

112424

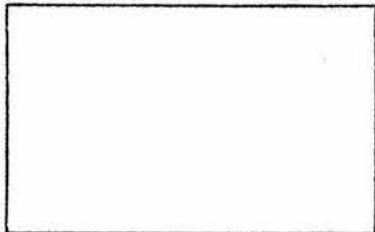
CON RECONOCIMIENTO UNIVERSITARIO  
(logos UNAM, ISSSTE)

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recapcional.

NOMBRE: Jiménez Montes de Oca  
Fernando

FECHA: 28 Agosto 2005

FIRMA: [Firma]



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"  
I.S.S.S.T.E.

TITULO:

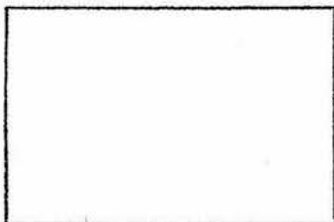
**IDENTIFICACION DE LAS MUTACIONES  
EN EL GEN DE LA GLUCOCINASA  
EN PACIENTES CON DIABETES  
GESTACIONAL**

TESIS DE POSGRADO

Para obtener el Diploma de Especialidad en

**MEDICINA MATERNO FETAL**

PRESENTA : DR FERNANDO JIMENEZ MONTES DE OCA



México D.F.

2005

m347452



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



**DR. MAURICIO DI.SILVIO LOPEZ  
SUBDIRECTOR DE ENEÑANZA E  
INVESTIGACION**

*[Handwritten signature]*  
\_\_\_\_\_

**DR. ARNOLDO RAUL ESPARZA AVILA  
COORDINADOR DE ENSEÑANZA**

\_\_\_\_\_  
*[Handwritten signature]*

**DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE  
PROFESOR TITULAR DE CURSO**

\_\_\_\_\_  
*[Handwritten signature]*

**DR. FERNANDO ESCOBEDO AGUIRRE  
ASESOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_  
*[Handwritten signature]*

**DR. TOMAS DE JESUS MENDOZA MARTINEZ  
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION  
DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

\_\_\_\_\_  
*[Handwritten signature]*

**IDENTIFICACION  
DE LAS  
MUTACIONES  
EN EL GEN  
DE LA  
GLUCOCINASA  
EN PACIENTES  
CON  
DIABETES  
GESTACIONAL**

IDENTIFICACION DE LAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOCINASA DE LAS PACIENTES MEXICANAS CON DIABETES GESTACIONAL. Dr Jiménez Montes de Oca Fernando., Dra Tusie Luna Ma Teresa., Dr Escobedo Aguirre Fernando., Q.F.B. Jiménez Perea Ma de Lourdes.- Medicina Materno - Fetal.- Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE.

#### RESUMEN:

Esta es la segunda parte de un trabajo diseñado para identificar las mutaciones o alteraciones génicas de la Glucocinasa en pacientes embarazadas que desarrollaron alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos para utilizarlo como marcador predictivo. Para este estudio, se analizan muestras sanguíneas de cien pacientes, de ellas el 72 % fueron Diabéticas Gestacionales y el resto desarrollaron Intolerancia a los Carbohidratos. Se hizo correlación con fichas estadísticas y árbol genealógico. El patrón de transmisión genética mostrado es autosómico dominante. Hasta el momento, se mantienen en cultivo las células sanguíneas para la obtención del ADN, separar el gen codificador de la glucocinasa localizado en el cromosoma 7 e identificar sus posibles mutaciones. Los resultados finales se obtendrán en 45 días a partir de Noviembre de 1999.

IDENTIFICATION OF THE MUTATIONS IN THE GENE OF THE GLUCOCINASA OF THE MEXICAN PATIENTS WITH DIABETES DURING THE GESTATION.

#### SUMMARY:

This is the second part of a work designed to identify the mutations or alterations in the genes of the glucocinasa in pregnant patients that develop alterations in the metabolism of the carbohydrates to use it as prediction marker. For this study, a hundred patients' sanguine samples are analyzed, of them 72 % was diabetic during the gestation and the rest they developed intolerance to the carbohydrates. Correlation was made with statistical records and genealogical tree. The shown pattern of the genetic transmission is dominant autosomic. Until this moment, they stay in cultivation the sanguine cells for obtaining of the DNA to separate the gene codifier of the glucocinasa located in the chromosome 7 and to identify their possible mutations. The final results will be obtained in 45 days starting from November of 1999.

#### ANTECEDENTES:

LA DIABETES GESTACIONAL \*DG SE DEFINE COMO LA INTOLERANCIA A LA GLUCOSA, DE SEVERIDAD VARIABLE, CON INICIO O DIAGNOSTICO DURANTE EL EMBARAZO. LA PREVALENCIA PUEDE SER DEL UNO AL CATORCE POR CIENTO DE LOS EMBARAZOS, DEPENDIENDO DE LA POBLACION ESTUDIADA. LA DG REPRESENTA APROXIMADAMENTE EL NOVENTA POR CIENTO DE TODOS LOS EMBARAZOS COMPLICADOS CON DIABETES.

PARA EL DIAGNOSTICO DE LA DG, SE DEBERA REALIZAR UNA PRUEBA DE ESCRUTINIO O TAMIZ, QUE CONSISTE EN LA DETERMINACION DE LA GLUCOSA PLASMATICA BASAL Y UNA HORA DESPUES DE PROPORCIONAR UNA CARGA DE CINCUENTA GRAMOS DE GLUCOSA ORAL.

ESTA PRUEBA DEBE REALIZARSE ENTRE LAS VEINTIDOS Y VEINTICUATRO SEMANAS DE GESTACION O ANTES SI LOS FACTORES DE RIESGO ASI LO PRECISARAN. EL RESULTADO BASAL IGUAL O MAYOR A 105 mg/dL Y/O 140 mg/dL O MAS A LA HORA , SE CONSIDERA ALTERADO Y SE DEBERA REALIZAR UNA CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA \*CTG, QUE CONSISTE EN PROPORCIONAR UNA DIETA DE 3 000 CALORIAS/DIA, 3 DIAS PREVIOS A RECIBIR UNA TOMA DE 100 GRAMOS DE GLUCOSA.

LA CUANTIFICACION DE GLUCOSA SERICA DEBERA SER BASAL, A LOS 60, 120 Y 180 MINUTOS DESPUES DE LA TOMA DE LA GLUCOSA, CON VALORES MENORES A 105, 190, 165 Y 145 mg/dL RESPECTIVAMENTE. CON DOS O MAS RESULTADOS ALTERADOS EL DIAGNOSTICO SERA DIABETES GESTACIONAL, CUANDO SOLO UNO DE LOS VALORES ESTA FUERA DE LOS RANGOS ESTABLECIDOS, EL DIAGNOSTICO SERA DE INTOLERANCIA A LOS CARBOHIDRATOS.

LA ALTERACION EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA OCURRE HABITUALMENTE DURANTE EL EMBARAZO, AL FINAL DE SEGUNDO E INICIO DEL TERCER TRIMESTRES. LA PRESENCIA DE LA DIABETES GESTACIONAL ESTA RELACIONADA CON UN AUMENTO EN LOS REQUERIMIENTOS DE INSULINA.

POR EFECTO DE LAS HORMONAS PLACENTARIAS ( LACTOGENO PLACENTARIO, PROGESTERONA, ESTRADIOL, ETC.) LAS MUJERES CON ANTECEDENTES DE DIABETES GESTACIONAL PUEDEN TENER UNA LIBERACION ANORMAL DE LA INSULINA, O PRESENTAR RESISTENCIA A LA MISMA DESPUES DEL EMBARAZO. ESTA ENFERMEDAD ES CONSIDERADA COMO UNA PATOLOGIA HETEROGENEA, POR LA PARTICIPACION DE CARACTERISTICAS CLINICAS, FENOTIPICAS Y GENOTIPICAS.

EL RESULTADO PERINATAL DE LOS EMBARAZOS COMPLICADOS CON ALTERACION METABOLICAS DE LOS CARBOHIDRATOS ES DIVERSO Y DE SEVERIDAD VARIABLE, CON UNA RELACION DIRECTAMENTE PROPORCIONAL A LA PRONTITUD DEL DIAGNOSTICO Y EL ESTABLECIMIENTO DEL TRATAMIENTO. UN ALTO PORCENTAJE DE LAS PACIENTES CON DIABETES GESTACIONAL O INTOLERANCIA A LOS CARBOHIDRATOS SE CONTROLAN CON DIETA SEGUN EL INDICE DE MASA CORPORAL, DE ACUERDO A LA EDAD GESTACIONAL Y SOLO ALGUNOS CASOS REQUIEREN INSULINOTERAPIA, EN ESPECIAL CUANDO UTILIZAN FARMACOS QUE INTERFIERAN EN EL CONTROL METABOLICO.

LOS DEFECTOS MOLECULARES QUE SE ENCUENTRAN RELACIONADOS CON LA DIABETES GESTACIONAL, DIFIEREN EN MUJERES CON DISTINTOS FENOTIPOS.

EL PAPEL DE LOS FACTORES GENETICOS PARA EL DESARROLLO DE LA DIABETES GESTACIONAL, FUE SUGERIDO AL OBSERVAR UN



AUMENTO EN LA PREVALENCIA DE DIABETES MELLITUS EN PACIENTES CON ANTECEDENTES DE FAMILIARES DE LINEA DIRECTA CON DIABETES MELLITUS.

ESTUDIOS RECIENTES HAN DEMOSTRADO QUE LAS MUTACIONES EN EL GEN CODIFICADOR DE LA GLUCOCINASA LOCALIZADO EN EL CROMOSOMA 7, PUEDE PREDISPONER A DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE EN FORMA AUTOSOMICA-DOMINANTE, PRESENTANDO UNA VARIANTE EN EL FENOTIPO CLINICO, EL CUAL PUEDE PRESENTARSE DURANTE LA NIÑEZ. DENTRO DE LAS VARIANTES EN EL FENOTIPO, SE INCLUYE LA INTOLERANCIA A LA GLUCOSA , LA DIABETES GESTACIONAL Y LA HIPERGLUCEMIA TRANSITORIA.

SE HA ASOCIADO LA PRESENCIA DE MUTACIONES DE LA GLUCOCINASA EN DIABETICAS GESTACIONALES. AQUELLAS MUJERES CON LA MUTACION, FUERON DIAGNOSTICADAS INICIALMENTE COMO PORTADORAS DE DIABETES GESTACIONAL.

EN MUCHOS ESTUDIOS, SE HA TRATADO DE IDENTIFICAR A LOS GENES RELACIONADOS CON LA APARICION DE DIABETES GESTACIONAL, ENCONTRANDOSE UNA ASOCIACION IMPORTANTE EN EL "POLIMORFISMO DE RESTRICCIÓN FRAGMENTADO" \* RFLP EN EL LOCUS DEL RECEPTOR DE INSULINA \*INSR EN MUJERES AFRO-AMERICANAS CON DIABETES GESTACIONAL Y LOS RFLP DEL RECEPTOR DE LA INSULINA Y DEL LOCUS DEL FACTOR II DE CRECIMIENTO RELACIONADO CON LA INSULINA \*IGF-II EN MUJERES CAUCASICAS. AUNQUE SOLO EL INSR Y NO EL IGF-II FUERON ASOCIADOS EN LAS MUJERES HISPANAS.

LA OBESIDAD, LA PARIDAD Y LA EDAD MATERNA, SON FACTORES DE RIESGO IMPORTANTES RELACIONADOS PARA DESARROLLAR DIABETES GESTACIONAL, EN MUJERES DE ESTOS GRUPOS RACIALES.

ESTOS DATOS HACEN SUPONER QUE LA DIABETES GESTACIONAL TIENE UN PATRON GENETICO HETEROGENEO.

ESTUDIOS RECIENTES HAN DEMOSTRADO QUE LAS MUTACIONES EN LA GLUCOCINASA PUEDEN SER LA CAUSA DEL DESARROLLO DE UNA FORMA DOMINANTE DE DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE, CON INICIO EN LA NIÑEZ, A LA CUAL SE DENOMINA "MODY" O, EN FORMA MAS APROPIADA COMO DIABETE MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE CON DEFICIENCIA DE GLUCOCINASA.

LAS MUTACIONES DE LA GLUCOCINASA PUEDEN CONTRIBUIR AL DESARROLLO DE LA DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE POR UN MECANISMO GENETICO, CON DISMINUCION EN LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LA GLUCOCINASA, CAUSANDO UN AUMENTO EN LA LIBERACION DE LA INSULINA ESTIMULADA POR LA GLUCOSA.

MUCHAS MUJERES DE FAMILIAS QUE PRESENTABAN MUTACIONES EN LA GLUCOCINASA, FUERON DIAGNOSTICADAS COMO DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE DURANTE EL EMBARAZO.

PROBLEMA:

LA MORBIMORTALIDAD MATERNO-FETAL Y NEONATAL ES UN GRAVE PROBLEMA INHERENTE A LA IDENTIFICACION TARDIA DE LA DIABETES GESTACIONAL. AL CONTAR CON MARCADORES PREDICTIVOS ESPECIFICOS LAS CATASTROFES EN LOS RESULTADOS PERINATALES SE PODRA ABOLIR.

## MATERIAL Y METODOS:

SE ESTUDIARON CIENTO PACIENTES CON ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS DURANTE LA GESTACION. SE HA REALIZADO LA RECOLECCION DE DATOS, LOS ARBOLES GENEALOGICOS Y LA OBTENCION DE DNA SEGUN LAS SIGUIENTES METODOLOGIAS:

- TOMAR 20 mL DE SANGRE VENOSA PERIFERICA POR VENOPUNCION.
- COLOCAR LA MUESTRA EN TUBOS DE PLASTICO CON 0.5 mL DE ANTICOAGULANTE.
- MANTENER LA TEMPERATURA < 5 GRADOS CENTIGRADOS.
- ENVIAR MUESTRAS A LA UNIDAD DE GENETICA DE LA NUTRICION DEL INSTITUTO DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE LA U.N.A.M., EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA.
- ESTABLECER EL DEPOSITO DE LINFOCITOS TRANSFORMADOS: LOS LINFOCITOS SON AISLADOS DE LA SANGRE TOTAL, UTILIZANDO EL GRADIENTE DE FICOLI-PHAGE E INFECTADOS CON VIRUS DE EPSTEIN BARR. DESPUES DE UNA A CUATRO SEMANAS LAS COLONIAS PROLIFERANTES SE RECOBRAN, AMPLIFICAN Y CONGELAN EN NITROGENO LIQUIDO. LAS MUESTRAS SON SOMETIDAS A SECUENCIA DE ANALISIS Y A PCR-SSCP. EL DNA GENOMICO SE OBTIENE DE LOS GLOBULOS BLANCOS DE LA SANGRE PERIFERICA DE LA LINEA DE LOS LINFOCITOS, UTILIZANDO LA PROTEINASA-K Y EL METODO DE EXTRACCION DE FENOL-CLOROFORMO.

LAS PLANTILLAS DISEÑADAS DE PCR SE UTILIZARAN PARA AMPLIAR TODOS LOS EXONES DEL GEN DE LA GLUCOCINASA. LAS AMPLIACIONES DE LOS PCR SE OBTIENEN UTILIZANDO 50 ng de ADN, 10 pmol POR CADA PLANTILLA, 0.1  $\mu$ C DE P<sup>32</sup> dCTP, 1 mM dNTPS, 1.5 mM DE MgCL Y 1 U DE POLIMERASA DE Taq EN

UN VOLUMEN DE REACCION DE 10  $\mu$ L. LA SELECCION DE LA TEMPERATURA SERA DE ACUERDO A LA  $T_m$ , EL ANALIS DE SSCP DE LA AMPLIACION DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR SERAN PROCESADOS Y LAS MUESTRAS SERAN COLOCADAS EN GEL POLIACRILAMIDA AL 5% EN AUSENCIA O PRESENCIA DE GLICEROL AL 10% CON CORRIENTE DE 6-12 WATTS POR 5-15 HORAS.

LAS VARIABLES CORRESPONDIENTES A LAS CARACTERISTICAS QUE DESCRIBEN A LA POBLACION ESTUDIADA COMO SON : EDAD, INDICE DE MASA CORPORAL, ALTERACION METABOLICA A LOS CARBOHIDRATOS, ETC., SERAN AGRUPADOS Y SE LES APLICARA UN ANALISIS DE ESTADISTICA DESCRIPTIVA.

DE ACUERDO AL ANALISIS DE LAS DIFERENCIAS DERIVADAS DE LA ALTERACION METABOLICA Y LAS MUTACIONES DEL GEN DE LA GLUCOCINASA, SE ESTABLECERAN DICHAS DIFERENCIAS APLICANDO PRUEBAS DE HIPOTESIS COMO t student Y  $\chi^2$ , PARA SU CLASIFICACION.

## BIBLIOGRAFIA:

- 1.- VIONNET N, STOFFELL M, TAKEDA J: Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early - onset non-insuline-depedent diabetes mellitus. Nature 356: 721-22, 1992.
- 2.- STOFFELL M, PATEL P, LO Y -MD BELL GL: Missense glucokinase mutation in maturity - onset diabetes of the yong and mutation screening in late- onset NIDDM. Nature Genet 2 : 153-56, 1992.
- 3.- FROGUEL P, ZOUALI H, VIONNET N, BELL GL, COHEN D: Familial hyperglycemia to mutations in glucokinase; Definition of a subtype of diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 328: 697-702, 1993.
- 4.- CHIU KC, TANAZAWA Y PERMUTT MA: Nonsense mutation of glucokinase gene. Lancet. 341: 335-86, 1993
- 5.- STOFFEL M, FROGUEL P, TAKEDA J, VELHO G: Human glucokinase gen: isolation and characterization, and identification of two missense mutation linked to early-onset non-insuline-dependent (type II) diabetes mellitus. Porc. Natl Acad. Sci. USA 9: 7698-702, 1992.
- 6.- GIDH-JAIN M, TAKEDA J, XU LZ, WEBER IT, BELL GL PILKIS SJ: Glucokinase mutations associated with non-insuline-dependent (type II) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: Implications for structures/function relationships. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1932-336, 1993.
- 7.- VELHO G, FROGUEL P, CLEMENT K, PUEYO ME, ROBERT JJ: Primary pancreatic  $\beta$ -cell secretory defect caused by mutations in glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. Lancet 340: 44-48, 1992.