet, K.G.M.M. Alberti & Jonathan Shaw. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, Vol. 414, december 2001: 782-7.
- 166) Pendegross M, Fazoni E, DeFronzo R. NIDDM and GDM: same disease, another name? *Diabetes Reviews* 1995; 3: 566-83.
- 167) Pepe G J and Albrecht E D. Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocrine Reviews* 1995; 16: 608 - 48.
- 168) Petersen H V, Serup P, Leonard J, Michelsen B K and Madsen O D. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF-1 acting through the CT boxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 10465-9.
- 169) Petersen J S, Dyrberg T, Damm P, Kuh C, Mølsted-Pedersen L, Buschard K. GAD65 autoantibodies in women with gestational or insulin dependent diabetes mellitus diagnosed during pregnancy. *Diabetologia* 1996; 39: 1329–33.
- 170) Pettitt D J, Aleck K A, Baird H R, Carraher M J, Bennett P H, Knowler W C. Congenital Susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine Enviromental. *Diabetes* 1988; 37: 622-8.
- 171) Pilkis S J, Weber I T, Harrison R W, Bell G I: Glucokinase: structural analysis of a protein involved in susceptibility of diabetes. *Journalof Biological Chemistry* 1994; 269:21925-8.
- 172) Pocio F and McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and Inmunity* 2002; 3: 235-49.
- 173) Pontoglio M, Prié D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M and Friedlander G. HNF1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man, *European Molecular Biology Organization, Reports* 2000; 1 (4): 359-65.

- 174) Prentice A M and Goldberg G R. Energy adaptations in human pregnancy: limits and long-term consequences 1-3. *American Journal Clinical Nutrition* 2000; 71 (suppl) 1226S-32S.
- 175) Prentice A M and Goldberg G R. Energy adaptations in human pregnancy: limits and long-term consequences 1-3 *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71(suppl) 1226S-32S.
- 176) Randle P J, Garland P B, Hales C N, Newsholme E A. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* i 1963; 785-9.
- 177) Reaven GM, Bernstein R, Davis B, Olefsky JM. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *American Journal of Medicine* 1976; 60: 80-8.
- 178) Regnault T R, Marconi A M, Smith C H, Glazier J D, Novak D A, Sibley C P, Jansson T. Placental amino acid transport systems and fetal growth restriction - A workshop report. *Placenta*. 2005; 26 Suppl S76-80.
- 179) Rhee K-H, Stier G, Becker P B, Suck D and Sandaltzopoulos R. The Bifunctional Protein DCoH Modulates interactions of the Homeodomain Transcription Factor HNF1 with Nucleic Acids, *J.Mol. Biol.*1997; 265: 20-9.
- 180) Richelsen B, Pendersen S B, Moller-Pendersen T, Bak J F. Regional differences in triglyceride break-down in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E2. *Metabolism* 1991; 40: 990-6.
- 181) Rissanen J, Markkanen A, Karkkainen P, Pihlajamaki J, Kekalainen P, Mykkanen L, Kuusisto J, Karhapaa P, Niskanen L, and Laakso M. Sulfonylurea receptor 1 gene variants are associated with gestational diabetes and type 2 diabetes but not with altered secretion of insulin. *Diabetes Care* 2000; 23: 70 - 3.
- 182) Roach P, Zick Y, Formisano P, Accili D, Taylor S I, Gorden P. A novel human IR gene mutation uniquely inhibits insulin binding without impairing posttranslational processing. *Diabetes* 1994; 43: 1096-102.
- 183) Robinson S, Walton R J, Clark P M, Barker D, Hales C N, Osmond C. The relation of fetal growth to plasma glucose in young men. *Diabetologia*1992; 35: 444-6.
- 184) Rodrigues S, Robinson E J, Ghezzi H, and Gray-Donald K. Interaction of body weight and ethnicity on risk of gestational diabetes mellitus 1-3. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 70: 1083-9.

- 185) Ryan E A, Enns L. Role of Gestational Hormones in Induction of Insulin Resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1988; 67 (2): 341-7.
- 186) Ryan EA, O'Sullivan MJ, and Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* 1985; 34: 380 – 389
- 187) Sacks D A, Greenspoon J S, Abu-Fadil S, Henry H M, Wolde-Tsadik G, and Yao J F. Toward universal criteria for gestational diabetes: the 75-gram glucose tolerance test in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1995; 172 (2 Pt 1): 607-14.
- 188) Saker P J, Hattersley AT, Barrow B, Hammersley M S, McLellan J-A, Lo Y M D, Olds R J, Gillmer M.D, Holman R R, Turner R C. High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. *Diabetologia* 1996; 39: 1325–8.
- 189) Sallam H. N, Rahman A. F, Ezzeldin F, Agameya A. A, Sallam A. N. Gestational diabetes in patients with polycystic ovaries pregnant after HMG therapy. *Fertility & Sterility* 2001;76(3) Supple1:S162.
- 190) Sambrook J, Fritsh F, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. 2da. Ed. Cold Spring Harbor, N Y: Cold spring Harbor Laboratory Press, B 4.
- 191) Savona-Ventura C, Azzopardi J, Sant R. Risk Factors for Gestational Diabetes Mellitus in the Maltese Population: a population based study *International Journal of Risk and Safety in Medicine* 2000;13: 1-7.
- 192) Sawka D, Tartare S, Decaux J, Girard J, Van Obberghen E. Stat 5B, Activated by Insulin in a Jak-Independent Fashion, Plays a Role in Glucokinase Gene Transcription. *Endocrinology* 2000; 141: 1977-88
- 193) Schaefer U, Songster G, Xiang A, Berkowitz K, Buchanan T A, Kjos S L. Congenital malformations in offspring of women with hyperglycaemia first detected in pregnancy. *Amerian Journal of Obstetrics and Gynecology* 1997; 177: 1165-71.
- 194) Schmidt M I, Duncan B B, Reichelt A J, Branchtein L, Matos M C, Costa e Forti A, Spichler E R, Pousada J M D C, Teixeira M M, and Yamashita T. Gestational Diabetes Mellitus Diagnosed With a 2-h 75-g Oral Glucose Tolerance Test and Adverse Pregnancy Outcomes. *Diabetes Care* 2001; 24: 1151 - 5.

- 195) Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, Prentki M: Metabolic fate of glucose in purified islet cells: glucose-regulated anaplerosis in [beta]-cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 18572-9.
- 196) Schwartz D B, Daoud Y, Zazula P, Goyert G, Bronsteen R, Wright D, Copes J. Gestational diabetes mellitus: Metabolic and blood glucose parameters in singleton versus twin pregnancies *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999;181: 912-4.
- 197) Schwarz P E H, Selisko T, Vcelak, J, Rietzsch H, Bendlova B, Schulze J. Identification of mutations in HNF1-Alpha in gestational Diabetes. *Diabetes* 2001; 50 (suppl 2) pA247.
- 198) Secretaría de Salud México. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2001. *Salud pública de México* 2002; 44 (6) 565-81.
- 199) Secretaría de Salud. Mortalidad 1999. México, DF: SSA, 2000.
- 200) Shao J, Catalano PMM, Yamashita H, Ruyter I, Smith S, Youngren J and Friedman J E. Decreased insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity and Plasma Cell Membrane Glycoprotein-1 Overexpression in skeletal Muscle From Obese Women with Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Evidence for Increased Serine/Threonine Phosphorylation in Pregnancy and GDM. *Diabetes* 2000; 49: 603-10
- 201) Sheffield J, Butler E L, Casey B M, McIntire D D, Levano K J. Maternal Diabetes Mellitus and Infant Malformations. *Obstetrics and Gynecology* 2002; 100: 925-30.
- 202) Shih D Q, Bussen M, Sehayeck E, Ananthanarayanan M, Shneider B L, Suchy F J, Shefer S, Bollileni J S, Gonzalez F J. Hepatocyte nuclear factor-1 α is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nature genetics* 2001; 27: 375-82.
- 203) Sibai B M, Caritis S, Hauth J, Lindheimer M, VanDorsten J P, MacPherson C, Klebanoff M , Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Dombrowski M, Thurnau G, Roberts, McNellis D. Risk of preeclampsia and adverse neonatal outcomes among women with pregestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2000; 182: 364-9.
- 204) Silverman L B, Metzger B E, Cho N M, Loeb C A. Impaired Glucose Tolerance in Adolescent offspring of Diabetic Mothers. *Diabetes Care* 1995; 18 (5) 611-7.
- 205) Simmons R A, Templeton L J Gertz S J. Intrauterine Growth retardation Leads to the development of Type 2 Diabetes in Rat. *Diabetes* 2001; 50: 2279-85.

- 206) Sivan E, Homko C J, Whittaker P J, Reece E A, Chen X, and Boden G. Free Fatty Acids and Insulin Resistance during Pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83 (7): 2338-42.
- 207) Skouby S O, Kuhl C, Hornnes P J, and Andersen A N. Prolactin and glucose tolerance in normal and gestational diabetic pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 1986; 67: 17-20.
- 208) Sorenson R L and Brelje T C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Hormone and Metabolic Research* 1997; 29(6): 301-7.
- 209) Spellacy W N, Goets F C, Greenburg B Z, Ells J. Plasma insulin y normal midpregnancy. *American Journal of Obstetrics y Gynecology* 1965; 92:11-5.
- 210) Sreenan S K, Zhou Y P, Otani K, Hansen P A, Currie K P, Pan C Y, Lee J Ostrega D M, Pugh W, Horikawa Y, Cox N J, Hanis C L, Burant C F, Fox A P, Bell G I, Polonsky K S: Calpain play a role in insulin secretion and action. *Diabetes* 2001; 50:2013–20.
- 211) Stern M P, Mitchell B D, Blangero J, Reinhart L, Krammerer C M, Harrison C R, Shipman P A, O'Connell P, Frazier M L and MacCluer J W. Evidence for a major gene for type II diabetes and linkage analyses with selected candidate genes in Mexican-Americans *Diabetes*. 1996; 45 (5): 563-8.
- 212) Stoffel M, Bell K L, Blackburn C L, Powell K L, Seo T S, Takeda J, Vionnet N, Xiang K S, Gidh-Jain M, Pilkis SJ. Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 1993; 42: 937 - 40.
- 213) Stride A, Shepherd M, Frayling T M, Bulman M P, Ellard S, and Hattersley A T. Intrauterine Hyperglycemia Is Associated With an Earlier Diagnosis of Diabetes in HNF-1 Gene Mutation Carriers. *Diabetes Care* 2002; 25: 2287 – 91.
- 214) Tamás Gy and Kerényi Z. Gestational diabetes: current aspects on pathogenesis and treatment. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2001; 109 (Suppl. 2) S400-11.
- 215) Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, et all. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372: 182-86.
- 216) Thomas H, Jaschowitz K, Bulman M, Frayling T M, Michell S M S, Rossen S, Lingott-Frieg A, Tack C J, Ellard S, Ryffel G U and Hattersley A T. A distant upstream promoter of

- the HNF-4 α gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Human Molecular Genetics* 2001; 10 (19): 2089-97.
- 217) Thomson KL, Gloyn AL, Colclough K, Batten M, Allen LI, Beards F, Hattersley AT, Ellard S. Identification of 21 novel glucokinase (GCK) mutations in UK and European Caucasians with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Hum Mutat.* 2003; 22 (5): 417.
- 218) Tomazic M, Janez A, Sketelj A, Kocijancie A, Eckel J, Sharma P M. Comparison of alterations in insulin signalling pathway in adipocytes from Type II diabetic pregnant women and women with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002; 45: 502-8.
- 219) Umpierrez GE, Casals MMC, Gebhart SSP, Mizon PS, Clark WS, Phillips LS: Diabetic ketoacidosis in obese African-Americans. *Diabetes* 1995; 44: 79–85.
- 220) Unger R H, Aguilar-Parada E, Muller W A, Eisentraut A M. Studies of pancreatic alpha cell in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation* 1970; 49: 837.
- 221) Urhammer S A, Hansen T, Jesper O C, Eiberg H, Pedersen O. The G/A nucleotide Variant at position -30 in the β Cell-specific Glucokinase Gene Promoter has no impact on the β Cell function in Danish Caucasians. *Diabetes* 1998; 47 (8) 1359-61.
- 222) Van Assche F A, Holemans K, Aerts L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *British Medical Bulletin* 2001; 60: 173-82.
- 223) Van Raaij JMA. Energy requirements of pregnancy for healthy Dutch women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1995; 61: 7-13.
- 224) Van Schaftingen V: Glycolysis Revisited. *Diabetologia* 1993; 36: 581-8.
- 225) Velho G, Blanche H, Vaxillaire M, Bellane-Chantelot C, Pardini V C, Timsit J, Passa P, Deschamps I., Robert J J, Weber I T, Marotta D, Pilkis S J, Lipkind G M, Bell G I, Froguel P. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 1997; 40: 217-224.
- 226) Velho G, Hattersley A T, Froguel P. Maternal diabetes alters birth weight in glucokinase-deficient (MDY2) kindred but has no influence on adult weight, height, insulin secretion or insulin sensitivity. *Diabetologia* 2000; 43: 1060-3.
- 227) Velho G, Petersen K F, Perseghin G, Hwang J H, Rothman D L, Pueyo M E, Cline G W, Froguel P, Shulman G I. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98 (8) 1755-61.

- 228) Vicens-Calvet E, Espadero R M, Carrascosa A. Longitudinal study of pubertal growth spurt in children born small for gestational without postnatal catch-up growth. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2002; 15: 381-3.
- 229) Wang Y, Storlien LH, Jenkins AB et al. Dietary variables and glucose tolerance in pregnancy. *Diabetes Care* 2000; 23: 460-4.
- 230) Warner J P, Leek J P, Intody S, Markham A F, Bonthron D T. Human glucokinase regulatory protein (GCKR): cDNA and genomic cloning, complete primary structure, and chromosomal localization. *Mammalian Genome* 1995; 6: 532-6.
- 231) Weinhaus A J, Stout L E, Brelje T C, Sorenson R L. Prolactin Regulation of Islet Glucokinase: Evidence for a Functional Stat5 Binding Site in the [beta]-Cell Glucokinase Promoter. *Diabetes* 2001; 50 Suppl 2 A360.
- 232) Weng J, Ekelund M, Lehto M, Li H, Ekberg G, Frid A, Aberg A, Groop L C and Berntorp K. Screening for MODY Mutations, GAD Antibodies, and Type 1 Diabetes-Associated HLA Genotypes in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2002; 25 (1): 68-71.
- 233) World Health Organization, Diabetes mellitus: report of a WHO study group. Geneva; World Health Organization; 1985.
- 234) Wu B, Takahashi J, Fu M, Cheng H, Matsumura S, Taniguchi H. Variants of calpain-10 gene and its association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population *Diabetes Research and Clinical Practice* 2005; 68 (2) :155-61.
- 235) Xiao D, Huang X, Bae S, Ducsay C A, Zhang L. Cortisol-mediated potentiation of uterine artery contractility: effect of pregnancy *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2002;283: H238-46.
- 236) Xing A Y, Challier J C, Leperq L, et al. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998; 83: 4097-101.
- 237) Yanagisawa K, Uchigata Y, Sanaka M, Sakura H, Minei S, Shimizu M, Kanamuro R, Kadowaki T, and Omori Y. Mutation in the mitochondrial tRNA(Leu) at position 3243 and spontaneous abortions in Japanese women attending a clinic for diabetic pregnancies. *Diabetologia* 1995; 38 (7) 809-15.

- 238) Yen SCC, Tsai CC, Vela P. Gestational diabetogenesis: quantitative analysis of glucose-insulin interrelationship between normal pregnancy and pregnancy with gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1971; 111: 792– 800.
- 239) Yorgev Y, Ben-Haroush A, Chen R, Rosenn B, Hod M, Langer O. Undiagnosed Asymptomatic Hypoglycemia: Diet, Insulin, and Glyburide for Gestational Diabetic Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 2004; 104 (1) 88-93
- 240) Yoshitaka S, Koji M, Shoji O, Hiroshi T, Hitomi I, Hitoshi H, Wen Ming C, Makoto S, Toshihiko I. The Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase Type IV Is Involved in the Glucose-Induced Glucokinase Transcription in INS-1 Cell. *Diabetes* 2002 ; 51 Suppl 2 A393.
- 241) Zaidi F K, Wareham N J, McCarthy M I, Holdstock J, Kaloo-Hosein H, Krook K, Swinn R A, O' Rahilly S. Homozygosity for a common polymorphism in the islet-specific promoter of the glucokinase gene is associated with a reduced early insulin response to oral glucose in pregnant women. *Diabetic Medicine* 1997; 14: 228-34.
- 242) Zhou Y P, Sreenan S, Pan C Y, Currie K P, Bindokas V P, Horikawa Y, Lee J P, Ostrega D, Ahmed N, Baldwin A C, Cox N J, Fox A P, Miller R J, Bell G I, Polonsky K S: A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin. *Metabolism* 2003; 52:528 –34.
- 243) Zimmet P, Shaw J and Alberti K G M M. Preventing type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. *Diabetic Medicine* 2003; 20: 693-702.