



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**BÚSQUEDA DE GENES DE
SUSCEPTIBILIDAD PARA EL DESARROLLO
DE DIABETES GESTACIONAL EN
POBLACIÓN MEXICANA**

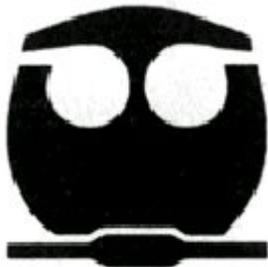
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

QFB.LEONOR JACOBO ALBAVERA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA



MÉXICO, D. F.

Septiembre 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Vocal: Dr. Armando Tovar Palacio

Secretario: Dra. Marcela Lizano Soberón

1er. Suplente: Dra. Marta Menjívar Iraheta

2do. Suplente: Dr. José Pedraza Chaverri

Sitio en donde se desarrolló el tema: Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y en el laboratorio de la Dra. Paivi Pajukanta en el Departamento de Human Genetics en UCLA.

Tutor: Dra. María Teresa Tusié Luna

Cotutores: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Dra. Marcela Lizano Soberón

DEDICATORIAS

A mis padres, por darme la vida y todo su amor y su apoyo incondicional en todo momento, porque en gran parte gracias a ellos he llegado a ser la mujer y la profesionalista que soy ahora.

A toda mi familia, por mantenerse unida y por enseñarme cada uno de sus integrantes siempre algo nuevo, en especial a mi hermano por su apoyo y profundo cariño.

A mis amigos, gracias por compartir conmigo su esencia y por darme la oportunidad de conocerlos y aprender siempre algo de cada uno de ellos.

A la UNAM y a todos los profesores, que con su sabiduría me han enseñado el fascinante mundo de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Teresa Tusié Luna por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por apoyarme constantemente en la realización de esta tesis.

A la Dra. Paivi Pajukanta por permitirme realizar parte de este trabajo de investigación en su laboratorio en el Departamento de Human Genetics en UCLA.

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros y a la Dra. Ma. Teresa Villarreal Molina por su apoyo en la revisión crítica de esta tesis.

A la M en C. Laura Riba Ramírez, al Biol. Salvador Ramírez Jiménez, a Maribel Rodríguez Torres y a Jesús López Velázquez por todo su apoyo en los aspectos técnicos del proyecto.

A la Dra. Daphna Weissglass y a la Dra. Sandra Romero por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, Dr. Armando Tovar Palacio, Dra. Marcela Lizano Soberón, Dra. Marta Menjivar Iraheta y Dr. José Pedraza Chaverri, por la revisión crítica del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Fundación TELMEX, por las becas recibidas para la realización de esta tesis.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
RESUMEN.....	4
ABREVIATURAS.....	5
I.- INTRODUCCIÓN.....	6
1. Diabetes mellitus.....	6
1.1. Definición.....	6
1.2. Clasificación.....	6
A. Diabetes mellitus tipo 1 (DT1).....	7
B. Diabetes mellitus tipo 2 (DT2).....	8
C. Otros tipos específicos de diabetes.....	12
D. Diabetes mellitus gestacional.....	15
2. Diabetes gestacional.....	16
2.1. Diagnóstico.....	16
2.2. Epidemiología.....	19
2.3. Fisiología del embarazo.....	20
2.4. Fisiopatología de la DG.....	23
2.5. Complicaciones.....	29
2.6. Tratamiento.....	38
2.7. Factores de riesgo.....	43
2.8. Componente genético.....	44
3. <i>PPARγ</i>	55
3.1. Características del gen <i>PPARγ</i> y de la proteína que codifica.....	56
3.2. Variantes comunes y su asociación a diversas entidades clínicas.....	59
4. <i>CASQ1</i>	62
4.1. Características del gen y de la proteína que codifica.....	62
4.2. SNPs asociados a DT2.....	63
5. <i>USF-1</i>	64
5.1. Características del gen y de la proteína que codifica.....	64
5.2. Variantes comunes y su asociación a diversos fenotipos metabólicos.....	66
6. <i>HNF-4α</i>	69
6.1. Características del gen y la proteína que codifica.....	69
6.2. Variantes comunes y su asociación a diversas entidades clínicas.....	71
II.- JUSTIFICACIÓN.....	75
III.- HIPOTESIS.....	76
IV.- OBJETIVOS.....	76
V.- METODOLOGÍA.....	77
1. Características del estudio.....	77
2. Población de estudio.....	77
A) Estudio de los polimorfismos de los genes <i>PPARγ</i> y <i>CASQ1</i>	77

a) Casos.....	77
b) Controles normoglucémicos.....	78
c) Controles con CTOG normal (Controles ideales).....	78
B) Estudio de los polimorfismos de los genes <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i>	79
a) Casos INPER.....	79
b) Casos CMN 20 de Noviembre.....	79
c) Controles.....	80
3. Esquema general de trabajo.....	80
4. Extracción de DNA genómico.....	82
5. Genotipificación de los polimorfismos de <i>PPARγ</i>	82
5.1. Genotipificación de P12A por PCR-SSCP.....	82
a) Fundamento de la técnica.....	82
b) Condiciones experimentales del PCR-SSCP para la genotipificación de P12A.....	84
5.2 Genotipificación de C161T por PCR en tiempo real.....	85
a) Fundamento de la técnica.....	85
b) Condiciones de la PCR en tiempo real para la genotipificación de C161T.....	88
6. Genotipificación de los SNPs 2351, rs3747623, rs617698 y rs2275703 de <i>CASQ1</i> por PCR en tiempo real.....	89
7. Genotipificación de los SNPs rs3737787 de <i>USF-1</i> (<i>USF1s1</i>) y rs2144908 y rs745975 de <i>HNF-4α</i> por pirosecuenciación.....	89
a) Fundamento de la técnica.....	89
b) Condiciones de los ensayos de pirosecuenciación para la genotipificación de los SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i>	91
8. Confirmación de los genotipos por secuenciación.....	93
9. Análisis estadístico de los resultados.....	94
9.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	94
9.2 Análisis de asociación caso-control.....	95
9.3 Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs P12A y C161T de <i>PPARγ</i> , los SNPs de <i>CASQ1</i> y los SNPs de <i>HNF-4α</i>	96
9.4 Análisis por haplotipos de los SNPs de <i>CASQ-1</i> y de <i>HNF-4α</i>	96
9.5. Análisis del posible efecto de estratificación poblacional utilizando marcadores de ancestría.....	97
VI.- RESULTADOS.....	99
1. Estudio del gen <i>PPARγ</i> y del gen <i>CASQ1</i>	99
1.1. Características de la población de estudio.....	99
1.2. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	99
1.3. Confirmación de los genotipos de los SNPs de <i>PPARγ</i> y <i>CASQ1</i> por secuenciación.....	100
1.4. Análisis de los posibles factores confusores.....	101

1.5.	Resultados del análisis de los polimorfismos de <i>PPARγ</i>	103
1.6.	Análisis de asociación de P12A y C161T a los rasgos cuantitativos.....	106
1.7.	Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs P12A y C161T de <i>PPARγ</i>	108
1.8.	Análisis de asociación por diplotipos de los SNPs P12A y C161T de <i>PPARγ</i>	109
1.9.	Resultados del análisis de los polimorfismos de <i>CASQ1</i>	109
1.10.	Análisis de asociación de los SNPs de <i>CASQ1</i> a los rasgos cuantitativos.....	112
1.11.	Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de <i>CASQ1</i>	115
1.12.	Análisis por haplotipos de los SNPs de <i>CASQ1</i>	118
2.	Estudio del gen <i>USF-1</i> y del gen <i>HNF-4α</i>	120
2.1.	Características de la población de estudio.....	120
2.2.	Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	120
2.3.	Confirmación de los genotipos de los SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF4α</i> por secuenciación.....	121
2.4.	Análisis de los posibles factores confusores.....	122
2.5.	Resultados del análisis de los polimorfismos de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i>	123
2.6.	Análisis de asociación de los SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> a los rasgos cuantitativos.....	124
2.7.	Análisis de asociación de los SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> a DG considerando la inclusión de los marcadores de ancestría.....	127
2.8.	Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de <i>HNF-4α</i>	128
2.9.	Análisis por diplotipos de los SNPs de <i>HNF-4α</i> y por haplotipos de los SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i>	129
VII.-	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	131
VIII.-	CONCLUSIONES.....	139
IX.-	PERSPECTIVAS.....	140
X.-	REFERENCIAS.....	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de una célula β pancreática donde se muestran las proteínas asociadas con la diabetes MODY.....	14
Figura 2. Relación entre la sensibilidad a la insulina y la secreción de insulina en mujeres con DG y mujeres normales durante el tercer trimestre del embarazo y fuera del embarazo (Postparto).....	26
Figura 3. Mecanismos potenciales para la resistencia a la insulina en músculo esquelético durante la etapa tardía de un embarazo con diabetes gestacional en humanos.....	28
Figura 4. Efecto transgeneracional de la diabetes materna durante el embarazo.....	36
Figura 5. Representación esquemática de las estrategias utilizadas para encontrar genes de predisposición a la DT2 y a la DG.....	45
Figura 6. Organización del gen $PPAR\gamma$ y variantes encontradas en $PPAR\gamma 2$	57
Figura 7. Estructura del gen <i>CASQ1</i> y los SNPs asociados a diabetes en población amish (menonita) y en población europea caucásica.....	63
Figura 8. Estructura del gen (A) y de la proteína USF-1 (B).....	65
Figura 9. Estructura del gen <i>USF-1</i> y localización del SNP <i>usf1s1</i> (rs3737787), altamente asociado a FCHL, CHD y rasgos metabólicos en diversas poblaciones.....	69
Figura 10. Estructura del gen <i>HNF-4α</i> y localización de los SNPs asociados a diversas entidades clínicas.....	70
Figura 11. Patrones de bandas observados en una autorradiografía de acuerdo al genotipo del polimorfismo P12A de $PPAR\gamma$ presentado en cada muestra.....	83
Figura 12. Mecanismo de acción de la sonda TaqMan en una PCR.....	86
Figura 13. Gráfica de un ensayo de discriminación alélica para la genotipificación de muestras por PCR en tiempo real obtenida mediante el programa SDS 2.2.....	88
Figura 14. Representación esquemática del proceso de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo durante la técnica de pirosecuenciación en fase líquida.....	90
Figura 15. Gráfica de desequilibrio de ligamiento (DL) de los SNPs de <i>CASQ1</i> utilizando 94 casos de DG y 112 controles normoglucémicos.....	116
Figura 16. Gráfica de desequilibrio de ligamiento (DL) de los SNPs de <i>CASQ1</i> utilizando 94 casos de DG y 46 controles con CTOG normal.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores límite de la CTOG utilizados para el diagnóstico de DG.....	18
Tabla 2. Genes estudiados con relación a la susceptibilidad al desarrollo de DG.....	48
Tabla 3. Ensayos de sondas TaqMan utilizados para la genotipificación de los SNPs de <i>CASQ1</i>	89
Tabla 4. Protocolos para la obtención de los productos de PCR empleados en la genotipificación de SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> por pirosecuenciación.....	91
Tabla 5. Condiciones de los ensayos para la obtención de los productos de PCR empleados en la genotipificación de SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> por pirosecuenciación.....	92
Tabla 6. Características de la población de estudio (<i>PPARγ</i> y <i>CASQ1</i>).....	99
Tabla 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de los genes <i>PPARγ</i> y <i>CASQ1</i> en los casos y controles.....	100
Tabla 8. Análisis de los posibles factores confusores en el grupo de DG (20Nov) vs controles normoglucémicos.....	101
Tabla 9. Análisis de los posibles factores confusores en el grupo de DG (20Nov) vs controles con CTOG normal (INPER).....	102
Tabla 10. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>PPARγ</i> a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles normoglucémicos).....	103
Tabla 11. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>PPARγ</i> a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles con CTOG normal).....	104
Tabla 12. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>PPARγ</i> a los rasgos cuantitativos en los controles normoglucémicos.....	106
Tabla 13. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>PPARγ</i> a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (CMN 20 de Nov.).....	107
Tabla 14. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>PPARγ</i> a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal del INPER.....	107
Tabla 15. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs P12A y C161T de <i>PPARγ</i>	108
Tabla 16. Análisis de asociación por diplotipos de los SNPs P12A y C161T de <i>PPARγ</i>	109
Tabla 17. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles normoglucémicos).....	110

Tabla 18. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles con CTOG normal).....	111
Tabla 19a. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a los rasgos cuantitativos en los controles normoglucémicos.....	112
Tabla 19b. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a los rasgos cuantitativos en los controles normoglucémicos.....	113
Tabla 20a. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (CMN 20 de Nov.).....	113
Tabla 20b. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (CMN 20 de Nov.).....	114
Tabla 21a. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal del INPER.....	114
Tabla 21b. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>CASQ1</i> a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal del INPER.....	115
Tabla 22. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de <i>CASQ1</i> (DG vs controles normoglucémicos).....	116
Tabla 23. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de <i>CASQ1</i> (DG vs controles con CTOG normal).....	118
Tabla 24. Análisis de asociación por haplotipos de los SNPs de <i>CASQ1</i>	119
Tabla 25. Características de la población de estudio.....	120
Tabla 26. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de los genes <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> en los casos y controles.....	121
Tabla 27. Análisis de los posibles factores confusores en el grupo de DG (INPER + CMN 20 Nov) vs controles con CTOG normal.....	122
Tabla 28. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> a DG con diferentes modelos genéticos (DG total vs controles con CTOG normal).....	123
Tabla 29. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (INPER + CMN 20 de Nov).....	125
Tabla 30. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal (INPER).....	126

Tabla 31. Análisis de asociación de los polimorfismos de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i> a DG considerando el efecto de la estratificación poblacional.....	128
Tabla 32. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs rs2144908 y rs745975 de <i>HNF-4α</i>	128
Tabla 33. Análisis de asociación por diplotipos de los SNPs de <i>HNF-4α</i>	129
Tabla 34. Análisis de asociación por haplotipos de los SNPs de <i>USF-1</i> y <i>HNF-4α</i>	130

RESUMEN

La diabetes gestacional (DG) es la intolerancia a la glucosa de severidad variable que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. La prevalencia mundial de la DG varía entre 1 y 14%, dependiendo de la población estudiada y el criterio de diagnóstico utilizado. En México, se desconoce la prevalencia nacional de DG; sin embargo se han reportado cifras desde 4.3 a un 19.6%. El desarrollo de DG durante el embarazo implica riesgos considerables en la salud tanto de la madre como del feto. La DG, al igual que la DT2, es una enfermedad genéticamente compleja. En este trabajo se analizó la contribución de los polimorfismos P12A y C161T en el gen *PPAR γ* , cuatro distintos SNPs en el gen de *CASQ1*, el SNP usf1s1 del gen *USF-1* y dos SNPs del gen *HNF-4 α* como posibles alelos de susceptibilidad para el desarrollo de DG en población mexicana. El SNP P12A del gen *PPAR γ* se genotipificó por PCR-SSCP, el SNP C161T de *PPAR γ* y los SNPs del gen *CASQ1* por PCR en tiempo real; todos estos SNPs se analizaron en casos con DG, en controles normoglucémicos y en un grupo reducido de controles con CTOG normal. Los SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* se genotipificaron por pirosecuenciación en casos con DG y controles con CTOG normal. Los genotipos obtenidos por estas tres técnicas fueron confirmados mediante secuenciación directa. Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los SNPs de los genes estudiados y en cada uno de los grupos de casos y controles mediante una prueba de χ^2 . Se evaluó la asociación de estos SNPs a la DG bajo diferentes modelos genéticos y a diversos rasgos cuantitativos utilizando el programa SPSS 15.0; se hizo también el análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs y el análisis de asociación por haplotipos con el programa Haploview 3.32. El alelo Ala del polimorfismo P12A del gen *PPAR γ* se asoció a un IMC mayor en el grupo de controles normoglucémicos. Se encontró un haplotipo de riesgo (AACC) a DG con los SNPs de *CASQ1*. El alelo común del SNP rs3737787 del gen *USF-1* presentó una tendencia de asociación a la DG y a diversos rasgos cuantitativos. Los SNPs del gen *HNF-4 α* también presentaron tendencias de asociación a los rasgos cuantitativos en los casos con DG. Es necesario incrementar el tamaño de los grupos de estudio para poder confirmar las tendencias de asociación encontradas con los SNPs analizados.

ABREVIATURAS

DT1	Diabetes mellitus tipo 1	INPER	Instituto Nacional de Perinatología
DT2	Diabetes mellitus tipo 2	IRS-1	Insulin receptor substrate 1 (Sustrato del receptor de la insulina 1)
DG	Diabetes gestacional	TZDs	Tiazolidinedionas
ADA	American Diabetes Association (Asociación americana de diabetes)	P12A	Prolina12Alanina (SNP rs1801282 del gen <i>PPARγ</i>)
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas)	C161T	Variante localizada en el exón 6 del gen <i>PPARγ</i>
IMC	Índice de masa corporal	CASQ1	Calsecuestrina
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)	USF-1	Upstream transcription factor 1 (Factor de transcripción río arriba 1)
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young (Diabetes del joven de aparición en la madurez)	FCHL	Familial combined hyperlipidemia (Hiperlipidemia familiar combinada)
GCK	Glucocinasa	CMN 20 de Nov	Centro Médico Nacional 20 de Noviembre
HNF-4 α	Factor nuclear del hepatocito 4 α	PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Acido desoxirribonucleico)	SSCP	Single strand conformation polymorphism (polimorfismo conformacional de una sola cadena)
RNA	Ribonucleic acid (Acido ribonucleico)	OR	Odds ratio (razón de momios)
GCT	Glucose challenge test (Prueba de reto a la glucosa)	IC	Intervalo de confianza
CTOG	Curva de tolerancia oral a la glucosa	AUC	Area under the curve (área bajo la curva)
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)	DL	Desequilibrio de ligamiento

I.- INTRODUCCIÓN

1. Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad que en las últimas dos décadas ha presentado un incremento considerable en el número de casos a nivel mundial (Zimmet y cols., 2003). La Organización Mundial de la Salud reporta que en el año 2000 se contaban con 171 millones de casos de diabetes y que para el 2030 se estima que este número se aproxime a 366 millones (WHO, 2007).

La diabetes mellitus es actualmente el principal problema de salud pública en México. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud del año 2000, la diabetes mellitus afecta al 10.9% de la población (ENSA, 2000) y se calcula que para el año 2025, alrededor de 11.7 millones de mexicanos serán diagnosticados con diabetes (King y cols., 1998a). Además, desde el año 2000, la diabetes mellitus es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres en nuestro país (Rull y cols., 2005).

1.1. Definición.

El término de diabetes mellitus se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizadas principalmente por hiperglucemia (niveles elevados de glucosa en sangre) que resulta por defectos en la secreción de la insulina, en la acción de la insulina o en ambas. (ADA, 2006).

1.2 Clasificación.

La Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association [ADA]) basándose en el reporte del comité de expertos sobre el diagnóstico y clasificación de la

diabetes mellitus elaborado en 1997, clasifica a la diabetes mellitus en cuatro tipos considerando su etiología: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, otros tipos específicos de diabetes y diabetes mellitus gestacional (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

A. Diabetes Mellitus tipo 1 (DT1)

La DT1 se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, la cual conduce generalmente a una deficiencia absoluta de insulina. Esta forma de diabetes constituye aproximadamente 5-10% del total de casos (ADA, 2006). Los marcadores de esta destrucción inmune de la célula β pancreática pueden ser autoanticuerpos contra células del islote pancreático, autoanticuerpos contra la insulina, autoanticuerpos contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD_{65}) y autoanticuerpos contra las fosfatasas de tirosina IA-2 e IA-2 β (Myers y cols., 1995; ADA, 2006). Algunos pacientes, generalmente niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad; otros tienen hiperglucemia en el ayuno que puede convertirse rápidamente en hiperglucemia severa y/o cetoacidosis en la presencia de infecciones u otras manifestaciones de estrés (ADA, 2006).

Se ha evidenciado que la DT1 tiene una fuerte asociación al antígeno de leucocitos humanos [HLA: Human Leukocyte Antigen] (Noble y cols., 1996; ADA, 2006). La región que contiene al HLA se localiza en el cromosoma 6 y en ella se han identificado haplotipos que se encuentran presentes en aproximadamente el 50% de los casos de DMT1 en población caucásica (Watanabe y cols., 2007a).

Los principales genes de susceptibilidad para DT1 codifican para moléculas de HLA polimórficas y en particular son alelos de genes del complejo mayor de histocompatibilidad [MHC: Mayor Histocompatibility Complex] clase II, es decir, genes

DR, DQ y DP (Jahromi y Eisenbarth, 2007). Se ha reportado ligamiento de DT1 a los genes DQA y DQB; los alelos HLA-DR/DQ pueden ser de predisposición a la enfermedad en algunos casos o pueden ser de protección en otros (ADA, 2006).

Existen también formas idiopáticas de DT1. En este caso los pacientes presentan insulinoopenia permanente y están propensos a la cetoacidosis pero no tienen evidencia de autoinmunidad. Sólo una minoría de la totalidad de pacientes con DT1 se ubica dentro de esta categoría y en su mayoría son de origen africano o asiático. Esta forma de DT1 no está asociada al HLA (ADA, 2006).

B. Diabetes Mellitus tipo 2 (DT2)

La DT2 es un padecimiento crónico que se caracteriza por resistencia a la insulina y deterioro de la función secretora de las células β pancreáticas (Shuldiner y McLenithan, 2004; ADA, 2006). Desde el inicio y habitualmente a lo largo del desarrollo de la enfermedad, los individuos no requieren insulina para el control de la hiperglucemia (ADA, 2006).

La DT2 es la forma más frecuente de diabetes ya que representa del 90 al 95% del total de casos. Existen diversas causas para el desarrollo de la DT2; aunque se desconoce la etiología específica, en este tipo de diabetes no se presenta la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. (ADA, 2006).

La mayoría de los pacientes con DT2 son obesos y se ha evidenciado que la obesidad por sí misma causa cierto grado de resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es definida como un estado de sensibilidad o de respuesta reducida a los niveles circulantes de insulina; la resistencia a la acción de esta hormona desempeña un papel importante en el desarrollo del síndrome metabólico y de la DT2 (Savage y cols., 2005).

Lo anterior se ha concluido a partir de las siguientes observaciones: existencia de estudios transversales en los que se ha demostrado la presencia consistente de resistencia a la insulina en pacientes con DT2, presencia de resistencia a la insulina en hijos no diabéticos de pacientes con DT2, estudios prospectivos que demuestran la utilidad de la resistencia a la insulina como un factor predictivo de un futuro desarrollo de DT2 y finalmente por la prevención de la diabetes debido a la aplicación de agentes insulino-sensibilizantes (Shulman, 2001; Savage y cols., 2005).

La DT2 es una enfermedad genéticamente compleja y multifactorial, es decir, se desarrolla gracias a la contribución de diversos factores, tanto genéticos como ambientales (Marx, 2002; Diamond, 2003; Malecki, 2004). El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes se incrementa con la edad, la presencia de obesidad y la falta de actividad física. Esta enfermedad es más frecuente en mujeres con diabetes gestacional previa y en individuos con hipertensión o dislipidemia. Su frecuencia varía entre los diferentes grupos étnico/raciales y presenta una mayor prevalencia en hispanoamericanos, americanos nativos, afroamericanos y asiático-americanos (Diamond, 2003; Permutt y cols., 2005; ADA, 2006).

La DT2 se asocia frecuentemente con una fuerte predisposición genética; sin embargo la genética de esta forma de diabetes es compleja y no está claramente definida. (ADA 2006). La DT2 parece resultar de la combinación de defectos en varios genes o de la acción simultánea de diversos alelos de susceptibilidad, o bien de la combinación de variantes frecuentes en varios loci que pueden tener efectos deletéreos en presencia de factores ambientales que predisponen al desarrollo de la enfermedad (Froguel y Velho, 2001).

Se han diseñado diversas estrategias para la búsqueda de genes que confieran susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades complejas como la DT2. Una de ellas ha sido el análisis de genes candidato, es decir, genes seleccionados por tener un papel importante en vías metabólicas que se ven afectadas por el desarrollo de la

enfermedad, considerando su conocida o posible función biológica (Froguel y Velho, 2001). Ejemplo de esto son los genes involucrados en el control de la homeostasis de la glucosa como el gen que codifica para la hormona insulina (*INS*), el gen del sustrato del receptor de la insulina uno (*IRS-1*) y el gen del factor promotor de la insulina uno (*IPF-1*), entre otros. (McCarthy y Froguel, 2002). Aunque esta estrategia ha permitido la identificación de diversos genes de susceptibilidad con pequeños efectos, hasta el momento no se han identificado genes con un efecto moderado o mayor sobre las formas poligénicas de diabetes como la DT2 (Froguel y Velho, 2001).

Otra estrategia que ha sido empleada extensamente en el estudio de la genética de la DT2 es la realización de escaneos completos del genoma para ligamiento en un grupo de familias nucleares o en pares de hermanos con DT2 (Froguel y Velho, 2001). Aunque se han mapeado un gran número de regiones con ligamiento significativo a la DT2, la identificación de genes de susceptibilidad ha avanzado de una manera muy lenta mediante el uso de esta estrategia; hasta la fecha se han realizado alrededor de 25 escaneos completos del genoma para ligamiento a DT2 y sólo pocas regiones del genoma han mostrado evidencia común de ligamiento en los diversos estudios realizados (Watanabe y cols, 2007a). Las regiones que han mostrado la mayor replicación entre los estudios incluyen los cromosomas 1q, 3q, 8p, 10q, 12q y 20q (Permutt y cols., 2005, Watanabe y cols., 2007a)

De manera interesante, uno de los primeros genes de susceptibilidad para DT2 se identificó no por análisis de ligamiento, sino por asociación (Deeb y cols., 1998). En una muestra de sujetos finlandeses, Deeb y colaboradores observaron asociación entre el polimorfismo P12A en el gen del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (*PPAR γ*) y el índice de masa corporal (IMC) y la sensibilidad a la insulina. Los individuos con al menos una copia del alelo alanina (Ala) tenían un menor índice de masa corporal y una mayor sensibilidad a la insulina comparado con los individuos homocigotos para prolina (Pro); además observaron un riesgo a DT2 incrementado significativamente (OR=4.25) para los individuos homocigotos para Pro en una muestra

de población de japoneses-americanos (Watanabe y cols., 2007a). Después de este reporte, diversos grupos de investigación se dedicaron a valorar la contribución del polimorfismo Pro12Ala, obteniéndose una gran variedad de asociaciones positivas y negativas; sin embargo, en un meta-análisis realizado por Altshuler y colaboradores en el 2000 se reportó un riesgo relativo modesto, pero significativo ($RR=1.25$) para el desarrollo de DT2 en presencia del alelo Pro (Altshuler y cols., 2000).

Finalmente, gracias al avance en el entendimiento del genoma humano, el cual se ha logrado en parte a través del desarrollo de tecnologías de genotipificación de alto rendimiento, se han podido concretar proyectos como el HapMap internacional (Zeggini, 2007). El HapMap ha hecho posible la identificación de las variaciones comunes presentes a lo largo del genoma completo, catalogando los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), proporcionando sus frecuencias y el establecimiento de sus relaciones de desequilibrio de ligamiento en muestras de cuatro diferentes poblaciones (International HapMap Consortium, 2005). Esto ha permitido el desarrollo de estudios de asociación de SNPs del genoma completo, los cuales han revolucionado recientemente el conocimiento de la etiología genética de la DT2, ya que en menos de un año se han publicado cinco estudios de asociación del genoma completo, incrementando así el número de loci de susceptibilidad a DT2 con la adición de *CDKAL*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *HHEX/IDE*, *FTO* y *SLC30A8*; la replicación de los principales hallazgos de estos estudios en diversas poblaciones, un mapeo fino de las señales de asociación y la resecuenciación de los genes implicados, son las tareas a realizar en la actualidad en el campo de la genética de la DT2 (Zeggini, 2007).

En cuanto a la epidemiología de la DT2, alrededor del 15% de los pacientes con diabetes en México son diagnosticados entre los 20 y los 40 años (Aguilar y cols., 2001). La esperanza de vida de millones de pacientes se reduce debido a la alta incidencia de DT2. Esta enfermedad conlleva altos costos humanos y económicos sobre los pacientes y sus familias, los sistemas de salud y la sociedad en general (Malecki, 2004).

En México se reportó que en el año 2000 la diabetes fue la onceava causa más frecuente de hospitalización y la segunda causa de mortalidad hospitalaria (Rull y cols., 2005). Esto se debe a que una edad de aparición temprana de la enfermedad conduce a una exposición más larga a la diabetes y también a que los adultos mexicanos con DT2 tienen una alta prevalencia de factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de complicaciones macrovasculares y microvasculares; en un estudio realizado en población mexicana con diabetes (n=3597) se informó que el 50% de los diabéticos estudiados presentaban hipertensión arterial y el 34% tabaquismo, además se encontró una alta prevalencia de dislipidemia, microalbuminuria e infecciones urinarias en la muestra estudiada (Aguilar y cols., 2003).

Las principales complicaciones macrovasculares de la DT2 son el infarto al miocardio y la insuficiencia vascular cerebral y de miembros inferiores. Entre las complicaciones microvasculares figuran la retinopatía diabética con pérdida potencial de la visión, la nefropatía que conduce a la insuficiencia renal y la neuropatía periférica con riesgo de úlceras en pies y amputaciones (Permutt y cols., 2005; Rull y cols., 2005; ADA, 2006).

C. Otros tipos específicos de diabetes

Dentro de este grupo la ADA incluye a la diabetes que resulta de defectos genéticos en la célula β pancreática, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino, endocrinopatías, diabetes inducida por fármacos o químicos, diabetes debida a infecciones, formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente y otros síndromes genéticos asociados a diabetes (ADA, 2006).

En el grupo de diabetes desarrollada debido a defectos genéticos en la célula β pancreática destaca la diabetes tipo MODY, llamada así por sus siglas en inglés: Maturity-Onset Diabetes of the Young. La diabetes tipo MODY es un subtipo de diabetes

mellitus no insulino dependiente; es una forma monogénica de diabetes, clínica y genéticamente heterogénea que se caracteriza por su inicio temprano, normalmente antes de los 25 años y frecuentemente en la infancia o en la adolescencia, un patrón de herencia autosómico dominante y un defecto primario en la función de la célula β pancreática (Velho y Froguel, 1998; Bell y Polonsky, 2001).

La diabetes tipo MODY es causada en la mayoría de los casos por mutaciones en uno de al menos seis diferentes genes; uno de ellos codifica para la enzima glucolítica glucocinasa o GCK (subtipo MODY 2) y los otros cinco genes codifican para factores de transcripción: el factor nuclear del hepatocito 4α o HNF- 4α (MODY 1), el factor nuclear del hepatocito 1α o HNF- 1α (MODY 3), el factor nuclear del hepatocito 1β o HNF- 1β (MODY 5), el factor promotor de la insulina 1 o IPF-1 (MODY 4) y el factor de diferenciación neurogénica 1 o NeuroD1/Beta2 (MODY 6) [Figura 1] (Bell y Polonsky, 2001; Froguel y Velho, 2001).

Los factores de transcripción HNF- 1α , HNF- 1β y HNF- 4α participan en la regulación tejido-específica de la expresión de genes en el hígado, en las células β pancreáticas y en otros tejidos; constituyen una parte de la red de factores de transcripción que controla la expresión de genes durante el desarrollo embrionario y en los tejidos del adulto en los cuales son coexpresados. Específicamente en la célula β pancreática, estos factores regulan la expresión del gen de la insulina y de proteínas involucradas en el transporte de glucosa, en la glucólisis y en el metabolismo mitocondrial, las cuales son importantes en la regulación de la secreción de insulina (Bell y Polonsky, 2001).

IPF-1 es un factor de transcripción que participa en el desarrollo pancreático, en la regulación transcripcional de genes expresados en la célula β pancreática incluyendo el gen de la insulina, el gen de la glucocinasa y el gen del transportador de glucosa 2 (GLUT2). NeuroD1/Beta2 es un factor involucrado en la regulación de la transcripción del gen de la insulina y es requerido para el desarrollo normal de la célula

β pancreática (Bell y Polonsky, 2001; Froguel y Velho, 2001).

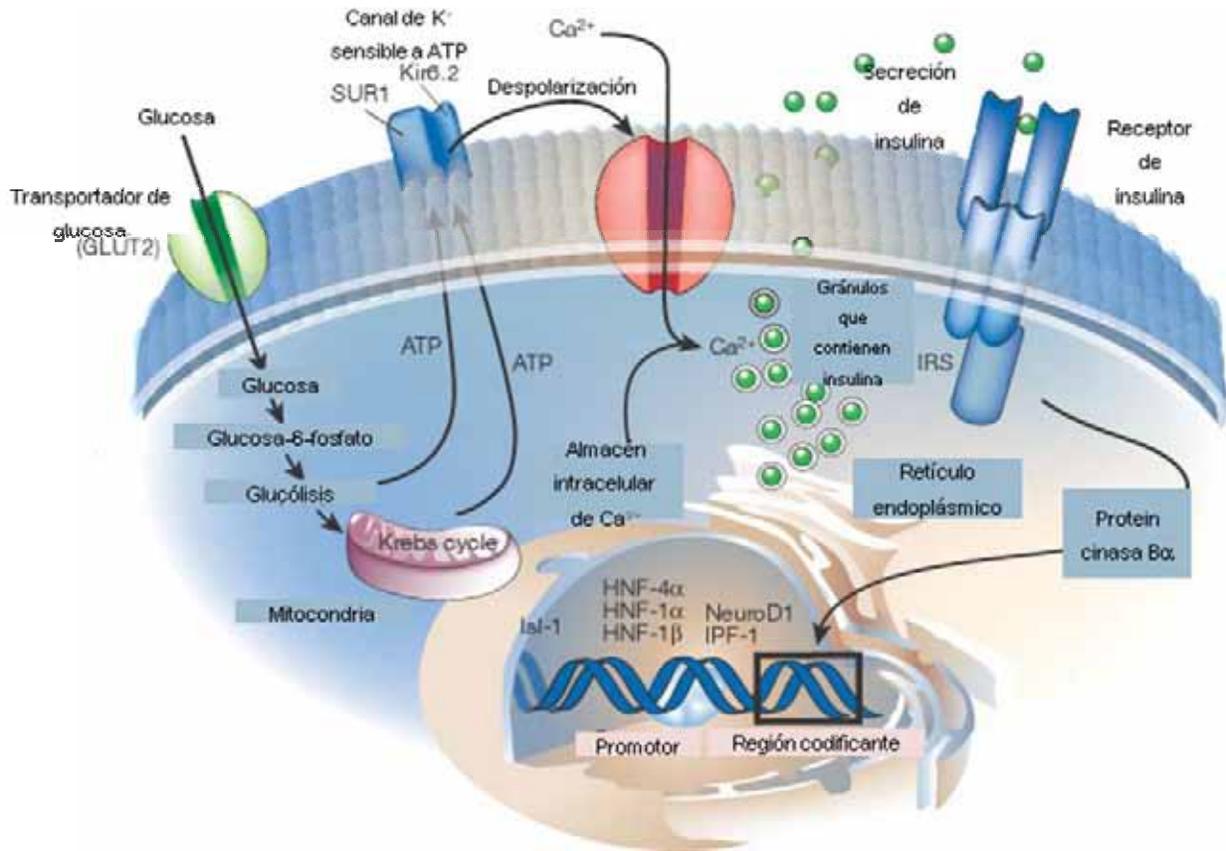


Figura 1. Modelo de una célula β pancreática donde se muestran las proteínas asociadas con la diabetes MODY. La enzima glucocinasa (MODY 2) que cataliza la transferencia de un fosfato del ATP a la glucosa para formar glucosa-6-fosfato, funciona como el sensor de glucosa de la célula β pancreática. Los factores de transcripción asociados a MODY: HNF-4 α (MODY 1), HNF-1 α (MODY 3), HNF-1 β (MODY 5), IPF-1 (MODY 4) y Neuro D1 (MODY6) regulan la transcripción del gen de la insulina y otros genes de la célula β (Bell y Polonsky, 2001).

Existen probablemente genes MODY adicionales, ya que se han reportado familias en las cuales la diabetes MODY no cosegrega con marcadores fuertemente ligados a alguno de los loci MODY conocidos (Froguel y Velho, 2001). Estas familias se han designado como el subtipo MODY X. La prevalencia de los diferentes subtipos de MODY varía entre los diversos estudios realizados en familias británicas, francesas, alemanas y españolas. Se estima que la proporción de familias MODY X representa del 16% al 45% de los casos de MODY en familias alemanas y españolas y a la fecha se

desconoce el locus genético asociado al desarrollo de este subtipo de diabetes en estas familias (Froguel y Velho, 2001).

- Mutaciones en el genoma mitocondrial como causa de algunas formas de DT2.

Además de las mutaciones en el DNA genómico, se ha reportado que algunas mutaciones en el DNA mitocondrial también se asocian al desarrollo de diabetes mellitus (Gerbitz y Gempel, 1996; Ohkubo y cols., 2001). La mutación más común (A3243G) ocurre en la posición 3243 del gen que codifica para el RNA de transferencia (RNAt) de la leucina (Gerbitz y Gempel, 1996; Bell y Polonsky, 2001). Esta mutación genera dos fenotipos distintos: el denominado síndrome MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y apoplejía) y el síndrome MIDD (diabetes y sordera de herencia materna) (Maassen y cols., 1996; ADA, 2006).

La prevalencia de MIDD en la población diabética oscila entre el 0.5 y el 3% dependiendo del origen étnico de la población estudiada (Salles y cols., 2007). Los sujetos que padecen MIDD presentan anormalidades en la secreción de insulina. Los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la hiperglucemia en estos pacientes son complejos y multifactoriales y pueden incluir defectos en la producción de insulina, glucotoxicidad y resistencia a la insulina (Velho y cols., 1996); sin embargo, se ha sugerido que los portadores de la mutación A3243G presentan defectos en la secreción de insulina como una anormalidad primaria temprana debido a una reducción progresiva de la fosforilación oxidativa en las células β pancreáticas causada por la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial (Maassen y cols., 1996; Froguel y Velho, 2001).

D. Diabetes mellitus gestacional

La diabetes mellitus gestacional o comúnmente denominada diabetes gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa de inicio o de primer

reconocimiento durante el embarazo (Buchanan y Xiang, 2005; ADA, 2006). Es importante mencionar que existe la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa pueda anteceder al embarazo como un síntoma no detectado.

2. Diabetes gestacional.

La diabetes gestacional (DG) es la intolerancia a la glucosa de severidad variable que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. La definición se aplica sin importar si se utiliza insulina o modificación de la dieta como tratamiento o si la condición persiste después del embarazo y no se aplica a las mujeres embarazadas con diagnóstico de diabetes previo al embarazo (Metzger y Coustan, 1998; Jovanovic y Pettitt, 2001; ADA, 2006).

2.1. Diagnóstico

El Cuarto Taller Internacional de DG realizado en 1997 y auspiciado por la ADA proporcionó las bases para el diagnóstico de la DG que prevalecen hasta la actualidad, recomendando que desde la primera consulta prenatal se realice una valoración del riesgo de desarrollo de DG en la paciente y que aquellas mujeres con características clínicas consistentes con un alto riesgo de DG sean evaluadas para intolerancia a la glucosa tan pronto como sea posible en el embarazo (Metzger y Coustan, 1998; ADA, 2006). La evaluación de la presencia de DG debe realizarse entre la semana 24 y la semana 28 de la gestación en aquellas mujeres que no hayan presentado intolerancia a carbohidratos antes de la semana 24 de la gestación; esta evaluación puede hacerse en uno o dos pasos (Metzger y Coustan, 1998; ADA, 2006).

En el procedimiento de dos pasos se lleva a cabo inicialmente una prueba de tamizaje midiendo la concentración de glucosa en suero o plasma una hora después de ingerir una carga de 50 gramos de glucosa (Glucose Challenge Test [GCT] o Prueba de reto a la glucosa). En este primer paso un valor de glucosa mayor a 140 mg/dL (7.8 mmol/L) identifica al 80% de las mujeres con DG y el porcentaje se incrementa a 90% si se usa un valor de corte de 130 mg/dL (7.2 mmol/L)(ADA, 2006). Las mujeres cuyo valor de glucosa excede el valor de corte establecido son sometidas al segundo paso de este procedimiento en el cual se realiza una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG). Esta prueba consiste en determinar mediante el método de la glucosa oxidasa, las concentraciones de glucosa en plasma en el ayuno, después de una hora, dos horas y tres horas de haber ingerido una carga de 100 gramos de glucosa y siguiendo los criterios de Carpenter y Coustan [Tabla 1: C y C] (Carpenter y Coustan, 1982; Metzger y Coustan, 1998; ADA, 2006; Hollander y cols., 2007).

En el procedimiento de un solo paso se realiza una CTOG sin una prueba de reto a la glucosa previa. El procedimiento de un solo paso puede ser bajo en costo y efectivo en pacientes que pertenecen a poblaciones de alto riesgo de desarrollo de DT2 o DG, por ejemplo, en americanos nativos (ADA, 2006).

En ambos procedimientos el diagnóstico de DG está basado en la elaboración de una CTOG, por lo cual la CTOG es considerada el estándar de oro para el diagnóstico de DG (Hanna y Peters, 2002; Hollander y cols., 2007). La CTOG debe realizarse en la mañana, después de un ayuno por la noche de 8 a 14 horas y después de por lo menos 3 días de dieta sin restricciones y con una ingesta mínima de 150 gramos de carbohidratos por día y actividad física ilimitada. Durante la realización de la prueba la paciente debe permanecer sentada y no debe fumar (ADA, 2006; Hollander y cols., 2007).

Tabla 1. Valores límite de la CTOG utilizados para el diagnóstico de DG (Hollander y cols., 2007).

	En el ayuno	Una hora	Dos horas	Tres horas
100 g CTOG (C y C)	95 mg/dL ó 5.3 mmol/L	180 mg/dL ó 10.0 mmol/L	155 mg/dL ó 8.6 mmol/L	140 mg/dL ó 7.8 mmol/L
100 g CTOG (NDDG)	105 mg/dL ó 5.8 mmol/L	190 mg/dL ó 10.6 mmol/L	165 mg/dL ó 9.2 mmol/L	145 mg/dL ó 8.0 mmol/L
75 g CTOG (WHO)	126 mg/dL ó 7.0 mmol/L		140 mg/dL ó 7.8 mmol/L	
75 g CTOG (ADA)	95 mg/dL ó 5.3 mmol/L	180 mg/dL ó 10.0 mmol/L	155 mg/dL ó 8.6 mmol/L	
75 g CTOG (CDA)	95 mg/dL ó 5.3 mmol/L	190 mg/dL ó 10.6 mmol/L	160 mg/dL ó 8.9 mmol/L	

C y C: criterio de Carpenter y Coustan; NDDG: National Diabetes Data Group (Grupo Nacional de Datos de Diabetes); WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud); ADA: American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes); CDA: Canadian Diabetes Association (Asociación Canadiense de Diabetes).

Se considera un diagnóstico de DG positivo cuando dos o más valores de las concentraciones plasmáticas de glucosa son iguales o exceden los valores límites establecidos para cada determinación de la CTOG. El criterio de diagnóstico establecido por Carpenter y Coustan para los valores de glucosa en plasma o suero [Tabla 1: C y C], se deriva del trabajo original de O'Sullivan y Mahan en el cual se habían señalado los valores límite para cada determinación de glucosa en sangre total (O'Sullivan y Mahan, 1964; Carpenter y Coustan, 1982; ADA, 2006).

En la actualidad, el criterio de diagnóstico de Carpenter y Coustan es el recomendado por la ADA y el más utilizado a nivel mundial; sin embargo, también se usa el criterio basado en la conversión de los valores de glucosa en sangre total a valores de glucosa en suero o plasma establecido por el grupo nacional de datos sobre

diabetes (The National Diabetes Data Group), una organización de Estados Unidos [Tabla 1: NDDG] (National Diabetes Data Group, 1979; Hollander y cols., 2007).

Alternativamente, el diagnóstico de DG en algunos centros europeos y en Japón se realiza mediante el uso de una carga de 75 gramos de glucosa y mediciones en el ayuno, después de una hora y de dos horas, como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud [Tabla 1: WHO] (Alberti y Zimmet, 1998; Agarwal y cols., 2007; Hollander y cols., 2007). La ADA y la Asociación Canadiense de Diabetes (CDA) establecen diferentes valores de corte para la CTOG de 75 gramos [Tabla 1: ADA y CDA]; sin embargo, esta prueba no está tan bien validada como la CTOG de 100g (ADA, 2006; Hollander y cols., 2007).

2.2. Epidemiología

La prevalencia mundial de la DG varía entre 1 y 14%, dependiendo de la población estudiada y el criterio de diagnóstico utilizado (ADA, 2006). En Estados Unidos la DG complica alrededor del 4% de todos los embarazos, resultando en 135,000 casos anualmente (ADA, 2006).

La frecuencia de la DG normalmente refleja la frecuencia de la DT2 en la población analizada. De manera incuestionable, existen diferencias étnicas en la prevalencia de la DG (Ben-Haroush y cols., 2003; Ferrara, 2007). En Estados Unidos, las mujeres pertenecientes a los grupos de americanos nativos, asiáticos, hispanos y afroamericanos tienen un mayor riesgo de desarrollar DG que las mujeres blancas no hispanas (Ferrara, 2007).

En México, la prevalencia nacional de DG es desconocida; sin embargo, se han realizado desde hace 20 años algunos estudios en diferentes regiones del país. El

primero de ellos se llevó a cabo en un hospital de Gineco-Obstetricia de la ciudad de Monterrey, Nuevo León, con una muestra de 693 mujeres embarazadas de las cuales el 4.3% presentó DG (Forsbach y cols., 1988). Posteriormente, en la ciudad de México se reportó una incidencia de DG del 7% en un hospital perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (Grupo de estudio sobre Diabetes Mellitus, 1992). Un tercer estudio elaborado en una clínica de consulta externa en Monterrey, Nuevo León, presentó una prevalencia de DG de 6% en 732 embarazadas (Tamez y cols., 1993) y finalmente en un estudio realizado en 519 mujeres provenientes de diversas instituciones de salud de Ciudad Juárez, Chihuahua se encontró una prevalencia de DG del 11% (Meza y cols., 1995).

En la actualidad, en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPER-IER) en la ciudad de México, en referencia a un comunicado del director de esta institución, un grupo de investigación está llevando a cabo un estudio para determinar cuál es el mejor criterio de diagnóstico para la población mexicana y en dicho estudio se ha encontrado una prevalencia de DG de 9.7-19.6%.

2.3. Fisiología del embarazo

Durante un embarazo normal ocurren diversas alteraciones fisiológicas cuyo fin es proveer un ambiente metabólico que favorezca inicialmente la deposición de grasa en la madre y posteriormente optimice el crecimiento del feto (Shaath y Groop, 2007). Estos cambios también preparan a la madre y al feto para obtener los requerimientos nutricionales necesarios, manteniendo una homeostasis durante todo el desarrollo del embarazo.

Se ha estimado que una mujer con una adecuada alimentación aumenta aproximadamente 12.5 kg durante un embarazo normal y el peso del bebé al

nacimiento es en promedio de 3.4 kg; el gasto energético total de este embarazo típico se calcula en 84,300 kcal (van Raaij, 1995; Butte y cols., 2004).

La etapa temprana de la gestación puede ser considerada como un estado anabólico en la madre, con un incremento en el almacenamiento de grasa y un ligero incremento en la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, los nutrientes son almacenados en la etapa temprana para cubrir las demandas tanto maternas como del feto-placenta en la etapa tardía de la gestación y en la lactancia (Lain y Catalano, 2007).

Conforme avanza la gestación, la secreción de insulina se incrementa, alcanzando su máximo en el tercer trimestre. La etapa tardía de la gestación se caracteriza por ser un estado catabólico con una disminución en la sensibilidad a la insulina alrededor de un 70% (Catalano y cols., 1993; Catalano y cols., 1999; Lain y Catalano, 2007). Un aumento en la resistencia a la insulina conduce a un incremento en la concentración de la glucosa materna y de los ácidos grasos libres, permitiendo una mejor disponibilidad de los sustratos para el crecimiento del feto (Lain y Catalano, 2007). La resistencia a la insulina parece resultar de la combinación del aumento de adiposidad materna y los efectos desensibilizadores a la insulina de los productos hormonales de la placenta. El hecho de que la resistencia a la insulina se abate rápidamente después del parto sugiere que los principales contribuyentes a este estado de resistencia son las hormonas placentarias (Buchanan y Xiang, 2005).

En un embarazo normal, las células β pancreáticas compensan el incremento de la resistencia a la insulina para controlar la concentración de la glucosa en sangre (Buchanan y cols., 1990a; Catalano y cols., 1991).

Con el fin de satisfacer la demanda incrementada de insulina que ocurre durante la etapa tardía del embarazo, los islotes de Langerhans experimentan cambios estructurales y funcionales. Los cambios adaptativos que ocurren son: 1) aumento en la secreción de insulina con una disminución del umbral de glucosa para estimular dicha

secreción, 2) aumento en la síntesis de insulina, 3) incremento en la proliferación de las células β pancreáticas, 4) aumento de las uniones estrechas entre las células β pancreáticas y 5) incremento en el metabolismo de la glucosa y del adenosil monofosfato cíclico (AMPC) (Sorenson y Brelje, 1997; Weinhaus y cols., 1998). Se ha evidenciado por estudios realizados en ratón, rata e islotes humanos que todas las modificaciones anteriores pueden ser producidas por la acción de hormonas como el lactógeno placentario y la prolactina (Brelje y cols., 1993).

El desarrollo paralelo de la resistencia a la insulina y el incremento en los niveles sanguíneos del lactógeno placentario y la hormona de crecimiento placentaria, ambas hormonas con una fuerte acción lipolítica y acción anti-insulina, sugieren que estas dos hormonas y probablemente otras hormonas diabetogénicas, incluyendo el cortisol, la progesterona y los estrógenos, son las responsables del desarrollo de resistencia a la insulina durante la etapa tardía del embarazo (Sivan y cols, 1999).

En la etapa tardía del embarazo también se presenta un incremento del 20-30% en la producción de glucosa endógena; la gluconeogénesis es la vía de mayor contribución para este incremento en la glucosa (Catalano y cols., 1991; Kalhan y cols., 1997). La acción de las hormonas lipolíticas favorece el catabolismo de lípidos en esta etapa del embarazo y en consecuencia se elevan los niveles circulantes de ácidos grasos libres principalmente en el ayuno, cuando las concentraciones de hidratos de carbono están disminuidas. La elevación de los ácidos grasos es una de las principales causas de resistencia a la insulina (Buchanan y cols., 1990b; Sivan y cols., 1999). 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 a una elevación de los niveles de triacilgliceroles y ésteres de coenzima A de ácidos grasos de cadena larga (Kraegen y cols., 2001); esta elevación conduce a una alteración en la señalización de la insulina o en la actividad de diversas enzimas, por ejemplo la glucógeno sintasa, ya sea directamente o vía la activación crónica de mediadores como la protein-cinasa C. (Kraegen y cols., 2001).

La glucosa es el sustrato energético principal utilizado por el feto y su transporte a través de la placenta es por difusión facilitada, mediante dos transportadores independientes de sodio: GLUT3 y GLUT1 cuya expresión no es dependiente de insulina (Illsley, 2000; Baumann y cols., 2002). La cantidad de glucosa transportada hacia el feto a través de la placenta es proporcional a la concentración de glucosa en sangre materna (Gaither y cols., 1999). El GLUT1 es el principal transportador transplacentario y está presente tanto en las microvellosidades como en la membrana basal; su actividad y expresión en la membrana basal (cara hacia el feto) aumentan hasta en un 50% en el segundo trimestre del embarazo. El GLUT3 se encuentra sólo en el endotelio vascular arterial y su papel es transportar la glucosa de la circulación arterial umbilical hacia el feto (Illsley, 2000).

2.4. Fisiopatología de la DG.

La DG es una forma de hiperglucemia. En general, la hiperglucemia resulta de un abastecimiento de insulina inadecuado para cubrir con las demandas de los tejidos para la regulación normal de la glucosa sanguínea (Buchanan y Xiang, 2005).

Diversos estudios que se han realizado en la etapa tardía del embarazo, cuando los requerimientos de insulina son altos y difieren solo ligeramente entre una mujer normal y una mujer con DG, revelan consistentemente una respuesta menor a la insulina en las mujeres con DG (Buchanan y Xiang, 2005). En un estudio desarrollado en el tercer trimestre de la gestación en mujeres con DG y en mujeres con un embarazo normal, donde se empleó la técnica del modelo mínimo para obtener medidas simultáneas de la sensibilidad a la insulina y de la respuesta de las células β pancreáticas a la glucosa, se observó que la primera fase de la respuesta de la insulina estaba significativamente reducida en las mujeres con DG comparada con la respuesta en las mujeres con un embarazo normal (Buchanan y cols., 1990a). En otro estudio realizado en la etapa tardía del embarazo de mujeres latinas con DG y en mujeres con

un embarazo normal, se reportó que las mujeres con DG tenían un defecto en la función de las células β pancreáticas en presencia de resistencia a la insulina de alrededor del 67% comparado con las mujeres embarazadas normales (Xiang y cols., 1999).

Los estudios realizados en mujeres después del embarazo, cuando las mujeres con DG previa son más resistentes a la insulina que las mujeres normales, con frecuencia revelan que la respuesta de la insulina es similar en ambos grupos o se encuentra reducida ligeramente en las mujeres con DG previa (Catalano y cols., 1999; Homko y cols., 2001). Sin embargo, cuando los niveles de la insulina y su respuesta son expresados de manera relativa al grado de resistencia a la insulina presente en cada paciente, se encuentra que existe un importante defecto en la función de las células β pancreáticas de las mujeres con DG previa (Kautzky y cols, 1997; Buchanan, 2001; Buchanan y Xiang, 2005). En un estudio desarrollado en mujeres con DG, en mujeres con un embarazo normal y en mujeres no embarazadas sanas se observó que la sensibilidad de la célula β pancreática a la glucosa para la consecuente liberación de insulina estaba disminuida en las mujeres con DG alrededor de un 40-50% comparada con las mujeres con un embarazo normal y con las mujeres no embarazadas sanas (Kautzky y cols, 1997).

Se ha sugerido que la resistencia a la insulina en las pacientes con DG tiene dos componentes: 1) la resistencia a la insulina que precede al embarazo, la cual es probablemente parcialmente heredada y parcialmente adquirida y 2) un incremento fisiológico en la resistencia a la insulina que ocurre en todas las mujeres durante la segunda mitad del embarazo, desaparece después del parto y se cree que es resultado de los niveles elevados de diversas hormonas circulantes durante el embarazo (Homko y cols., 2001). Sin embargo, es importante considerar que la resistencia a la insulina de manera individual, a menudo no es suficiente para causar diabetes, a menos que alcance niveles similares a los que tienen los pacientes con anticuerpos anti-receptor de insulina; por lo tanto, las mujeres con DG tienen también defectos en la secreción de la

insulina así como defectos en la acción de esta hormona (Homko y cols., 2001; Ben-Haroush y cols., 2003).

Durante el tercer trimestre del embarazo la realización de mediciones precisas y directas de la sensibilidad a la insulina han identificado en las mujeres con DG la presencia de resistencia a la capacidad de la insulina para estimular la utilización de la glucosa y para suprimir la producción de glucosa y niveles de ácidos grasos (Xiang y cols, 1999; Catalano y cols., 1999). Además, en diversos estudios se ha reportado un incremento en la producción de glucosa endógena en mujeres con DG en comparación con mujeres embarazadas sanas (Catalano y cols., 1993; Catalano y cols., 1999; Shaat y Groop, 2007).

Se ha observado también que en las mujeres obesas que desarrollan DG puede incrementarse considerablemente la secreción de insulina por semanas o meses en asociación con la resistencia a la insulina adquirida durante el embarazo. Sin embargo, el incremento ocurre a lo largo de una curva de sensibilidad-secreción de la insulina que es aproximadamente 50% más baja en las mujeres con DG comparada con las mujeres embarazadas normales, es decir, en las mujeres con DG la cantidad de insulina secretada es menor en un 50% dado cualquier grado de resistencia a la insulina que en las mujeres que no desarrollan DG durante el embarazo [Figura 2] (Buchanan, 2001; Buchanan y Xiang, 2005).

El hecho de que la curva de sensibilidad-secreción de la insulina sea alrededor de un 50% más baja en las mujeres con DG comparada con las mujeres embarazadas normales [Figura 2] sugiere la presencia de un mayor deterioro en la función de las células β pancreáticas en las mujeres con DG, el cual con el paso del tiempo puede conducir a una hiperglucemia progresiva y por ende al desarrollo de diabetes después del embarazo (Buchanan y Xiang, 2005).

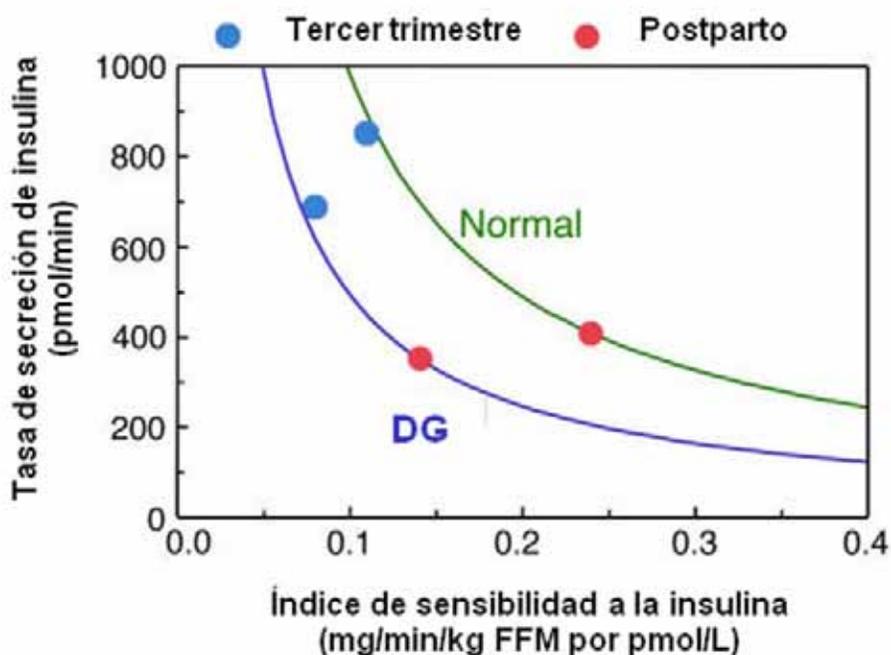


Figura 2. Relación entre la sensibilidad a la insulina y la secreción de insulina en mujeres con DG y mujeres normales durante el tercer trimestre del embarazo y fuera del embarazo (Postparto). Los valores fueron medidos al término de un clamp hiperglucémico de 3 horas (concentración de glucosa en plasma alrededor de 180 mg/dL). Las tasas de secreción de insulina prehepática fueron calculadas a partir de la insulina en plasma y los niveles de péptido-C. El índice de sensibilidad a la insulina fue calculado como un estado estacionario en la tasa de infusión de glucosa dividida entre el estado estacionario de la concentración de insulina en plasma. FFM es fat-free mass [masa libre de grasa] (Buchanan, 2001; Buchanan y Xiang, 2005).

Después del parto, una vez que la resistencia a la insulina provocada por el embarazo se abate, es posible observar que las mujeres con DG terminan en promedio con resistencia a la insulina mayor que las mujeres que tuvieron un embarazo normal. Este hallazgo ha sido consistente en diversos estudios e indica que la mayoría de las mujeres que desarrollan DG tienen resistencia a la insulina crónica y esto ha sido documentado tanto en mujeres delgadas que desarrollan DG como en obesas (Catalano y cols., 1993; Catalano y cols., 1999).

Por todo lo anterior, es probable que no exista una etiología bioquímica específica para la DG (Buchanan y Xiang, 2005). Las mujeres con DG tienden a ser

obesas, por lo cual se sugiere que los mecanismos que promueven la obesidad o que relacionan la obesidad con la resistencia a la insulina estén jugando un papel importante en el desarrollo de la DG. En estudios que incluyen un número pequeño de individuos se han reportado niveles elevados de leptina circulante, marcadores de inflamación como TNF- α y proteína C reactiva y niveles bajos de adiponectina en mujeres con DG (Kautzky y cols., 2001; Winkler y cols., 2002; Retnakaran y cols., 2003; Winzer y cols., 2004; Buchanan y Xiang, 2005).

Se ha observado que los defectos en la unión de la insulina a su receptor en el músculo esquelético no parecen estar involucrados con la resistencia a la insulina que se presenta en las mujeres con DG (Damm, 1998). Sin embargo, se ha reportado que la actividad de la tirosin-cinasa del receptor de la insulina está disminuida en el músculo esquelético de las mujeres con DG comparada con mujeres embarazadas normales y mujeres no embarazadas (Shao y cols., 2000).

Otros eventos que se han evidenciado en el músculo esquelético y en los adipocitos de mujeres con DG o con historia de DG previa son: alteraciones en la vía de señalización de la insulina, localización subcelular anormal de los transportadores GLUT4, expresión reducida de PPAR γ , expresión incrementada de la glucoproteína PC-1 y una reducción del transporte de glucosa mediado por insulina (Shao y cols., 2000; Buchanan y Xiang, 2005; Weijers y Bekedam, 2007).

Recientemente Barbour y colaboradores establecieron los posibles mecanismos por los cuales se desarrolla resistencia a la insulina en las mujeres con DG [Figura 3] (Barbour y cols., 2007). La ruta para que la insulina estimule el transporte de la glucosa en músculo involucra la activación del receptor de la insulina, el cual se acopla a los sustratos del receptor de la insulina 1 y 2 (IRS-1 e IRS-2) y fosforila a estas proteínas en sus residuos de tirosina (pY).

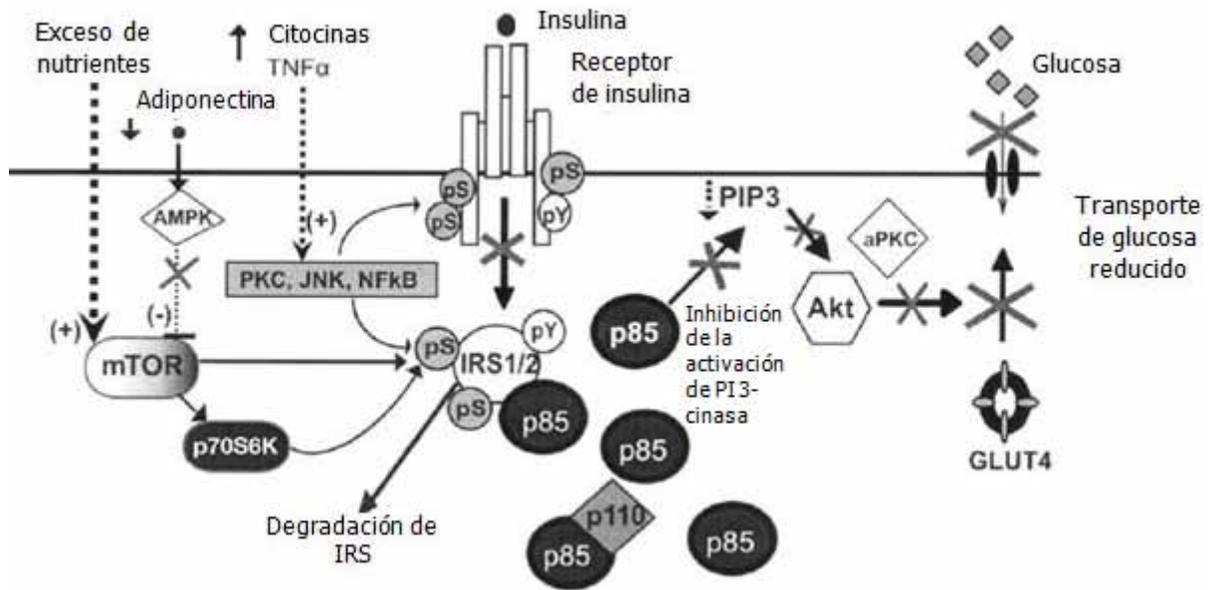


Figura 3. Mecanismos potenciales para la resistencia a la insulina en músculo esquelético durante la etapa tardía de un embarazo con diabetes gestacional en humanos (Barbour y cols., 2007).

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-cinasa) está compuesta por dos subunidades: la subunidad reguladora $p85\alpha$ y la subunidad catalítica $p110$. IRS-1 recluta a la subunidad $p85\alpha$ de la PI 3-cinasa, resultando en la fosforilación de los fosfolípidos unidos a membrana en la posición 3' y en la obtención del fosfoinositol-3,4,5-fosfato [PIP3]. La producción de PIP3 se requiere para la activación de Akt y para la señalización de la translocación de GLUT4. La fosforilación defectuosa en los residuos de tirosina del receptor de insulina (IR) y de IRS-1 se ha observado en mujeres con DG y está asociada a un incremento en la fosforilación en serina inhibitoria (pS) y a una importante pérdida en los niveles de IRS-1 comparados con mujeres obesas no diabéticas. Una fosforilación incrementada en los residuos de serina del IR y de IRS-1 se ha relacionado a una activación incrementada de JNK y de la protein-cinasa C (PKC), enzimas que son activadas por citocinas inflamatorias como $TNF-\alpha$ [Figura 3] (Barbour y cols., 2007).

De manera alternativa, el incremento en la fosforilación de los residuos de serina de IRS-1 puede ser atribuido a la activación aumentada de la ruta de mTOR-p70S6.

mTOR, p70S6K1 y la protein-quinasa activada por AMP (AMPK) actúan como sensores de nutrientes y de energía dentro de la célula. Una fosforilación basal más alta de p70S6K1 se ha observado en mujeres con DG versus controles; esto puede contribuir al incremento en la fosforilación basal de los residuos de serina de IRS-1 y conducir a su degradación. AMPK es un blanco de la señalización de adiponectina y es un regulador negativo de mTOR [Figura 3] (Barbour y cols., 2007).

En las mujeres con DG los niveles de adiponectina son bajos, lo cual podría contribuir al incremento en la activación de la ruta de mTOR. Tanto en mujeres embarazadas normales como en las mujeres con DG, los niveles de p85 α están elevados antes del parto pero regresan a la normalidad después del parto. Un exceso en p85 α actúa como una molécula de señalización negativa, bloqueando la asociación de la PI 3-quinasa (el heterodímero formado por p85 y p110) con el IRS-1 y en consecuencia atenuando la activación de la PI 3-quinasa durante el embarazo. La pérdida de la activación de la PI 3-quinasa a partir de un incremento en p85 y un incremento en la fosforilación de los residuos de serina de IRS-1 conduce a la reducción de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y esto resulta en una disminución en la utilización de la glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético (Barbour y cols., 2007).

2.5. Complicaciones.

El desarrollo de DG durante el embarazo implica riesgos considerables en la salud tanto de la madre como del feto (Winzer y cols., 2004).

En la madre se incrementa el porcentaje de cesáreas, principalmente por la presencia de macrosomía en el feto; sin embargo, se ha encontrado que aún después de haber normalizado el peso del bebé al nacimiento mediante tratamiento, la tasa de cesáreas es del 20% en las mujeres con DG comparado con un 10% en mujeres con un

embarazo normal (Hollander y cols., 2007).

La preeclampsia y la hipertensión gestacional son complicaciones frecuentes en las mujeres con DG. La hipertensión se presenta en 6-9% de los embarazos y es una causa de muerte materna en alrededor del 15% de los embarazos en Estados Unidos y a nivel mundial (Montoro y cols., 2005). La preeclampsia es comúnmente definida como la condición médica en la cual se desarrolla hipertensión (presión sistólica ≥ 140 mmHg y presión diastólica ≥ 90 mmHg) y proteinuria (> 300 mg/24h) después de la semana 20 del embarazo (Higgins y de Swiet, 2001; Montoro y cols., 2005). En un estudio realizado con un gran número de pacientes se detectó preeclampsia en el 2.7% de las mujeres con DG comparado con un 1.1% en las mujeres con un embarazo normal (Xiong y cols., 2001; Ben-Haroush y cols., 2003); de igual manera en otro estudio realizado en 4572 mujeres embarazadas, se encontró que la DG estaba asociada a un riesgo dos a tres veces mayor de desarrollo de preeclampsia (Schmidt y cols., 2001). En otros estudios se ha reportado que las mujeres con DG presentan un riesgo de desarrollar preeclampsia del 10-30% comparado con un 5-7% en mujeres con tolerancia normal a la glucosa durante su embarazo (Montoro y cols., 2005).

De manera general, se ha reportado una incidencia de desórdenes hipertensivos del 20% en mujeres con DG comparado con un 11% en controles (Hollander y cols., 2007) y se ha propuesto como factor etiológico a la resistencia a la insulina, una condición persistente en las mujeres con DG (Innes y cols., 2005; Carpenter, 2007). En un estudio donde se utilizó la técnica de clamp euglicémico-hiperinsulinémico se demostró que la resistencia a la insulina estaba incrementada más de dos veces en 8 mujeres con DG e hipertensión crónica comparadas con 15 mujeres con DG únicamente (Caruso y cols., 1999). Sin embargo, en otro estudio realizado en mujeres con DG no se encontró ninguna correlación entre diversas medidas de resistencia a la insulina y la función de la célula β pancreática con el subsecuente desarrollo de preeclampsia durante el embarazo, concluyendo así que aún hacen falta más estudios para determinar la contribución de la resistencia a la insulina a la etiología de la

preeclampsia (Montoro y cols., 2005).

Se ha demostrado que las mujeres que desarrollan DG durante su embarazo presentan niveles más altos de biomarcadores de inflamación y resistencia vascular periférica cuatro años después del parto, comparadas con las mujeres que tuvieron un embarazo normal (Carpenter, 2007). Diversos estudios de cohorte que han utilizado bases de datos de poblaciones de mujeres embarazadas han identificado consistentemente una asociación clínica significativa entre la hipertensión gestacional y la preeclampsia con desórdenes hipertensivos posteriores al parto. Si bien se ha sugerido que la DG es un factor de riesgo cardiovascular (Tamás y Kérenyi, 2001), las asociaciones con enfermedad arterial coronaria o accidente cerebro vascular son poco consistentes y requieren de la realización de más estudios (Carpenter, 2007).

Se ha propuesto a la DG como un modelo mediante el cual es posible identificar defectos metabólicos tempranos que preceden al desarrollo de la diabetes en mujeres jóvenes; para ello se han utilizado principalmente dos estrategias hasta el momento (Xiang y cols., 1999). Los estudios longitudinales se han enfocado en las características clínicas y en las concentraciones de insulina plasmática durante el embarazo como posibles factores predictivos de diabetes; estos estudios han revelado que la hiperglucemia previa al parto, la obesidad y la baja respuesta de la insulina a la glucosa oral son predictivos de la persistencia o del desarrollo de diabetes después del embarazo. Los estudios transversales han incluido medidas más detalladas del metabolismo previo al parto en pequeños grupos de mujeres con y sin DG; estos estudios han consistentemente evidenciado daño en la función de la célula β pancreática comparado con mujeres embarazadas normales y un exceso en la resistencia a la insulina en la etapa tardía del embarazo en aquellas pacientes con hiperglucemia presente en el ayuno (Xiang y cols., 1999).

Aunque la mayoría de las mujeres con DG regresan a la tolerancia normal a la glucosa después del parto, se ha evidenciado que la intolerancia a la glucosa detectada

durante el embarazo es un factor predictivo de desarrollo posterior de DT2 en la madre. La prevalencia de DT2 en mujeres previamente diagnosticadas con DG es muy alta comparada con las mujeres que no desarrollaron DG durante sus embarazos (Kjos y Buchanan, 1999; Metzger, 2007). En una revisión sistemática reciente, se evaluó la incidencia acumulativa de DT2 en mujeres con DG que fueron examinadas en diversos estudios de seguimiento a largo plazo, a partir de las seis semanas hasta 28 años después del parto y se reportó que dicha incidencia varía desde 2.6 hasta más del 70% (Kim y cols., 2002). Después de ajustar por duración del seguimiento y cohortes de los estudios, se mostró que esta incidencia se incrementaba marcadamente en los primeros cinco años después del parto y que parecía estabilizarse después de los 10 años. Un nivel elevado de glucosa en el ayuno durante el embarazo fue el factor de riesgo más importante para el desarrollo de DT2 en el futuro (Kim y cols., 2002; Ben-Haroush y cols., 2003; Agarwal y cols., 2005; Buchanan y Xiang, 2005). En otro estudio se reportó que las mujeres con DG tienen un riesgo de 17-63% de DT2 dentro de los 5-16 años después del parto. Este riesgo varía de acuerdo a diferentes parámetros. Dos o más valores alterados en la CTOG, un valor alterado de glucosa una hora o dos después de haber ingerido una carga oral de glucosa y un índice de masa corporal alto en el embarazo son factores predictivos útiles de diabetes en una etapa posterior de la vida (Ben-Haroush y cols., 2003).

La primera CTOG postparto debe realizarse alrededor de dos meses después del parto con el objetivo de diagnosticar a aquellas mujeres que siguen siendo diabéticas e identificar a las mujeres con alto riesgo de desarrollar DT2. La CTOG postparto no solo sirve para identificar el 10% de las mujeres que pueden tener diabetes posterior al parto, sino también para identificar un grupo de alto riesgo que deberá tener un seguimiento intensivo y una evaluación regular de la tolerancia a la glucosa en años posteriores al embarazo (Damm, 1998; Buchanan y Kjos, 1999). Es importante considerar también que la DG recurre en alrededor del 20-50% de los embarazos subsecuentes (Hanna y Peters, 2002).

El 22% de las mujeres con DG todavía presentan niveles elevados de glucosa seis semanas después del parto (Catalano y cols., 1991; Hollander y cols., 2007). La prevalencia de DT2 que se ha reportado en mujeres previamente diagnosticadas con DG varía de acuerdo al grupo étnico y va desde un 9% en mujeres caucásicas a un 25% en mujeres asiáticas, 47% en hispanas y 70% en aborígenes canadienses (Henry y cols., 1993; Kjos y cols., 1995; Mohamed y Dooley, 1998).

En el feto, la macrosomía es la complicación más común asociada a la DG (Jovanovic, 2001; Maresh, 2001; Hollander y cols., 2007). La macrosomía se define como el peso al nacimiento mayor que la percentila 90 para una edad gestacional, etnicidad y sexo determinados; también se define como un peso al nacimiento por arriba de dos desviaciones estándar del peso promedio normal o como un peso al nacimiento mayor a los 4000 gramos, independiente de la edad gestacional y del sexo (Jovanovic, 2001; Zisser y cols., 2006; Catalano y cols., 2007).

Se ha reportado que las mujeres con DG que monitorean solamente sus niveles de glucosa preprandiales tienen un 42% de riesgo de macrosomía neonatal mientras que aquellas que vigilan tanto los niveles preprandiales como los niveles de glucosa una hora después de haber comido, disminuyen el riesgo de macrosomía neonatal hasta ser cercano a lo normal o alrededor de un 12% (de Veciana y cols., 1995). En otro estudio donde se evaluó la influencia del criterio de diagnóstico de DG (ADA vs WHO) sobre las complicaciones del embarazo en mujeres brasileñas, se evidenció que la DG independientemente del criterio de diagnóstico utilizado, estaba asociada a un riesgo mayor del 50% de macrosomía neonatal (Schmidt y cols., 2001). De manera interesante, se ha sugerido que el feto tiene un papel importante en la determinación de su peso al nacer, ya que se ha demostrado que la actividad fetal incrementada puede reducir el impacto de la hiperglucemia materna en el peso al nacimiento; el feto inactivo parece tener un mayor riesgo de presentar macrosomía mediada por los niveles de glucosa en la madre (Zisser y cols., 2006).

La incidencia de macrosomía en los bebés de mujeres con DG varía entre 16 y 29%, a diferencia del 10% presente en las mujeres sin DG (Hollander y cols., 2007). Sin embargo, en un estudio se concluyó que sólo el 12% de la macrosomía puede ser atribuida a la presencia de DG en la madre y que el resto puede deberse a la edad materna, al peso materno y a la multiparidad (Casey y cols., 1997). En otro estudio realizado en Estados Unidos se evidenció que el riesgo de desarrollo de macrosomía fetal estaba incrementado en las mujeres obesas con DG controladas con dieta versus mujeres con DG controladas con dieta y con un índice de masa corporal normal, es decir, entre 18.5 y 24.9 kg/m² (Langer y cols., 2005a; Catalano y cols., 2007). Con respecto a México, en un estudio se reportó que la prevalencia de macrosomía en los bebés de mujeres con DG es alrededor del 25% (Forsbach y cols., 1998).

Hasta el momento se desconoce la etiología de la macrosomía en los bebés de las mujeres con DG. Sin embargo se ha establecido que la hiperglucemia materna y altos niveles de aminoácidos pueden causar hiperglucemia fetal y también favorecer la hiperplasia pancreática fetal con una consecuente hiperinsulinemia; la insulina actúa como un factor de crecimiento, posiblemente resultando en el desarrollo de macrosomía (Hanna y Peters, 2002; Kwik y cols., 2007).

La intolerancia a la glucosa durante el embarazo además de asociarse a un peso del bebé mayor al nacimiento también se ha relacionado con dificultades concomitantes durante el parto: distocia de hombro (cuando el hombro anterior se sitúa arriba y atrás de la sínfisis del pubis y no desciende espontáneamente), incremento en el número de cesáreas y traumas al nacimiento como fractura clavicular y daño en el plexo braquial (Tamás y Kérenyi, 2001; Kwik y cols., 2007; Hollander y cols., 2007).

Se ha reportado que en los bebés de las mujeres con DG también existe un incremento en los trastornos metabólicos como la hipoglucemia neonatal, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia y policitemia (Hanna y Peters, 2002; Hollander y cols., 2007). La mortalidad perinatal fue originalmente considerada como una de las

complicaciones más importantes de la DG; sin embargo, en estudios recientes con un gran número de individuos no se ha logrado confirmar un incremento en la tasa de mortalidad de los bebés de mujeres con DG comparada con la de mujeres con embarazos normales (Hollander y cols., 2007).

Las malformaciones congénitas también han sido un punto de controversia ya que algunos estudios han reportado una mayor proporción de malformaciones congénitas en el sistema nervioso central, en el sistema renal y en el urinario de los bebés de las mujeres con DG comparados con los bebés de mujeres con embarazos normales (Martínez y cols., 1998; Sheffield y cols., 2002) mientras que en otros estudios se ha concluido que la tasa de malformaciones congénitas en los bebés de madres con DG es ligeramente mayor o prácticamente igual que la encontrada en los bebés de las mujeres con embarazos normales (Janssen y cols., 1996; Farrel y cols., 2002). En estudios realizados en México se ha estimado que la prevalencia de malformaciones en los bebés de mujeres con DG es del 6 al 9.8% (Forsbach y cols., 1998; Lazalde y cols., 2001).

El desarrollo fetal en un ambiente intrauterino anormal como el que se presenta en la diabetes gestacional, puede inducir alteraciones en el metabolismo fetal con consecuencias sobre la tolerancia a la glucosa del bebé en la edad adulta y el posible riesgo de desarrollo de obesidad (Aerts y van Assche, 2006; Metzger, 2007). El impacto del metabolismo materno sobre el desarrollo del feto, el cual produce una tendencia diabetogénica en una etapa posterior de la vida, ha sido estudiado en diversos modelos animales, en los cuales el metabolismo materno se ha manipulado experimentalmente. En humanos, donde el componente genético y la influencia del ambiente son heterogéneos, es más complejo determinar el impacto preciso del metabolismo materno sobre el desarrollo del feto. Sin embargo, se han realizado varios estudios epidemiológicos que demuestran un origen fetal similar de la diabetes adulta (Aerts y van Assche, 2006).

Se ha observado en estudios realizados en ratas que la hiperglucemia moderada en el ambiente intrauterino de una madre con diabetes estimula el páncreas fetal, lo cual conduce a presencia de hiperinsulinemia y anabolismo acelerado, resultando en macrosomía fetal y neonatal. Por el contrario, la hiperglucemia severa induce sobreestimulación de las células β pancreáticas fetales, provocando desorganización celular e incapacidad de secreción apropiada de la insulina; la hiperinsulinemia inicial se convierte en hipoinsulinemia, anabolismo disminuido y microsomía [Figura 4] (Aerts y van Assche, 2006).

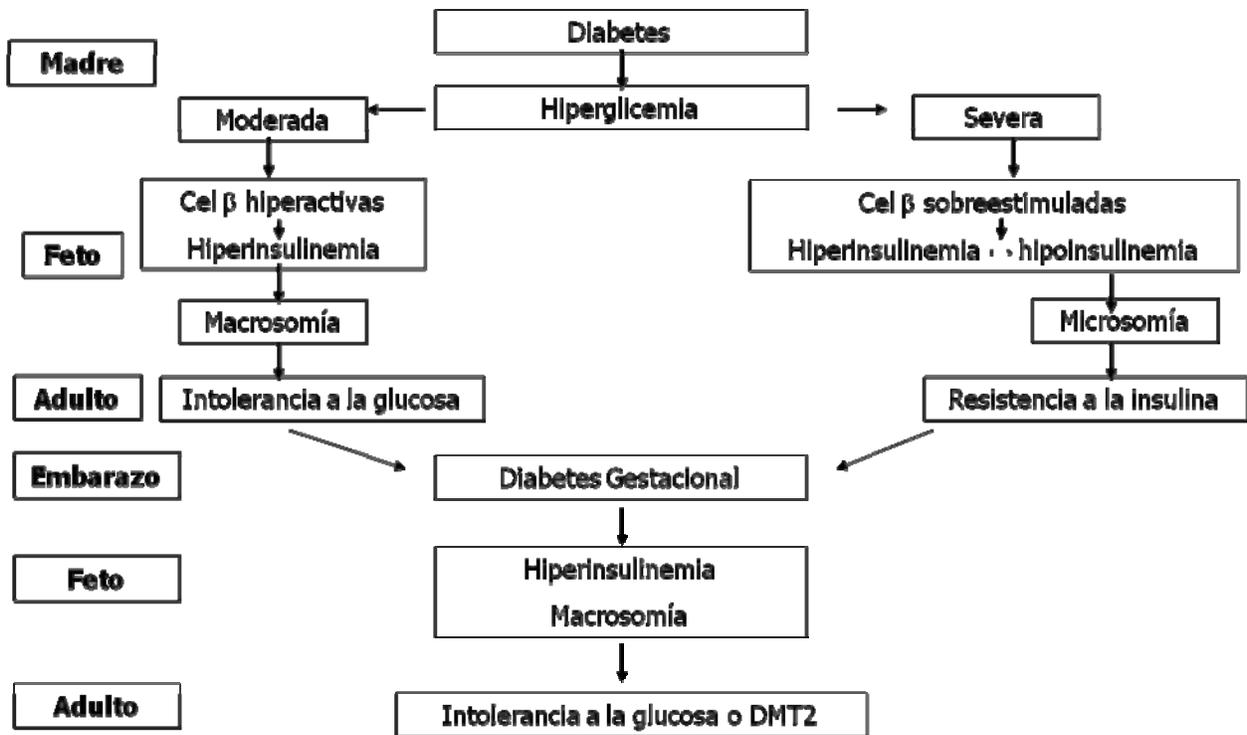


Figura 4. Efecto transgeneracional de la diabetes materna durante el embarazo. (Figura modificada de Aerts y van Assche, 2006).

En estudios realizados en ratas se ha podido evidenciar que los hijos jóvenes de madres con diabetes moderada manifiestan una respuesta reducida a la insulina e intolerancia a la glucosa, mientras que los hijos jóvenes de madres con diabetes severa presentan una respuesta excesiva a la insulina y bajo condiciones hiperinsulinémicas,

desarrollan resistencia a la insulina, principalmente ubicada en hígado y en músculo esquelético [Figura 4] (Hattersley y Tooke, 1999; Aerts y van Assche, 2006). Por lo tanto, la tendencia diabetogénica es transmitida de madre a hijo: los hijos jóvenes de madres diabéticas pueden mantener la homeostasis de la glucosa en condiciones basales, pero son incapaces de manejar situaciones de estrés que afectan el metabolismo de la glucosa.

El embarazo es una situación de estrés y requiere de adaptaciones a nivel de la capacidad de secreción de insulina y en la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos. En la hija de una madre diabética, estas adaptaciones al embarazo son insuficientes y se produce hipoinsulinemia significativa e hiperglucemia, desencadenando de esta manera el desarrollo de DG. Finalmente, el bebé de la madre con DG desarrollará macrosomía, hiperplasia de los islotes pancreáticos, hiperactividad de las células β pancreáticas e hiperinsulinemia y cuando sea adulto tendrá intolerancia a la glucosa o posiblemente DT2 [Figura 4] (Aerts y van Assche, 2006).

En otros estudios realizados tanto en animales como en humanos, los datos epidemiológicos, clínicos y experimentales obtenidos indican que la insulina por sí misma cuando se encuentra en elevadas concentraciones durante la vida perinatal puede programar el desarrollo de obesidad y diabetes; situaciones similares pueden ocurrir debido a un sobrepeso materno acompañado por un incremento en el abastecimiento de nutrientes para el feto y por sobrealimentación neonatal (Plagemann y cols., 2008). En un estudio realizado recientemente en población caucásica se observó que existe una alta prevalencia de DT2 y de intolerancia a la glucosa en los hijos adultos de mujeres que desarrollaron DG durante su embarazo y que fueron tratadas con dieta (Clausen y cols., 2008).

2.6. Tratamiento.

Cuando la DG es diagnosticada y tratada adecuadamente, el riesgo de muerte fetal intrauterina no es mayor al de la población obstétrica en general. Asimismo, la frecuencia y severidad de las morbilidades perinatales son menores cuando la DG es controlada de manera intensiva que cuando no lo es (Metzger y Coustan, 1998; Langer y cols., 2005b).

Para manejar la DG, el primer paso una vez que se hace el diagnóstico es prescribir una dieta adecuada (Tamás y Kérenyi, 2001). La dieta óptima provee los nutrientes y las calorías necesarias para sustentar el embarazo, evitando la presencia de hiperglucemia posprandial (Kjos y Buchanan, 1999; Jovanovic y Pettitt, 2001; Reader, 2007). La ADA y el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (American College of Obstetrics and Gynecology [ACOG]) recomiendan una terapia nutricional para las mujeres con DG enfocada a la promoción de una ganancia de peso apropiada, normoglucemia sin cetonuria y una restricción de energía moderada para las mujeres obesas (Gunderson, 2004).

La ADA establece que la dieta debe ser prescrita de preferencia por un dietista calificado y que debe restringir la ingesta de carbohidratos a un 35-40% del total de calorías diarias, ya que se ha demostrado que esta restricción disminuye los niveles de glucosa materna y reduce las complicaciones maternas y fetales (ADA, 2003; Turok y cols., 2003; Hollander y cols., 2007; Reader, 2007). No obstante, la restricción calórica debe ser manejada con cautela ya que el riesgo principal es el desarrollo de cetosis en la madre, la cual se ha relacionado con retraso psicomotor y un coeficiente intelectual (IQ) bajo en el niño de una mujer con DG (Rizzo y cols., 1991; Rizzo y cols., 1995; Turok y cols., 2003; Hollander y cols., 2007).

La ADA propone que la ingesta diaria de calorías para una mujer con un peso normal en la segunda mitad del embarazo debe ser de 30-32 kcal por kg de peso (Kjos y Buchanan, 1999). Para las pacientes obesas, es decir, aquellas con un índice de masa corporal mayor a 30 kg/m², la ADA sugiere disminuir la ingesta calórica diaria en un 30-33%, lo que equivale aproximadamente a ingerir 25 kcal por kg del peso actual por día (Kjos y Buchanan 1999; ADA, 2003; Turok y cols., 2003; Vidaeff y cols., 2003; Hollander y cols., 2007). Se ha demostrado que esta reducción en la ingesta calórica disminuye la hiperglucemia y los niveles de triglicéridos plasmáticos, sin incrementar la cetonuria (ADA, 2003). Sin embargo, es importante considerar que una dieta excesivamente restrictiva puede resultar contraproducente ya que en estudios desarrollados en animales se ha observado que este tipo de dietas provocan una disminución del total de células β pancreáticas en la progenie y favorecen el desarrollo de diabetes en los productos (Jovanovic y Pettitt, 2001). En humanos, específicamente en poblaciones con una alta prevalencia de desnutrición, el retardo en el crecimiento intrauterino se ha asociado a un desarrollo subsecuente de diabetes (Jovanovic y Pettitt, 2001).

Las mujeres diagnosticadas con DG deben monitorear sus niveles de glucosa y se recomienda que hagan ejercicio regularmente aunado a la dieta (Metzger y Coustan, 1998; Vidaeff y cols., 2003; Turok y cols., 2003; Catalano y cols., 2007; Reader, 2007). El tratamiento ideal para la DG es aquel que mantenga el nivel de glucosa sanguínea en el ayuno menor a 95-105 mg/dL (5.3-5.8 mmol/L) y el nivel de glucosa posprandial menor a 140 mg/dL (7.8 mmol/L) después de una hora y menor a 120 mg/dL (6.7 mmol/L) después de dos horas (ADA, 2003; Turok y cols., 2003).

Si los niveles de glucosa sanguínea en una mujer con DG a pesar de seguir una dieta adecuada no logran estabilizarse y exceden los valores deseados, se debe iniciar un tratamiento con insulina (Tamás y Kérenyi, 2001; Jovanovic y Pettitt, 2001; Vidaeff y cols., 2003).

La insulina es la terapia farmacológica que ha demostrado más consistentemente la reducción de morbilidades fetales cuando se agrega al tratamiento con dieta (Kjos y Buchanan, 1999; ADA, 2003). El tipo de insulina a elegir dependerá de las anomalías en el metabolismo de la glucosa observadas. La dosificación deberá ser prescrita con el fin de disminuir los niveles de glucosa basales y posprandiales (Jovanovic y Pettit, 2001). La insulina humana ha sido el tipo de insulina más utilizado en el embarazo debido a que es menos inmunogénica (Metzger y cols., 2007); la insulina animal ha sido asociada a niveles incrementados de anticuerpos IgG que se unen a la insulina y la transportan a través de la placenta, incrementando el riesgo de macrosomía fetal (Vidaeff y cols., 2003).

Existen en la actualidad diversos análogos de la insulina humana, como la insulina lispro y la insulina aspart. La insulina lispro, considerada de acción rápida, alcanza su pico de acción máximo una hora después de la inyección y de esta manera mejora significativamente los niveles de glucosa posprandial (Jovanovic y Pettitt, 2007). La seguridad y eficacia de la insulina lispro ha sido confirmada en diversos estudios. En un estudio de 42 mujeres con DG se administró al azar insulina NPH (Neutral Protamina Hagedorn) de acción intermedia, insulina regular e insulina lispro; después de seis semanas de tratamiento el grupo que recibió insulina lispro tenía niveles de glucosa posprandiales significativamente menores que los registrados en los otros grupos y no se presentaron eventos hipoglucémicos (Jovanovic y cols., 1999). La insulina aspart produce un pico de acción a los 40 minutos de haberse administrado y reduce los niveles de glucosa posprandial significativamente mejor que la insulina humana. Hasta la fecha se han realizado pocos estudios del uso de insulina aspart durante el embarazo; sin embargo, en un estudio se evidenció que la eficacia y la seguridad de la insulina aspart es comparable con la de la insulina regular humana en mujeres embarazadas con DG (Pettitt y cols., 2007), además de que no se ha reportado asociación del uso de insulina aspart con complicaciones maternas o fetales ni tampoco existe evidencia de que este análogo de la insulina sea teratogénico (Jovanovic y Pettitt, 2007; Metzger y cols., 2007).

En un estudio clínico australiano de la intolerancia a carbohidratos en mujeres embarazadas se reportó que el tratamiento a base de dieta, monitoreo de la glucosa sanguínea y terapia de insulina reducía la tasa de complicaciones perinatales como muerte, distocia del hombro y fractura de huesos de un 4% a un 1% en los bebés de las mujeres con DG que recibieron dicho tratamiento, comparando con los bebés de las mujeres que sólo recibieron cuidados de rutina (Crowther y cols., 2005; Greene y Solomon, 2005).

El mayor inconveniente de la terapia basada en la insulina es que se administra vía subcutánea, lo cual implica una barrera de utilización y es por esto que ha surgido el interés en el tratamiento de la DG con agentes antidiabéticos orales como las sulfonilureas, las cuales se unen a los receptores de sulfonilurea en la célula β pancreática estimulando la secreción de insulina. Las sulfonilureas de primera generación incluyen la tolbutamida, clorpropamida y tolazamida; estos fármacos atraviesan la placenta y se ha considerado que pueden causar hipoglucemia neonatal y anomalías fetales (Greene, 2000; Vidaeff y cols., 2003; Turok y cols., 2003). Las sulfonilureas de segunda generación incluyen a la glipizida, la cual es de acción rápida y a la gliburida o glibenclamida, la cual es de acción lenta. De todos estos fármacos, la gliburida ha demostrado ser la mejor opción para utilizarse durante el embarazo, debido a que solo una pequeña cantidad logra transportarse a través de la placenta (aproximadamente un 4%) y beneficia a la madre directamente y al feto de manera indirecta ya que no se ha asociado a presencia de hipoglucemia neonatal (Coustan, 2007; Metzger y cols., 2007).

En un estudio clínico se comparó el uso de gliburida e insulina en 404 mujeres con DG que requerían tratamiento durante las semanas 11 y 33 de la gestación. Se observó que con ambos tratamientos se obtuvieron resultados similares tanto en el control glucémico en la madre y el número de cesáreas como en las complicaciones neonatales tales como macrosomía e hipoglucemia; además no se detectó gliburida en el suero del cordón umbilical de ninguno de los bebés de las madres que recibieron

gliburida como tratamiento, concluyendo así que la gliburida es una alternativa efectiva a la terapia con insulina en mujeres con DG (Langer y cols., 2000). En otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación reveló que la gliburida y la insulina tienen una eficacia equivalente para el tratamiento de DG en diversos niveles de severidad de la enfermedad (Langer y cols., 2005c). Sin embargo, el uso de gliburida durante el embarazo es hasta el momento controversial debido a que se ha cuestionado el poder estadístico de los estudios anteriormente mencionados (Moore, 2007) y además se ha reportado que la gliburida alcanza su pico máximo dos horas después de su administración, tiempo considerablemente mayor al registrado por los análogos de la insulina, lo cual sugiere que la gliburida no logra abatir exitosamente la glucosa posprandial hasta un rango normal (Jovanovic, 2007).

Por último, existen dos tipos de agentes sensibilizadores a la insulina: las biguanidas y las tiazolidinedionas (TZDs) (Vidaeff y cols., 2003; Coustan, 2007). Las biguanidas aumentan la acción de la insulina estimulando la incorporación de glucosa en el hígado y en la periferia e inhibiendo la producción hepática de glucosa; la metformina es la única biguanida actualmente disponible en el mercado. La metformina atraviesa la placenta y hasta el momento se desconoce si su efecto es terapéutico o deletéreo en el feto (Brown y cols., 2006; Metzger y cols., 2007; Coustan, 2007). En la actualidad se está desarrollando un estudio australiano prospectivo donde se pretende dilucidar en un futuro si el tratamiento con metformina comparado con la administración de insulina está asociado a complicaciones perinatales similares en los bebés de mujeres con DG (Rowan y cols., 2007).

Las TZDs son agonistas del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas; estos receptores se encuentran en tejidos blanco para la acción de la insulina (Coustan, 2007); por lo tanto, las TZDs aumentan la acción periférica de la insulina, promoviendo la utilización de la glucosa en músculo e hígado y son útiles en el tratamiento de la DT2. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado la rosiglitazona y la pioglitazona. Debido a que estos fármacos son sensibilizadores a la

insulina, resulta lógico considerarlos útiles en el tratamiento de la DG en la cual se presenta resistencia a la insulina crónica; sin embargo, hasta el momento no se cuenta con evidencia suficiente para recomendar su uso durante el embarazo (Vidaeff y cols., 2003; Metzger y cols. 2007; Coustan y cols., 2007).

2.7. Factores de riesgo.

Existen diversos factores que favorecen el desarrollo de DG, dentro de los cuales destacan una edad igual o mayor a 25 años al momento del embarazo (Jovanovic y Pettitt, 2001; ADA 2006; Lao y cols., 2006), presencia de sobrepeso u obesidad indicados por un índice de masa corporal mayor a 25 kg/m² y a 30 kg/m² respectivamente (Solomon y cols. 1997; Hanna y Peters, 2002; Ben-Haroush y cols., 2003; Hollander y cols., 2007), tener una historia familiar de diabetes, es decir, contar con familiares en primer grado con diabetes (Berger y cols., 2002; ADA, 2006) y pertenecer a un grupo étnico/racial con alta prevalencia de diabetes, por ejemplo, hispanoamericanos, americanos nativos, asiático-americanos y afroamericanos (King, 1998b; Hanna y Peters, 2002; ADA, 2006). Todos estos factores pueden estar actuando de forma aditiva o por sí solos para generar riesgo de desarrollar DG.

Otros factores de riesgo para el desarrollo de DG que no son mencionados comúnmente son la falta de ejercicio (Damm y cols., 2007), alta ingesta de grasas saturadas (Bo y cols., 2001), estatura corta (Kousta y cols., 2000), multiparidad (King, 1998), sobrepeso previo al embarazo (Di Cianni y cols., 2003), ganancia de peso mayor a la recomendada durante el embarazo e intolerancia a la glucosa o DG en un embarazo previo (MacNeill y cols., 2001), haber tenido un bebé macrosómico o de gran tamaño para la edad gestacional correspondiente en un embarazo previo (Keshavarz y cols., 2005) y muerte neonatal en un embarazo previo (Hanna y Peters, 2002; Ben-Haroush y cols., 2003).

El desarrollo de un embarazo múltiple también aumenta el riesgo de DG debido a que se incrementa la masa placentaria y en consecuencia existe un aumento de las hormonas diabetogénicas que participan en la etiología de la DG (Sivan y cols., 2002).

En diversos estudios se ha reportado que en las mujeres con síndromes relacionados con resistencia a la insulina como el síndrome de ovario poliquístico existe un mayor riesgo de desarrollar DG (Villaruel y cols., 2007; Kashanian y cols., 2008).

Otro factor de riesgo para el desarrollo de DG que se ha evidenciado en diversas poblaciones es la presencia de un bajo peso al nacer (Innes y cols., 2002; Seghieri y cols., 2002); sin embargo, en otros estudios se ha reportado que existe un mayor riesgo de desarrollo de DG tanto en las mujeres que tuvieron un bajo peso al nacer como en aquellas cuyo peso fue alto al nacimiento comparadas con mujeres de peso normal al nacimiento (Pettit y Jovanovic, 2007). La asociación de un bajo o un alto peso al nacimiento con un riesgo incrementado de DG concuerda con la hipótesis de que en el ambiente intrauterino es donde se condiciona al feto a desarrollar resistencia a la insulina y susceptibilidad al desarrollo de diabetes en la edad adulta (Pettit y Jovanovic, 2007).

2.8 Componente genético.

La DG, al igual que la DT2, es una enfermedad genéticamente compleja. Hasta el momento, la mayor parte del estudio de la genética de la DG se ha concentrado en el estudio de genes que previamente han demostrado ser responsables del desarrollo de diabetes tipo MODY o que se han asociado a la susceptibilidad para el desarrollo de DT1 o DT2 en diversas poblaciones. En la figura 5 se muestran las diversas estrategias que se han empleado para el estudio de los genes que confieren susceptibilidad para el desarrollo de la DT2, algunas de las cuales han sido también utilizadas para el estudio de la genética de la DG (Shaaf y Groop, 2007).

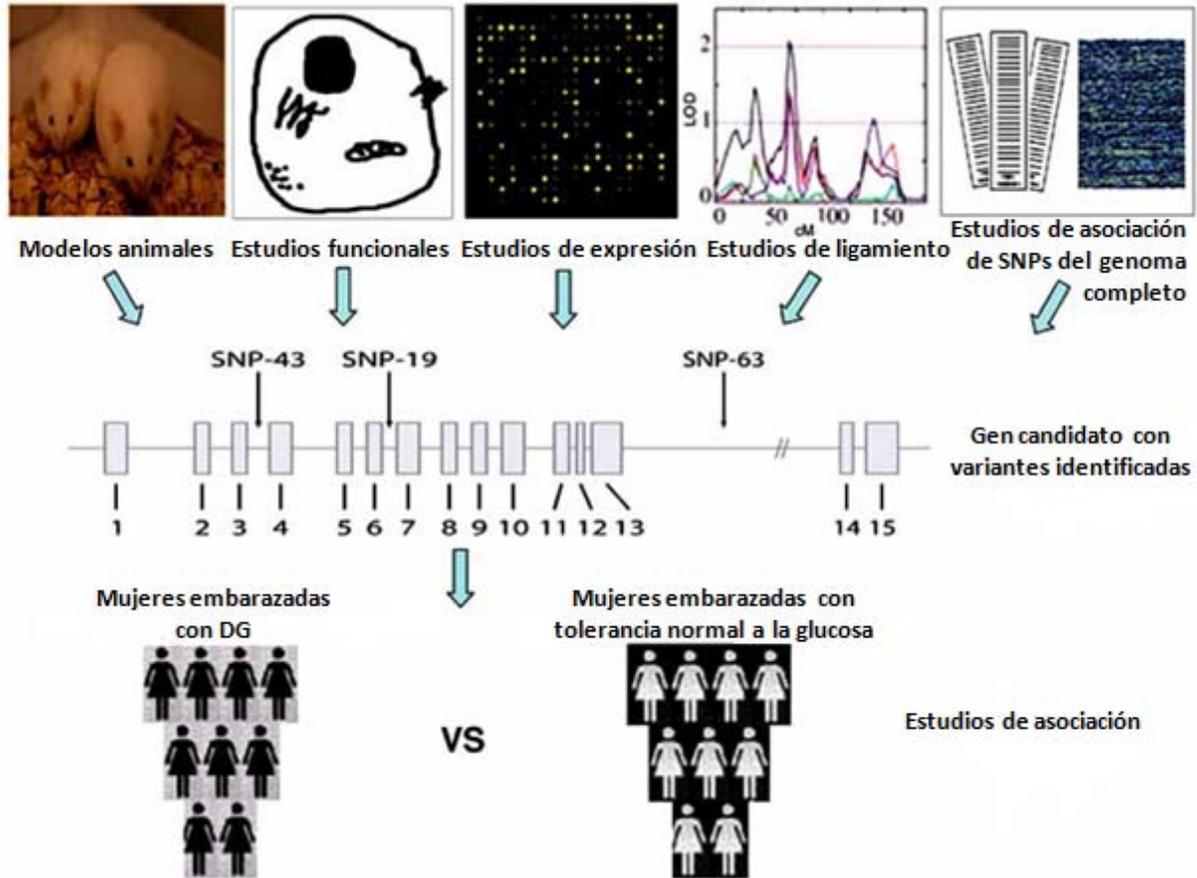


Figura 5. Representación esquemática de las estrategias utilizadas para encontrar genes de predisposición a la DT2 y a la DG (Shaht y Groop, 2007).

Los genes candidato para el estudio de la genética de la DT2 han sido seleccionados a partir de estudios de ligamiento (escaneos completos del genoma), estudios de asociación del genoma completo (estudios de asociación de SNPs del genoma completo), estudios funcionales, perfiles de expresión (microarreglos de cDNA) y modelos animales [Figura 5] (Shaht y Groop, 2007).

Para la disección de la genética de la DG hasta el momento no se han realizado estudios de ligamiento ni tampoco estudios de asociación de SNPs del genoma completo debido a que para llevar a cabo este tipo de estudios se requiere de un gran número de pacientes; por lo tanto, solo se han realizado algunos estudios funcionales, perfiles de expresión y estudios de asociación caso-control, los cuales han analizado

variantes, generalmente SNPs, que se encuentran cercanos o dentro de genes candidato. En los estudios de asociación, las frecuencias de los alelos de los SNPs son comparadas entre mujeres con DG y controles embarazadas sanas para evaluar si existen diferencias en las frecuencias de distintos alelos entre estos dos grupos y si estos alelos están asociados al desarrollo de DG [Figura 5] (Shaath y Groop, 2007).

Se han encontrado hasta el momento alrededor de 20 genes con un papel potencial en la susceptibilidad al desarrollo de DG, dentro de los cuales se han estudiado diversas variantes alélicas (Shaath y Groop, 2007; Watanabe y cols., 2007a). Dentro de estos genes destacan la región del antígeno de leucocitos humanos (HLA), genes del DNA mitocondrial como el gen del tRNA mitocondrial de leucina (*tRNA^{leu}*), el gen del canal rectificador de potasio (*KCNJ11*), el gen del receptor 1 de sulfonilurea (*SUR1* o *ABCC8*), el gen de calpaína 10 (*CAPN-10*), el gen del receptor β 3-adrenérgico (*ADRB3*), genes MODY como el gen de la glucocinasa (*GCK*), el gen del factor promotor de la insulina 1 (*IPF1*), el gen del factor nuclear del hepatocito 1 α (*HNF-1 α*) y el gen del factor nuclear del hepatocito 4 α (*HNF-4 α*), otros genes asociados previamente a DT2 como el gen del factor de transcripción 7 parecido al 2 (*TCF7L2*) y el gen del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (*PPAR γ*) [Tabla 2].

El embarazo es una condición inmunológica única donde normalmente la placenta actúa como una barrera inmunológica entre dos diferentes genotipos de HLA, por lo cual se ha planteado la posibilidad de que la autoinmunidad tenga un papel importante en la patogénesis de la DG (Mauricio y de Leiva, 2001). La región del HLA es un conjunto de genes localizado dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés), en el cromosoma 6p21; esta región ha mostrado la asociación más fuerte a DT1 (Pociot y McDermott, 2002). En el primer estudio donde se analizó la posible relación entre la región HLA y la DG se reportó que los antígenos HLA-DR3 y -DR4 estaban asociados con los anticuerpos de las células del islote en mujeres con DG; sin embargo no se encontró una diferencia significativa entre la frecuencia de estos antígenos en mujeres con DG y en mujeres con un embarazo normal (Rubinstein

cols, 1981). Años más tarde en un estudio alemán se encontró que el alelo DR3 estaba significativamente incrementado en mujeres con DG que presentaban anticuerpos anti-células del islote y/o, anticuerpos vs la ácido glutámico decarboxilasa (GAD65Ab) (Ferber y cols., 1999). Posteriormente se realizaron diversos estudios de asociación de genotipos del HLA y DG en población china, sueca y escandinava (Song y cols., 2002; Törn y cols, 2004; Shaat y cols., 2004); sin embargo, también existen estudios donde no se encontraron diferencias significativas en la distribución de los alelos del HLA o de los antígenos entre las mujeres con DG y los controles en población árabe y francesa (Stangenberg y cols., 1990; Vambergue y cols., 1997) sugiriendo así que la autoinmunidad probablemente no juegue un papel primario en el desarrollo de la DG en las poblaciones estudiadas.

La mitocondria humana tiene un DNA circular de doble cadena que codifica para 2 RNAs ribosomales, 22 RNAs de transferencia (RNAt) y 13 subunidades del complejo de enzimas de la cadena respiratoria (Shaat y Groop, 2007). Se ha descrito una mutación, la A3243G, en la posición 3243 del gen que codifica para el RNAt de la leucina que causa diabetes y sordera de herencia materna (MIDD), la cual se caracteriza por daño en la secreción de insulina (Kadowaki y cols., 1994; Gerbitz y Gempel, 1996). Esta mutación también ha sido estudiada en mujeres con DG, sin encontrarse evidencia de asociación en población caucásica de Estados Unidos ni en población de Singapur (Allan y cols., 1997; Chen y cols., 2000). En el estudio realizado en población de Singapur se reportó que otra mutación, la T3398C en el gen mitocondrial que codifica para la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (*ND1*), fue más común en las mujeres con DG que en las mujeres con un embarazo normal (2.9% vs 0%); sin embargo, se desconoce la funcionalidad de esta mutación (Chen y cols., 2000).

Tabla 2. Genes estudiados con relación a la susceptibilidad al desarrollo de DG.

Gen	Proteína que codifica	Función	Referencias de los estudios de asociación a DG
<i>HLA</i>	HLA	Antígenos de leucocitos humanos; proteínas que participan en el sistema inmune, específicamente en el proceso de reconocimiento de lo propio y lo ajeno.	Ferber y cols., 1999; Song y cols., 2002; Shaat y cols., 2004.
<i>tRNA^{leu}</i>	tRNA ^{leu}	RNA de transferencia mitocondrial de leucina; participa en el proceso de traducción de las proteínas.	Allan y cols., 1997; Chen y cols., 2000.
<i>KCNJ11</i>	Kir6.2	Canal rectificador de entrada de potasio; esta proteína junto con SUR1 constituyen el canal de potasio sensible a ATP expresado en célula β pancreática que regula la secreción de insulina.	Shaat y cols., 2005.
<i>SUR1</i> o <i>ABCC8</i>	SUR1	Receptor 1 de sulfonilurea; esta proteína junto con Kir6.2 constituyen el canal de potasio sensible a ATP expresado en célula β pancreática que regula la secreción de insulina.	Rissanen y cols., 2000.
<i>CAPN-10</i>	Calpaina 10	Proteasa de cisteína no lisosomal estimulada por calcio.	Leipold y cols., 2004; Shaat y cols., 2005.
<i>ADRB3</i>	ADRB3	Receptor β_3 adrenérgico; regula la termogénesis estimulada por catecolaminas y la lipólisis.	Festa y cols., 1999; Alevizaki y cols., 2000.
<i>GCK</i>	GCK	Glucocinasa; cataliza la reacción de fosforilación en el carbono 6 de la glucosa; primer paso de la glucólisis.	Stoffel y cols., 1993; Zouali y cols., 1993; Weng y cols., 2002.
<i>IPF1</i>	IPF1	Factor promotor de la insulina; regula la transcripción de diversos genes como el de la insulina y GLUT2	Weng y cols., 2001; Gagnoli y cols., 2005
<i>HNF-1α</i>	HNF-1 α	Factor de transcripción que regula la expresión de genes específicos en hígado y célula β pancreática.	Lehto y cols., 1997; Weng y cols., 2002
<i>TCF7L2</i>	TCF7L2	Factor de transcripción involucrado en la homeostasis de la glucosa. Participa en la vía de señalización Wnt.	Shaat y cols., 2007; Watanabe y cols., 2007b.
<i>PPARγ</i>	PPAR γ	Controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, transporte de ácidos grasos y diferenciación de adipocitos.	Shaat y cols., 2004; Shaat y cols. 2007.
<i>HNF-1α</i>	HNF-4 α	Regula la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos.	Shaat y cols., 2006; Watanabe y cols., 2007a.

El canal de potasio sensible a ATP que se expresa en la célula β pancreática es un complejo octamérico de cuatro subunidades formadoras de un poro, que constituyen el canal rectificador de entrada de potasio (Kir6.2) y cuatro subunidades regulatorias que componen el receptor 1 de sulfonilurea (SUR1) (Aguilar y cols., 1995; Bryan y Aguilar, 1999). Kir6.2, codificado por el gen *KCNJ11* y SUR1, codificado por el gen *ABCC8* regulan la secreción de insulina de las células β pancreáticas (Gribble y Reimann, 2003). Los genes *KCNJ11* y *ABCC8* se localizan en el cromosoma 11p15.1; el gen *KCNJ11* se encuentra justo donde termina la región 3' del gen *ABCC8* (Inagaki y cols., 1995). Mutaciones en el gen *KCNJ11* que lo inactivan han sido asociadas a hiperinsulinismo; mutaciones que lo activan causan diabetes neonatal (Gloyn y cols., 2004; Gloyn y cols., 2006). El polimorfismo E23K en el gen *KCNJ11* ha sido asociado a disminución de secreción de insulina y a desarrollo de DT2 en diversas poblaciones (Gloyn y cols., 2003; Flores y cols., 2004). En un estudio reciente, se reportó que la variante E23K en el gen *KCNJ11* estuvo asociada a un riesgo moderadamente incrementado de DG en población escandinava, con un odds ratio (OR) o razón de momios de 1.17 (Shaaf y cols., 2005), apoyando la hipótesis de que la DT2 y la DG poseen un componente genético común (Shaaf y Groop, 2007).

Como se mencionó anteriormente, el gen *SUR1* o *ABCC8* codifica para el receptor 1 de sulfonilurea (SUR1), una proteína muy importante en la regulación de la secreción de la insulina, ya que forma parte del canal de potasio sensible a ATP que se expresa en la célula β pancreática (Rissanen y cols., 2000). Mutaciones en *SUR1* han sido asociadas a desórdenes hiperinsulinémicos (Thomas y cols., 1995; Huopio y cols., 2000); además, variantes comunes en *SUR1* han sido asociadas a DT2 en diversas poblaciones (Hani y cols., 1997; Hansen y cols., 1998; Hart y cols., 1999; Florez y cols., 2004). En un estudio realizado en población finlandesa se analizó el papel de diversas variantes en el gen *SUR1*; se observó que la variante cagGCC \rightarrow tagGCC en el sitio aceptor de splicing cercano al exón 16 y el polimorfismo R1273R (AGA \rightarrow AGG) estaban relacionados con el desarrollo de DG y de DT2. Estos resultados apoyan la idea de que la DG y la DT2 presentan predisposición genética similar. Cabe mencionar que

ambas variantes estaban en desequilibrio de ligamiento y que los alelos de riesgo eran diferentes entre las poblaciones, lo cual sugiere la existencia de otra variante en el mismo gen *SUR1* o en otro gen cercano a *SUR1* que está en desequilibrio de ligamiento con estos dos polimorfismos (Rissanen y cols., 2000).

El gen *CAPN10* codifica para la calpaína 10, una proteasa de cisteína no lisosomal estimulada por calcio. *CAPN10* está localizado en el cromosoma 2q37 y se expresa en diversos tejidos, incluyendo el páncreas, músculo y tejido adiposo (Horikawa y cols., 2000; Carlsson y cols., 2004). *CAPN10* es el primer gen de susceptibilidad a DT2 identificado por clonación posicional (Hanis y cols., 1996; Horikawa y cols., 2000). En el primer estudio donde se relacionó este gen con DT2, se identificaron tres variantes intrónicas (SNP 43, SNP19 y SNP63) asociadas a riesgo incrementado de DT2 en población mexico-americana, finlandesa y alemana; además el haplotipo 121/112 definido por estos tres SNPs estuvo asociado con un riesgo 2.8 veces incrementado de DT2 (Horikawa y cols., 2000). En algunos de los estudios de asociación genética subsecuentes se logró replicar este hallazgo, mientras que en otros estudios esto no fue posible (Song y cols., 2004; Ridderstråle y cols., 2005). Es importante mencionar que en un estudio realizado en población mexicana, se encontró que otra variante, el SNP44, estaba asociada a un riesgo incrementado de DT2 (Del Bosque y cols., 2004). Estas cuatro variantes (SNP 43, SNP44, SNP19 y SNP63) también han sido analizadas en relación a la DG. En un estudio realizado en 40 mujeres austriacas caucásicas con DG se observó que el haplotipo 121/221 conformado por los SNPs 43, 19 y 63 estaba asociado a un riesgo incrementado de DG y que sólo el SNP63 estaba asociado de manera individual al desarrollo de DG, lo cual sugiere que diferentes alelos de riesgo son los que están determinando la susceptibilidad a la DT2 y a la DG (Leipold y cols., 2004). En otro estudio realizado en mujeres escandinavas con DG se reportó que ni el SNP43 ni el SNP44 tuvieron impacto en el riesgo de desarrollo de DG (Shaaf y cols., 2005).

El receptor β_3 adrenérgico es un receptor que regula la termogénesis estimulada por catecolaminas y la lipólisis (Strosberg y Pietri, 1996). En humanos este receptor es expresado en diversos tejidos, incluyendo tejido adiposo, músculo esquelético y células β pancreáticas (Chamberlain y cols., 1999; Perfetti y cols., 2001). El gen *ADRB3* que codifica para este receptor se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 8. El polimorfismo Trp64Arg en *ADRB3* ha sido asociado a obesidad abdominal, resistencia a la insulina y DT2 de inicio temprano (Walston y cols., 1995; Widen y cols., 1995); además se ha observado que este polimorfismo afecta la secreción de insulina *in vivo* e *in vitro* (Perfetti y cols., 2001; Christiansen y cols., 1999; Walston y cols., 2000). Se ha investigado también el papel de la variante Trp64Arg en la susceptibilidad al desarrollo de DG obteniéndose resultados controversiales. En un estudio realizado en mujeres austriacas caucásicas se encontró que esta variante estaba asociada a una forma leve de DG (Festa y cols., 1999); sin embargo, esta asociación no logró replicarse en población griega, taiwanesa, italiana o escandinava (Alevizaki y cols., 2000; Tsai y cols., 2004; Fallucca y cols., 2006; Shaat y cols., 2007). No obstante, este SNP ha sido asociado a un incremento en la ganancia de peso y en los niveles de glucosa e insulina durante el embarazo (Festa y cols., 1999; Tsai y cols., 2004).

Los genes MODY son genes candidato potenciales para la DG considerando que el daño en la función de la célula β pancreática es una característica fundamental de ambas enfermedades (Shaat y Groop, 2007). De los seis genes MODY conocidos hasta el momento, sólo cuatro de ellos han sido estudiados con relación a la DG: el gen *GCK* que codifica para la enzima glucolítica glucocinasa (GCK), el gen *IPF-1* que codifica para el factor promotor de la insulina 1 (IPF-1), el gen *HNF-1 α* que codifica para el factor nuclear del hepatocito 1 α (HNF-1 α) y el gen *HNF-4 α* que codifica para el factor nuclear del hepatocito 4 α (HNF-4 α).

La enzima glucocinasa cataliza la reacción de fosforilación en el carbono seis de la glucosa; esta reacción constituye el primer paso de la glucólisis. La hexocinasa IV o glucocinasa (GCK) se expresa en el hígado y en algunas células neuroendócrinas del

cerebro, intestino y páncreas de los mamíferos (Matschinsky y cols., 1993; Jetton y cols., 1994). Mutaciones heterocigotas en el gen *GCK*, localizado en el cromosoma 7, causan la diabetes MODY 2 (Hattersley y cols., 1992; Froguel y cols., 1993), caracterizada por defectos en la sensibilidad de la glucosa, lo cual conduce a un umbral de glucosa incrementado para la estimulación de la secreción de la insulina y en consecuencia se produce hiperglucemia moderada (Bell y cols., 1996). La diabetes MODY 2 representa alrededor del 20-30% de todos los subtipos de MODY (Frayling y cols., 2001; Pruhova y cols., 2003). En 1993, paralelamente a la caracterización de MODY 2 se encontraron mutaciones en *GCK* en mujeres con DG (Stoffel y cols., 1993; Zouali y cols., 1993). Estos dos estudios, junto con estudios subsecuentes, han demostrado que la prevalencia de las mutaciones en *GCK* en mujeres con DG es alrededor del 5% (Saker y cols., 1996; Weng y cols., 2002). Sin embargo, Ellard y colaboradores encontraron que la prevalencia de las variantes de *GCK* era de 80% en una pequeña muestra de mujeres inglesas caucásicas con DG seleccionadas por criterios clínicos específicos: 1) hiperglucemia en el ayuno persistente fuera del embarazo (5.5- 8 mmol/L), 2) un pequeño incremento (<4.6 mmol/L) durante una CTOG de 2 horas, 3) tratamiento de insulina durante al menos un embarazo pero subsecuentemente controlado con dieta y 4) un familiar en primer grado con DT2, DG o hiperglucemia en el ayuno (>5.5 mmol/L) (Ellard y cols, 2000). Con respecto al papel de las variantes comunes encontradas en pacientes MODY en el desarrollo de DG, la variante común -30G>A en el promotor de *GCK* específico de la célula β pancreática ha sido asociada a un incremento modesto en el riesgo de DG (OR=1.28) (Shaaf y cols., 2006); la presencia del alelo A de esta variante en la madre también ha sido asociada a un incremento en el peso al nacimiento del bebé, el cual probablemente refleja un valor elevado de glucosa en el ayuno en la madre durante el embarazo (Weedon y cols., 2005).

Otro de los genes MODY estudiados con relación a la DG es *HNF-1 α* . Este gen codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de genes específicos en el hígado y en la célula β pancreática (Yamagata y cols., 2002). Mutaciones en *HNF-1 α*

causan la diabetes MODY 3, la cual se caracteriza por disfunción severa de la célula β pancreática (Lehto y cols., 1997). La diabetes MODY 3 representa alrededor del 12-65% de todos los subtipos MODY en Europa (Frayling y cols., 2001; Pruhova y cols., 2003). En el estudio realizado por Lehto y colaboradores, se sugirió que *HNF-1 α* podía tener un papel importante en la predisposición a la DG, ya que se demostró que el 38% de las mujeres diabéticas con ligamiento al gen MODY 3 (*HNF-1 α*) tenían historia de DG (Lehto y cols., 1997). Además, en el estudio realizado por Weng y colaboradores en 66 mujeres suecas con DG se identificó en una mujer la mutación A203H en *HNF-1 α* ; esta mutación fue considerada diabetogénica, ya que la paciente desarrolló DT2 un año después del parto (Weng y cols., 2002). Se ha reportado también que portadores de mutaciones en *HNF-1 α* tienen una edad de aparición más temprana de la diabetes cuando sus madres presentan hiperglucemia durante el embarazo (Stride y cols., 2002). En un estudio realizado en población escandinava, se encontró que el polimorfismo I27L estaba asociado a un riesgo incrementado de DG (Shaaf y cols., 2006); en otro estudio sueco se demostró que este polimorfismo estaba asociado a disminución de la actividad transcripcional *in vitro* así como a DT2 y a rasgos fenotípicos de esta enfermedad (Holmkvist y cols., 2006). En un estudio se reportó también que el polimorfismo I27L influye en la función de la célula β pancreática, ya que altera la primera y la segunda fase de respuesta de la insulina (Chiu y cols., 2003), por lo cual este polimorfismo al provocar daño en la función de las células β pancreáticas puede predisponer a las mujeres a desarrollar intolerancia a la glucosa cuando presentan resistencia a la insulina durante el embarazo (Chiu y cols., 2003; Shaaf y Groop, 2007).

El gen de *IPF1* codifica para un factor de transcripción que regula la transcripción de diversos genes incluyendo el de la insulina y el del transportador de glucosa GLUT2; *IPF1* tiene un papel fundamental en el desarrollo y en el metabolismo de la célula β pancreática (Petersen y cols., 1994; Jonsson y cols., 1995; Ahlgren y cols., 1998; Frayling y cols., 2001). Mutaciones en *IPF1* causan la diabetes MODY 4 (Weng y cols., 2001; Gragnoli y cols., 2005). Hasta el momento se han encontrado mutaciones en *IPF1* relacionadas con la susceptibilidad a DG en población sueca e italiana (Weng y

cols., 2002; Gragnoli y cols., 2005). En el estudio realizado en población sueca se analizaron 66 mujeres con DG y se encontró la mutación P239Q en el gen *IPF1* en una de las pacientes; la expresión de esta mutación (P239Q) en células Nes2y mostró una reducción de alrededor del 50% en la capacidad de activación de la transcripción del gen de la insulina comparada con el *IPF1* silvestre (Weng y cols., 2002). En el estudio desarrollado en población italiana se encontró la mutación P33T, la cual incrementó el riesgo de susceptibilidad a la DG e *in vitro* esta mutación redujo la unión al DNA y la función de activación transcripcional de la proteína mutante comparada con el *IPF1* silvestre (Gragnoli y cols., 2005).

Recientemente por estudios de asociación del genoma completo se han logrado identificar genes nuevos de predisposición a la DT2, el más importante de ellos es el gen *TCF7L2* (Weedon y cols., 2007). En el reporte donde se identificó por primera vez a *TCF7L2* como un gen asociado a la diabetes, el microsatélite DG10S478 dentro del intrón 3 del gen *TCF7L2* fue altamente asociado a la DT2 en tres cohortes de población caucásica (islandesa, danesa y estadounidense) y cinco SNPs se encontraban en desequilibrio de ligamiento con este marcador; los portadores de los alelos de riesgo de forma heterocigota y homocigota tenían riesgos relativos de 1.45 y 2.41, respectivamente (Grant y cols., 2006). De esos cinco SNPs, el SNP rs12255372 y el SNP rs7903146 fueron identificados como los más fuertemente asociados a DT2; en estudios subsecuentes se determinó que el SNP rs7903146 tenía el mayor efecto (Grant y cols., 2006; Goodarzi y Rotter, 2007). El producto del gen *TCF7L2* es un factor de transcripción implicado en la homeostasis de la glucosa; actúa a través de la regulación de la expresión del gen del proglucagon en las células enteroendócrinas participando en la vía de señalización Wnt; esto sugiere que *TCF7L2* modula el riesgo a la diabetes vía un daño en la secreción de la insulina (Grant y cols., 2006; Goodarzi y Rotter, 2007; Hattersley, 2007). Estudios genéticos y epidemiológicos sugieren una asociación entre la DT2 y la DG; ambas son enfermedades poligénicas y multifactoriales caracterizadas por disfunción de la célula β pancreática y resistencia a la insulina (Shaath y cols., 2007). Por lo anterior también se ha estudiado el papel de las variantes en *TCF7L2* en la

susceptibilidad al desarrollo de DG. Hasta el momento existen solo dos estudios, uno realizado en 649 mujeres con DG y 1232 controles de población escandinava; en este estudio se encontró que el alelo T del SNP rs7903146 estuvo asociado a un riesgo incrementado de DG con un OR= 1.49 y un valor de $p= 4.9 \times 10^{-7}$ (Shaath y cols., 2007). El otro estudio se realizó en 132 familias mexico-americanas con un probando con DG previa y se reportó que el SNP rs12255372 estaba asociado a DG con un OR=2.49 y un valor de $p=0.018$; además en este estudio se encontró que este SNP interactuaba con la adiposidad para alterar la secreción de insulina en la población mexico-americana estudiada (Watanabe y cols., 2007b).

Por último, otros dos genes que han sido analizados para su posible asociación a DG debido a su previa asociación a DT2 y/o a diabetes MODY son el gen que codifica para el receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (*PPAR γ*) y el gen que codifica para el factor nuclear del hepatocito 4 α (*HNF-4 α*), de los cuales por ser motivo de este estudio se hablará con más detalle a continuación.

3. *PPAR γ*

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas nucleares. Existen tres tipos de PPARs: *PPAR α* , *PPAR β - δ* y *PPAR γ* . Los PPARs forman un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen a los elementos de respuesta presentes en los genes blanco (Berger y Moller, 2002; Alemán y cols., 2004). Los PPARs controlan la expresión de genes que participan en la síntesis y en la oxidación de ácidos grasos; además están involucrados en el almacenamiento de ácidos grasos en diferentes tejidos. Estos receptores se localizan en la mayoría de los tejidos; *PPAR α* es la forma más abundante en el hígado y en el músculo esquelético, *PPAR β - δ* se expresa predominantemente en la placenta y en el intestino grueso, mientras que *PPAR γ* se localiza principalmente en el tejido adiposo, aunque también se expresa en el

intestino grueso y en macrófagos (Walczak y Tontonoz, 2002; Wieser y cols., 2008). Los ligandos naturales de los PPARs son los ácidos grasos poliinsaturados y algunos eicosanoides (Berger y Moller, 2002; Alemán y cols., 2004). Los ligandos sintéticos más potentes de los PPARs son los fibratos y las tiazolidinedionas (TZDs), los cuales han probado ser efectivos en el tratamiento de la dislipidemia y la DT2 (Auwerx, 1999; Walczak y Tontonoz, 2002; Yki-Järvinen, 2004).

3.1 Características del gen *PPAR γ* y de la proteína que codifica.

El gen *PPAR γ* está localizado en el cromosoma 3, en la banda 3p25 (Beamer y cols., 1997). Este gen consta de 100 kb y está compuesto de 9 exones (Fajas y cols., 1997; Deeb y cols., 1998). Existen tres isoformas de esta proteína: PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3, las cuales se originan por la existencia de promotores alternativos en el mismo gen y por procesos de corte-empalme (splicing) alternativos en el extremo 5' del gen (Fajas y cols., 1997; Fajas y cols., 1998; Alemán y cols., 2004). PPAR γ 2 contiene 28 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal a diferencia de PPAR γ 1 [Figura 6] (Spiegelman, 1998; Elbrecht y cols., 1998; Moffett y cols., 2005); PPAR γ 3 es idéntico a PPAR γ 1, pero utiliza un promotor alternativo para su transcripción (Fajas y cols., 1998). PPAR γ 1 y PPAR γ 2 tienen un dominio de activación dependiente de ligando y también un dominio de activación independiente de ligando en la región amino terminal cuya actividad es potenciada por la insulina [Figura 6] (Werman y cols., 1997; Deeb y cols., 1998). Se ha establecido que existe una expresión diferencial de las isoformas de esta proteína en los tejidos u órganos; sin embargo, se conoce que la funcionalidad de las tres isoformas es la misma, por lo que se tiende a generalizar el término de PPAR γ sin especificar la isoforma (Alemán y cols., 2004).

En los humanos, PPAR γ se encuentra abundantemente en el tejido adiposo blanco y pardo, donde promueve la diferenciación de preadipocitos a adipocitos

(Walczak y Tontonoz, 2002; Alemán y cols., 2004). La isoforma PPAR γ 1 se expresa en el tejido adiposo en bajos niveles y en una gran variedad de células, incluyendo macrófagos, células epiteliales intestinales y en células de próstata; PPAR γ 2 se expresa principalmente en el tejido adiposo con niveles elevados y en menor grado en el músculo esquelético, mientras que PPAR γ 3 se expresa en el tejido adiposo blanco, en el intestino y en macrófagos (Auboeuf y cols., 1997; Fajas y cols., 1998; Rosen y cols., 2000; Alemán y cols., 2004). La proporción del RNAm de PPAR γ 1 y PPAR γ 2 en el tejido adiposo parece variar de un individuo a otro (Mukherjee y cols., 1997). Vidal-Puig y colaboradores encontraron una correlación positiva entre la proporción de PPAR γ 1/ γ 2 y el índice de masa corporal; además ellos observaron expresión incrementada de ambas isoformas en el tejido adiposo subcutáneo de las mujeres comparada con los hombres, sugiriendo de esta manera que el efecto de la variación genética en PPAR γ es más pronunciado en los sujetos obesos y en las mujeres (Vidal-Puig y cols., 1997).

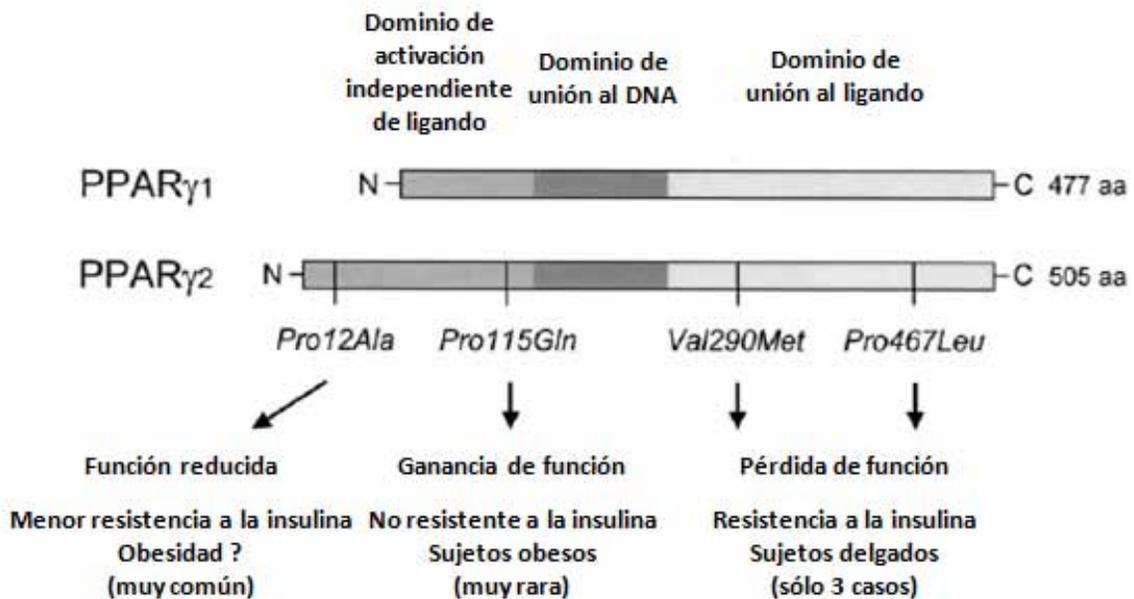


Figura 6. Organización del gen PPAR γ y variantes encontradas en PPAR γ 2 (Stumvoll y Häring, 2002).

PPAR γ actúa como un sensor de lípidos, integrando el control homeostático de la energía y el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Auwerx y cols., 2003). PPAR γ

tiene la capacidad de estimular la adipogénesis, ya que coopera con otras familias de factores de transcripción incluyendo los C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) y los SREBPs (Sterol regulatory element binding proteins) para regular la diferenciación de los adipocitos; todos estos factores de transcripción de manera conjunta realizan los cambios necesarios en la expresión de genes para el desarrollo de un adipocito funcional (Ntambi y Young-Cheul, 2000; Rosen y cols., 2000; Walczak y Tontonoz, 2002).

Actualmente se ha evidenciado claramente que los ligandos de PPAR γ , por ejemplo, las TZDs aumentan la sensibilidad a la insulina; esto se logra a través de diversos mecanismos. PPAR γ al estimular la adipogénesis provoca un incremento en el número de adipocitos, lo cual favorece un aumento en la captura y el almacenamiento de ácidos grasos libres por los nuevos adipocitos y disminuye el transporte de los ácidos grasos libres hacia el músculo esquelético; PPAR γ logra este efecto mediante el incremento en la expresión de genes como el de la proteína de unión a ácidos grasos (aP2), la lipoproteína lipasa, la acil-CoA sintasa y la fosfoenolpiruvato carboxinasa (Tontonoz y cols., 1995; Schoonjans y cols., 1995; Schoonjans y cols., 1996). Otro de los mecanismos por los cuales los agonistas de PPAR γ pueden afectar el metabolismo de los lípidos y de la glucosa es a través de la alteración de las funciones endócrinas del tejido adiposo: PPAR γ disminuye la expresión del gen de TNF- α , el cual es un inhibidor de la diferenciación de adipocitos (Hoffman y cols., 1994; Walczak y Tontonoz, 2002; Alemán y cols., 2004); PPAR γ también disminuye la expresión del gen de la leptina, la resistina e interleucina 6 (Rosen y Spiegelman, 2001) e induce la expresión de adiponectina, una hormona que aumenta la sensibilidad a la insulina (Hotta y cols., 2000; Walczak y Tontonoz, 2002). Se ha observado que PPAR γ en el músculo esquelético aumenta la expresión del sustrato del receptor de la insulina 2 (IRS-2), la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-cinasa) y del transportador de glucosa GLUT4 (Wu y cols., 1998; Rieusset y cols., 1999; Smith y cols., 2001); además disminuye la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa 4, lo cual reprime el metabolismo oxidativo de la glucosa y también disminuye la expresión de genes

involucrados en el transporte y la oxidación de los ácidos grasos (Way y cols., 2001). Estos cambios sugieren que PPAR γ incrementa la utilización de glucosa en músculo, mientras que en hígado la activación de PPAR γ disminuye la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis (Way y cols., 2001; Alemán y cols., 2004). En la célula β pancreática, PPAR γ estimula la expresión de GLUT2 (Kim y cols., 2000) y regula la expresión de la enzima GCK en la célula β y en el hígado, lo cual demuestra que PPAR γ controla la expresión de genes del aparato sensor de glucosa en páncreas, regulando de esta manera la sensibilidad a la glucosa en las células β y contribuyendo en general a la homeostasis de la glucosa (Kim y cols., 2002; Kim y cols., 2004).

3.2 Variantes comunes y su asociación a diversas entidades clínicas.

Diversos polimorfismos y mutaciones dominante negativas en *PPAR γ* se han asociado a los componentes del síndrome metabólico, tales como la hiperlipidemia combinada, la obesidad, la resistencia severa a la insulina, la DT2 y la hipertensión arterial (Walczak y Tontonoz, 2002). Estas incluyen a la mutación muy rara con ganancia de función Pro115Gln, la cual ha sido asociada con obesidad pero no a resistencia a la insulina (Ristow y cols., 1998), dos mutaciones con pérdida de función (Val290Met y Pro467Leu) reportadas en tres individuos con resistencia a la insulina severa y peso corporal normal (Barroso y cols., 1999) y la variante frecuente Pro12Ala (P12A) en el gen de PPAR γ 2 [Figura 6], presente en todas las poblaciones humanas estudiadas (Stumvoll y [Häring](#), 2002).

La variante P12A (SNP rs1801282) fue identificada en 1997 y resulta del cambio de una C (prolina) por una G (alanina) en el codón 12 del exón B del gen *PPAR γ* ; este exón codifica el residuo amino terminal que define a la isoforma específica PPAR γ 2 y se localiza dentro del dominio de activación independiente de ligando de esta proteína [Figura 6] (Yen y cols., 1997; Werman y cols., 1997). Se ha evidenciado que este cambio provoca una reducción en la actividad transcripcional y adipogénica de la

proteína in vitro, lo cual puede conducir a una disminución en la masa del tejido adiposo (Masugi y cols., 2000).

La primera evidencia de asociación del polimorfismo P12A en el gen *PPAR γ 2* a la DT2 se realizó en una muestra de sujetos finlandeses y en una muestra de sujetos japoneses-americanos (Deeb y cols., 1998). En la muestra de sujetos finlandeses se observó asociación entre el polimorfismo P12A el índice de masa corporal y la sensibilidad a la insulina. Los individuos con al menos una copia del alelo alanina (Ala) tenían un menor índice de masa corporal y una mayor sensibilidad a la insulina comparado con los individuos homocigotos para prolina (Pro); en la muestra de japoneses-americanos además observaron un riesgo a DT2 incrementado significativamente (OR=4.25) para los individuos homocigotos para Pro (Deeb y cols., 1998). Después de este reporte, surgieron diversos estudios para valorar la contribución del polimorfismo Pro12Ala, obteniéndose una gran variedad de asociaciones positivas y negativas (Hegele y cols., 2000; Watanabe y cols., 2007a). En un meta-análisis realizado en el 2000 se reportó un riesgo relativo modesto, pero significativo (RR=1.25; p=0.002) para el desarrollo de DT2 en presencia del alelo Pro (Altshuler y cols., 2000). De manera interesante, el alelo Pro también ha sido asociado a riesgo de desarrollo de DT1 (Eftychi y cols., 2004) y el alelo Ala ha sido reportado como alelo de protección en el desarrollo de nefropatía diabética en diversas poblaciones (Hermann y cols., 2002; Pollex y cols., 2007). Este polimorfismo ha sido asociado también a obesidad en diversas poblaciones, incluyendo mexicanos mestizos y dos poblaciones amerindias de México (Kadowaki y cols., 2002; Canizales y cols., 2007).

Otra variante común de *PPAR γ* que ha sido ampliamente estudiada en diversas poblaciones, es una sustitución C-->T en el exón 6 del gen. Esta variante ha sido asociada a riesgo reducido de enfermedad arterial coronaria en población australiana caucásica (Wang y cols., 1999) y a niveles circulantes de leptina en personas obesas francesas (Meirhaeghe y cols., 1998). Valve y cols. examinaron las variantes P12A y C161T en población finlandesa y encontraron que ambos polimorfismos estaban

asociados a diversos rasgos de obesidad en mujeres obesas; sin embargo, el polimorfismo P12A mostró una asociación más fuerte que el polimorfismo C161→T (Valve y cols., 1999).

En un estudio realizado en un grupo de individuos hispanos y no hispanos (San Luis Valley Diabetes Study), se genotipificaron las variantes P12A y C161→T de *PPAR γ* para determinar si existía asociación de estas dos variantes con niveles de glucosa en ayuno, insulina, niveles de ácidos grasos libres, sensibilidad a la insulina y grasa corporal (Moffett y cols., 2005). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de los individuos hispanos y no hispanos, ni asociación significativa con los fenotipos metabólicos en hombres. Sin embargo, en las mujeres sí hubo asociación entre la variante C161→T e insulina en el ayuno ($p=0.008$) y resistencia a la insulina ($p=0.007$); además, en las mujeres de este estudio, el polimorfismo C161→T parecía predecir de una mejor manera los niveles de insulina en el ayuno y resistencia a la insulina que la variante P12A; por lo anterior, en dicho estudio concluyeron que sus resultados apoyaban la hipótesis de que el polimorfismo C161→T está en desequilibrio de ligamiento con variantes funcionales aún no identificadas en *PPAR γ* o en otro gen en la misma región (Moffet y cols., 2005).

En relación a la diabetes gestacional y la variante P12A de *PPAR γ* , hasta el momento se han realizado solo dos estudios, uno en población árabe y escandinava y otro en población escandinava exclusivamente. En el estudio realizado en población árabe y escandinava no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de la variante P12A en las 500 pacientes con DG (400 escandinavas y 100 árabes) con respecto a los controles (428 escandinavas y 122 árabes) (Shaaf y cols., 2004). En el otro estudio realizado en 649 mujeres escandinavas con diabetes gestacional y en 1232 controles se encontró que el polimorfismo P12A tampoco estaba asociado a DG (Shaaf y cols., 2007).

Catalano y colaboradores demostraron que el RNAm y la proteína de PPAR γ se expresaban un 38% menos en el tejido adiposo de controles embarazadas obesas y un 48% menos en las pacientes obesas con DG comparadas con controles obesas no embarazadas; la disminución en la expresión de PPAR γ sugiere que esta proteína es importante en la regulación del catabolismo de los lípidos durante la gestación (Catalano y cols.,2002). En un estudio realizado recientemente se reportó que sólo las mujeres con DG que portaban el polimorfismo P12A ganaron significativamente más peso durante su embarazo, lo cual sugiere que este polimorfismo juega un papel dinámico e interactivo en la regulación del IMC y la homeostasis de la glucosa (Tok y cols., 2006).

4. *CASQ1*.

4.1. Características del gen y de la proteína que codifica.

El gen *CASQ1* se localiza en el cromosoma 1, en la banda 1q21. Este gen consta de 11 exones y codifica para la proteína denominada calsecuestrina (CASQ1) [Figura 7], una proteína que se une al calcio y se encarga de su almacenamiento; CASQ1 se localiza en el retículo sarcoplásmico de las células de músculo esquelético (Fujii y cols., 1990; Otsu y cols., 1993). CASQ1 es un componente importante del reservorio de Ca²⁺ luminal y juega un papel fundamental en el flujo del calcio a través de la regulación de la actividad del canal de calcio y de la interacción con otras proteínas presentes en el retículo sarcoplásmico (Shin y cols., 2003). Se ha demostrado que la liberación del calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el citosol regula la expresión de GLUT4 y el transporte de glucosa en el músculo (Ojuka y cols., 2002). Además, se ha observado que la expresión de CASQ1 y su unión al calcio se incrementa en el músculo esquelético de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (Howarth y cols, 2002).

4.2. SNPs asociados a DT2.

Mediante la realización de escaneos completos del genoma humano se ha identificado un locus de susceptibilidad para el desarrollo de la DT2 en el cromosoma 1q21-24 en diversas poblaciones: indios Pima (Hanson y cols., 1998), caucásicos de Utah (Elbein y cols., 1999), caucásicos franceses (Vionnet y cols., 2000), caucásicos ingleses (Wiltshire y cols., 2001), población amish o menonita (Hsueh y cols., 2003) y en población china (Xiang y cols., 2004). En este locus se encuentra el gen *CASQ1*, el cual, como se mencionó anteriormente, codifica para CASQ1, una proteína que regula indirectamente la expresión de GLUT-4, el transportador de la glucosa en las células del músculo (Das y cols, 2004). En conjunto, estos datos sugieren que CASQ1 puede jugar un papel importante en el transporte de glucosa estimulado por insulina y que variantes de secuencia en *CASQ1* que alteren la expresión o función de la proteína pueden cambiar el flujo intracelular del Ca^{2+} y disminuir el transporte de glucosa, favoreciendo el desarrollo de intolerancia a la glucosa o de diabetes (Fu y cols., 2004).

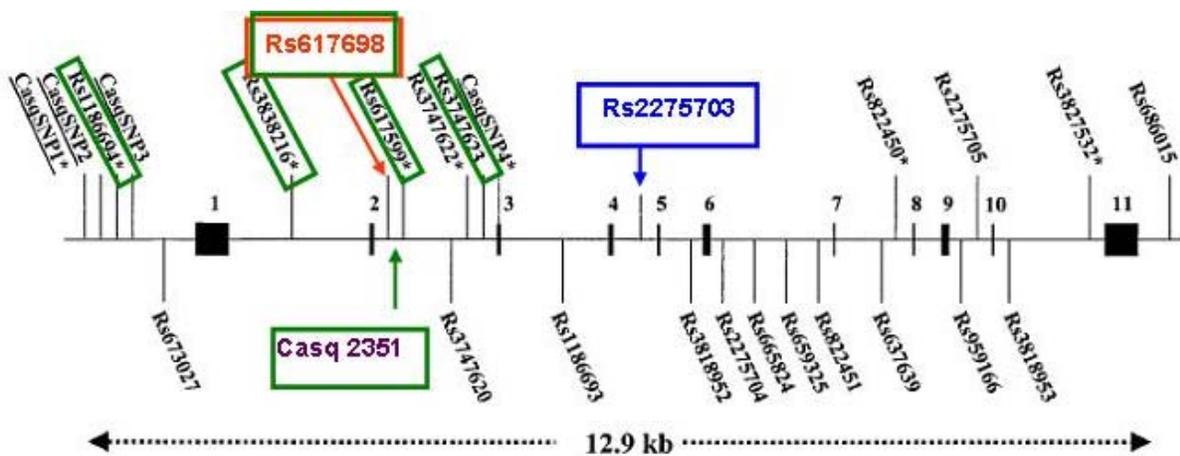


Figura 7. Estructura del gen *CASQ1* y los SNPs asociados a diabetes en población amish (menonita) y en población europea caucásica. Los exones se muestran como cuadros negros y los intrones como líneas horizontales. Los SNPs en rojo y azul estuvieron asociados a DT2 en población menonita; los SNPs en verde forman un haplotipo asociado a DT2 en población europea caucásica (Figura modificada de Fu y cols., 2004).

En un estudio realizado en población menonita se reportó que el SNP rs2275703 en el intrón 4 y el SNP rs617698 en el intrón 2 del gen *CASQ1* estuvieron asociados al riesgo de desarrollo de DT2, con un valor de OR=1.75 ($p=0.008$) y OR=1.54 ($p=0.04$) respectivamente, utilizando un modelo aditivo [Figura 7] (Fu y cols., 2004). El alelo común de ambos polimorfismos fue el que se asoció a un mayor riesgo de DT2 (Fu y cols., 2004).

En otro estudio realizado en población europea caucásica, un haplotipo de 6 SNPs (cuatro localizados en el intrón 2, uno en el intrón 1 y uno en la región 5' del gen) se encontró asociado a riesgo para desarrollar DT2 ($p=0.008$) [Figura 7] (Das y cols., 2004). Tres de los SNPs reportados como asociados a DT2 en los estudios anteriormente mencionados (SNPs 2351, rs3747623 y rs617698), fueron analizados por nuestro grupo de trabajo en la población mexicana con DT2, concluyendo que no había asociación de dichos SNPs al riesgo de DT2 en la muestra de la población mexicana estudiada.

5. *USF-1*.

5.1. Características del gen y de la proteína que codifica.

USF-1 es un gen que codifica para el factor de transcripción río arriba 1 (*USF-1*), conocido en un principio como Upstream Stimulatory Transcription Factor 1 y posteriormente nombrado Upstream Transcription Factor. En los mamíferos, *USF-1* tiene una organización genómica similar, consta de 10 exones y tiene una extensión de aproximadamente 6.7 kb (Henrion y cols., 1996; Corre y Galibert, 2005). *USF-1* se localiza en el ratón y en el humano en la región cromosómica 1q22-q23 [Figura 8] (Shieh y cols., 1993; Henrion y cols., 1995).

USF-1 es miembro de una familia de factores de transcripción eucarióticos

conservados evolutivamente y constituidos por una estructura básica de hélice-vuelta-hélice (HLH) y un cierre de leucina (LZ) [Figura 8] (Atchley y Fitch, 1997; Corre y Galibert, 2005). La región básica del gen está involucrada en la interacción del DNA con sitios consenso de una caja-E (CANNTG), donde NN es generalmente GC o CG; estos motivos de caja-E se encuentran en los genes blanco de *USF-1* (Ferre-D'Amaré y cols., 1994). Existe una región altamente conservada en el gen *USF-1*, conocida como región específica de USF (USR) y es codificada por el exón 6; esta región se localiza río arriba de la región básica del gen (b) [Figura 8]. Los dominios hélice-vuelta-hélice y el cierre de leucina están involucrados principalmente en la dimerización, aunque la integridad del cierre de leucina es esencial para la unión específica y de alta afinidad de *USF-1* (Baxevanis y Vinson, 1993; Sha y cols., 1995). La fosforilación de *USF-1* en la posición T153 es esencial para su actividad transcripcional [Figura 8] (Corre y Galibert, 2005).

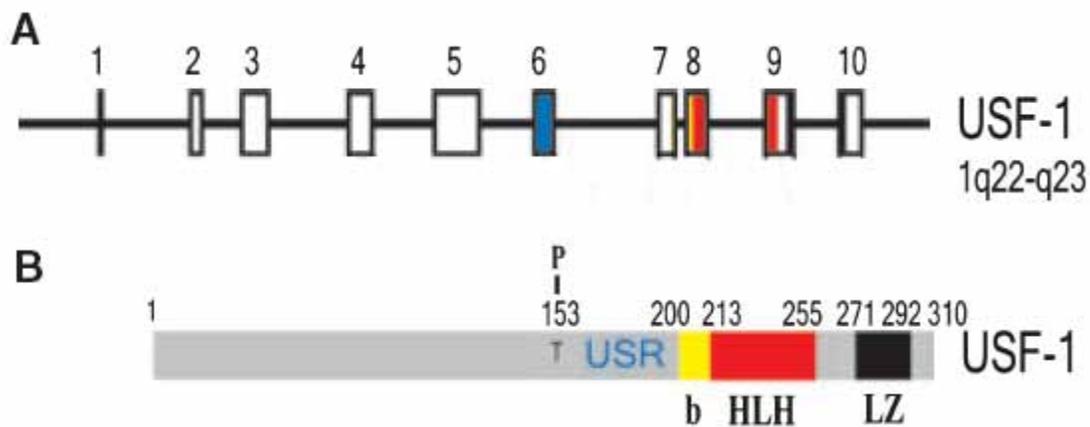


Figura 8. Estructura del gen (A) y de la proteína *USF-1* (B). (A y B) La secuencia en amarillo corresponde al dominio o región básica (b), en rojo se encuentra el dominio hélice-vuelta-hélice (HVH) y en negro el cierre de leucina (LZ). En azul se encuentra el dominio USR (Región específica de USF), localizado río arriba de la región básica; USR es esencial para la activación de la transcripción de *USF-1* (Figura modificada de Corre y Galibert, 2005).

USF-1 es una proteína de 43 kDa que se expresa de manera ubicua en los mamíferos (Siritto y cols., 1994). Esta proteína es un elemento regulatorio clave de la máquina transcripcional y participa en diferentes procesos transcripcionales, mediando

el reclutamiento de las enzimas encargadas del remodelaje de la cromatina y además interactuando con coactivadores y miembros del complejo de preiniciación de la transcripción como TFIID y factores asociados a TBP (TAFs) (Bungert y cols. 1992; Chiang y Roeder, 1995; West y cols., 2004; Corre y Galibert, 2006).

USF-1 es un factor de transcripción importante en diversos procesos celulares, incluyendo la respuesta inmune humoral y celular (Galibert y cols., 1997; Wallin y cols., 1999), la respuesta al estrés (Corre y cols., 2004), el ciclo celular y la proliferación celular (North y cols., 1999; Ismail y cols., 1999). USF-1 está involucrado también en la regulación de la expresión de diversos genes del metabolismo de lípidos y de carbohidratos (Corre y Galibert, 2006). USF-1 regula la expresión de gen de la insulina, el gen de la proteína de unión 1 al factor de crecimiento de la insulina (IGF-BP1), el gen del receptor de glucagon, el gen de la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa islote-específica y el gen de la glucocinasa; todas estas proteínas, hormonas y enzimas son importantes en el control del metabolismo de la glucosa (Iynedjian, 1998; Read y cols., 1993; Matsukawa y cols., 2001; Portoís y cols., 2002; Martin y cols., 2003). Además USF-1 se ha relacionado con la lipogénesis, ya que regula la expresión de diversos genes incluyendo el gen de la sintasa de ácidos grasos, distintas apolipoproteínas, la lipasa hepática y la acetil-CoA carboxilasa, entre otros (Corre y Galibert, 2005).

5.2. Variantes comunes y su asociación a diversos fenotipos metabólicos.

La hiperlipidemia familiar combinada (FCHL), una enfermedad caracterizada por niveles séricos elevados de colesterol total, triglicéridos o ambos, fue ligada y asociada por primera vez al gen *USF-1* en 60 familias finlandesas. En este estudio la asociación más fuerte se observó con dos SNPs: *usf1s1* (rs3737787) localizado en la región 3'UTR de *USF-1* y *usf1s2* (rs2073658) localizado en el intrón 7 del gen y su haplotipo combinado, especialmente en hombres con niveles de triglicéridos altos ($p=0.0000009$)

(Pajukanta y cols., 2004). Existe un fuerte desequilibrio de ligamiento en esta región con 5 distintos clusters que representan la mayoría de las variantes comunes en la región; *usf1s1* y *usf1s2* también están en fuerte desequilibrio de ligamiento y pertenecen al mismo cluster de desequilibrio de ligamiento (Lee y cols., 2006).

Debido a que el gen *USF-1* se ubica en la región cromosómica 1q22-23, cerca de la señal de ligamiento a DT2 ampliamente replicada en el cromosoma 1q y a que se ha evidenciado que *USF-1* participa en la regulación de expresión de genes de las vías metabólicas de los carbohidratos y de los lípidos, se ha analizado el gen *USF-1* en diversas poblaciones para poder esclarecer si existe asociación entre dicho gen y la DT2, FCHL, enfermedades cardiovasculares y diversos rasgos metabólicos relacionados (Hitman y Sudagani, 2004; Lee y cols. 2006; Suviolahti y cols., 2006).

Las variantes de *USF-1* han sido investigadas en varios estudios independientes con muestras de individuos con FCHL o con riesgo de enfermedad arterial coronaria prematura (Lee y cols., 2006; Suviolahti y cols., 2006). En uno de estos estudios se genotificaron los dos SNPs asociados anteriormente a FCHL en las familias finlandesas [*usf1s1* (rs3737787) y *usf1s2* (rs2073658)] y se encontró asociación de estas variantes de *USF-1* en 87 familias de Utah que presentaban muertes tempranas por enfermedad arterial coronaria (CHD), accidente vascular cerebral o hipertensión arterial diagnosticada tempranamente y en 262 individuos relacionados que padecían FCHL. El SNP *usf1s1* mostró evidencia de asociación con FCHL ($p=0.02$), triglicéridos y colesterol LDL ($p=0.02$ para ambos rasgos) y nuevamente se evidenció una mayor asociación en hombres ($p=0.001-0.002$) (Coon y cols., 2005).

El primer estudio que logró replicar la asociación entre las variantes de *USF-1* y la FCHL fue realizado en 24 familias multigeneracionales mexicanas no relacionadas, de las cuales se genotificaron 314 individuos (Huertas y cols., 2005). Trece SNPs dentro de una región de 88 kb fueron examinados; la FCHL y niveles altos de triglicéridos se asociaron a 3 SNPs: *f11rs4* (hCV1459766), rs3737787 y rs2073658. El análisis por

haplotipos confirmó esta asociación, ya que para el haplotipo usf1s1-f11rs4 se obtuvo una $p=0.0009$ para triglicéridos y una $p=0.02$ para FCHL, mientras que para el haplotipo usf1s1-usf1s2 los valores de p fueron 0.006 y 0.03 para triglicéridos y para FCHL respectivamente. En contraste a los resultados reportados en familias finlandesas, en las mexicanas no se observó efecto específico de género y la región de asociación se restringió de aproximadamente 46 kb en los finlandeses, a 14 kb en los mexicanos, esto debido probablemente a las diferencias en la estructura del desequilibrio de ligamiento entre las diversas poblaciones (Huertas y cols., 2005).

Recientemente en un estudio realizado en familias alemanas con FCHL y en una cohorte de sujetos blancos de Estados Unidos con CHD se analizó el SNP rs3737787 y se encontraron asociaciones entre el alelo común del SNP rs3737787 y la FCHL, niveles elevados de colesterol y/o triglicéridos y rasgos metabólicos relacionados ($p=0.02$ a 0.006) exclusivamente en los hombres de las familias estudiadas; en los blancos de Estados Unidos se encontraron asociaciones dependientes de género con los niveles de triglicéridos y distintos rasgos metabólicos, siendo el alelo común el asociado en hombres ($p=0.04$ a 0.02) y el alelo raro en mujeres ($p=0.05-0.002$). Estos resultados demostraron que USF-1 influye de manera diferente en ambos géneros en cuanto a los distintos factores de riesgo cardiovasculares en las poblaciones alemanas y de Estados Unidos estudiadas (Lee y cols., 2007).

En dos estudios independientes se investigó la posible contribución de los alelos de *USF-1* a los rasgos metabólicos que constituyen la DT2 y el síndrome metabólico (Lee y cols., 2006). En un estudio realizado en población china, se analizaron tres SNPs de *USF-1*: rs3737787, rs2516841 y rs2516839; se estudiaron 179 familias con DT2, 1385 casos con DT2 y 432 controles (Ng y cols., 2005). Se encontró una asociación significativa entre el SNP rs3737787 (usf1s1) y el riesgo de DT2 y algunos rasgos fenotípicos del síndrome metabólico en las familias analizadas [Figura 9]; sin embargo, en los casos no se encontró asociación a la DT2 ni al síndrome metabólico, lo cual podría implicar que la región analizada posee genes adicionales de susceptibilidad para

DT2 o el síndrome metabólico (Ng y cols., 2005).

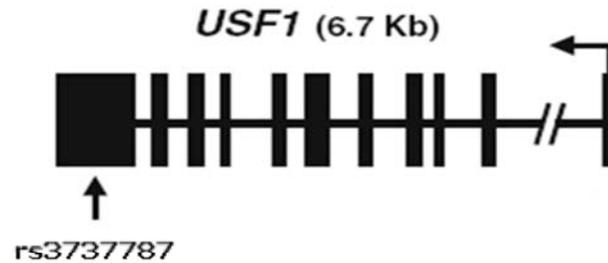


Figura 9. Estructura del gen *USF-1* y localización del SNP *usf1s1* (rs3737787), altamente asociado a FCHL, CHD y rasgos metabólicos en diversas poblaciones. *Usf1s1* representa un clúster de 19 SNPs en desequilibrio de ligamiento y se localiza en la región 3'UTR de *USF-1* (Figura modificada de Ng y cols., 2005).

En otro estudio realizado en población caucásica francesa, se investigó la contribución de ocho SNPs a la susceptibilidad para el desarrollo de DT2 en 744 casos no relacionados y en 731 controles (Gibson y cols., 2005). Ninguno de los ocho SNPs analizados, incluyendo *usf1s1* y *usf1s2*, mostraron diferencia en las frecuencias alélicas entre los diabéticos y los controles estudiados, por lo que concluyeron que no encontraron evidencia para apoyar la hipótesis de que la variación genética en *USF-1* contribuye a la susceptibilidad a la DT2 en la población caucásica francesa estudiada (Gibson y cols., 2005).

6. *HNF-4α*.

6.1. Características del gen y la proteína que codifica.

El gen *HNF-4α* codifica para el factor nuclear del hepatocito 4α (HNF-4α) y se localiza en la región cromosómica 20q12-q13.1 ([Argyrokastitis](#) y cols., 1997). *HNF-4α* es un gen de aproximadamente 30 kb y comprende 13 exones: los exones 2-10 y los

exones que sufren el proceso de corte-empalme (splicing) alternativo 1a, 1b, 1c y 1d (Ellard y Colclough, 2006). El gen *HNF-4 α* codifica para nueve isoformas; el promotor P1 específico de hígado conduce la expresión de los transcritos de HNF-4 α 1 a 6, los cuales incluyen los exones 1a y 2-10 (HNF-4 α 1 a 3) o los exones 1a, 1b y 2-10 (HNF-4 α 4 a 6) [Figura 10]. Los transcritos de HNF-4 α 7 a 9 son expresados a partir del promotor P2 pancreático, localizado aproximadamente 46 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *HNF-4 α* ; estos transcritos experimentan splicing del exón 1d al exón 2, sin la inclusión de secuencias de los exones 1a o 1b [Figura 10] (Thomas y cols., 2001). En el páncreas HNF-1 α activa la transcripción de *HNF-4 α* a través del promotor P2, el cual a su vez activa la transcripción de *HNF-1 α* (Ellard y Colclough, 2006).

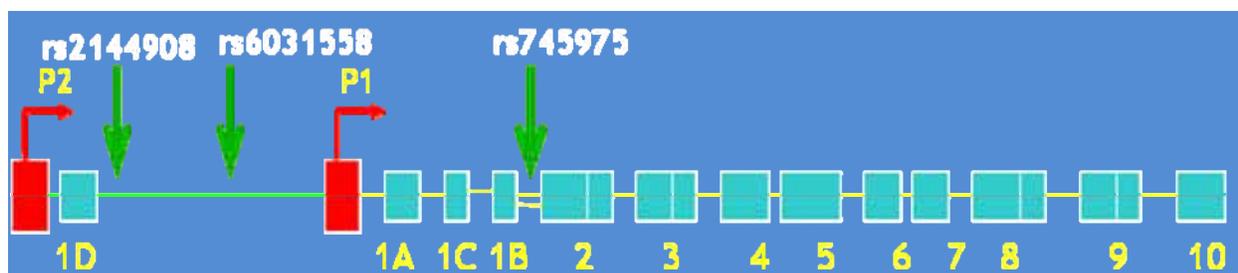


Figura 10. Estructura del gen *HNF-4 α* y localización de los SNPs asociados a diversas entidades clínicas: a DT2 en diversas poblaciones (rs2144908), triglicéridos altos en familias mexicanas (rs6031558) y el haplotipo asociado a triglicéridos altos en familias mexicanas (rs6031558-rs745975) (Figura modificada de Weissglas y cols., 2006).

HNF-4 α es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares y es un factor de transcripción dependiente de ligando (Yamagata y cols., 1996; Furuta y cols., 1997). HNF-4 α está compuesto por varios dominios funcionales: un dominio de activación amino terminal (AF1), una región de unión a DNA formada por dedos de zinc, un dominio de dimerización y de unión al ligando con una segunda función de activación (AF2) y un dominio de represión carboxilo terminal (Erdmann y cols., 2007). Los ligandos naturales de HNF-4 α son ácidos grasos endógenos los cuales actúan como cofactores estructurales (Dhe-Paganon y cols., 2002).

HNF-4 α se expresa en hígado, en riñón, en intestino, en páncreas y en estómago (Tanaka y cols., 2006). En el hígado, este factor de transcripción juega un papel importante en la regulación de varios genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y colesterol, así como en la coagulación sanguínea y en el desarrollo y diferenciación del hepatocito (Miura y cols., 2006). En el páncreas, HNF-4 α es fundamental en el desarrollo, diferenciación y función de la célula β pancreática (Hansen y cols., 2002; Weedon y cols., 2004); además HNF-4 α regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo y en el transporte de la glucosa en la célula β pancreática como el gen que codifica para el canal rectificador de entrada de potasio (Kir6.2), el cual junto con SUR1 regula la secreción de insulina de las células β pancreáticas (Gribble y Reimann, 2003; Gupta y cols., 2005), el gen que codifica para el transportador de glucosa GLUT2 y los genes que codifican para las enzimas glucolíticas aldolasa B y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), entre otros (Stoffel y Duncan, 1997).

6.2. Variantes comunes y su asociación a diversas entidades clínicas.

Mutaciones heterocigotas raras en el gen *HNF-4 α* causan la diabetes MODY 1; los pacientes con este subtipo de diabetes presentan disminución en la secreción de la insulina estimulada por glucosa y niveles alterados de lípidos y lipoproteínas (Yamagata y cols., 1996; Herman y cols., 1997; Stride y Hattersley 2002; Miura y cols., 2006). La diabetes MODY 1 representa alrededor del 2-5% de todos los subtipos MODY en Europa (Frayling y cols., 2001; Pruhova y cols., 2003).

Existen numerosos estudios de ligamiento a la DT2 que muestran evidencia de ligamiento a la región 20q12-13.1 (Bowden y cols., 1997; Ji y cols., 1997; Permutt y cols., 2001), en la misma región cromosómica donde se localiza el gen *HNF-4 α* , por lo que se ha evaluado la asociación de varios SNPs que se encuentran en la región promotora y codificante de *HNF-4 α* en relación a la susceptibilidad al desarrollo de la

DT2 en diferentes poblaciones. Los SNPs rs4810424, rs1884613, rs1882614 y rs2144908 de *HNF-4 α* han sido asociados a riesgo de DT2 en caucásicos ingleses (Barroso y cols., 2003; Weedon y cols., 2004), en judíos ashkenazi (Love-Gregory y cols., 2004) y en finlandeses (Silander y cols., 2004); estos resultados se replicaron en población menonita (Damcott y cols., 2005), en caucásicos daneses (Hansen y cols., 2005) y en otra muestra de población finlandesa, en la cual se reportaron nuevos SNPs de *HNF-4 α* asociados a DT2 (Bonnycastle y cols., 2006). En contraste, existen estudios donde la asociación de los polimorfismos en *HNF-4 α* a DT2 es modesta, por ejemplo, en indios Pima (Muller y cols., 2005) y en población escandinava, caucásica de norteamérica y de Polonia (Winckler y cols., 2007); en otros estudios no se ha encontrado asociación entre polimorfismos de *HNF-4 α* y la DT2 en población caucásica francesa (Vaxillaire y cols., 2005), en población china (Zhang y cols., 2006) y en población danesa con DT2 o DG previa (Ek y cols., 2006).

En el estudio para prevenir la diabetes no insulino-dependiente (STOP-NIDDM) se demostró que el poseer polimorfismos en *HNF-4 α* predispone la conversión de los sujetos intolerantes a la glucosa a diabéticos tipo 2. Mujeres con el alelo menos frecuente del SNP rs4810424 mostraron tener un riesgo 1.7 veces mayor para convertirse en diabéticas tipo 2 comparadas con las que poseían el alelo común; esta asociación no se encontró en hombres (Andrulionyte y cols., 2006).

Con respecto al comportamiento de las variantes en *HNF-4 α* en población mexicana, recientemente se publicó un estudio de asociación con niveles altos de lípidos séricos (Weissglas y cols., 2006). Los SNPs que se analizaron fueron rs2144908, el cual ha sido asociado a DT2 en diversas poblaciones (Weedon y cols., 2004; Silander y cols., 2004), rs6031558, rs745975, rs3212198 y rs2425640. En este estudio se examinaron 314 individuos pertenecientes a 24 familias mexicanas con FCHL y se encontró que el alelo común del SNP rs2144908 [Figura 10] se asoció a niveles elevados de apoB; el SNP rs6031558 estuvo asociado a niveles altos de triglicéridos y también se encontró un haplotipo de riesgo para niveles altos de triglicéridos

conformado por los SNPs rs6031558 y rs745975 [Figura 10] (Weissglas-Volkov y cols., 2006). En otro estudio realizado en familias pertenecientes a población mexicano-americana se analizó la asociación de seis SNPs localizados en el promotor P2 de *HNF-4 α* (rs1884613, rs2144908, rs2425640, rs3212183, rs1885088 y rs3818247) a riesgo de DT2 y se reportó que los SNPs rs1884613 y rs2144908, los cuales se encontraban en desequilibrio de ligamiento, se asociaron a DT2 con un valor de $p=0.003$ (Lehman y cols., 2007).

Considerando que mutaciones raras en los genes *MODY GCK* y *HNF-1 α* han sido asociadas a DG (Stoffel y cols., 1993; Saker y cols., 1996; Ellard y cols., 2000; Weng y cols., 2002) y que la disfunción de la célula β pancreática es una característica fundamental tanto de la diabetes MODY como de la DG, Shaat y colaboradores probaron la hipótesis de que variantes comunes en los genes MODY podían incrementar el riesgo de DG (Shaat y cols., 2006). En 1880 mujeres escandinavas, 648 mujeres con DG y 1232 embarazadas no diabéticas (controles), se analizaron tres SNPs localizados río abajo del promotor P2 de *HNF-4 α* : rs2144908, rs2425637 y rs1885088; ninguna de estas tres variantes estuvo asociada a DG en esa población (Shaat y cols., 2006).

La función de la célula β pancreática es un rasgo altamente heredable, por lo cual ha surgido el interés en la identificación de genes relacionados con su disfunción durante el desarrollo de la DG. Debido a esto, se creó el estudio BetaGene, para el cual se están reclutando familias mexicano-americanas con un probando con DG previa (Watanabe y cols., 2007a). En este estudio se ha evaluado la asociación del SNP rs2144908 con la DT2 y rasgos fenotípicos relacionados, encontrando asociación entre esta variante y el índice de disponibilidad bajo, utilizando un modelo aditivo ($P=0.035$). El índice de disponibilidad es una medida de la compensación de la célula β pancreática y su asociación es consistente con la función biológica conocida de *HNF-4 α* en estas células, por lo tanto, los autores han sugerido que la variación en *HNF-4 α* puede contribuir a la disfunción de la célula β pancreática observada en las pacientes con DG (Watanabe y cols., 2007a).

En un estudio realizado recientemente se examinó el peso al nacimiento y la presencia de hipoglucemia en 108 pacientes provenientes de familias con diabetes debida a mutaciones en el gen *HNF-4 α* (Pearson y cols., 2007). El peso al nacimiento estuvo incrementado por un promedio de 790 g en los portadores de mutaciones en *HNF-4 α* comparados con los miembros de la familia sin mutaciones ($p < 0.001$); 56% de los portadores de mutaciones en *HNF-4 α* fueron macrosómicos comparados con un 13% de los miembros de la familia sin mutaciones ($p < 0.001$). La presencia de hipoglucemia transitoria se reportó en 8 de los 54 infantes con mutaciones heterocigotas en *HNF-4 α* , pero no se reportó en ninguno de los 54 infantes sin mutaciones en *HNF-4 α* ($p = 0.003$). Con estos resultados se concluyó que las mutaciones en *HNF-4 α* están asociadas con un incremento considerable en el peso al nacimiento y macrosomía y son causa de hipoglucemia neonatal, lo cual puede provocar hiperinsulinemia al nacimiento y evolucionar a secreción de insulina disminuída y desarrollo de diabetes en etapas posteriores de la vida (Pearson y cols., 2007; Glaser, 2007).

II.- JUSTIFICACIÓN

La DG es la intolerancia a la glucosa que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Su prevalencia ha aumentado en los últimos años a nivel mundial y en nuestro país. La DG es una enfermedad que conlleva diversos riesgos tanto para la madre como para el feto y que confiere riesgo de desarrollar DT2 en la madre años después de la aparición de la DG.

El conocimiento a detalle de la etiología genética de la DG es un paso fundamental para entender el proceso fisiopatológico de esta enfermedad y para diseñar en un futuro mejores estrategias de diagnóstico y de prevención de complicaciones. Se han realizado varios estudios de asociación para evaluar la contribución de polimorfismos presentes en diferentes genes para el desarrollo de la DG; sin embargo se desconoce el papel de diversos polimorfismos de los genes *PPAR γ* , *CASQ1*, *USF-1* y *HNF-4 α* en la susceptibilidad al desarrollo de DG en población mexicana.

III.- HIPOTESIS

Diversos polimorfismos en los genes *PPAR γ* , *CASQ1*, *USF-1* y *HNF-4 α* están asociados a la susceptibilidad al desarrollo de DG en la población mexicana.

IV.- OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Determinar la contribución de los polimorfismos P12A y C161T en el gen *PPAR γ* , cuatro distintos SNPs en el gen de *CASQ1*, el SNP usf1s1 del gen *USF-1* y dos SNPs del gen *HNF-4 α* como posibles alelos de susceptibilidad para el desarrollo de DG en población mexicana.

2. Objetivos particulares.

- Genotipificar los polimorfismos P12A y C161T del gen *PPAR γ* en pacientes con DG y controles; evaluar la asociación de ambos polimorfismos al desarrollo de DG, a los rasgos cuantitativos estudiados y hacer el análisis de asociación por diplotipos.
- Genotipificar cuatro SNPs (2351, rs3747623, rs617698 y rs2275703) en el gen de *CASQ1* en pacientes con DG y controles; hacer el análisis por SNPs y por haplotipos y evaluar su asociación al desarrollo de DG y a los rasgos cuantitativos estudiados.
- Genotipificar el SNP usf1s1 del gen *USF-1* y evaluar su asociación al desarrollo de DG y a los rasgos cuantitativos estudiados.
- Genotipificar dos SNPs (rs2144908 y rs745975) en el gen de *HNF-4 α* en pacientes con DG y controles; hacer el análisis por SNPs y por haplotipos y evaluar su asociación al desarrollo de DG y a los rasgos cuantitativos estudiados.

V.- METODOLOGÍA

1. Características del estudio.

Las pacientes con DG, los controles normoglucémicos y los controles ideales fueron reclutados en un período de dos años (febrero del 2005 a enero del 2007). El estudio de los polimorfismos de los genes *PPAR γ* y *CASQ1* se realizó en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El estudio de los polimorfismos de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* se realizó en el laboratorio de la Dra. Paivi Pajukanta, perteneciente al Departamento de Genética Humana (Human Genetics) de la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA), como parte de una estancia de investigación de cuatro meses con el objetivo de aprender el manejo de los programas estadísticos SPSS v15.0 y Haploview 3.32 para realizar el análisis de los resultados obtenidos en todo el proyecto.

2. Población de estudio.

A) Estudio de los polimorfismos de los genes *PPAR γ* y *CASQ1*.

a) Casos.

Este grupo estuvo comprendido por 94 mujeres embarazadas de origen mexicano en por lo menos tres generaciones, diagnosticadas con DG de acuerdo a los criterios de Carpenter y Coustan (ADA, 2006). Estas pacientes tenían una edad de 18 a 45 años y se contaba con sus datos de índice de masa corporal y antecedentes familiares. La captación de estas pacientes se realizó a través de la Unidad de Medicina Materno-Infantil del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del Instituto de

Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Se excluyeron aquellas pacientes que presentaban problemas tiroideos (hipertiroidismo e hipotiroidismo previos al embarazo).

b) Controles normoglucémicos.

En la mayoría de los estudios de asociación a DG se utilizan como controles a aquellas mujeres que cursan un embarazo normal, es decir, sin evidencia de desarrollo de DG evaluada a través de la CTOG entre la semana 24-28 del embarazo que no muestre ningún valor alterado. Sin embargo, la CTOG en todas las mujeres embarazadas no es una prueba de rutina en nuestro país, por lo cual al inicio de este proyecto no fue posible contar con las mujeres controles mencionadas y se utilizó como grupo control el constituido por 112 mujeres normoglicémicas (con un valor de glucosa en el ayuno menor a 126 mg/dL) de origen mexicano en por lo menos tres generaciones, mayores de 45 años y que no refirieron antecedentes de DG durante sus embarazos. Estos controles fueron captados a través del Departamento de Endocrinología del INCMNSZ. Para este grupo se excluyeron por lo tanto aquellas mujeres con diagnóstico previo de DG, DT2 o intolerancia a carbohidratos.

c) Controles con CTOG normal (Controles ideales).

Con la colaboración de las autoridades del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPer IER), un año después de iniciado el proyecto de investigación se logró la captación de 46 mujeres embarazadas con una CTOG normal, con datos de edad e índice de masa corporal. Se excluyeron aquellas mujeres con diagnóstico previo de DG, DT2 o intolerancia a carbohidratos y las que presentaban problemas tiroideos (hipertiroidismo e hipotiroidismo previos al embarazo). Se continuó con la captación de muestras de este grupo de controles para la realización del estudio

de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* .

B) Estudio de los polimorfismos de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* .

a) Casos INPER.

Este grupo estuvo comprendido por 165 mujeres embarazadas de origen mexicano en por lo menos tres generaciones, diagnosticadas con DG de acuerdo a los criterios de Carpenter y Coustan (ADA, 2006). Estas pacientes tenían una edad de 18 a 45 años y se contaba con datos de índice de masa corporal, presión sistólica y diastólica y antecedentes familiares. La captación de estas pacientes se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPer IER). Se excluyeron aquellas pacientes que presentaban problemas tiroideos (hipertiroidismo e hipotiroidismo previos al embarazo).

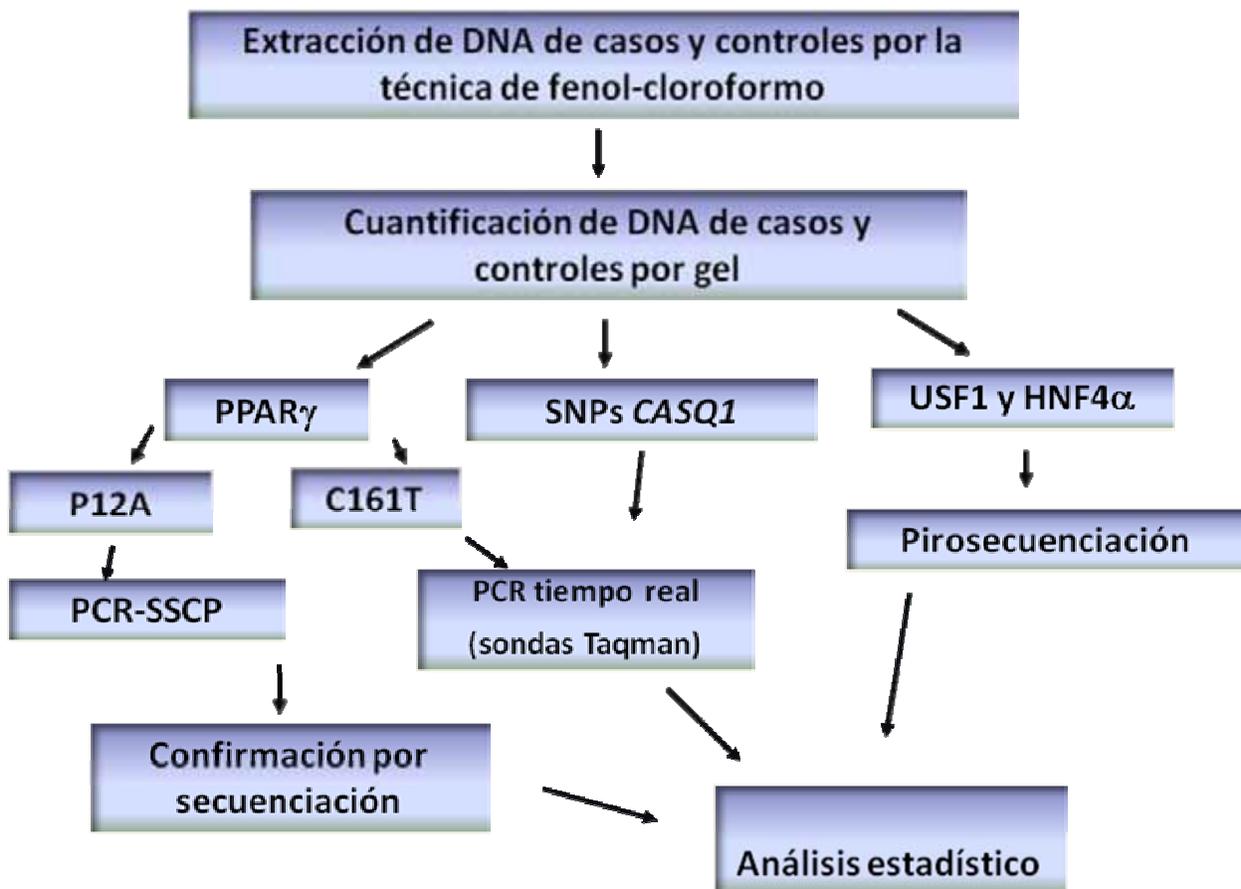
b) Casos CMN 20 de Noviembre.

Este grupo estuvo formado por 85 mujeres embarazadas de origen mexicano en por lo menos tres generaciones, diagnosticadas con DG de acuerdo a los criterios de Carpenter y Coustan (ADA, 2006). Estas pacientes tenían una edad de 18 a 45 años y se contaba con sus datos de índice de masa corporal y antecedentes familiares. La captación de estas pacientes se realizó a través de la Unidad de Medicina Materno-Infantil del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Se excluyeron aquellas pacientes que presentaban problemas tiroideos (hipertiroidismo e hipotiroidismo previos al embarazo).

c) Controles

Este grupo estuvo constituido por 213 mujeres embarazadas con una CTOG normal, con datos de edad (de 18 a 45 años), índice de masa corporal y presión sistólica y diastólica. Estos controles fueron captados en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPer IER). Se excluyeron aquellas mujeres con diagnóstico previo de DG, DT2 o intolerancia a carbohidratos y las que presentaban problemas tiroideos (hipertiroidismo e hipotiroidismo previos al embarazo).

3. Esquema general de trabajo.



Como se observa en el esquema, en el caso del gen *PPAR γ* se tipificaron dos SNPs: P12A, un SNP asociado a diabetes y obesidad en diversas poblaciones (Deeb y cols., 1998; Altshuler y cols., 2000; Kadowaki y cols., 2002) y C161T, un SNP asociado modestamente a obesidad en mujeres finlandesas (Valve y cols., 1999) y a resistencia a la insulina en mujeres hispanas (Moffett y cols., 2005). P12A se genotipificó por PCR-SSCP amplificando un fragmento de 167pb tal como se reportó por Deeb y colaboradores (Deeb y cols., 1998). La técnica de PCR-SSCP es confiable y altamente sensible en fragmentos de DNA menores de 300 pb (Kukita y cols., 1997). C161T se genotipificó por PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan ya que es una técnica altamente específica, sensible, exacta y rápida y que tiene la ventaja de no requerir un procesamiento post-PCR (Higuchi y cols., 1993). Con respecto al gen *CASQ1* se analizaron 4 SNPs (SNP2351, rs3747623, rs617698 y rs2275703), los cuales se asociaron a DT2 en población caucásica y menonita (Fu y cols., 2004; Das y cols., 2004); estos SNPs fueron genotipificados también mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan. En relación al gen *USF-1* se genotipificó el SNP rs3737787 (*usf1s1*) debido a que es un SNP que representa un clúster de 19 SNPs en desequilibrio de ligamiento, que ha sido asociado a niveles altos de triglicéridos en familias mexicanas (Huertas y cols., 2005) y del cual se ha estudiado su posible contribución a los rasgos metabólicos asociados a la DT2 y al síndrome metabólico (Lee y cols., 2006; Ng y cols., 2005; Gibson y cols., 2005). Del gen *HNF-4 α* se analizaron los SNPs rs2144908 y rs745975, el primero asociado a DT2 en diversas poblaciones (Weedon y cols., 2004; Silander y cols., 2004; Lehman y cols., 2007) y el segundo asociado a niveles altos de triglicéridos en familias mexicanas con FCHL (Weissglas-Volkov y cols., 2006). Los SNPs de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* fueron genotipificados por pirosecuenciación en el laboratorio de la Dra. Paivi Pajukanta en UCLA. La pirosecuenciación es una técnica utilizada para el análisis de mutaciones y de SNPs por su alta especificidad y sensibilidad (Fakhrai-Rad y cols., 2002).

4. Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de leucocitos provenientes de una muestra de sangre total, empleando la técnica de fenol-cloroformo, previa digestión con proteinasa K (Sambrook y cols., 1989). Se observó la integridad del DNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% previamente teñido con bromuro de etidio [0.5µg/µL], en amortiguador TBE 1X (Tris base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA, pH 8, 0.002M) y se hizo un estimado de la concentración de cada muestra utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb para preparar diluciones de 100 ng/µL de cada muestra, necesarias para la realización de los ensayos de SSCP, PCR en tiempo real y pirosecuenciación.

5. Genotipificación de los polimorfismos de *PPAR γ* .

5.1 Genotipificación de P12A por PCR-SSCP.

a) Fundamento de la técnica.

Para la genotipificación del polimorfismo P12A en el gen *PPAR γ* se utilizó la técnica de PCR-SSCP (por sus siglas en inglés: Single Strand Conformation Polymorphism; polimorfismo conformacional de una sola cadena). Esta técnica se utiliza para la detección de variaciones alélicas debido a su simplicidad, sensibilidad y confiabilidad (Sunnucks y cols, 2000; Milterski y cols., 2000). En este método la región de interés es amplificada por PCR (Polymerase Chain Reaction: reacción en cadena de la polimerasa) a partir de DNA genómico (Milterski y cols., 2000). 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 desnaturante, se calientan a 95°C y se enfrían rápidamente para 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 lo tanto una conformación específica dependiendo de su secuencia de bases (Orita y cols., 1989; Kukita y cols., 1997). Los productos de la PCR, una vez que se han desnaturalizado, se cargan en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante 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 específico en cada una de las muestras, donde cada banda corresponde a una cadena única de DNA.

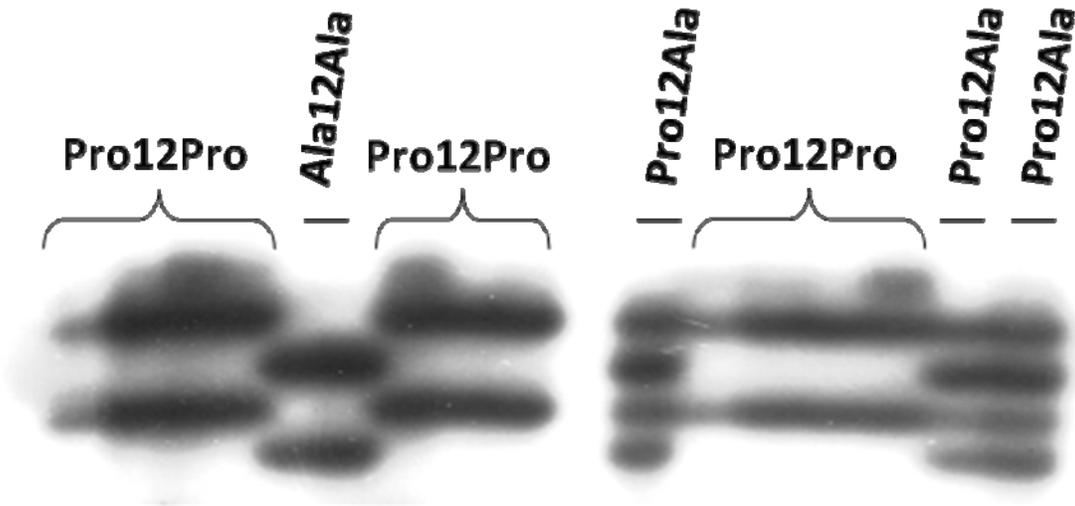


Figura 11. Patrones de bandas observados en una autorradiografía de acuerdo al genotipo del polimorfismo P12A de *PPAR γ* presentado en cada muestra.

Si la región amplificada es polimórfica y bialélica (con dos formas alternativas en la secuencia de bases), se pueden observar hasta cuatro bandas distintas y tres patrones de bandas en la autorradiografía: uno corresponderá al genotipo homocigoto con la variante común y presentará 2 bandas (Pro12Pro), el segundo genotipo homocigoto para la variante no común también presentará 2 bandas (Ala12Ala) y por último el genotipo heterocigoto presentará las cuatro bandas (Pro12Ala) [Figura 11]. El método tiene la sensibilidad de detectar diferencias en los alelos debido a variaciones en la secuencia de un solo nucleótido (Orita y cols., 1989; Kukita y cols., 1997).

b) Condiciones experimentales del PCR-SSCP para la genotipificación de P12A.

La amplificación de la región de interés del gen *PPAR γ* se realizó a través de una PCR para obtener un fragmento de 167 pb que abarca el exón b del gen, en el cual se localiza el polimorfismo Pro12Ala. Los iniciadores u oligonucleótidos utilizados fueron: 5'-GACAAAATATCAGTGTGAATTACAGC-3'(forward) y 5'-CCCAATAGCCGTATCTGGAAGG-3' (reverse) (Deeb y cols., 1998); la reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems).

La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95°C durante 7 minutos. La PCR se conformó por 35 ciclos que incluían cada uno 3 temperaturas: temperatura de desnaturalización a 95°C, temperatura de alineamiento a 60°C y temperatura de elongación a 72°C; estas tres temperaturas se mantuvieron por 30 segundos y finalmente una temperatura de elongación de 72°C por 7 minutos. El volumen total de reacción de la mezcla para la PCR fue de 10 μ L y contenía: 1.0 μ L de buffer 10X, (KCl-Tris-HCl pH 8.3), 1.0 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0.8 μ L de una mezcla equimolar al 2.5mM de los nucleótidos adenina, timina, y guanina (A,T,G), 1.0 μ L del nucleótido citosina 0.05mM, 50 ng de cada oligonucleótido, 0.25 U de Taq polimerasa (Taq Gold- Perkin Elmer), 100 ng de DNA genómico, 0.2 μ Ci de α -³²P-dCTP (Amersham 3000 Ci/mmol, 10mCi/mL) y agua c.b.p. 10 μ L.

Una vez terminada la PCR, se agregaron a cada tubo de reacción 32 μ L buffer de carga desnaturalizante que contenía formamida al 95%, EDTA 20mM, NaOH 10mM, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de cianol de xileno. Los tubos con la mezcla del producto de la PCR y el buffer se colocaron en el termociclador a 95°C durante 3 minutos para la desnaturalización de las cadenas del DNA e inmediatamente después los tubos se colocaron en una cuba con hielo para mantener las cadenas separadas. Posteriormente se cargaron 5 μ L de la mezcla de cada tubo en un gel de poliacrilamida al 6% con glicerol al 10%. La electroforesis se corrió con buffer TBE 1X a 30mA durante 6 horas. Después de la electroforesis el gel fue transferido a un papel Whatman 3M y se

colocó en un secador de geles durante 2 horas. El gel totalmente seco se puso en contacto con una placa radiográfica Kodak a -70°C por 24 horas y se reveló en la unidad de revelado del laboratorio de Biología de la Reproducción del INCMNSZ.

5.2 Genotipificación de C161T por PCR en tiempo real.

a) Fundamento de la técnica.

La PCR en tiempo real es un método que, mediante la reacción de PCR y detección de fluorescencia, permite cuantificar la cantidad de DNA producido, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado; esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. La PCR en tiempo real es un método específico y sumamente sensible; en esta técnica, los procesos de amplificación y detección se llevan a cabo de manera simultánea (Higuchi y cols., 1993).

Los sistemas de detección de secuencia (SDS) por fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble cadena. El más empleado en PCR tiempo real es el SYBR green. El incremento de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de reacción es muy fácil; sin embargo, tiene baja especificidad, por lo cual los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos.

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (Fluorescence Resonance Energy Transfer:

FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan.

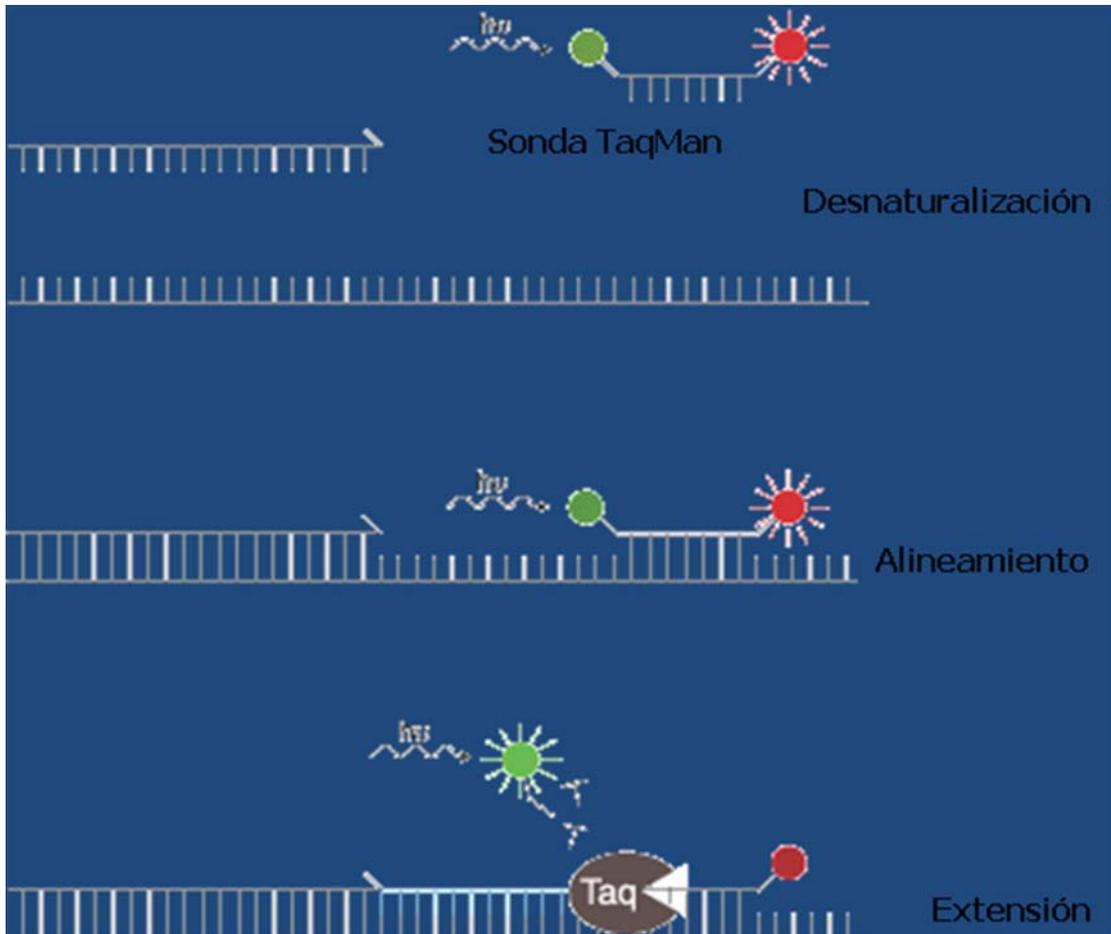


Figura 12. Mecanismo de acción de la sonda TaqMan en una PCR. En la etapa de desnaturalización la sonda se encuentra intacta, los fluoróforos reportero (en verde) y apagador (en rojo) están próximos entre sí y no hay emisión de fluorescencia. En la etapa de alineamiento la sonda se hibrida con su secuencia complementaria y en la etapa de extensión una vez que ha comenzado la amplificación del DNA molde, se escinde la sonda y el alejamiento del fluoróforo reportero y el apagador provoca la emisión de fluorescencia.

Las sondas TaqMan tienen un marcador fluorescente (reportero) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y una molécula que absorbe (apagador) la fluorescencia emitida por el marcador en el otro extremo [Figura 12] (Livak, 1999; McGuigan y cols., 2002). Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia

emitida por el donador es absorbida por el aceptor; sin embargo, durante la amplificación del DNA molde, la sonda se hibrida con su cadena complementaria y al desplazarse a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, la Taq polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como el donador y aceptor ahora están espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector [Figura 12].

El empleo de sondas TaqMan garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales (McGuigan y cols., 2002; Gibson y cols., 2006). Las sondas TaqMan presentan dos fluoróforos reporteros diferentes (VIC y FAM), lo cual permite la detección de la base incorporada. Una de las sondas incluye la base correspondiente al alelo silvestre y la otra sonda presenta la base correspondiente al alelo mutado; el fluoróforo detectado revela la presencia o ausencia del polimorfismo en la muestra analizada.

El ensayo de discriminación alélica, una de las aplicaciones de la PCR en tiempo real, nos permite conocer el genotipo presente en cada una de las muestras de DNA analizadas. El programa computacional SDS 2.2 acoplado al equipo de PCR tiempo real, mediante la aplicación de un algoritmo previamente establecido y tomando en cuenta la fluorescencia basal del ensayo, nos indica el genotipo presente en la muestra analizada y además nos proporciona un valor de calidad del ensayo. Los resultados de la discriminación alélica son presentados en forma de gráfica (alelo Y vs alelo X), en donde es fácil ubicar las muestras genotipificadas como homocigotos para el alelo X, homocigotos para el alelo Y o como heterocigotos [Figura 13].

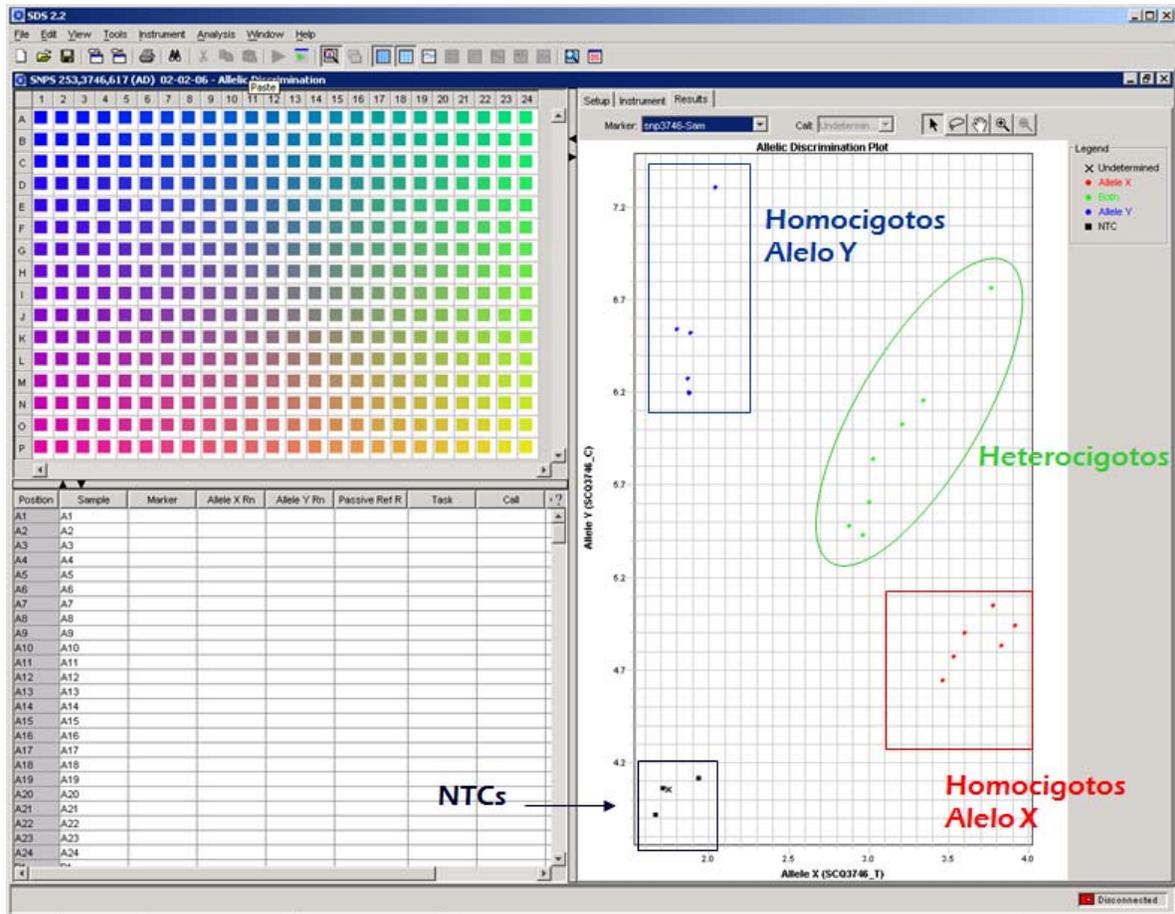


Figura 13. Gráfica de un ensayo de discriminación alélica para la genotipificación de muestras por PCR en tiempo real obtenida mediante el programa SDS 2.2. El color y la ubicación de las muestras dentro de la gráfica permite la determinación del genotipo, considerando la fluorescencia basal del ensayo, representada por NTCs (controles negativos; sin DNA).

b) Condiciones de la PCR en tiempo real para la genotipificación de C161T.

La genotipificación del polimorfismo C161T del gen *PPAR-γ* se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan prediseñadas y distribuidas por Applied Biosystems y el programa de discriminación alélica SDS 2.2 para el análisis de polimorfismos acoplado al termociclador ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems). El número de identificación del ensayo es: C_11922961_30 (www.appliedbiosystems.com).

6. Genotipificación de los SNPs 2351, rs3747623, rs617698 y rs2275703 de *CASQ1* por PCR en tiempo real.

Los 4 SNPs del gen de *CASQ-1* se analizaron mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando sondas Taqman prediseñadas y distribuidas por Applied Biosystems y el programa de discriminación alélica SDS 2.2 para el análisis de polimorfismos acoplado al termociclador ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems). En la tabla 3 se presentan los números de identificación de cada uno de los ensayos de PCR en tiempo real utilizados para la genotipificación de los SNPs de *CASQ1*.

Tabla 3. Ensayos de sondas TaqMan utilizados para la genotipificación de los SNPs de *CASQ1*

SNP de <i>CASQ1</i>	No. de identificación del ensayo*
2351	Sondas fabricadas bajo diseño, no inventariadas.
rs3747623	C__22272081_20
rs617698	C__1927058_10
rs2275703	C__1927053_1_

*www.appliedbiosystems.com

7. Genotipificación de los SNPs rs3737787 de *USF-1* (USF1s1) y rs2144908 y rs745975 de *HNF-4 α* por pirosecuenciación.

a) Fundamento de la técnica.

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación de DNA que se basa en la detección del pirofosfato liberado (PPi) durante la síntesis del DNA. En una cascada de reacciones enzimáticas, la luz visible que se genera es proporcional al número de nucleótidos incorporados (Ronaghi, 2001).

La cascada de reacciones enzimáticas de la pirosecuenciación comienza con la reacción de polimerización del ácido nucleico en la cual el PPI inorgánico es liberado como resultado de la incorporación de un nucleótido por la polimerasa. El PPI liberado es subsecuentemente convertido a ATP por la ATP-sulfurilasa, la cual provee la energía necesaria para que la luciferasa oxide la luciferina y se genere luz [Figura 14]. Los nucleótidos no incorporados son degradados por la apirasa antes de añadir el siguiente nucleótido, permitiendo una adición iterativa de nucleótidos. Debido a que los nucleótidos son añadidos uno a la vez y a que se conoce el nucleótido añadido, es posible determinar la secuencia del templado (Ronaghi, 2001).

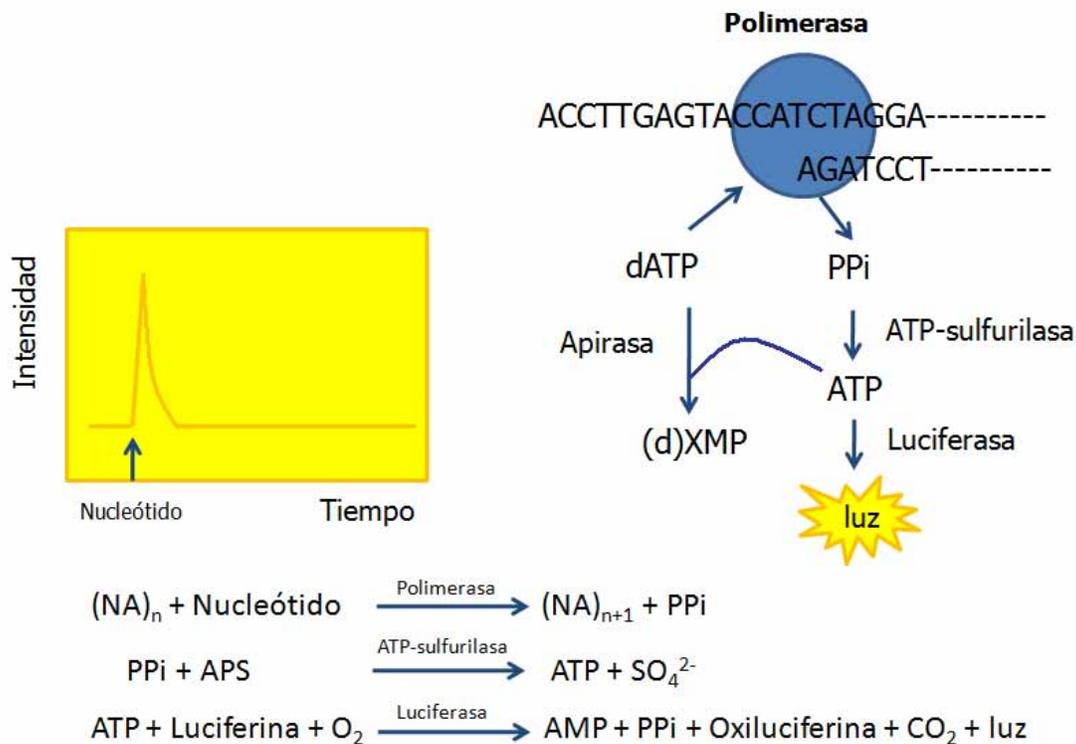


Figura 14. Representación esquemática del proceso de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo durante la técnica de pirosecuenciación en fase líquida. El DNA templado y las cuatro enzimas que participan en estas reacciones se colocan en un pozo de una microplaca. Los cuatro diferentes nucleótidos son añadidos paso a paso y su incorporación es monitoreada utilizando la enzima ATP-sulfurilasa y la luciferasa. Los nucleótidos son continuamente degradados por la apirasa permitiendo la incorporación del nucleótido subsecuente.

Conforme avanza el proceso de la pirosecuenciación, la cadena complementaria de DNA es construida y la secuencia de nucleótidos se determina a partir de los picos

de las señales registradas en el pirograma. La pirosecuenciación es una técnica utilizada para el análisis de mutaciones y de SNPs; se emplea también en la investigación genómica y algunas de sus aplicaciones moleculares en esta área son el diagnóstico de enfermedades y pruebas farmacogenómicas (Fakhrai-Rad y cols., 2002).

b) Condiciones de los ensayos de pirosecuenciación para la genotipificación de los SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* .

Los SNPs rs3737787 de *USF-1* (USF1s1), rs2144908 y rs745975 de *HNF-4 α* fueron genotipificados utilizando la técnica de pirosecuenciación (Pyrosequencing, Foxboro, MA). Los oligonucleótidos para la PCR fueron diseñados utilizando el programa Primer3 y para su detección se utilizó el paquete de diseño de oligonucleótidos para SNPs (Pyrosequencing). Los protocolos de los PCRs de estos tres SNPs se encuentran descritos en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolos para la obtención de los productos de PCR empleados en la genotipificación de SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* por pirosecuenciación.

	SNPs		
	rs3737787 (<i>USF-1</i>)	rs2144908 (<i>HNF-4α</i>)	rs745975 (<i>HNF-4α</i>)
Reactivo	Volumen 1x (μ L)		
ddH ₂ O	12.1	11	14.7
Buffer 10X	3.75	3.75	3.75
dNTPs (2mMol)	3.75	3.75	3.75
Betaina 1M	3.75	3.75	0
MgCl ₂ 25mM	2.5	3.6	3.6
Primer 10 μ M BIO	1	1	1
Primer 10 μ M	3	3	3
AmpliTaq Gold 5U/ μ L	0.3	0.3	0.3
DNA (4ng/ μ L)	4	4	4
Total	34.15	34.15	34.15

Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Biometra T1, bajo las condiciones descritas en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de los ensayos para la obtención de los productos de PCR empleados en la genotipificación de SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* por pirosecuenciación.

SNP rs3737787 de <i>USF-1</i>		SNPs rs2144908 y rs745975 de <i>HNF-4α</i>	
Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
95	10	95	10
94	0.30	94	0.30
66	0.40	66	0.40
72	0.45	72	0.45
94	30	94	30
57	40	55	40
72	45	72	45
72	7	72	7
16	Pausa	16	Pausa

*Se requieren 19 ciclos; *se requieren 29 ciclos.

Las reacciones de PCR se realizaron en el laboratorio de la Dra. Paivi Pajukanta en el Departamento de Human Genetics de UCLA. Una vez obtenidos los productos de PCR, se corrieron 5 μ L en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio y TBE 1X para verificar la amplificación y para validar el ensayo de PCR con los controles negativos.

La pirosecuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación del Departamento de Human Genetics en UCLA, utilizando un pirosecuenciador PSQ96 (Biotage). En breve, los productos de PCR biotinilados se purificaron mediante perlas magnéticas cubiertas con estreptavidina y adición de buffer de lavado. Se agregó NaOH 0.5M para la obtención del DNA de una cadena, posteriormente se añadió el buffer de

alineamiento y el oligonucleótido para la secuenciación 2 μ M. En el pirosecuenciador se colocó la placa con los productos purificados y desnaturalizados y también se agregaron la mezcla de substratos, las enzimas y los cuatro nucleótidos por separado en un cartucho empleado para ello. Se inició la corrida en el pirosecuenciador y una vez finalizada, se generó un pirograma con la secuencia correspondiente. El programa computacional acoplado al pirosecuenciador determinó el genotipo de cada muestra y además proporcionó un valor de calidad del ensayo utilizando un algoritmo para la genotipificación de SNPs.

8. Confirmación de los genotipos por secuenciación.

Los genotipos obtenidos por PCR-SSCP, PCR en tiempo real y pirosecuenciación fueron confirmados mediante secuenciación directa. Cinco muestras de cada genotipo (10 homocigotos y 5 heterocigotos) fueron analizadas por esta técnica.

Para ello, primeramente se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de cada gen que contenía al SNP de interés. Se estandarizó la amplificación de esos fragmentos y se realizó la purificación de los productos de PCR obtenidos mediante columnas (QIAquick PCR Purification kit; QIAGEN). Las etapas de la purificación incluyen: unión del DNA a una matriz de la columna, lavado del DNA, secado y elusión con agua. Una vez que se han purificado los productos, se utilizan como DNA templado para una segunda reacción de PCR (secuenciación). Durante esta reacción se incorporan los nucleótidos fluorescentes (DNA Sequencing Kit BigDye Terminator v3.0).

Las condiciones de la PCR de secuenciación son las siguientes: 1 μ l del reactivo BigDye, 3 μ l de buffer 5X, 50ng del oligonucleótido (forward o reverse), 100 ng del DNA purificado y agua c.b.p. 20 μ l. Los productos de esta PCR se purifican en columnas de Sephadex (CentriSep;Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones descritas en el

manual del producto y se colocan en una centrifuga de vacío durante 20 minutos para su secado. Se resuspenden en una solución de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) y se colocan en una placa de 96 pozos. Se desnaturalizan por 2 minutos a 95°C y se colocan en hielo. La placa con las muestras se coloca en el secuenciador (secuenciador de DNA automatizado ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer); en este aparato cada una de las muestras se somete a electroforesis capilar utilizando el buffer TBE 1X (Applied Biosystems) y una matriz de acrilamida (POP6 de Applied Biosystems). Se generó un electroferograma con la secuencia correspondiente a cada muestra y se comparó el genotipo obtenido mediante esta técnica y las anteriormente mencionadas.

9. Análisis estadístico de los resultados.

9.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg.

La determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg es un importante paso de control de calidad en los estudios de poblaciones genéticas. El principio del equilibrio de Hardy-Weinberg determina que en una población en equilibrio, las frecuencias genotípicas están definidas por las frecuencias alélicas (Iniesta y cols., 2005).

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=a², la frecuencia genotípica de pq=2ab, la frecuencia del genotipo qq=b² y p + q= 1.

Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg pueden ser muy informativas. En los sujetos control, estas desviaciones pueden indicar que uno o más de los supuestos del modelo han sido violados o que ha ocurrido un error de genotipificación. En los casos, la desviación del equilibrio de HW, asumiendo que las fuentes de error han sido eliminadas, puede indicar la asociación de un locus con la enfermedad (Szeszko y cols., 2006).

Para saber si nuestra población a analizar mediante estudio de asociación caso-control estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg, primero se obtuvieron las frecuencias alélicas de cada polimorfismo en cada grupo (pacientes y controles) por separado. El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó mediante una prueba de χ^2 , utilizando un programa en internet diseñado para ello (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

9.2 Análisis de asociación caso-control.

Como primer paso, se hizo el análisis de los posibles factores confusores para el desarrollo del análisis de asociación caso-control mediante una prueba de t de Student, utilizando el programa SPSS v15.0 (SPSS Chicago, II).

El análisis de asociación de los polimorfismos a DG se realizó utilizando los diferentes modelos genéticos (aditivo, dominante y recesivo), mediante una prueba de regresión logística con el programa SPSS v15.0 (SPSS Chicago, II); se obtuvieron los valores de OR y de intervalo de confianza (IC) del 95%. El análisis de asociación de los polimorfismos a DG tomando en cuenta los factores confusores se realizó utilizando una prueba de regresión logística multinomial, empleando el mismo programa estadístico.

El análisis de asociación de los polimorfismos de los distintos genes a los rasgos cuantitativos estudiados se realizó mediante una prueba de t de Student. En los casos

donde fue necesario ajustar por edad y/o IMC, se aplicó una prueba de covarianza. Ambas pruebas se realizaron utilizando el programa SPSS v15.0 (SPSS Chicago, II).

9.3 Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs P12A y C161T de *PPAR γ* , los SNPs de *CASQ1* y los SNPs de *HNF-4 α* .

El desequilibrio de ligamiento se refiere a la asociación no azarosa entre alelos que se encuentran en diferentes loci (Weir, 2008). Existen diversas medidas del desequilibrio de ligamiento, entre las cuales destacan D' y r^2 . Se obtuvieron los valores de D' y de r^2 para los SNPs de *PPAR γ* , *CASQ1* y *HNF-4 α* mediante la utilización del programa Haploview 3.32. Haploview es un programa bioinformático diseñado para analizar y visualizar los patrones de desequilibrio de ligamiento de datos genéticos. Haploview nos proporciona valores de desequilibrio de ligamiento como D' y r^2 y también genera representaciones gráficas utilizando esos valores (Barrett y cols., 2004).

9.4 Análisis por haplotipos de los SNPs de *CASQ-1* y de *HNF-4 α*

El análisis por haplotipos de los SNPs de *CASQ-1* y de *HNF-4 α* se realizó utilizando el programa Haploview 3.32.

El genoma humano tiene una estructura en bloques de haplotipos, de tal manera que puede ser dividido en bloques diferenciados de una diversidad de haplotipos limitada. En cada bloque, una pequeña fracción de SNPs denominados "tag SNPs", pueden ser utilizados para distinguir una amplia fracción de los haplotipos (Zhang y cols., 2002). Los tag SNPs son representativos de una región del genoma con alto desequilibrio de ligamiento.

Haploview es útil para los estudios de asociación, ya que selecciona los tag SNPs y estima las frecuencias de los haplotipos en la población estudiada; además, como se mencionó anteriormente, calcula varias medidas del desequilibrio de ligamiento (D' , r^2), las cuales son utilizadas para generar representaciones gráficas de los bloques de haplotipos (Barrett y cols., 2004).

9.5. Análisis del posible efecto de estratificación poblacional utilizando marcadores de ancestría.

Debido a que la población mexicana es mestiza y por lo tanto está conformada por una mezcla de poblaciones de distintas ancestrías (caucásica, amerindia, africana), se consideró necesario analizar marcadores informativos de ancestría para evaluar si la asociación de los SNPs de *USF-1* y de *HNF-4 α* a DG pudiera estar influenciada por la estratificación poblacional.

Para esto se utilizó un panel de 10 marcadores informativos de ancestría (rs4884, rs2695, rs17203, rs2862, rs3340, rs722098, rs203096, rs223830, rs1800498 y rs281478), los cuales distinguen principalmente la ancestría amerindia de la europea ($\delta > 0.44$) (Villarreal y cols., 2007). La genotipificación fue realizada por KBiosciences (Hertfordshire, U.K.), utilizando un sistema de ensayos KASPar. Se empleó el programa ADMIXMAP para analizar el posible efecto de la estratificación poblacional sobre los resultados de las asociaciones caso-control estudiadas (Hoggart y cols., 2003; Hoggart y cols., 2004).

ADMIXMAP es un programa que elabora modelos de mezclas poblacionales, utilizando genotipos de marcadores y datos de rasgos de una muestra de individuos de una población mezclada. ADMIXMAP está basado en un modelo multinivel para la distribución de la mezcla individual en la población y la variación estocástica de la ancestría en los cromosomas híbridos; esto hace posible el modelar las asociaciones de

ancestría entre un marcador ligado a un loci y la asociación de un rasgo con la mezcla individual o con la ancestría de un marcador ligado a un locus. Una de las aplicaciones de ADMIXMAP es en los estudios de asociación caso-control para poblaciones con mezcla étnica donde sirve para evaluar la relación que existe entre el riesgo a una enfermedad y la mezcla poblacional.

VI.- RESULTADOS

1. Estudio del gen *PPAR γ* y del gen *CASQ1*.

1.1. Características de la población de estudio.

Para esta primera parte del proyecto se analizaron 252 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión. Las características de cada uno de los grupos estudiados están descritas en la tabla 6.

Tabla 6. Características de la población de estudio (*PPAR γ* y *CASQ1*).

	n	Edad x \pm DE (años)
Casos DG (CMN 20 de Nov)	94	34.56 \pm 4.9
Controles Normoglucémicos (INCMNSZ)	112	59.77 \pm 10.6
Controles con CTOG Normal (INPER)	46	32.02 \pm 6.1

1.2. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los SNPs de los genes *PPAR γ* y *CASQ1* y en cada uno de los grupos estudiados mediante una prueba de χ^2 . Los valores de p obtenidos se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de los genes *PPAR γ* y *CASQ1* en los casos y controles.

Gen	SNP	Casos DG 20 de Nov	Controles normoglucémicos	Controles con CTOG normal (INPER)
<i>PPARγ</i>	rs1801282 (P12A)	0.339	0.581	0.173
	rs3856806 (C161T)	0.763	0.716	0.250
<i>CASQ1</i>	rs617698	0.005	0.643	0.388
	SNP 2351	0.184	0.725	0.213
	rs3747623	0.023	0.741	0.395
	rs2275703	0.071	0.947	0.483

Como se puede observar en la tabla 7, sólo el SNP rs617698 y el rs2275703 del gen *CASQ1* no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de los casos de DG del Hospital 20 de Noviembre.

1.3. Confirmación de los genotipos de los SNPs de *PPAR γ* y *CASQ1* por secuenciación.

Se obtuvo un 100% de concordancia entre los genotipos obtenidos por PCR-SSCP para el polimorfismo P12A de *PPAR γ* , los genotipos obtenidos por PCR en tiempo real para el SNP C161T de *PPAR γ* y los genotipos de ambos polimorfismos observados en las secuencias obtenidas mediante secuenciación automatizada.

Para los SNPs de *CASQ1* estudiados, también se obtuvo un 100% de concordancia entre los genotipos obtenidos por PCR en tiempo real y los genotipos obtenidos mediante la secuenciación.

1.4. Análisis de los posibles factores confusores.

Se procedió a examinar los posibles factores confusores para observar si había diferencias significativas entre el grupo de casos de DG y los dos grupos de controles y dependiendo de ello, considerar estos factores al momento de realizar el análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* y *CASQ1* a DG con diferentes modelos genéticos.

Tabla 8. Análisis de los posibles factores confusores en el grupo de DG (20Nov) vs controles normoglucémicos.

	Grupo	n	Media	Desviación estándar	p
Edad de Dx	Controles	112	59.77	10.60	<0.001
	Casos	94	34.56	4.94	
IMC (peso habitual)	Controles	108	26.61	4.00	0.398
	Casos	91	26.10	4.45	

En la tabla 8 se observa que la edad de los controles normoglucémicos es significativamente diferente de la edad de los casos con DG; este resultado se esperaba debido a que uno de los criterios de inclusión de los controles normoglucémicos era ser mayor de 45 años, por lo tanto la edad no se consideró como un factor confusor para el análisis caso-control. En el caso del IMC, no fue significativamente diferente entre estos dos grupos y tampoco se consideró como un factor confusor para el análisis.

Tabla 9. Análisis de los posibles factores confusores en el grupo de DG (20Nov) vs controles con CTOG normal (INPER).

	Grupo	n	Media	Desviación estándar	p
Edad de Dx	Controles	46	32.02	6.09	0.009
	Casos	94	34.56	4.94	
IMC (peso habitual)	Controles	42	25.28	5.30	0.355
	Casos	91	26.10	4.45	

En la tabla 9 se observa que la edad tuvo un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al comparar el grupo de DG vs controles con CTOG normal, por lo cual se corrigió por edad cuando se hizo el análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* y *CASQ1* a DG con diferentes modelos genéticos; el IMC no fue significativamente diferente entre los grupos y no se consideró como un factor confusor dentro del análisis de asociación.

Es importante mencionar que el análisis de asociación caso-control se hizo con cada uno de los diferentes grupos de controles por separado (controles normoglucémicos y controles con CTOG normal) debido a que estos dos grupos de controles tienen diferentes criterios de inclusión; por ejemplo, la edad entre ambos grupos de controles es diferente significativamente, con un valor de $p < 0.001$. Esto imposibilita el manejar a estos grupos como un solo grupo para el análisis.

Por ello a continuación se presentan las tablas con el análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* y *CASQ1* a DG con diferentes modelos genéticos, comparando DG vs controles normoglucémicos (tabla 10 y tabla 17, respectivamente) y DG vs controles con CTOG normal (tabla 11 y tabla 18, respectivamente).

1.5. Resultados del análisis de los polimorfismos de *PPAR γ*

Tabla 10. Análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles normoglucémicos).

Gen	SNP	Genotipo	DG n(%)	Controles normoglucémicos n(%)	OR (95% IC) y p para el modelo aditivo ^a	OR (95% IC) y p para el modelo dominante ^b	OR (95% IC) y p para el modelo recesivo ^c
<i>PPARγ</i>	rs1801282 (P12A)	CC (Pro/Pro)*	70 (76.1)	85 (78.0)	1.21 (0.67-2.16) <i>0.530</i>	1.11 (0.58-2.15) <i>0.750</i>	3.64 (0.37-35.61) <i>0.267</i>
		CG (Pro/Ala)	19 (20.6)	23 (21.1)			
GG (Ala/Ala)		3 (3.3)	1 (0.9)				
<i>PPARγ</i>	rs3856806 (C161T)	CC*	71 (75.5)	85 (79.4)	1.20 (0.67-2.16) <i>0.534</i>	1.25 (0.64-2.43) <i>0.508</i>	1.14 (0.16-8.27) <i>0.896</i>
		CT	21 (22.4)	20 (18.7)			
		TT	2 (2.1)	2 (1.9)			

^a Modelo aditivo: 0=11, 1=12, 2=22, donde 1=alelo común y 2=alelo raro

^b Modelo dominante: 12 + 22

^c Modelo recesivo: 11 + 12

*Alelo común de los SNPs estudiados.

Tabla 11. Análisis de asociación de los polimorfismos de PPAR γ a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles con CTOG normal).

Gen	SNP	Genotipo	DG n(%)	Controles con CTOG normal n(%)	OR (95% IC) y p para el modelo aditivo	OR (95% IC) y p para el modelo dominante	OR (95% IC) y p para el modelo recesivo
<i>PPARγ</i>	rs1801282 (P12A)	CC (Pro/Pro)* CG (Pro/Ala) GG (Ala/Ala)	70 (76.1) 19 (20.6) 3 (3.3)	30 (69.77) 13 (30.23) 0 (0)	0.89 (0.43-1.82) <i>0.739</i>	0.73 (0.32-1.63) <i>0.436</i>	-----
	rs3856806 (C161T)	CC* CT TT	71 (75.5) 21 (22.4) 2 (2.1)	35 (76.09) 11 (23.91) 0 (0)	1.13 (0.53-2.43) <i>0.751</i>	1.03 (0.45-2.35) <i>0.943</i>	-----

^a Modelo aditivo: 0=11, 1=12, 2=22, donde 1=alelo común y 2=alelo raro

^b Modelo dominante: 12 + 22

^c Modelo recesivo: 11 + 12

*Alelo común de los SNPs estudiados.

El modelo dominante supone que una única copia del alelo mutado es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud; por ejemplo, para el polimorfismo P12A los heterocigotos CG y homocigotos GG bajo este modelo tienen el mismo riesgo y por ello se compara la combinación de estos dos genotipos (CG+GG) respecto a los homocigotos CC (Tabla 10). Siguiendo con el mismo ejemplo, el modelo recesivo supone que son necesarias dos copias del alelo G, por lo tanto, los heterocigotos CG y los homocigotos del alelo más frecuente (CC) tienen el mismo riesgo y bajo este modelo se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo mutado (GG). Y por último, el modelo aditivo supone que cada copia del alelo G modifica el riesgo en una cantidad aditiva, por lo cual, los homocigotos GG tienen el doble de riesgo que los heterocigotos CG y bajo este modelo se compara la combinación de estos alelos, donde se otorga el valor de 1 a los heterocigotos CG y valor de 2 a los homocigotos GG (Tabla 10).

Para la comparación de DG vs controles con CTOG normal se hizo también el análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* ajustado por edad, recordando que la edad había demostrado ser un factor confusor entre estos grupos. Este análisis se realizó en los modelos aditivo y dominante, ya que el recesivo no se pudo realizar por no contar con homocigotos Ala en los controles con CTOG normal. No se obtuvieron valores de p estadísticamente significativos para ninguno de los dos modelos ajustados por edad. Cabe mencionar que también se hizo el análisis de asociación de los polimorfismos a DG ajustado por el hospital de origen de las muestras, ya que los controles con CTOG normal provienen del INPER y los casos de DG provienen del CMN 20 de Noviembre; en este análisis tampoco se obtuvo un valor de p estadísticamente significativo para ninguno de los SNPs de *PPAR γ* bajo los modelos analizados.

1.6. Análisis de asociación de P12A y C161T al IMC.

El análisis de asociación de los polimorfismos del gen *PPAR γ* al IMC se llevó a cabo en cada uno de los grupos estudiados mediante una prueba de t de Student y utilizando el modelo dominante. Los resultados correspondientes se encuentran en las tablas 12 a 14.

Tabla 12. Análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* a los rasgos cuantitativos en los controles normoglucémicos.

	P12A (rs1801282)			C161T (rs3856806)		
	CC x \pm DE	CG + GG x \pm DE	P	CC x \pm DE	CT + TT x \pm DE	P
IMC (kg/m ²)	26.1 \pm 4.0	28.3 \pm 3.8	0.019	26.4 \pm 3.9	27.3 \pm 4.2	0.324
Glucosa (mg/dL)	88.0 \pm 11.7	91.7 \pm 13.2	0.186	88.7 \pm 11.6	93.0 \pm 13.4	0.136

Se observa en la tabla 12 que sólo el IMC tuvo un valor de p significativo para el polimorfismo P12A en el grupo de los controles normoglucémicos, ya que los portadores del alelo Ala (GG), ya sea en una copia o en dos, presentaron un IMC mayor que aquéllos que no portaban ese alelo. Es importante mencionar que, debido a que este grupo de controles maneja un rango de edad amplio (desde 45 a 92 años), se hizo un ajuste por edad para el análisis de asociación del polimorfismo P12A al IMC, obteniéndose un valor de p=0.024 después del ajuste, conservándose así la significancia del resultado.

Tabla 13. Análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (CMN 20 de Nov.).

	P12A (rs1801282)			C161T (rs3856806)		
	CC x \pm DE	CG + GG x \pm DE	p	CC x \pm DE	CT + TT x \pm DE	P
IMC (kg/m ²)	26.3 \pm 4.1	25.7 \pm 5.5	0.603	26.5 \pm 4.8	24.8 \pm 2.9	0.110
Glucosa (mg/dL)	95.0 \pm 12.1	93.3 \pm 7.5	0.518	94.4 \pm 11.4	94.7 \pm 10.3	0.932
AUC (mg/dL)min	29687 \pm 3134	29693 \pm 3039	0.994	29477 \pm 3244	30167 \pm 2479	0.353

En la tabla 13 se aprecia que ninguno de los dos SNPs de *PPAR γ* analizados se asoció a alguno de los rasgos cuantitativos estudiados en el grupo de DG, ya que no se obtuvo un valor de p estadísticamente significativo.

Tabla 14. Análisis de asociación de los polimorfismos de *PPAR γ* a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal del INPER.

	P12A (rs1801282)			C161T (rs3856806)		
	CC x \pm DE	CG + GG x \pm DE	p	CC x \pm DE	CT + TT x \pm DE	P
IMC (kg/m ²)	25.5 \pm 5.6	23.2 \pm 3.11	0.214	25.3 \pm 5.5	25.3 \pm 5.0	0.974
Glucosa (mg/dL)	82.7 \pm 4.8	80.8 \pm 8.4	0.354	82.4 \pm 5.7	80.48 \pm 6.24	0.241
AUC (mg/dL)min	21472 \pm 2374	20961 \pm 2586	0.531	21567 \pm 2421	20375 \pm 1997	0.147

Se observa que para el grupo de controles con CTOG normal del INPER, ninguno de los dos SNPs de *PPAR γ* analizados se asoció a alguno de los rasgos cuantitativos

estudiados, ya que no se obtuvo un valor de p estadísticamente significativo (Tabla 14).

1.7. Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs P12A y C161T de *PPAR γ* .

Se hizo el cálculo del desequilibrio de ligamiento (DL) entre los SNPs P12A y C161T de *PPAR γ* mediante el programa Haploview, obteniendo los valores de D' y r^2 .

Tabla 15. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs P12A y C161T de *PPAR γ* .

	DG vs controles normoglucémicos	DG vs controles con CTOG normal
D'	0.634	0.600
r^2	0.393	0.317

Se observa en la tabla 15 que los valores de D' y r^2 para las comparaciones de DG vs los distintos grupos de controles son muy similares. D' resulta de la división del coeficiente de desequilibrio de ligamiento entre su máximo valor posible, dadas las frecuencias alélicas en dos loci. $D'=1$ nos indica un completo DL entre dos SNPs y un valor de $D'>0.8$ es sugerente de DL, por lo tanto, los SNPs de *PPAR γ* analizados no están en DL. r^2 es el coeficiente de correlación entre los dos loci y está relacionado con la cantidad de información que puede proporcionar un locus con respecto a otro, ya que toma en cuenta las diferencias en las frecuencias alélicas entre dos loci; un valor de $r^2=1$ indica un perfecto DL, por lo tanto, bajo este parámetro también es posible afirmar que los SNPs de *PPAR γ* analizados no están en desequilibrio de ligamiento.

1.8. Análisis de asociación por diplotipos de los SNPs P12A y C161T de *PPAR γ* .

Considerando que los SNPs de *PPAR γ* no están en desequilibrio de ligamiento, se hizo también el análisis de asociación caso-control por diplotipos de estos SNPs utilizando el programa Haploview.

Tabla 16. Análisis de asociación por diplotipos de los SNPs P12A y C161T de *PPAR γ* .

DG vs controles normoglucémicos			DG vs controles con CTOG normal		
DiploTipos P12A-C161T	Frecuencia	p	DiploTipos P12A-C161T	Frecuencia	p
CC	0.838	0.270	CC	0.814	0.906
GT	0.081	0.858	GT	0.084	0.892
GC	0.042	0.409	GC	0.058	0.517
CT	0.039	0.320	CT	0.044	0.486

Se puede observar en la tabla 16 que ninguno de los diplotipos formados con los SNPs de *PPAR γ* presenta valores de p significativos para el análisis de asociación realizado con el grupo de casos y con los dos grupos de controles. Las frecuencias de los diplotipos son similares cuando se comparan los casos de DG vs controles normoglucémicos y controles con CTOG normal; sin embargo, los valores de p obtenidos con el análisis de DG vs controles con CTOG normal son aún menos significativos que los obtenidos en la comparación de DG vs controles normoglucémicos.

1.9. Resultados del análisis de los polimorfismos de *CASQ1*.

En las tablas 17 y 18 se muestran los resultados del análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a DG, utilizando diferentes modelos genéticos.

Tabla 17. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles normoglucémicos).

Gen	SNP	Genotipo	DG n(%)	Controles normoglucémicos n(%)	OR (95% IC) y <i>p</i> para el modelo aditivo	OR (95% IC) y <i>p</i> para el modelo dominante	OR (95% IC) y <i>p</i> para el modelo recesivo
<i>CASQ1</i>	rs617698	AA*	28 (30.1)	37 (33.9)	0.93	1.19	0.51
		AG	57 (61.3)	55 (50.5)	(0.60-1.43)	(0.66-2.16)	(0.21-1.24)
		GG	8 (8.6)	17 (15.6)	<i>0.726</i>	<i>0.561</i>	<i>0.138</i>
	SNP 2351	GG*	65 (69.9)	81 (77.1)	1.47	1.45	2.93
GA		23 (24.7)	22 (21.0)	(0.86-2.51)	(0.77-2.75)	(0.55-15.46)	
AA		5 (5.4)	2 (1.9)	<i>0.158</i>	<i>0.248</i>	<i>0.206</i>	
rs3747623	CC*	25 (26.9)	32 (30.2)	0.94	1.18	0.64	
	CT	56 (60.2)	54 (50.9)	(0.62-1.44)	(0.63-2.18)	(0.29-1.39)	
	TT	12 (12.9)	20 (18.9)	<i>0.776</i>	<i>0.607</i>	<i>0.256</i>	
rs2275703	AA*	24 (26.1)	36 (33.3)	1.12	1.42	0.84	
	AC	54 (58.7)	53 (49.1)	(0.74-1.69)	(0.77-2.62)	(0.40-1.79)	
	CC	14 (15.2)	19 (17.6)	<i>0.608</i>	<i>0.266</i>	<i>0.652</i>	

*Alelo común de los SNPs estudiados.

Tabla 18. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a DG con diferentes modelos genéticos (DG vs controles con CTOG normal).

Gen	SNP	Genotipo	DG n(%)	Controles con CTOG normal n(%)	OR (95% IC) y p para el modelo aditivo	OR (95% IC) y p para el modelo dominante	OR (95% IC) y p para el modelo recesivo
<i>CASQ1</i>	rs617698	AA*	28 (30.1)	12 (32.4)	0.77	0.90	0.48
		AG	57 (61.3)	24 (64.9)	(0.42-1.39)	(0.40-2.0)	(0.16-1.44)
		GG	8 (8.6)	1 (2.7)	<i>0.380</i>	<i>0.793</i>	<i>0.191</i>
	SNP 2351	GG*	65 (69.9)	33 (73.3)	1.37	1.19	-----
		GA	23 (24.7)	12 (26.7)	(0.69-2.75)	(0.54-2.63)	
		AA	5 (5.4)	0 (0)	<i>0.371</i>	<i>0.676</i>	
rs3747623	CC*	25 (26.9)	14 (31.8)	1.11	1.27	0.94	
	CT	56 (60.2)	24 (54.6)	(0.63-1.98)	(0.58-2.78)	(0.33-2.69)	
	TT	12 (12.9)	6 (13.6)	<i>0.714</i>	<i>0.550</i>	<i>0.906</i>	
rs2275703	AA*	24 (26.1)	17 (36.9)	1.16	1.66	0.74	
	AC	54 (58.7)	20 (43.5)	(0.68-1.97)	(0.78-3.55)	(0.29-1.86)	
	CC	14 (15.2)	9 (19.6)	<i>0.589</i>	<i>0.190</i>	<i>0.519</i>	

*Alelo común de los SNPs estudiados.

Se observa en las tablas 17 y 18 que ninguno de los SNPs de *CASQ1* estuvo asociado a DG con los tres modelos genéticos analizados. Es importante mencionar que para la comparación de DG vs controles con CTOG normal se hizo también el análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* ajustado por edad y por el hospital de origen; no se obtuvieron valores de p estadísticamente significativos para ninguno de los SNPs analizados bajo los modelos genéticos utilizados.

1.10. Análisis de asociación de los SNPs de *CASQ1* a los rasgos cuantitativos.

El análisis de asociación de los polimorfismos del gen *CASQ1* a los rasgos cuantitativos se llevó a cabo en cada uno de los grupos estudiados mediante una prueba de t de Student y utilizando el modelo dominante. Los resultados correspondientes se encuentran en las tablas 19 a 21.

Tabla 19a. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a los rasgos cuantitativos en los controles normoglucémicos.

	rs617698			SNP2351		
	AA x ± DE	AG + GG x ± DE	p	GG x ± DE	GA + AA x ± DE	P
IMC (kg/m ²)	26.6 ± 3.9	26.8 ± 4.1	0.791	26.4 ± 3.9	26.7 ± 4.3	0.723
Glucosa (mg/dL)	90.2 ± 12.8	88.9 ± 11.9	0.596	88.0 ± 11.4	91.3 ± 14.5	0.248

Tabla 19b. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a los rasgos cuantitativos en los controles normoglucémicos.

	rs3747623			rs2275703		
	CC x ± DE	CT + TT x ± DE	p	AA x ± DE	AC + CC x ± DE	P
IMC (kg/m ²)	26.0 ± 4.1	26.9 ± 4.0	0.309	27.4 ± 4.6	26.4 ± 3.6	0.196
Glucosa (mg/dL)	90.0 ± 12.8	88.2 ± 11.6	0.475	89.4 ± 11.3	88.0 ± 12.7	0.881

Se observa en las tablas 19a y 19b que ninguno de los SNPs de *CASQ1* se asoció a algún rasgo cuantitativo en el grupo de controles normoglucémicos.

Tabla 20a. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (CMN 20 de Nov.).

	rs617698			SNP2351		
	AA x ± DE	AG + GG x ± DE	p	GG x ± DE	GA + AA x ± DE	p
IMC (kg/m ²)	25.7 ± 3.5	26.4 ± 4.8	0.480	26.2 ± 3.9	26.1 ± 5.5	0.939
Glucosa (mg/dL)	95.9 ± 11.7	93.9 ± 10.9	0.436	94.6 ± 10.4	94.4 ± 12.8	0.928
AUC (mg/dL)min	29528±2777	29602 ±3146	0.914	29706±3048	29286±3004	0.542

Tabla 20b. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (CMN 20 de Nov.).

	rs3747623			rs2275703		
	CC x ± DE	CT + TT x ± DE	p	AA x ± DE	AC + CC x ± DE	P
IMC (kg/m ²)	25.5 ± 3.2	26.4 ± 4.8	0.384	26.4 ± 3.9	26.1 ± 4.7	0.785
Glucosa (mg/dL)	94.0 ± 9.6	94.7 ± 11.7	0.804	92.0 ± 11.1	95.4 ± 11.2	0.208
AUC (mg/dL)min	29274±2071	29692 ±3314	0.557	29709±3597	29538 ±2848	0.815

Como podemos observar en las tablas 20a y 20b, ningún SNP de *CASQ1* resultó asociado a algún rasgo cuantitativo en el grupo de los casos con DG.

Tabla 21a. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal del INPER.

	rs617698			SNP2351		
	AA x ± DE	AG + GG x ± DE	P	GG x ± DE	GA + AA x ± DE	P
IMC (kg/m ²)	25.7 ± 4.7	25.4 ± 5.7	0.918	25.6 ± 5.0	24.7 ± 6.4	0.646
Glucosa (mg/dL)	81.8 ± 7.0	82.5 ± 5.8	0.757	82.4 ± 6.3	80.3 ± 6.5	0.335
AUC (mg/dL)min	20753±2311	21387 ±2384	0.427	21425±2448	20688 ±2103	0.360

Tabla 21b. Análisis de asociación de los polimorfismos de *CASQ1* a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal del INPER.

	rs3747623			rs2275703		
	CC x ± DE	CT + TT x ± DE	p	AA x ± DE	AC + CC x ± DE	P
IMC (kg/m ²)	24.5 ± 4.4	25.7 ± 5.9	0.538	25.6 ± 6.4	25.1 ± 4.5	0.748
Glucosa (mg/dL)	80.6 ± 6.6	82.5 ± 6.3	0.347	81.4 ± 4.1	82.0 ± 7.4	0.764
AUC (mg/dL)min	21069±2446	21507 ±2367	0.574	20813±2588	21557±2220	0.308

Se observa en las tablas anteriores que ningún SNP de *CASQ1* se asoció a los rasgos cuantitativos analizados en el grupo de controles con CTOG normal [Tabla 21a y 21b].

1.11. Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de *CASQ1*.

Se hizo el análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs de *CASQ1* utilizando el programa Haploview y se obtuvieron las siguientes figuras.

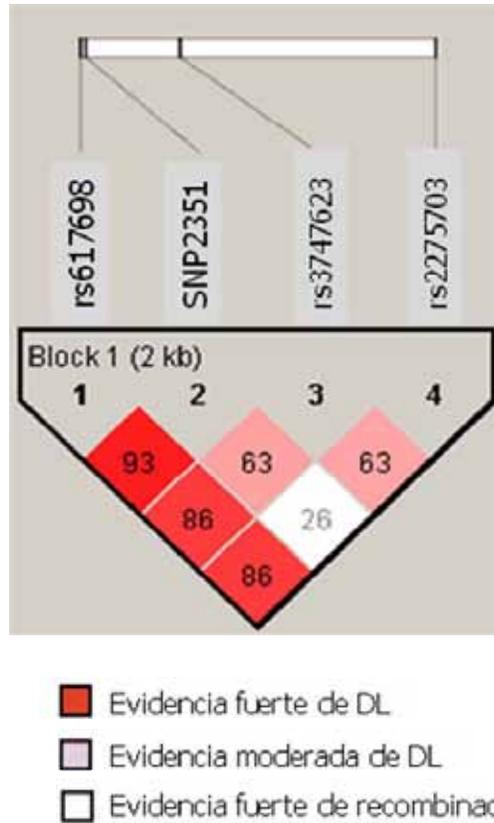


Figura 15. Gráfica de desequilibrio de ligamiento (DL) de los SNPs de *CASQ1* utilizando 94 casos de DG y 112 controles normoglucémicos. Los números que se encuentran dentro de los cuadros son el valor de D' .

Tabla 22. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de *CASQ1* (DG vs controles normoglucémicos).

SNPs	D'	r^2
rs617698-SNP2351	0.931	0.103
rs617698-rs3747623	0.864	0.645
rs617698-rs2275703	0.866	0.381
SNP2351- rs3747623	0.636	0.057
SNP2351- rs2275703	0.262	0.009
rs3747623- rs2275703	0.630	0.223

Se observa en la figura 15 y en la tabla 22 que solo el SNP rs617698 de *CASQ1* presenta fuerte evidencia de desequilibrio de ligamiento con los SNPs 2351, rs3747623 y rs2275703 ($D' > 0.8$); sin embargo, los valores de r^2 para este mismo SNP no indican lo mismo, ya que bajo este parámetro solo puede sugerirse desequilibrio de ligamiento entre el SNP rs617698 y el SNP rs3747623 (Tabla 22).

Este análisis de desequilibrio de ligamiento también se hizo para la comparación de DG vs controles con CTOG normal. Los resultados se encuentran en la figura 16 y en la tabla 23.

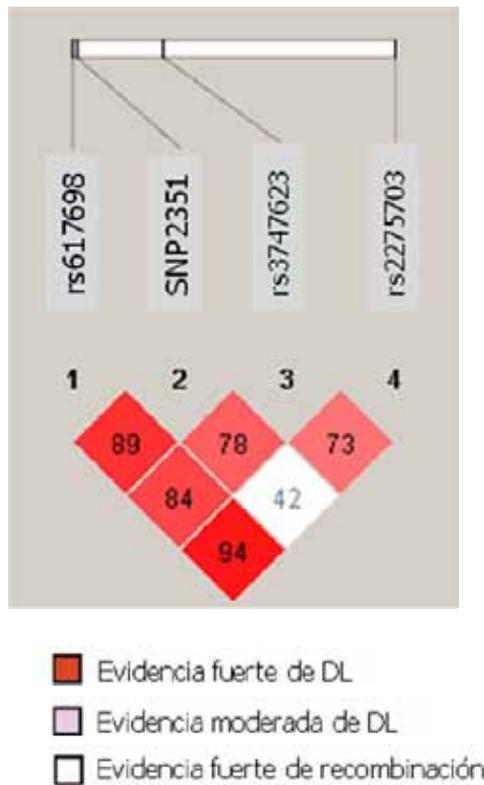


Figura 16. Gráfica de desequilibrio de ligamiento (DL) de los SNPs de *CASQ1* utilizando 94 casos de DG y 46 controles con CTOG normal. Los números que se encuentran dentro de los cuadros son el valor de D' .

Tabla 23. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs de *CASQ1* (DG vs controles con CTOG normal).

SNPs	D'	r ²
rs617698-SNP2351	0.890	0.106
rs617698-rs3747623	0.843	0.648
rs617698-rs2275703	0.947	0.472
SNP2351- rs3747623	0.785	0.087
SNP2351- rs2275703	0.424	0.028
rs3747623- rs2275703	0.738	0.310

Se observa en la figura 16 y en la tabla 23 que al hacer el análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de *CASQ1* para los grupos de DG vs controles con CTOG normal, nuevamente el SNP rs617698 de *CASQ1* presenta fuerte evidencia de desequilibrio de ligamiento con los SNPs 2351, rs3747623 y rs2275703 ($D' > 0.8$). También en este análisis, los valores de r^2 para este mismo SNP no indican lo mismo, ya que bajo este parámetro solo puede sugerirse desequilibrio de ligamiento entre el SNP rs617698 y el SNP rs3747623 (Tabla 23).

1.12. Análisis por haplotipos de los SNPs de *CASQ1*.

Se hizo el análisis de asociación caso-control por haplotipos de los SNPs de *CASQ1* utilizando el programa Haploview. Los resultados de este análisis para la comparación del grupo de DG vs los dos grupos de controles se encuentran en la tabla 24.

Tabla 24. Análisis de asociación por haplotipos de los SNPs de *CASQ1*.

DG vs controles normoglucémicos			DG vs controles con CTOG normal		
Haplotipos	Frecuencia	P	Haplotipos	Frecuencia	p
GGTA	0.347	0.774	GGTA	0.357	0.907
AGCC	0.331	0.946	AGCC	0.339	0.840
AACA	0.096	0.409	AACA	0.105	0.782
AGCA	0.071	0.205	AGCA	0.05	0.945
AGTC	0.036	0.534	AGTC	0.045	0.899
AACC	0.035	0.041	AACC	0.045	0.196
GGCA	0.028	0.110	GGCA	0.031	0.010
GGTC	0.019	0.359			
AGTA	0.015	0.353			

SNP1=rs617698, SNP2=SNP2351, SNP3=rs3747623, SNP4=rs2275703

Se puede observar en la tabla 24 que solo el haplotipo AACC formado con los cuatro SNPs de *CASQ1* analizados presenta un valor de p estadísticamente significativo para el análisis de asociación realizado con el grupo de casos y el grupo de controles normoglucémicos. En el análisis de asociación de casos de DG vs controles con CTOG normal, se observa que sólo se pudieron formar 7 haplotipos, lo cual se debe a que el grupo con CTOG normal tiene una n reducida (46 controles); en este grupo el haplotipo GGCA presentó un valor de p de asociación significativo.

Se hizo también el análisis de asociación por haplotipos de los SNPs de *PPAR γ* y los SNPs de *CASQ1* en conjunto. Para el análisis de asociación de DG vs controles normoglucémicos se generaron 17 haplotipos, de los cuales solo el haplotipo conformado por los alelos CCGGCA (P12A, C161T, rs617698, SNP2351, rs3747623 y rs2275703, respectivamente) tuvo una tendencia de asociación a la DG ($p=0.066$). En el análisis de asociación de DG vs controles con CTOG normal, se generaron 13 haplotipos de los cuales nuevamente el conformado por los alelos CCGGCA se asoció a DG, con un valor de $p=0.007$.

2. Estudio del gen *USF-1* y del gen *HNF-4 α*

2.1. Características de la población de estudio.

Para esta segunda parte del proyecto se analizaron 463 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión. Las características de cada uno de los grupos estudiados están descritas en la tabla 25.

Tabla 25. Características de la población de estudio.

	N	Edad $\bar{x} \pm DE$ (años)
Controles con CTOG normal (INPER)	213	30.74 \pm 6.8
Casos DG (INPER)	165	33.62 \pm 5.6
Casos DG (CMN 20 de Nov.)	85	34.55 \pm 4.9
Casos DG totales (INPER + CMN 20 de Nov.)	250	33.94 \pm 5.4

2.2. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los SNPs de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* en cada uno de los grupos estudiados mediante una prueba de χ^2 . Los valores de p obtenidos se encuentran en la tabla 26.

Tabla 26. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* en los casos y controles.

Gen	SNP	Controles con CTOG normal	Casos DG INPER	Casos DG 20 de Nov	Casos DG Totales
<i>USF-1</i>	rs3737787	0.318	0.356	0.555	0.274
<i>HNF-4α</i>	rs2144908	0.859	0.404	0.871	0.560
	rs745975	0.354	0.202	0.898	0.365

Como se puede observar en la tabla 26, todos los SNPs de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* analizados estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos de casos y controles estudiados. Cabe mencionar que se formó un grupo de los casos totales de DG (última columna de la tabla 26), es decir, se juntaron los casos de DG provenientes del INPER y los casos de DG provenientes del CMN 20 de noviembre, ya que ambos grupos tienen los mismos criterios de inclusión; esto se hizo con el objetivo de incrementar el tamaño del grupo de casos. Por lo tanto, para los siguientes análisis se manejará un solo grupo de casos con DG y se hará el ajuste correspondiente por el hospital de origen de las muestras.

2.3. Confirmación de los genotipos de los SNPs de *USF-1* y *HNF4 α* por secuenciación.

Se obtuvo un 100% de concordancia entre los genotipos obtenidos por pirosecuenciación para el polimorfismo rs3737787 de *USF-1*, los polimorfismos rs2144908 y rs745975 de *HNF4 α* y los genotipos observados en las secuencias obtenidas mediante secuenciación automatizada.

2.4. Análisis de los posibles factores confusores.

Se procedió a examinar los posibles factores confusores para observar si había diferencias significativas entre el grupo de casos de DG y el grupo de controles y dependiendo de ello, considerar estos factores al momento de realizar el análisis de asociación de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF-4 α* a DG con diferentes modelos genéticos.

Tabla 27. Análisis de los posibles factores confusores en el grupo de DG (INPER + CMN 20 Nov) vs controles con CTOG normal.

	Grupo	N	Media	Desviación estándar	P
Edad de Dx	Controles	206	30.74	6.76	<0.001
	Casos	250	33.94	5.39	
IMC (peso habitual)	Controles	211	25.88	5.44	<0.001
	Casos	247	27.87	5.23	

En la tabla 27 se observa que tanto la edad como el IMC en los controles es significativamente diferente de la edad y el IMC de los casos con DG, por lo cual se corrigió por edad y por IMC cuando se hizo el análisis de asociación de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF-4 α* a DG con diferentes modelos genéticos.

2.5. Resultados del análisis de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF-4 α* .

Tabla 28. Análisis de asociación de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF-4 α* a DG con diferentes modelos genéticos (DG total vs controles con CTOG normal).

Gen	SNP	Genotipo	DG n(%)	Controles n(%)	OR (95% IC) y p para el modelo aditivo	OR (95% IC) y p para el modelo dominante	OR (95% IC) y p para el modelo recesivo
<i>USF-1</i>	rs3737787	CC*	144 (58.30)	104 (49.76)	0.82 (0.61-1.10) <i>0.176</i>	0.71 (0.49-1.03) 0.068	1.10 (0.53-2.26) <i>0.806</i>
		CT	85 (34.41)	91 (43.54)			
		TT	18 (7.29)	14 (6.70)			
<i>HNF4-α</i>	rs2144908	AA*	102 (42.15)	79 (37.80)	0.88 (0.66-1.15) <i>0.357</i>	0.83 (0.57-1.22) <i>0.348</i>	0.87 (0.52-1.48) <i>0.614</i>
		AG	107 (44.21)	98 (46.89)			
		GG	33 (13.64)	32 (15.31)			
	rs745975	GG*	202 (82.45)	170 (80.95)	0.91 (0.57-1.44) <i>0.678</i>	0.91 (0.56-1.46) <i>0.680</i>	0.86 (0.05-13.78) <i>0.913</i>
		GA	42 (17.14)	39 (18.57)			
		AA	1 (0.41)	1 (0.48)			

^a Modelo aditivo: 0=11, 1=12, 2=22, donde 1=alelo común y 2=alelo raro

^b Modelo dominante: 12 + 22

^c Modelo recesivo: 11 + 12

*Alelo común de los SNPs estudiados.

Como se puede observar en la tabla 28 solo el SNP rs3737787 del gen *USF-1* presenta una tendencia de asociación a DG bajo el modelo dominante ($p=0.068$); el resultado de la regresión logística indica que el alelo común de este SNP (C) es el alelo de riesgo. Al hacer el análisis de asociación de los polimorfismos de estos dos genes a DG bajo los distintos modelos y con el ajuste por edad e IMC, la tendencia de asociación del SNP rs3737787 a DG bajo el modelo dominante disminuye, encontrándose un valor de $p=0.105$. Para los demás SNPs, los valores de p después del ajuste por edad e IMC siguen siendo no significativos.

2.6. Análisis de asociación de los SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* a los rasgos cuantitativos.

El análisis de asociación de los SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* en el grupo de DG se corrigió de acuerdo al hospital de origen de la muestra, ya que hay que recordar que este grupo está constituido por casos de DG de dos diferentes instituciones (INPER y CMN 20 de Nov).

El SNP rs3737787 de *USF-1* resultó asociado al rasgo de área bajo la curva (AUC), con una p de 0.033 en el grupo de casos con DG, ya que los portadores del alelo común en forma homocigota tienen un valor de AUC mayor que aquellos que lo portan en forma heterocigota o no lo portan (Tabla 29). El SNP rs745975 estuvo asociado a la presión sistólica y con tendencia de asociación a la presión diastólica en los casos con DG, ya que las portadoras del alelo raro (A) tuvieron valores mayores de ambas presiones que aquéllas que no portan dicho alelo (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis de asociación de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF-4α* a los rasgos cuantitativos en los casos con DG (INPER + CMN 20 de Nov).

	<i>USF-1</i>			<i>HNF-4α</i>					
	rs3737787			rs2144908			rs745975		
	CC x ± DE	CT + TT x ± DE	p*	AA x ± DE	AG + GG x ± DE	p*	GG x ± DE	GA + AA x ± DE	p*
IMC (kg/m ²)	27.9 ± 5.4	27.7 ± 5.1	0.734	27.4 ± 5.0	28.1 ± 5.5	0.268	28.0 ± 5.5	27.0 ± 3.9	0.361
Glucosa (mg/dL)	96.2 ± 18.0	94.2 ± 14.6	0.338	95.3 ± 18.6	95.0 ± 15.1	0.937	95.8 ± 17.4	94.8 ± 16.6	0.801
AUC (mg/dL)min	29881±3884	28912 ±2882	0.033	29180 ±3518	29553 ±3422	0.416	29703±4003	28967±2492	0.245
Presión sistólica (mmHg)	110.8 ± 11.9	112.14±11.99	0.465	110.1 ± 10.5	112.6 ± 13.1	0.158	110.4 ± 11.6	116.3 ± 13.3	0.015
Presión diastólica (mmHg)	71.6 ± 9.5	72.3 ± 10.2	0.626	70.5 ± 9.0	73.0 ± 10.3	0.089	71.2 ± 9.1	75.0 ± 12.5	0.051

*Valores de p corregidos por hospital de origen de la muestra.

Tabla 30. Análisis de asociación de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF-4α* a los rasgos cuantitativos en los controles con CTOG normal (INPER).

	<i>USF-1</i>			<i>HNF-4α</i>					
	rs3737787			rs2144908			rs745975		
	CC x ± DE	CT + TT x ± DE	P	AA x ± DE	AG + GG x ± DE	p	GG x ± DE	GA + AA x ± DE	P
IMC (kg/m ²)	26.3 ± 5.8	25.3 ± 4.7	0.170	25.8 ± 5.3	25.9 ± 5.4	0.961	26.0 ± 5.5	25.6 ± 5.4	0.708
Glucosa (mg/dL)	82.2 ± 7.0	80.5 ± 6.24	0.055	81.5 ± 6.8	81.4 ± 6.4	0.904	81.3 ± 6.7	81.4 ± 6.8	0.885
AUC (mg/dL)min	20138 ± 2483	19716 ± 2751	0.246	19957 ± 2395	19905 ± 2744	0.888	19806 ± 2571	20505 ± 2706	0.127
Presión sistólica (mmHg)	109.0 ± 11.9	105.8 ± 11.7	0.063	107.2 ± 10.6	107.4 ± 12.6	0.925	107.4 ± 12.1	107.1 ± 10.8	0.884
Presión diastólica (mmHg)	70.1 ± 9.7	68.0 ± 9.3	0.144	69.3 ± 9.6	68.8 ± 9.5	0.764	69.3 ± 9.5	68.2 ± 10.1	0.562

En el grupo de los controles se observa que para el SNP rs3737787 de *USF-1* se presenta una tendencia de asociación al valor de glucosa en el ayuno ($p=0.055$), ya que los portadores del alelo común C en su forma homocigota, el alelo que resultó ser el de riesgo para DG bajo el modelo dominante (Tabla 28), tienen un valor de glucosa en el ayuno mayor que los controles que lo portan en forma heterocigota o no lo portan. Este mismo SNP tuvo una tendencia de asociación a la presión sistólica ($p=0.063$), ya que se observa que los portadores del alelo C en forma homocigota presentan una presión sistólica mayor que los controles heterocigotos u homocigotos para el alelo raro (T). Los SNPs rs2144908 y rs745975 de *HNF-4 α* no estuvieron asociados a ningún rasgo cuantitativo en este grupo (Tabla 30).

2.7. Análisis de asociación de los SNPs de *USF-1* y *HNF4 α* a DG considerando la inclusión de los marcadores de ancestría.

Los 10 marcadores informativos de ancestría (rs4884, rs2695, rs17203, rs2862, rs3340, rs722098, rs203096, rs223830, rs1800498 y rs281478) que se enviaron a genotipificar por KBiosciences (Hertfordshire, U.K.), estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en el grupo de casos como de controles.

Mediante el programa ADMIXMAP se obtuvieron los valores de asociación de los SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* a DG corregidos por el posible efecto de la estratificación poblacional (Tabla 31).

Tabla 31. Análisis de asociación de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF-4α* a DG considerando el efecto de la estratificación poblacional.

	<i>USF-1</i>	<i>HNF-4α</i>	
	rs3737787	rs2144908	rs745975
Modelo Aditivo	p= 0.302	p= 0.180	p= 0.499
Modelo Aditivo (con corrección por ancestría)	Pc= 0.362	Pc= 0.314	Pc= 0.560

En la tabla 31 se observa que los valores de p para el análisis de asociación de los polimorfismos de *USF-1* y *HNF4α* a DG corregidos por ancestría no son estadísticamente significativos y comparados con los valores de p antes del ajuste, los valores ajustados son aún menos significativos que los valores previos al análisis corregido por ancestría.

2.8. Análisis del desequilibrio de ligamiento de los SNPs de *HNF-4α*.

Se hizo el cálculo del desequilibrio de ligamiento (DL) entre los SNPs rs2144908 y rs745975 de *HNF-4α* mediante el programa Haploview, obteniendo los valores de D' y r^2 .

Tabla 32. Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los SNPs rs2144908 y rs745975 de *HNF-4α*.

	DG total vs controles
D'	0.756
r^2	0.102

Se observa en la tabla 32 que tanto el valor de D' como el valor de r^2 nos indican que no hay evidencia de desequilibrio de ligamiento entre estos dos SNPs de *HNF-4 α* .

2.9. Análisis por diplotipos de los SNPs de *HNF-4 α* y por haplotipos de los SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* .

Considerando que los SNPs de *HNF-4 α* no están en desequilibrio de ligamiento, se hizo también el análisis de asociación caso-control por diplotipos de estos SNPs utilizando el programa Haploview.

Tabla 33. Análisis de asociación por diplotipos de los SNPs de *HNF-4 α* .

DiploTipos rs2144908-rs745975	Frecuencia	p
AG	0.615	0.370
GG	0.291	0.500
GA	0.079	0.594
AA	0.014	0.903

Se puede observar en la tabla 33 que ninguno de los diplotipos formados con los SNPs de *HNF-4 α* presenta valores de p significativos para el análisis de asociación caso-control realizado.

También se hizo el análisis de asociación caso-control por haplotipos del SNP de *USF-1* estudiado (rs3737787) y los dos SNPs de *HNF-4 α* . Los resultados de este análisis se encuentran en la tabla 34.

Tabla 34. Análisis de asociación por haplotipos de los SNPs de *USF-1* y *HNF-4 α* .

Haplotipos	Frecuencia	p
AGC	0.450	0.403
GGC	0.225	0.829
AGT	0.165	0.963
GGT	0.067	0.116
GAC	0.048	0.672
GAT	0.031	0.167
AAC	0.014	0.876

SNP1=rs2144908, SNP2=rs745975, SNP3=rs3737787

Se observa en la tabla 34 que ninguno de los haplotipos formados por los SNPs de *HNF-4 α* (rs2144908 y rs745975) y *USF-1* (rs3737787) estuvo asociado a la DG.

VII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La diabetes gestacional (DG) es una enfermedad genéticamente compleja que durante el embarazo implica riesgos considerables en la salud tanto de la madre como del feto (Winzer y cols., 2004).

En este estudio se determinó la participación de diversos SNPs de *PPAR γ* , *CASQ1*, *USF-1* y *HNF-4 α* , cuatro genes que previamente habían sido asociados a DG, a DT2 y/o a rasgos metabólicos relacionados con estas dos entidades clínicas en diversas poblaciones (Deeb y cols., 1998; Altshuler y cols., 2000; Moffett y cols., 2005; Fu y cols., 2004; Das y cols., 2004; Huertas y cols., 2005; Lee y cols., 2006; Weedon y cols., 2004; Weissglas-Volkov y cols., 2006).

Los dos polimorfismos del gen *PPAR γ* estudiados estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos analizados. No se encontró asociación de P12A a DG bajo ninguno de los tres modelos genéticos empleados, lo cual sugiere que P12A no contribuye de manera sustancial a la susceptibilidad para el desarrollo de DG en la muestra de la población mexicana estudiada. Este resultado concuerda con lo observado en otras poblaciones: en un estudio que se llevó a cabo en población árabe y escandinava no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de la variante P12A en 500 pacientes con DG (400 escandinavas y 100 árabes) con respecto a los controles (428 escandinavas y 122 árabes) (Shaath y cols., 2004) y en otro estudio realizado en 649 mujeres escandinavas con diabetes gestacional y en 1232 controles se encontró que el polimorfismo P12A tampoco estaba asociado a DG (Shaath y cols., 2007).

El polimorfismo P12A ha sido asociado a obesidad en diversas poblaciones; sin embargo, en este estudio no se observó asociación de este SNP a un IMC mayor en las mujeres mexicanas con DG. No fue posible hacer un análisis específico de asociación de este polimorfismo al sobrepeso y a la obesidad definidos por los valores de IMC debido

al tamaño de la muestra, ya que este análisis implica la estratificación del grupo de casos entre aquellas mujeres con diagnóstico de DG con IMC en rango normal, con sobrepeso y con obesidad incluyendo obesidad mórbida; la estratificación requerida para este análisis disminuye el poder estadístico de la muestra analizada.

Es importante mencionar que el IMC considerado en este estudio fue obtenido mediante el peso habitual de cada mujer antes del embarazo, por lo cual no fue posible analizar la ganancia de peso durante el embarazo. En este sentido, en un estudio reciente en mujeres turcas se reportó que las mujeres con DG que portaban el polimorfismo P12A ganaron significativamente más peso durante su embarazo comparadas con aquellas mujeres que no portaban el polimorfismo (Tok y cols., 2006).

El alelo Ala del polimorfismo P12A del gen *PPAR γ* se asoció a un IMC mayor en el grupo de controles normoglucémicos ($p=0.019$). Este resultado concuerda con lo reportado recientemente en población mexicana y en dos grupos amerindios, donde los genotipos Pro12Ala y Ala12Ala, se asociaron significativamente a un IMC mayor (Canizales y cols., 2007), reforzando así la asociación entre esta variante y el riesgo de sobrepeso u obesidad en la población mexicana.

El polimorfismo C161T del gen *PPAR γ* no se asoció a DG bajo ninguno de los tres modelos genéticos empleados. Es importante destacar que este polimorfismo no había sido estudiado en relación a la DG en otra población; solo existen dos estudios previos a éste, donde esta variante se asoció modestamente a obesidad en mujeres finlandesas (Valve y cols., 1999) y a resistencia a la insulina en mujeres hispanas (Moffett y cols., 2005). Sin embargo, en este estudio este polimorfismo no estuvo asociado a ningún rasgo cuantitativo analizado. Estos resultados de manera general sugieren que la variante C161T no contribuye de manera significativa a la susceptibilidad para el desarrollo de DG en la muestra de la población mexicana estudiada.

Los resultados del análisis de desequilibrio de ligamiento de los dos SNPs del gen *PPAR γ* indican que estos dos SNPs no están en desequilibrio de ligamiento, es decir, no se heredan de manera conjunta, tomando en cuenta tanto el valor obtenido de D' como el de r^2 para las comparaciones de DG vs controles normoglucémicos y DG vs controles con CTOG normal. Sin embargo, en el artículo mencionado anteriormente, el realizado en mujeres hispanas, se reportó que estas dos variantes sí estaban en desequilibrio de ligamiento en esa población, aunque es importante mencionar que ese estudio solo muestra los valores de D' y en diversos reportes se ha evidenciado que el valor de D' suele mostrar inflación en muestras pequeñas y con bajas frecuencias alélicas y que r^2 , si bien es considerado un parámetro dependiente de las frecuencias alélicas, el sesgo debido a estas frecuencias es considerablemente menor en el valor de r^2 que en el de D' , lo cual hace de r^2 un parámetro más confiable que D' (Wang y cols., 2005; Weissglas y cols., 2006; Feng-Xing y cols., 2007).

Por otro lado, ninguno de los diplotipos formados con los SNPs de *PPAR γ* presentó valores de p significativos para el análisis de asociación realizado con el grupo de casos y con los dos grupos de controles de manera independiente. Las frecuencias de los diplotipos fueron similares cuando se compararon los casos de DG vs controles normoglucémicos y controles con CTOG normal. Los valores de p obtenidos con el análisis de DG vs controles con CTOG normal fueron aún menos significativos que los obtenidos en la comparación de DG vs controles normoglucémicos; esto puede deberse a que el tamaño del grupo de los controles CTOG normal es más pequeño que el de los controles normoglucémicos (46 vs 112), lo cual disminuye el poder estadístico de la muestra.

Con respecto al gen *CASQ1*, al analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg para los distintos SNPs estudiados en todos los grupos de casos y controles, sólo dos de ellos no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg: el SNP rs617698 ($p=0.005$) y el SNP rs3747623 ($p=0.023$) en el grupo de casos de DG del CMN 20 de Noviembre. La determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg es un importante paso de control de

calidad en los estudios de poblaciones genéticas y sus desviaciones pueden ser muy informativas, ya que cuando la desviación se presenta en los casos, asumiendo que las fuentes de error han sido eliminadas, puede indicar la asociación de un locus con la enfermedad (Szeszko y cols., 2006).

En este estudio se hizo la confirmación de los genotipos por secuenciación, lo cual nos garantiza la eliminación del error de genotipificación, por lo tanto, esta desviación del equilibrio en estos dos SNPs podría sugerir asociación con la DG que no es evidente en el análisis genético por un bajo poder estadístico de la muestra. Para fundamentar esto se hizo el cálculo del poder estadístico de la muestra para el análisis del SNP rs617698 mediante el programa Qanto v1.2.3, considerando una prevalencia de DG del 7%, la frecuencia del alelo de riesgo encontrada en los controles normoglucémicos (0.592), utilizando el modelo aditivo y un valor esperado de OR de 1.5, ya que el OR reportado para este SNP y DT2 en población menonita fue de 1.75 (Fu y cols., 2004). El poder estadístico de la muestra es de 49.4% y bajo los parámetros utilizados, el programa indica que se requieren 193 casos y 226 controles más para alcanzar un poder estadístico de 80%. Por lo anterior, es posible que se logre evidenciar la asociación de estos SNPs en particular a DG incrementando el número de casos y controles estudiados.

Cabe mencionar que los SNPs rs617698 y rs3747623 de *CASQ1* que no están en equilibrio de Hardy-Weinberg, mostraron evidencia de desequilibrio de ligamiento al hacer el análisis mediante el programa Haploview, ya que sólo este par de SNPs presentó un valor de $D' > 0.8$ y valor de $r^2 > 0.6$ y como se mencionó anteriormente, r^2 es considerado un parámetro más confiable que D' (Wang y cols., 2005; Weissglas y cols., 2006; Feng-Xing y cols., 2007). Este resultado de desequilibrio de ligamiento entre estos dos SNPs concuerda con lo reportado en los estudios de asociación de SNPs de *CASQ1* a DT2 en población menonita (Fu y cols., 2004) y en población caucásica europea (Das y cols., 2004), ya que en ambos estudios estos dos SNPs se encontraron en desequilibrio de ligamiento tomando en cuenta los valores de r^2 ($r^2 = 0.94$ y $r^2 > 0.65$

respectivamente).

Ninguno de los cuatro SNPs de *CASQ1* analizados (rs617698, SNP2351, rs3747623 y rs2275703) se asoció a DG de manera individual, bajo ninguno de los modelos genéticos estudiados. Estos cuatro SNPs presentaron evidencia de asociación a DT2 en población caucásica (Das y cols., 2004) y en población menonita (Fu y cols., 2004) en dos estudios independientes. Recientemente, se hizo otro estudio en población danesa para evaluar la asociación del SNP rs2275703 de *CASQ1* a DT2 y a rasgos cuantitativos relacionados con esta entidad y no se encontró asociación de este polimorfismo a DT2 o alguno de los rasgos analizados (Sparsø y cols., 2007). En otro estudio realizado en este año, se encontró que el SNP rs617698 de *CASQ1* junto con la variante rs6413453 del gen de la apolipoproteína A-II (APOA2) y otras ocho variantes en los genes de la fosfatasa de especificidad dual 12 (DUSP12), el receptor gamma X retinoide (RXRG) y la piruvato cinasa hepática (PKLR) contribuye al riesgo para el desarrollo de la DT2 tanto en un estudio de asociación caso-control como en los individuos afectados en una familia de Utah (Hasstedt y cols., 2008).

En el presente estudio, al hacer el análisis por haplotipos de estos SNPs se encontró un haplotipo de riesgo a DG (AACC) con un valor de p modestamente significativo ($p=0.045$) al comparar DG vs controles normoglucémicos. Este haplotipo está conformado por el alelo de riesgo para DT2 del SNP rs617698 (A) reportado en el estudio de población menonita (Fu y cols., 2004), el alelo de riesgo para DT2 del SNP2351 (A) encontrado en el estudio de población caucásica europea (Das y cols., 2004), el alelo que no se asoció independientemente al riesgo para DT2 del SNP rs3747623 (C) en población caucásica europea y finalmente el alelo de riesgo para DT2 del SNP rs2275703 (C) reportado en población menonita, el cual en nuestra población fue el alelo raro y en la población menonita fue el común (Fu y cols., 2004). Estas diferencias de asociación entre el alelo raro y el común entre distintas poblaciones sugieren que otros SNPs fuera de la región analizada pudieran participar directamente en el riesgo. Cabe mencionar que la frecuencia del haplotipo mencionado es muy baja

(3.5%), lo cual hace de este resultado de asociación poco confiable y para poder confirmarlo se requiere incrementar el tamaño de la muestra analizada.

En relación a los SNPs de los genes *USF-1* y *HNF-4 α* , todos se mantienen en equilibrio de Hardy-Weinberg. El alelo común del SNP rs3737787 (*usf1s1*) del gen *USF-1* presentó una tendencia de asociación a la DG bajo el modelo dominante ($p=0.068$), lo cual concuerda con lo reportado para este SNP en los estudios de asociación a FCHL y a diversos rasgos metabólicos (Suviolahti y cols., 2006; Huertas y cols., 2005; Lee y cols., 2006). Esta tendencia encontrada en este estudio podría ser más contundente si se aumentara el poder estadístico de la muestra. Se hizo el cálculo del poder estadístico de la muestra mediante el programa Quanto v1.2.3, considerando una prevalencia de DG del 7%, la frecuencia del alelo de riesgo encontrada en los controles con CTOG normal (0.715), utilizando el modelo dominante y un valor esperado de OR de 1.5. El poder estadístico de la muestra es de 20% por lo cual, es necesario incrementar el tamaño de la muestra para confirmar la posible asociación a DG encontrada.

El alelo común del SNP rs3737787 estuvo asociado en su forma homocigota a un valor mayor de AUC en los casos con DG y presentó una tendencia de asociación a valores mayores de glucosa en el ayuno y de presión sistólica en los controles con CTOG normal. La asociación de este alelo a un valor mayor de AUC en el grupo de DG fortalece la tendencia de asociación a DG obtenida; la asociación de este alelo a valores mayores de glucosa en el ayuno en los controles con CTOG normal sugiere también que confiere riesgo a desarrollar DG. Recientemente se reportó el primer estudio que muestra evidencia de asociación del SNP rs3737787 a DT2 en población caucásica alemana (Meex y cols., 2008), ya que en estudios anteriores en población china (Ng y cols., 2005) y en población caucásica francesa (Gibson y cols., 2005) no se había encontrado evidencia de que la variación genética en *USF-1* contribuyera a la susceptibilidad a la DT2 en esas poblaciones. En este último estudio el alelo asociado a DG fue precisamente el alelo común (C) de este SNP (Meex y cols., 2008), lo cual

también nos sugiere que la tendencia de asociación encontrada en la muestra de DG analizada podría convertirse en franca asociación si se incrementa el tamaño de los grupos estudiados.

Con respecto al gen *HNF-4 α* , ninguno de los dos SNPs estudiados (rs2144908 y rs745975) se asoció a DG de manera individual o por diplotipos. El SNP rs2144908 se ha asociado a DT2 en diversas poblaciones (Weedon y cols., 2004; Silander y cols., 2004; Lehman y cols., 2007); sin embargo en el único estudio previo a éste en el cual se analizó la posible asociación de rs2144908 a DG en mujeres escandinavas, no se encontró evidencia de asociación de este polimorfismo a esta entidad clínica (Shaath y cols., 2006). Por lo tanto, el hecho de que este SNP tampoco se haya asociado a DG en la población mexicana sugiere que esta variante probablemente no tenga una repercusión funcional significativa para conferir susceptibilidad a DG en las poblaciones estudiadas.

El SNP rs745975 al gen *HNF-4 α* no se había estudiado con anterioridad en una población con DG y solo se había encontrado asociado a niveles altos de triglicéridos en familias mexicanas con FCHL (Weissglas y cols., 2006). Este SNP resultó asociado a la presión sistólica y con tendencia de asociación a la presión diastólica en los casos con DG. Sin embargo, estos resultados habría que tomarlos con cautela debido a que la presión es un parámetro susceptible a variabilidad en el proceso de medición y se tendrían que hacer más estudios para poder evidenciar su posible relación con la DG.

Los dos SNPs estudiados de *HNF-4 α* (rs2144908 y rs745975) no estuvieron en desequilibrio de ligamiento bajo los dos parámetros evaluados (D' y r^2), lo cual concuerda con lo reportado previamente en familias mexicanas (Weissglas y cols., 2006).

Para los SNPs de los genes de *USF-1* y *HNF-4 α* se hizo también el análisis de asociación de estos polimorfismos a DG, considerando el efecto de la estratificación

poblacional. Los resultados de asociación después de ajustar mediante la utilización de 10 marcadores de ancestría y el programa ADMIXMAP mostraron valores de p no significativos, con lo cual se descarta el posible efecto de estratificación poblacional sobre los valores de asociación a DG inicialmente obtenidos sin el ajuste.

Finalmente, en este año se publicó un estudio en donde se analizó la posible interacción entre el polimorfismo P12A de *PPAR γ* y la variante rs2144908 de *HNF-4 α* y si esta interacción estaba asociada a rasgos cuantitativos relacionados con DT2 en familias mexico-americanas con un probando con DG previa. (Black y cols., 2008). En este estudio se encontró que sí existe interacción entre estas dos variantes y que esta interacción está significativamente asociada tanto a la sensibilidad a la insulina como al nivel de insulina a las 2 h. En el presente estudio no fue posible evaluar la interacción entre estos dos SNPs debido a que se analizaron en grupos de casos y controles distintos; sin embargo, resulta prometedor el evaluar su posible interacción considerando la evidencia obtenida en el estudio citado en familias mexico-americanas.

Es importante señalar que en los estudios de asociación es imposible estimar a priori el efecto individual sobre el riesgo de cada SNP analizado, debido a la heterogeneidad propia del padecimiento y aún cuando el efecto de riesgo se encuentre en todas las poblaciones, la contribución de cada variante alélica sobre el riesgo estará determinada entre otras cosas por la frecuencia alélica y la frecuencia del padecimiento en la población estudiada. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo aún con una muestra pequeña, sugieren la posible asociación a DG de distintas variantes genéticas analizadas.

VIII.- CONCLUSIONES

- Ningún SNP de los genes *PPAR γ* , *CASQ1*, *USF-1* y *HNF-4 α* estudiados se asoció de manera individual a la DG.
- El alelo Ala del polimorfismo P12A del gen *PPAR γ* se asoció a un IMC mayor en el grupo de controles normoglucémicos.
- Se encontró un haplotipo de riesgo (AACC) conformado por los SNPs rs617698, SNP2351, rs3747623 y rs2275703 de *CASQ1* con un valor de p modestamente significativo.
- El alelo común del SNP rs3737787 (usf1s1) del gen *USF-1* presentó una tendencia de asociación a la DG bajo el modelo dominante en la población estudiada; este alelo en su forma homocigota estuvo asociado a un valor mayor de AUC en los casos con DG y presentó una tendencia de asociación a valores mayores de glucosa en el ayuno y de presión sistólica en los controles con CTOG normal.
- Las tendencias de asociación encontradas con los diversos SNPs analizados probablemente pudieran alcanzar valores estadísticamente significativos si se incrementa el tamaño de los grupos estudiados.

IX.- PERSPECTIVAS

- Incrementar el tamaño de los grupos analizados para confirmar o descartar las asociaciones encontradas para los distintos genes en este estudio.
- Hacer análisis de expresión de los genes que resulten asociados a DG una vez que se aumente el tamaño de los grupos analizados para poder evaluar de manera conjunta la genética y la expresión de esos genes en mujeres mexicanas con DG.
- Genotipificar los polimorfismos de *PPAR γ* y *HNF-4 α* en las mismas muestras de DG y controles para poder evaluar la posible interacción de estos genes en la población mexicana.
- Incluir los niveles de insulina dentro de los parámetros bioquímicos a medir en las nuevas muestras de casos de DG y controles con CTOG normal incorporadas al estudio ya que esto permitiría el analizar genes involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina y abarcar un espectro más amplio de los factores bioquímicos y moleculares involucrados en el desarrollo de DG.

X.- REFERENCIAS

1. Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(5-6):894-903. Review.
2. Agarwal MM, Dhath GS, Punnose J, Koster G. Gestational diabetes: dilemma caused by multiple international diagnostic criteria. *Diabet Med.* 2005 Dec;22(12):1731-6.
3. Agarwal MM, Dhath GS, Zayed R, Bali N. Gestational diabetes: relevance of diagnostic criteria and preventive strategies for Type 2 diabetes mellitus. *Arch Gynecol Obstet* 2007;276(3):237-43.
4. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995 21;268(5209):423-6.
5. Aguilar-Salinas CA, Reyes-Rodríguez E, Ordóñez-Sánchez ML, Torres MA, Ramírez-Jiménez S, Domínguez-López A, Martínez-Francois JR, Velasco-Pérez ML, Alpizar M, García-García E, Gómez-Pérez F, Rull J, Tusié-Luna MT. Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the mexican population. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(1):220-6.
6. Aguilar-Salinas CA, Velazquez Monroy O, Gómez-Pérez FJ, Gonzalez Chávez A, Esqueda AL, Molina Cuevas V, Rull-Rodrigo JA, Tapia Conyer R; Encuesta Nacional de Salud 2000 Group. Characteristics of patients with type 2 diabetes in México: Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care* 2003;26(7):2021-6.
7. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 1998;12(12):1763-8.
8. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15(7):539-53.
9. Alemán G, Torres N, Tovar AR. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development. *Rev Invest Clin* 2004;56(3):351-67.
10. Alevizaki M, Thalassinou L, Grigorakis SI, Philippou G, Lili K, Souvatzoglou A, Anastasiou E. Study of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor in Greek women with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2000;23(8):1079-83.

11. Allan CJ, Argyropoulos G, Bowker M, Zhu J, Lin PM, Stiver K, Golichowski A, Garvey WT. Gestational diabetes mellitus and gene mutations which affect insulin secretion. *Diabetes Res Clin Pract* 1997;36(3):135-41.
12. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl M-C, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2000;26:76–80.
13. American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2003;26(Suppl. 1):S103-105.
14. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2006;29(Suppl. 1):S43-48.
15. Andrulionyte L, Laukkanen O, Chiasson JL, Laakso M; STOP-NIDDM Study Group. Single nucleotide polymorphisms of the HNF4 α gene are associated with the conversion to type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM trial. *J Mol Med* 2006;84(8):701-8.
16. Argyrokastritis A, Kamakari S, Kapsetaki M, Kritis A, Talianidis I, Moschonas NK. Human hepatocyte nuclear factor-4 (hHNF-4) gene maps to 20q12-q13.1 between PLCG1 and D20S17. *Hum Genet* 1997;99(2):233-6.
17. Atchley WR, Fitch WM. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(10):5172-6.
18. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46(8):1319-27.
19. Auwerx J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetología* 1999;42:1033-1049.
20. Auwerx J, Cock TA, Knouff C. PPAR-gamma: a thrifty transcription factor. *Nucl Recept Signal*. 2003;1:e006.
21. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S112-9.
22. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21(2):263-5.
23. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant negative

mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999;402(6764):880-3.

24. Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* 2003;1(1):E20.
25. Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 2002;19(1):13-22.
26. Baxevanis AD, Vinson CR. Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(2):278-85.
27. Beamer BA, Negri C, Yen CJ, Gavrilova O, Rumberger JM, Durcan MJ, Yarnall DP, Hawkins AL, Griffin CA, Burns DK, Roth J, Reitman M, Shuldiner AR. Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233(3):756-9.
28. Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS. Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. *Annu Rev Physiol* 1996;58:171-86.
29. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 2001;414(6865):788-91. Review.
30. Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004;21(2):103-13. Review.
31. Berger H, Crane J, Farine D, Armson A, De La Ronde S, Keenan-Lindsay L, Leduc L, Reid G, Van Aerde J; Maternal-Fetal Medicine Committee; Executive and Council for the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Screening for gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Can* 2002;24(11):894-912.
32. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35.
33. Black MH, Fingerlin TE, Allayee H, Zhang W, Xiang AH, Trigo E, Hartiala J, Lehtinen AB, Haffner SM, Bergman RN, McEachin RC, Kjos SL, Lawrence JM, Buchanan TA, Watanabe RM. Evidence of interaction between PPARG2 and HNF4A contributing to variation in insulin sensitivity in Mexican Americans. *Diabetes* 2008;57(4):1048-56.
34. Bo S, Menato G, Lezo A, Signorile A, Bardelli C, De Michieli F, Massobrio M, Pagano G. Dietary fat and gestational hyperglycaemia. *Diabetologia* 2001;44(8):972-8.
35. Bonnycastle LL, Willer CJ, Conneely KN, Jackson AU, Burrill CP, Watanabe RM, Chines PS, Narisu N, Scott LJ, Enloe ST, Swift AJ, Duren WL, Stringham HM, Erdos MR, Riebow NL, Buchanan TA, Valle TT, Tuomilehto J, Bergman RN, Mohlke KL,

- Boehnke M, Collins FS. Common variants in maturity-onset diabetes of the young genes contribute to risk of type 2 diabetes in Finns. *Diabetes* 2006;55(9):2534-40.
36. Bowden DW, Sale M, Howard TD, Qadri A, Spray BJ, Rothschild CB, Akots G, Rich SS, Freedman BI. Linkage of genetic markers on human chromosomes 20 and 12 to NIDDM in Caucasian sib pairs with a history of diabetic nephropathy. *Diabetes* 1997;46(5):882-6.
 37. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. 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(2):879-87.
 38. Brown FM, Wyckoff J, Rowan JA, Jovanovic L, Sacks DA, Briggs GG. Metformin in pregnancy: its time has not yet come. *Diabetes Care* 2006;29(2):485-6.
 39. Bryan J, Aguilar-Bryan L. Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1999;1461(2):285-303.
 40. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. 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. *Am J Obstet Gynecol* 1990a;162(4):1008-14.
 41. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N. Accelerated starvation in late pregnancy: a comparison between obese women with and without gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1990b;162(4):1015-20.
 42. Buchanan TA, Kjos SL. Gestational diabetes: risk or myth? *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(6):1854-7. Review.
 43. Buchanan TA. Pancreatic B-cell defects in gestational diabetes: implications for the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):989-93. Review.
 44. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005;115(3):485-91. Review.
 45. Bungert J, Kober I, Düring F, Seifart KH. Transcription factor eUSF is an essential component of isolated transcription complexes on the duck histone H5 gene and it mediates the interaction of TFIID with a TATA-deficient promoter. *J Mol Biol* 1992;223(4):885-98.
 46. Butte NF, Wong WW, Treuth MS, Ellis KJ, O'Brian Smith E. Energy requirements during pregnancy based on total energy expenditure and energy deposition. *Am J Clin Nutr*. 2004 Jun;79(6):1078-87.

47. Canizales-Quinteros S, Aguilar-Salinas CA, Ortiz-López MG, Rodríguez-Cruz M, Villarreal-Molina MT, Coral-Vázquez R, Huertas-Vázquez A, Hernández-Caballero A, López-Alarcón M, Brito-Zurita OR, Domínguez-Banda A, Martínez-Sánchez LR, Canto-de Cetina T, Vilchis-Dorantes G, Rosas-Vargas H, Granados-Silvestre MA, Medeiros-Domingo A, Menjivar M, Tusié-Luna MT. Association of PPARG2 Pro12Ala variant with larger body mass index in Mestizo and Amerindian populations of Mexico. *Hum Biol* 2007;79(1):111-9.
48. Carlsson E, Fredriksson J, Groop L, Ridderstråle M. Variation in the calpain-10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3601-5.
49. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening test for gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1982;144:763-73.
50. Carpenter MW. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S246-50. Review.
51. Caruso A, Ferrazzani S, De Carolis S, Lucchese A, Lanzone A, Paradisi G. Carbohydrate metabolism in gestational diabetes: effect of chronic hypertension. *Obstet Gynecol* 1999;94(4):556-61.
52. Casey BM, Lucas MJ, McIntire DD, Leveno KJ. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. *Obstet Gynecol* 1997;90(6):869-73.
53. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1667-72.
54. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Calles J, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol* 1993;264(1 Pt 1):E60-7.
55. Catalano PM, Huston L, Amini SB, Kalhan SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(4):903-16.
56. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(3):E522-33.
57. Catalano PM, Thomas A, Huston-Presley L, Amini SB. Phenotype of infants of mothers with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S156-60.

58. Chamberlain PD, Jennings KH, Paul F, Cordell J, Berry A, Holmes SD, Park J, Chambers J, Sennitt MV, Stock MJ, Cawthorne MA, Young PW, Murphy GJ. The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23(10):1057-65.
59. Chen Y, Liao WX, Roy AC, Loganath A, Ng SC. Mitochondrial gene mutations in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;48(1):29-35.
60. Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 1995;267(5197):531-6.
61. Chiu KC, Chuang LM, Chu A, Wang M. Transcription factor 1 and beta-cell function in glucose-tolerant subjects. *Diabet Med* 2003;20(3):225-30.
62. Christiansen C, Poulsen P, Beck-Nielsen H. The Trp64Arg mutation of the adrenergic beta-3 receptor gene impairs insulin secretion: a twin study. *Diabet Med* 1999;16(10):835-40.
63. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Damm P. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 2008;31(2):340-6.
64. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS; Australian Carbohydrate Intolerance Study in Pregnant Women (ACHOIS) Trial Group. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2005;352(24):2477-86.
65. Coon H, Xin Y, Hopkins PN, Cawthon RM, Hasstedt SJ, Hunt SC. Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides. *Hum Genet* 2005;117(5):444-51.
66. Corre S, Primot A, Sviderskaya E, Bennett DC, Vaulont S, Goding CR, Galibert MD. UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 2004;279(49):51226-33.
67. Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 2005;18(5):337-48. Review.
68. Corre S, Galibert MD. USF as a key regulatory element of gene expression]. *Med Sci*. 2006;22(1):62-7. Review.
69. Coustan DR. Pharmacological management of gestational diabetes: an overview. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S206-8. Review.

70. Damcott CM, Hoppman N, Ott SH, Reinhart LJ, Wang J, Pollin TI, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR. Polymorphisms in both promoters of hepatocyte nuclear factor 4-alpha are associated with type 2 diabetes in the Amish. *Diabetes* 2004;53(12):3337-41.
71. Damm P. Gestational diabetes mellitus and subsequent development of overt diabetes mellitus. *Dan Med Bull* 1998;45(5):495-509.
72. Damm P, Breitowicz B, Hegaard H. Exercise, pregnancy, and insulin sensitivity--what is new?. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007;32(3):537-40.
73. Das SK, Chu W, Zhang Z, Hasstedt SJ, Elbein SC. Calsquestrin 1 (CASQ1) gene polymorphisms under chromosome 1q21 linkage peak are associated with type 2 diabetes in Northern European Caucasians. *Diabetes* 2004;53(12):3300-6.
74. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20:284 –287.
75. Del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna MT, Ramírez-Jiménez S, Rodríguez-Torres M, Aurón-Gómez M, Ramírez E, Velasco-Pérez ML, Ramírez-Silva A, Gómez-Pérez F, Hanis CL, Tsuchiya T, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Mol Genet Metab* 2004;81(2):122-6.
76. de Veciana M, Major CA, Morgan MA, Asrat T, Toohey JS, Lien JM, Evans AT. Postprandial versus preprandial blood glucose monitoring in women with gestational diabetes mellitus requiring insulin therapy. *N Engl J Med* 1995;333(19):1237-41.
77. Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi YI, Shoelson SE. Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J Biol Chem* 2002;277(41):37973-6.
78. Diamond J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003;423(6940):599-602.
79. Di Cianni G, Volpe L, Lencioni C, Miccoli R, Cuccuru I, Ghio A, Chatzianagnostou K, Bottone P, Teti G, Del Prato S, Benzi L. Prevalence and risk factors for gestational diabetes assessed by universal screening. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;62(2):131-7.
80. Eftychi C, Howson JM, Barratt BJ, Vella A, Payne F, Smyth DJ, Twells RC, Walker NM, Rance HE, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Undlien DE, Rønningen KS, Guja C, Ionescu-Tiirgoviște C, Savage DA, Todd JA. Analysis of the Type 2 Diabetes-Associated Single Nucleotide Polymorphisms in the Genes IRS1, KCNJ11, and PPAR γ 2 in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2004;53:870–873.
81. Ek J, Hansen SP, Lajer M, Nicot C, Boesgaard TW, Pruhova S, Johansen A, Albrechtsen A, Yderstraede K, Lauenborg J, Parrizas M, Boj SF, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Damm P, Ferrer J, Lebl J, Pedersen O, Hansen T. A novel -192c/g

mutation in the proximal P2 promoter of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene (HNF4A) associates with late-onset diabetes. *Diabetes* 2006;55(6):1869-73.

82. Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes* 1999;48(5):1175-82.
83. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz M, Moller DE, Berger J. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224(2):431-7.
84. Ellard S, Beards F, Allen LI, 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(2):250-3.
85. Ellard S, Colclough K. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat* 2006;27(9):854-69.
86. Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. Programa de acción: diabetes mellitus. México: Secretaría de Salud 2001. p. 10-22.
87. Erdmann S, Senkel S, Arndt T, Lucas B, Lausen J, Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Thomas H. Tissue-specific transcription factor HNF4alpha inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 beta-cell line. *Biol Chem* 2007;388(1):91-106.
88. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997;272(30):18779-89.
89. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 1998;438(1-2):55-60.
90. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 2002;19(5):479-85.
91. Fallucca F, Dalfrà MG, Sciullo E, Masin M, Buongiorno AM, Napoli A, Fedele D, Lapolla A. Polymorphisms of insulin receptor substrate 1 and beta3-adrenergic receptor genes in gestational diabetes and normal pregnancy. *Metabolism* 2006;55(11):1451-6.
92. Farrell T, Neale L, Cundy T. Congenital anomalies in the offspring of women with type 1, type 2 and gestational diabetes. *Diabet Med* 2002;19(4):322-6.

93. Feng-Xing D, Clutter A, Lohuis M. Characterizing Linkage Disequilibrium in Pig Populations. *Int J Biol Sci* 2007; 3(3): 166–178.
94. Ferber KM, Keller E, Albert ED, Ziegler AG. Predictive value of human leukocyte antigen class II typing for the development of islet autoantibodies and insulin-dependent diabetes postpartum in women with gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(7):2342-8.
95. Ferrara A. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S141-6.
96. Ferré-D'Amaré AR, Pognonec P, Roeder RG, Burley SK. Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J* 1994;13(1):180-9.
97. Festa A, Krugluger W, Shnawa N, Hopmeier P, Haffner SM, Schernthaner G. Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene in pregnancy: association with mild gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(5):1695-9.
98. Florez JC, Burt N, de Bakker PI, Almgren P, Tuomi T, Holmkvist J, Gaudet D, Hudson TJ, Schaffner SF, Daly MJ, Hirschhorn JN, Groop L, Altshuler D. Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes* 2004;53(5):1360-8.
99. Forsbach G, Contreras-Soto JJ, Fong G, Flores G, Moreno O. Prevalence of gestational diabetes and macrosomic newborns in a Mexican population. *Diabetes Care* 1988;11(3):235-8.
100. Forsbach G, Vázquez-Lara J, Alvarez-y-García C, Vázquez-Rosales J. Diabetes and pregnancy in Mexico. *Rev Invest Clin* 1998;50(3):227-31. Review.
101. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT. beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S94-100.
102. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, et al. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;328(10):697-702.
103. Froguel P, Velho G. Genetic Determinants of Type 2 Diabetes. *Recent Progress in Hormone Research* 2001;56:91-106.
104. Fu M, Damcott CM, Sabra M, Pollin TI, Ott SH, Wang J, Garant MJ, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR. Polymorphism in the caldesmon 1 (CASQ1) gene on chromosome 1q21 is associated with type 2 diabetes in the old order Amish. *Diabetes* 2004;53(12):3292-9.

105. Fujii J, Willard HF, MacLennan DH. Characterization and localization to human chromosome 1 of human fast-twitch skeletal muscle calsequestrin gene. *Somat Cell Mol Genet* 1990;16(2):185-9.
106. Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikawa Y, Yamagata K, Yano N, Sugahiro J, Ogata M, Ohgawara H, Omori Y, Iwamoto Y, Bell GI. Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 1997;46(10):1652-7.
107. Galibert MD, Boucontet L, Goding CR, Meo T. Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor. *J Immunol* 1997;159(12):6176-83.
108. Gaither K, Quraishi AN, Illsley NP. Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(2):695-701.
109. Gerbitz KD, Gempel K. Mitochondria and diabetes: Genetic Biochemical and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 1996; 45: 113-26.
110. Gibson F, Hercberg S, Froguel P. Common polymorphisms in the USF1 gene are not associated with type 2 diabetes in French Caucasians. *Diabetes* 2005;54(10):3040-2.
111. Gibson NJ, The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006; 363 (1-2): 32-47.
112. Glaser B. Type 2 diabetes: hypoinsulinism, hyperinsulinism, or both? *PLoS Med* 2007;4(4):e148.
113. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52(2):568-72.
114. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JM, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JP, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JK, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njølstad PR, Ashcroft FM, Hattersley AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 2004;350(18):1838-49.
115. Gloyn AL, Siddiqui J, Ellard S. Mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat* 2006;27(3):220-31.

116. Goodarzi MO, Rotter JI. Testing the gene or testing a variant? The case of TCF7L2. *Diabetes* 2007;56(10):2417-9.
117. Gragnoli C, Stanojevic V, Gorini A, Von Preussenthal GM, Thomas MK, Habener JF. IPF-1/MODY4 gene missense mutation in an Italian family with type 2 and gestational diabetes. *Metabolism* 2005;54(8):983-8.
118. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006;38(3):320-3.
119. Greene MF. Oral hypoglycemic drugs for gestational diabetes. *N Engl J Med* 2000;343(16):1178-9.
120. Greene MF, Solomon CG. Gestational diabetes mellitus -- time to treat. *N Engl J Med* 2005;352(24):2544-6.
121. Gribble FM, Reimann F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* 2003;46(7):875-91.
122. Grupo de estudio sobre Diabetes Mellitus. Diabetes y Embarazo. Importancia Diagnóstica. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS* 1992;30:35-9.
123. Gunderson EP. Gestational diabetes and nutritional recommendations. *Curr Diab Rep* 2004;4(5):377-86.
124. Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, Flaschen RC, Fulmer JT, Matschinsky FM, Duncan SA, Kaestner KH. The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest* 2005;115(4):1006-15.
125. Hani EH, Clément K, Velho G, Vionnet N, Hager J, Philippi A, Dina C, Inoue H, Permutt MA, Basdevant A, North M, Demenais F, Guy-Grand B, Froguel P. Genetic studies of the sulfonylurea receptor gene locus in NIDDM and in morbid obesity among French Caucasians. *Diabetes* 1997;46(4):688-94.
126. Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shepard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzch H, Schröder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Lindner T, Mereu LE, Wang YQ, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet* 1996;13(2):161-6.

127. Hanna FW, Peters JR. Screening for gestational diabetes; past, present and future. *Diabet Med* 2002;19(5):351-8. Review.
128. Hansen T, Echwald SM, Hansen L, Møller AM, Almind K, Clausen JO, Urhammer SA, Inoue H, Ferrer J, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Pedersen O. Decreased tolbutamide-stimulated insulin secretion in healthy subjects with sequence variants in the high-affinity sulfonylurea receptor gene. *Diabetes* 1998;47(4):598-605.
129. Hansen SK, Párrizas M, Jensen ML, Pruhova S, Ek J, Boj SF, Johansen A, Maestro MA, Rivera F, Eiberg H, Andel M, Lebl J, Pedersen O, Ferrer J, Hansen T. Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. *J Clin Invest* 2002 ;110(6):827-33.
130. Hansen SK, Rose CS, Glümer C, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T. Variation near the hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha gene associates with type 2 diabetes in the Danish population. *Diabetologia* 2005;48(3):452-8.
131. Hanson RL, Ehm MG, Pettitt DJ, Prochazka M, Thompson DB, Timberlake D, Foroud T, Kobes S, Baier L, Burns DK, Almasy L, Blangero J, Garvey WT, Bennett PH, Knowler WC. An autosomal genomic scan for loci linked to type II diabetes mellitus and body-mass index in Pima Indians. *Am J Hum Genet* 1998;63(4):1130-8.
132. Hart LM, de Knijff P, Dekker JM, Stolk RP, Nijpels G, van der Does FE, Ruige JB, Grobbee DE, Heine RJ, Maassen JA. Variants in the sulphonylurea receptor gene: association of the exon 16-3t variant with Type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians. *Diabetologia* 1999;42(5):617-20.
133. Hasstedt SJ, Chu WS, Das SK, Wang H, Elbein SC. Type 2 diabetes susceptibility genes on chromosome 1q21-24. *Ann Hum Genet* 2008;72(Pt 2):163-9.
134. Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, O'Rahilly S, Watkins PJ, Wainscoat JS. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 1992;339(8805):1307-10.
135. Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 1999;353(9166):1789-92. Review.
136. Hattersley AT. Prime suspect: the TCF7L2 gene and type 2 diabetes risk. *J Clin Invest* 2007;117(8):2077-9.
137. Hegele RA, Cao H, Harris SB, Zinman B, Hanley AJ, Anderson CM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 P12A and type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(5):2014-9.

138. Henrion AA, Martinez A, Mattei MG, Kahn A, Raymondjean M. Structure, sequence, and chromosomal location of the gene for USF2 transcription factors in mouse. *Genomics* 1995;25(1):36-43.
139. Henrion AA, Vaulont S, Raymondjean M, Kahn A. Mouse USF1 gene cloning: comparative organization within the c-myc gene family. *Mamm Genome* 1996;7(11):803-9.
140. Henry OA, Beischer NA, Sheedy MT, Walstab JE. Gestational diabetes and follow-up among immigrant Vietnam-born women. *Aust NZJ Obstet Gynaecol* 1993;33(2):109-14.
141. Herman WH, Fajans SS, Smith MJ, Polonsky KS, Bell GI, Halter JB. Diminished insulin and glucagon secretory responses to arginine in nondiabetic subjects with a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4alpha/MODY1 gene. *Diabetes* 1997;46(11):1749-54.
142. Herrmann SM, Ringel J, Wang JG, Staessen JA, Brand E; Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. *Diabetes* 2002;51(8):2653-7.
143. Higgins JR, de Swiet M. Blood-pressure measurement and classification in pregnancy. *Lancet* 2001;357(9250):131-5.
144. Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11:1026-1030.
145. Hitman GA, Sudagani J. Searching for genes in diabetes and the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract Suppl* 2004;(143):3-8.
146. Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 1994;134(1):264-70.
147. Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* 2003;72(6):1492-1504.
148. Hoggart CJ, Shriver MD, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Design and analysis of admixture mapping studies. *Am J Hum Genet* 2004;74(5):965-78.
149. Hollander MH, Paarlberg KM, Huisjes AJ. Gestational diabetes: a review of the current literature and guidelines. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62(2):125-36.
150. Holmkvist J, Cervin C, Lyssenko V, Winckler W, Anevski D, Cilio C, Almgren P, Berglund G, Nilsson P, Tuomi T, Lindgren CM, Altshuler D, Groop L. Common

- variants in HNF-1 alpha and risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49(12):2882-91.
151. Homko C, Sivan E, Chen X, Reece EA, Boden G. Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(2):568-73.
152. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000;26(2):163-75.
153. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(6):1595-9.
154. Howarth FC, Glover L, Culligan K, Qureshi MA, Ohlendieck K. Calcineurin expression and calcium binding is increased in streptozotocin-induced diabetic rat skeletal muscle though not in cardiac muscle. *Pflugers Arch* 2002;444(1-2):52-8.
155. Hsueh WC, St Jean PL, Mitchell BD, Pollin TI, Knowler WC, Ehm MG, Bell CJ, Sakul H, Wagner MJ, Burns DK, Shuldiner AR. Genome-wide and fine-mapping linkage studies of type 2 diabetes and glucose traits in the Old Order Amish: evidence for a new diabetes locus on chromosome 14q11 and confirmation of a locus on chromosome 1q21-q24. *Diabetes* 2003;52(2):550-7.
156. Huertas-Vazquez A, Aguilar-Salinas C, LUIS AJ, Cantor RM, Canizales-Quinteros S, Lee JC, Mariana-Nuñez L, Riba-Ramirez RM, Jokiahho A, Tusie-Luna T, Pajukanta P. Familial combined hyperlipidemia in Mexicans: association with upstream transcription factor 1 and linkage on chromosome 16q24.1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(9):1985-91.
157. Huopio H, Reimann F, Ashfield R, Komulainen J, Lenko HL, Rahier J, Vauhkonen I, Kere J, Laakso M, Ashcroft F, Otonkoski T. Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1. *J Clin Invest* 2000;106(7):897-906.
158. Illsley NP. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 2000;21(1):14-22.
159. Inagaki N, Gono T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995;270(5239):1166-70.

160. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit* 2005;19(4):333-41.
161. Innes KE, Wimsatt JH. Pregnancy-induced hypertension and insulin resistance: evidence for a connection. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999;78(4):263-84. Review.
162. Innes KE, Byers TE, Marshall JA, Barón A, Orleans M, Hamman RF. Association of a woman's own birth weight with subsequent risk for gestational diabetes. *JAMA* 2002;287(19):2534-41.
163. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299–1320.
164. Ismail PM, Lu T, Sawadogo M. Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines. *Oncogene* 1999;18(40):5582-91.
165. Iynedjian PB. Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene. *Biochem J* 1998;333 (Pt 3):705-12.
166. Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(7-8):865-72.
167. Janssen PA, Rothman I, Schwartz SM. Congenital malformations in newborns of women with established and gestational diabetes in Washington State, 1984-91. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1996;10(1):52-63.
168. Jetton TL, Liang Y, Pettepher CC, Zimmerman EC, Cox FG, Horvath K, Matschinsky FM, Magnuson MA. Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem* 1994;269(5):3641-54.
169. Ji L, Malecki M, Warram JH, Yang Y, Rich SS, Krolewski AS. New susceptibility locus for NIDDM is localized to human chromosome 20q. *Diabetes* 1997;46(5):876-81.
170. Jonsson J, Ahlgren U, Edlund T, Edlund H. IPF1, a homeodomain protein with a dual function in pancreas development. *Int J Dev Biol* 1995;39(5):789-98.
171. Jovanovic L, Ilic S, Pettitt DJ, Hugo K, Gutierrez M, Bowsher RR, Bastyr EJ 3rd. Metabolic and immunologic effects of insulin lispro in gestational diabetes. *Diabetes Care* 1999;22(9):1422-7.
172. Jovanovic L. What is so bad about a big baby? *Diabetes Care* 2001;24(8):1317-8.
173. Jovanovic L, Pettitt DJ. Gestational diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286(20):2516-8. Review.

174. Jovanovic L. Point: Oral hypoglycemic agents should not be used to treat diabetic pregnant women. *Diabetes Care* 2007;30(11):2980-2.
175. Jovanovic L, Pettitt DJ. Treatment with insulin and its analogs in pregnancies complicated by diabetes. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S220-4. Review.
176. Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, Tanabe Y, Sakura H, Awata T, Goto Y. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1994;330(14):962-8.
177. Kadowaki T, Hara K, Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Yamauchi T, Eto K, Kadowaki H, Noda M, Hagura R, Akanuma Y. The role of PPARgamma in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *J Diabetes Complications* 2002;16(1):41-5.
178. Kalhan S, Rossi K, Gruca L, Burkett E, O'Brien A. Glucose turnover and gluconeogenesis in human pregnancy. *J Clin Invest* 1997;100(7):1775-81.
179. Kashanian M, Fazy Z, Pirak A. Evaluation of the relationship between gestational diabetes and a history of polycystic ovarian syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2008. In Press.
180. Kautzky-Willer A, Prager R, Waldhausl W, Pacini G, Thomaseth K, Wagner OF, Ulm M, Strelci C, Ludvik B. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. *Diabetes Care* 1997;20(11):1717-23.
181. Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Bieglmayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R, Waldhäusl W. Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia* 2001;44(2):164-72.
182. Keshavarz M, Cheung NW, Babaei GR, Moghadam HK, Ajami ME, Shariati M. Gestational diabetes in Iran: incidence, risk factors and pregnancy outcomes. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;69(3):279-86.
183. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2002;25(10):1862-8.
184. Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH. Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. *Diabetes* 2000;49(9):1517-24.
185. Kim HI, Cha JY, Kim SY, Kim JW, Roh KJ, Seong JK, Lee NT, Choi KY, Kim KS, Ahn YH. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma upregulates glucokinase gene expression in beta-cells. *Diabetes* 2002;51(3):676-85.
186. Kim SY, Kim HI, Park SK, Im SS, Li T, Cheon HG, Ahn YH. Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 2004;53 Suppl 1:S66-70.

187. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998a;21:1414-1431.
188. King H. Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age. *Diabetes Care* 1998b;21 Suppl 2:B9-13.
189. Kjos SL, Peters RK, Xiang A, Henry OA, Montoro M, Buchanan TA. Predicting future diabetes in Latino women with gestational diabetes. Utility of early postpartum glucose tolerance testing. *Diabetes* 1995;44(5):586-91.
190. Kjos SL, Buchanan TA. Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999;341(23):1749-56. Review.
191. Kousta E, Lawrence NJ, Penny A, Millauer BA, Robinson S, Johnston DG, McCarthy MI. Women with a history of gestational diabetes of European and South Asian origin are shorter than women with normal glucose tolerance in pregnancy. *Diabet Med* 2000;17(11):792-7.
192. Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, Thompson AL. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109(4):S516-26.
193. Kukita Y, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat* 1997;10(5):400-7.
194. Kwik M, Seeho SK, Smith C, McElduff A, Morris JM. Outcomes of pregnancies affected by impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77(2):263-8.
195. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50(4):938-48.
196. Langer O, Conway DL, Berkus MD, Xenakis EM, Gonzales O. A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000 19;343(16):1134-8.
197. Langer O, Yogev Y, Xenakis EM, Brustman L. Overweight and obese in gestational diabetes: the impact on pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2005a;192(6):1768-76.
198. Langer O, Yogev Y, Most O, Xenakis EM. Gestational diabetes: the consequences of not treating. *Am J Obstet Gynecol* 2005b;192(4):989-97.
199. Langer O, Yogev Y, Xenakis EM, Rosenn B. Insulin and glyburide therapy: dosage, severity level of gestational diabetes, and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2005c;192(1):134-9.

200. Lao TT, Ho LF, Chan BC, Leung WC. Maternal age and prevalence of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29(4):948-9.
201. Lazalde B, Sánchez-Urbina R, García de Alba JE, Ramírez-Dueñas ML. Gestational diabetes mellitus and congenital malformations. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69:399-405.
202. Lee JC, Lusic AJ, Pajukanta P. Familial combined hyperlipidemia: upstream transcription factor 1 and beyond. *Curr Opin Lipidol* 2006;17(2):101-9. Review.
203. Lee JC, Weissglas-Volkov D, Kyttälä M, Sinsheimer JS, Jokiaho A, de Bruin TW, Lusic AJ, Brennan ML, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Hazen SL, Pajukanta P. USF1 contributes to high serum lipid levels in Dutch FCHL families and U.S. whites with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(10):2222-7.
204. Lehto M, Tuomi T, Mahtani MM, Widén E, Forsblom C, Sarelin L, Gullström M, Isomaa B, Lehtovirta M, Hyrkkö A, Kanninen T, Orho M, Manley S, Turner RC, Brettin T, Kirby A, Thomas J, Duyk G, Lander E, Taskinen MR, Groop L. Characterization of the MODY3 phenotype. Early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *J Clin Invest* 1997;99(4):582-91.
205. Lehman DM, Richardson DK, Jenkinson CP, Hunt KJ, Dyer TD, Leach RJ, Arya R, Abboud HE, Blangero J, Duggirala R, Stern MP. P2 promoter variants of the hepatocyte nuclear factor 4alpha gene are associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* 2007;56(2):513-7
206. Leipold H, Knöfler M, Gruber C, Haslinger P, Bancher-Todesca D, Worda C. Calpain-10 haplotype combination and association with gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 2004;103(6):1235-40.
207. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14(5-6):143-9.
208. Love-Gregory LD, Wasson J, Ma J, Jin CH, Glaser B, Suarez BK, Permutt MA. A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. *Diabetes* 2004;53(4):1134-40.
209. Maassen JA, Jansen JJ, Kadowaki T, van den Ouweland JM, 't Hart LM, Lemkes HH. The molecular basis and clinical characteristics of Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD), a recently recognized diabetic subtype. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104(3):205-11.
210. MacNeill S, Dodds L, Hamilton DC, Armson BA, VandenHof M. Rates and risk factors for recurrence of gestational diabetes. *Diabetes Care* 2001;24(4):659-62.

211. Malecki MT. Type 2 diabetes mellitus and its complications: from the molecular biology to the clinical practice. *Rev Diabet Stud* 2004;1(1):5-8.
212. Maresh M. Diabetes in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13(2):103-7. Review.
213. Martin CC, Svitek CA, Oeser JK, Henderson E, Stein R, O'Brien RM. Upstream stimulatory factor (USF) and neurogenic differentiation/beta-cell E box transactivator 2 (NeuroD/BETA2) contribute to islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic-subunit-related protein (IGRP) gene expression. *Biochem J* 2003;371(Pt 3):675-86.
214. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Prieto L, Frías JL. Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers. *Am J Med Genet* 1998;78(2):140-5.
215. Marx J. Unraveling the causes of diabetes. *Science* 2002;296(5568):686-9.
216. Masugi J, Tamori Y, Mori H, Koike T, Kasuga M. Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:178-182.
217. Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, Permutt MA, Tanizawa Y, Jetton TL, et al. Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* 1993;92(5):2092-8. Review.
218. Matsukawa T, Inoue Y, Oishi Y, Kato H, Noguchi T. Up-regulation of upstream stimulatory factors by protein malnutrition and its possible role in regulation of the IGF-binding protein-1 gene. *Endocrinology* 2001;142(11):4643-51.
219. Mauricio D, de Leiva A. Autoimmune gestational diabetes mellitus: a distinct clinical entity?. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(6):422-8.
220. McCarthy MI, Froguel P. Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E217–E225.
221. McGuigan FE, Ralston SH. Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatr Genet* 2002;12(3):133-6.
222. Meex SJ, van Vliet-Ostaptchouk JV, van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Feskens EJ, Blaak EE, Wijmenga C, Hofker MH, Stehouwer CD, de Bruin TW. Upstream transcription factor 1 (USF1) in risk of type 2 diabetes: association study in 2000 Dutch Caucasians. *Mol Genet Metab* 2008;94(3):352-5.
223. Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Lebel P. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. *Hum Mol Genet* 1998;7(3): 435–40.

224. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B161-7.
225. Metzger BE. Long-term outcomes in mothers diagnosed with gestational diabetes mellitus and their offspring. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50(4):972-9. Review.
226. Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, de Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, Hod M, Kitzmiller JL, Kjos SL, Oats JN, Pettitt DJ, Sacks DA, Zoupas C. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S251-60.
227. Meza E, Barraza L, Martínez G, Fernández V, Ramos-Jáquez E, Cano-Vargas C, Valdez-Torres A, Izaguirre R. Gestational diabetes in a Mexican-U.S. border population: prevalence and epidemiology. *Rev Invest Clin* 1995;47:433-8.
228. Mitterski B, Krüger R, Wintermeyer P, Epplen JT. PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations in large scale screening projects. *Comb Chem High Throughput Screen* 2000;3(3):211-8.
229. Miura A, Yamagata K, Kakei M, Hatakeyama H, Takahashi N, Fukui K, Nammo T, Yoneda K, Inoue Y, Sladek FM, Magnuson MA, Kasai H, Miyagawa J, Gonzalez FJ, Shimomura I. Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2006;281(8):5246-57.
230. Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Damcott CM, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE. The C161-->T polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma, but not P12A, is associated with insulin resistance in Hispanic and non-Hispanic white women: evidence for another functional variant in peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Metabolism* 2005;54(11):1552-6.
231. Mohamed N, Dooley J. Gestational diabetes and subsequent development of NIDDM in aboriginal women of northwestern Ontario. *Int J Circumpolar Health* 1998;57 Suppl 1:355-8.
232. Montoro MN, Kjos SL, Chandler M, Peters RK, Xiang AH, Buchanan TA. Insulin resistance and preeclampsia in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2005 Aug;28(8):1995-2000.
233. Moore TR. Glyburide for the treatment of gestational diabetes. A critical appraisal. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S209-13. Review.
234. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR Jr. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 1997;272(12):8071-6.

235. Muller YL, Infante AM, Hanson RL, Love-Gregory L, Knowler W, Bogardus C, Baier LJ. Variants in hepatocyte nuclear factor 4alpha are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 2005;54(10):3035-9.
236. Myers MA, Rabin DU, Rowley MJ. Pancreatic islet cell cytoplasmic antibody in diabetes is represented by antibodies to islet cell antigen 512 and glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 1995;44(11):1290-5.
237. Ng MC, Miyake K, So WY, Poon EW, Lam VK, Li JK, Cox NJ, Bell GI, Chan JC. The linkage and association of the gene encoding upstream stimulatory factor 1 with type 2 diabetes and metabolic syndrome in the Chinese population. *Diabetologia* 2005;48(10):2018-24.
238. Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet* 1996;59:1134-1148.
239. North S, Espanel X, Bantignies F, Viollet B, Vallet V, Jalinot P, Brun G, Gillet G. Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs). *Oncogene* 1999;18(11):1945-55.
240. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr* 2000;130:3122S-3126S.
241. Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiya 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.
242. Ojuka EO, Jones TE, Nolte LA, Chen M, Wamhoff BR, Sturek M, Holloszy JO. Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca(2+). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(5):E1008-13.
243. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(8):2766-70.
244. O'Sullivan JB, Mahan CM: Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes* 1964; 13:278-85.
245. Otsu K, Fujii J, Periasamy M, Difilippantonio M, Uppender M, Ward DC, MacLennan DH. Chromosome mapping of five human cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum protein genes. *Genomics* 1993;17(2):507-9.
246. Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusi AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J, Laakso M, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet* 2004;36(4):371-6.

247. Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, Shield JP, Ellard S, Ferrer J, Hattersley AT. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med* 2007;4(4):e118.
248. Perfetti R, Hui H, Chamie K, Binder S, Seibert M, McLenithan J, Silver K, Walston JD. Pancreatic beta-cells expressing the Arg64 variant of the beta(3)-adrenergic receptor exhibit abnormal insulin secretory activity. *J Mol Endocrinol* 2001;27(2):133-44.
249. Permutt MA, Wasson JC, Suarez BK, Lin J, Thomas J, Meyer J, Lewitzky S, Rennich JS, Parker A, DuPrat L, Maruti S, Chayen S, Glaser B. A genome scan for type 2 diabetes susceptibility loci in a genetically isolated population. *Diabetes* 2001;50(3):681-5.
250. Permutt MA, Wasson J, Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest* 2005;115(6):1431-9. Review.
251. Petersen HV, Serup P, Leonard J, Michelsen BK, Madsen OD. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(22):10465-9.
252. Pettitt DJ, Jovanovic L. Low birth weight as a risk factor for gestational diabetes, diabetes, and impaired glucose tolerance during pregnancy. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S147-9. Review.
253. Pettitt DJ, Ospina P, Howard C, Zisser H, Jovanovic L. Efficacy, safety and lack of immunogenicity of insulin aspart compared with regular human insulin for women with gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 2007;24(10):1129-35.
254. Plagemann A, Harder T, Dudenhausen JW. The Diabetic Pregnancy, Macrosomia, and Perinatal Nutritional Programming. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2008;61:91-102.
255. Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun* 2002;3(5):235-49.
256. Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, Harris SB, Hegele RA, Hanley AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2007;21(3):166-71.
257. Portois L, Tastenoy M, Viollet B, Svoboda M. Functional analysis of the glucose response element of the rat glucagon receptor gene in insulin-producing INS-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1574(2):175-86.

258. Pruhova S, Ek J, Lebl J, Sumnik Z, Saudek F, Andel M, Pedersen O, Hansen T. Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia* 2003;46(2):291-5.
259. Read ML, Clark AR, Docherty K. The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer. *Biochem J* 1993;295(Pt 1):233-7.
260. Reader DM. Medical nutrition therapy and lifestyle interventions. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S188-93.
261. Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B. C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(8):3507-12.
262. Ridderstråle M, Parikh H, Groop L. Calpain 10 and type 2 diabetes: are we getting closer to an explanation? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8(4):361-6.
263. Rieusset J, Auwerx J, Vidal H. Regulation of gene expression by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma with rosiglitazone (BRL 49653) in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265(1):265-71.
264. Rissanen J, Markkanen A, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, Kekäläinen P, Mykkänen L, Kuusisto J, Karhapää P, Niskanen L, 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 Jan;23(1):70-3.
265. Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 1998;339(14):953-9.
266. Rizzo T, Metzger BE, Burns WJ, Burns K. Correlations between antepartum maternal metabolism and child intelligence. *N Engl J Med* 1991;325(13):911-6.
267. Rizzo TA, Dooley SL, Metzger BE, Cho NH, Ogata ES, Silverman BL. Prenatal and perinatal influences on long-term psychomotor development in offspring of diabetic mothers. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(6):1753-8.
268. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001;11(1):3-11.
269. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000;14(11):1293-307.
270. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001;276(41):37731-4. Review.

271. Rowan JA; MiG Investigators. A trial in progress: gestational diabetes. Treatment with metformin compared with insulin (the Metformin in Gestational Diabetes [MiG] trial). *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S214-9.
272. Rubinstein P, Walker M, Krassner J, Carrier C, Carpenter C, Dobersen MJ, Notkins AL, Mark EM, Nechemias C, Hausknecht RU, Ginsberg-Fellner F. HLA antigens and islet cell antibodies in gestational diabetes. *Hum Immunol* 1981;3(3):271-5.
273. Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Ríos Torres JM, Gómez-Pérez FJ, Olaiz G. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Arch Med Res* 2005;36(3):188-96. Review.
274. Saker PJ, Hattersley AT, Barrow B, Hammersley MS, McLellan JA, Lo YM, Olds RJ, Gillmer MD, Holman RR, Turner RC. 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(11):1325-8.
275. Salles JE, Kalinin LB, Ferreira SR, Kasamatsu T, Moisés RS. Diabetes mellitus associated with the mitochondrial mutation A3243G: frequency and clinical presentation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51(4):559-65.
276. Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor. USA. 2nd ed. 1989. pp. B24.
277. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 2005;45(5):828-33. Review.
278. Schmidt MI, Duncan BB, Reichelt AJ, Branchtein L, Matos MC, Costa e Forti A, Spichler ER, Pousada JM, Teixeira MM, Yamashita T; Brazilian Gestational Diabetes Study Group. Gestational diabetes mellitus diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes Care* 2001;24(7):1151-5.
279. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 1995;270(33):19269-76.
280. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996;15(19):5336-48.
281. Seghieri G, Anichini R, De Bellis A, Alviggi L, Franconi F, Breschi MC. Relationship between gestational diabetes mellitus and low maternal birth weight. *Diabetes Care* 2002;25(10):1761-5.

282. Sha M, Ferré-D'Amaré AR, Burley SK, Goss DJ. Anti-cooperative biphasic equilibrium binding of transcription factor upstream stimulatory factor to its cognate DNA monitored by protein fluorescence changes. *J Biol Chem* 1995;270(33):19325-9.
283. Shaat N, Ekelund M, Lernmark A, Ivarsson S, Nilsson A, Perfekt R, Berntorp K, Groop L. Genotypic and phenotypic differences between Arabian and Scandinavian women with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004;47(5):878-84.
284. Shaat N, Ekelund M, Lernmark A, Ivarsson S, Almgren P, Berntorp K, Groop L. Association of the E23K polymorphism in the KCNJ11 gene with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005;48(12):2544-51.
285. Shaat N, Karlsson E, Lernmark A, Ivarsson S, Lynch K, Parikh H, Almgren P, Berntorp K, Groop L. Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006;49(7):1545-51.
286. Shaat N, Groop L. Genetics of gestational diabetes mellitus. *Curr Med Chem* 2007;14(5):569-83. Review.
287. Shaat N, Lernmark A, Karlsson E, Ivarsson S, Parikh H, Berntorp K, Groop L. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2007;50(5):972-9.
288. Shao J, Catalano PM, Yamashita H, Ruyter I, Smith S, Youngren J, Friedman JE. 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(4):603-10.
289. Sheffield JS, Butler-Koster EL, Casey BM, McIntire DD, Leveno KJ. Maternal diabetes mellitus and infant malformations. *Obstet Gynecol* 2002;100(5 Pt 1):925-30.
290. Shieh BH, Sparkes RS, Gaynor RB, Lusk AJ. Localization of the gene-encoding upstream stimulatory factor (USF) to human chromosome 1q22-q23. *Genomics* 1993;16(1):266-8.
291. Shin DW, Pan Z, Kim EK, Lee JM, Bhat MB, Parness J, Kim DH, Ma J. A retrograde signal from calsequestrin for the regulation of store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2003;278(5):3286-92.
292. Shuldiner AR, McLenithan JC. Genes and pathophysiology of type 2 diabetes: more than just the Randle cycle all over again. *J Clin Invest* 2004;114(10):1414-7.
293. Shulman G. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(2):171-6. Review.

294. Silander K, Mohlke KL, Scott LJ, Peck EC, Hollstein P, Skol AD, Jackson AU, Deloukas P, Hunt S, Stavrides G, Chines PS, Erdos MR, Narisu N, Conneely KN, Li C, Fingerlin TE, Dhanjal SK, Valle TT, Bergman RN, Tuomilehto J, Watanabe RM, Boehnke M, Collins FS. Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53(4):1141-9.
295. Sirito M, Lin Q, Maity T, Sawadogo M. Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1994;22(3):427-33.
296. Sivan E, Homko CJ, Chen X, Reece EA, Boden G. Effect of insulin on fat metabolism during and after normal pregnancy. *Diabetes* 1999;48(4):834-8.
297. Sivan E, Maman E, Homko CJ, Lipitz S, Cohen S, Schiff E. Impact of fetal reduction on the incidence of gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 2002;99(1):91-4.
298. Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V, Svalstedt B. Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB J* 2001;15(1):215-220.
299. Solomon CG, Willett WC, Carey VJ, Rich-Edwards J, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Spiegelman D, Manson JE. A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. *JAMA* 1997;278(13):1078-83.
300. Song D, Liu Y, Han Y, Shang G, Hua S, Zhang H, Guo S, Jiao S. Study on the gestational diabetes mellitus and histocompatibility human leukocyte antigen DRB allele polymorphism. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002;37(5):284-6.
301. Song Y, Niu T, Manson JE, Kwiatkowski DJ, Liu S. Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies. *Am J Hum Genet* 2004;74(2):208-22.
302. Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 1997;29(6):301-7.
303. Sparsø T, Hussain MS, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsbad S, Hansen T, Pedersen O, Andersen G. Studies of association of the CASQ1 rs2275703 polymorphism in relation to type 2 diabetes and related quantitative metabolic traits among 7,088 Danish whites. *Mol Genet Metab* 2007;92(3):278-82.
304. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998;47(4):507-14.
305. Stangenberg M, Agarwal N, Rahman F, Sheth K, al Sedeiry S, De Vol E. Frequency of HLA genes and islet cell antibodies (ICA) and result of postpartum oral

- glucose tolerance tests (OGTT) in Saudi Arabian women with abnormal OGTT during pregnancy. *Diabetes Res* 1990;14(1):9-13.
306. Stoffel M, Bell KL, Blackburn CL, Powell KL, Seo TS, Takeda J, Vionnet N, Xiang KS, Gidh-Jain M, Pilkis SJ, et al. Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 1993;42(6):937-40.
307. Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(24):13209-14.
308. Stride A, Hattersley AT. Different genes, different diabetes: lessons from maturity-onset diabetes of the young. *Ann Med* 2002;34(3):207-16.
309. Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Hattersley AT. Intrauterine hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF-1 α gene mutation carriers. *Diabetes Care* 2002;25(12):2287-91.
310. Strosberg AD, Pietri-Rouxel F. Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17(10):373-81.
311. Stumvoll M, Häring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002;51(8):2341-7. Review.
312. Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 2000;9(11):1699-710.
313. Suviolahti E, Lilja HE, Pajukanta P. Unraveling the complex genetics of familial combined hyperlipidemia. *Ann Med* 2006;38(5):337-51. Review.
314. Szeszko J, J Howson, J Cooper, N Walker, R Twells *et al.* Analysis of polymorphisms of the interleukin-18 gene in Type 1 Diabetes and Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Diabetes* 2006;55: 559-62.
315. Tamás G, Kerényi Z. Gestational diabetes: current aspects on pathogenesis and treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109 Suppl 2:S400-11. Review.
316. Tamez-Pérez HE, Rodríguez-Ayala M, Treviño-Hernández M, Espinosa-Campos J, Salas-Galindo LR, Barquet-Barquet J, Páez-Jiménez FJ. Experiencia con un programa de escrutinio de diabetes gestacional. *Rev Invest Clin* 1993;45:453-6.
317. Tanaka T, Jiang S, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, Daigo K, Ohashi R, Sugai M, Ikegame C, Umezumi H, Hirayama Y, Midorikawa Y, Hippo Y, Watanabe A, Uchiyama Y, Hasegawa G, Reid P, Aburatani H, Hamakubo T, Sakai J, Naito M, Kodama T. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol* 2006;208(5):662-72.

318. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183–1197.
319. Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 1995;268(5209):426-9.
320. Thomas H, Jaschowitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SM, Roosen S, Lingott-Frieg A, Tack CJ, Ellard S, Ryffel GU, Hattersley AT. A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 2001;10(19):2089-97.
321. Tok EC, Ertunc D, Bilgin O, Erdal EM, Kaplanoglu M, Dilek S. PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism is associated with weight gain in women with gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;129(1):25-30.
322. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 1995;15(1):351-7.
323. Törn C, Gupta M, Sanjeevi CB, Aberg A, Frid A, Landin-Olsson M. Different HLA-DR-DQ and MHC class I chain-related gene A (MICA) genotypes in autoimmune and nonautoimmune gestational diabetes in a Swedish population. *Hum Immunol* 2004;65(12):1443-50.
324. Tsai PJ, Ho SC, Tsai LP, Lee YH, Hsu SP, Yang SP, Chu CH, Yu CH. Lack of relationship between beta3-adrenergic receptor gene polymorphism and gestational diabetes mellitus in a Taiwanese population. *Metabolism* 2004;53(9):1136-9.
325. Turok DK, Ratcliffe SD, Baxley EG. Management of gestational diabetes mellitus. *Am Fam Physician* 2003;68(9):1767-72. Review.
326. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamaki J, Rissanen A. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3708–3712.
327. Vambergue A, Fajardy I, Bianchi F, Cazaubiel M, Verier-Mine O, Goeusse P, Fontaine P, Danze PM. Gestational diabetes mellitus and HLA class II (-DQ, -DR) association: The Digest Study. *Eur J Immunogenet* 1997;24(5):385-94.
328. van Raaij JM. Energy requirements of pregnancy for healthy Dutch women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995 Jul;61(1):7-13. Review.
329. Vaxillaire M, Dina C, Lobbens S, Dechaume A, Vasseur-Delannoy V, Helbecque N, Charpentier G, Froguel P. Effect of common polymorphisms in the HNF4alpha

promoter on susceptibility to type 2 diabetes in the French Caucasian population. *Diabetologia* 2005;48(3):440-4.

330. Velho G, Byrne MM, Clément K, Sturis J, Pueyo ME, Blanché H, Vionnet N, Fiet J, Passa P, Robert JJ, Polonsky KS, Froguel P. Clinical phenotypes, insulin secretion, and insulin sensitivity in kindreds with maternally inherited diabetes and deafness due to mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Diabetes* 1996;45(4):478-87.
331. Velho G, Froguel P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur J Endocrinol* 1998;138(3):233-9. Review.
332. Vidaeff AC, Yeomans ER, Ramin SM. Gestational diabetes: a field of controversy. *Obstet Gynecol Surv* 2003;58(11):759-69. Review.
333. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99(10):2416-22.
334. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P, Königsoerg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S; Metabolic Study Group. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes* 2007;56(7):1881-7.
335. Villarroel AC, Echiburú B, Riesco V, Maliqueo M, Cárcamo M, Hitschfeld C, Sánchez F, Del Solar MP, Sir-Petermann T. Polycystic ovary syndrome and pregnancy: Clinical experience. *Rev Med Chil* 2007;135(12):1530-8.
336. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, De Matos F, Durand E, Leprêtre F, Lecoœur C, Gallina P, Zekiri L, Dina C, Froguel P. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet* 2000;67(6):1470-80.
337. Walczak R, Tontonoz P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res* 2002;43(2):177-86. Review.
338. Wallin JJ, Rinkenberger JL, Rao S, Gackstetter ER, Koshland ME, Zwollo P. B cell-specific activator protein prevents two activator factors from binding to the immunoglobulin J chain promoter until the antigen-driven stages of B cell development. *J Biol Chem* 1999;274(22):15959-65.

339. Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, et al. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med* 1995;333(6):343-7.
340. Walston J, Silver K, Hilfiker H, Andersen RE, Seibert M, Beamer B, Roth J, Poehlman E, Shuldiner AR. Insulin response to glucose is lower in individuals homozygous for the Arg 64 variant of the beta-3-adrenergic receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(11):4019-22.
341. Wang XL, Oosterhof J, Duarte N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161→T polymorphism and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 1999; 44(3): 588-94.
342. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* 2005;6(2):109-18.
343. Watanabe RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA. Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007a;30 (Suppl.2):S134-40. Review.
344. Watanabe RM, Allayee H, Xiang AH, Trigo E, Hartiala J, Lawrence JM, Buchanan TA. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. *Diabetes* 2007b;56(5):1481-5.
345. Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 2001;142(3):1269-77.
346. Weedon MN, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Love-Gregory LD, Permutt MA, Hattersley AT, Frayling TM. Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the U.K. population. *Diabetes* 2004;53(11):3002-6.
347. Weedon MN, Frayling TM, Shields B, Knight B, Turner T, Metcalf BS, Voss L, Wilkin TJ, McCarthy A, Ben-Shlomo Y, Davey Smith G, Ring S, Jones R, Golding J, Byberg L, Mann V, Axelsson T, Syvänen AC, Leon D, Hattersley AT. Genetic regulation of birth weight and fasting glucose by a common polymorphism in the islet cell promoter of the glucokinase gene. *Diabetes* 2005;54(2):576-81.
348. Weedon MN. The importance of TCF7L2. *Diabet Med* 2007;24(10):1062-6.

349. Weijers RN, Bekedam DJ. Relationship between gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes: evidence of mitochondrial dysfunction. *Clin Chem* 2007;53(3):377-83.
350. Weinhaus AJ, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Role of cAMP in upregulation of insulin secretion during the adaptation of islets of Langerhans to pregnancy. *Diabetes* 1998;47(9):1426-35.
351. Weir BS. Linkage Disequilibrium and Association Mapping. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008. In Press.
352. Weissglas-Volkov D, Huertas-Vazquez A, Suviolahti E, Lee J, Pajukanta P, *et al.* Common hepatic nuclear factor-4alpha variants are associated with high serum lipid levels and the metabolic syndrome. *Diabetes* 2006;55(7):1970-7.
353. Weng J, Macfarlane WM, Lehto M, Gu HF, Shepherd LM, Ivarsson SA, Wibell L, Smith T, Groop LC. Functional consequences of mutations in the MODY4 gene (IPF1) and coexistence with MODY3 mutations. *Diabetologia* 2001;44(2):249-58.
354. Weng J, Ekelund M, Lehto M, Li H, Ekberg G, Frid A, Aberg A, Groop LC, 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.
355. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* 1997;272(32):20230-5.
356. West AG, Huang S, Gaszner M, Litt MD, Felsenfeld G. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell* 2004;16(3):453-63.
357. Widén E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 1995;333(6):348-51.
358. Wieser F, Waite L, Depoix C, Taylor RN. PPAR Action in Human Placental Development and Pregnancy and Its Complications. *PPAR Res* 2008; In Press.
359. Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, O'Rahilly S, Frayling TM, Bell JI, Lathrop GM, Bennett A, Dhillon R, Fletcher C, Groves CJ, Jones E, Prestwich P, Simecek N, Rao PV, Wishart M, Bottazzo GF, Foxon R, Howell S, Smedley D, Cardon LR, Menzel S, McCarthy MI. A genomewide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in a U.K. population (the Diabetes UK Warren 2 Repository): analysis of 573 pedigrees provides independent replication of a susceptibility locus on chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 2001;69(3):553-69.

360. Winckler W, Weedon MN, Graham RR, McCarroll SA, Purcell S, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Boström KB, Walker M, Hitman G, Hattersley AT, McCarthy MI, Ardlie KG, Hirschhorn JN, Daly MJ, Frayling TM, Groop L, Altshuler D. Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. *Diabetes* 2007;56(3):685-93.
361. Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajós P, Salamon F, Turi Z, Kovács M, Vargha P, Karádi I. Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;56(2):93-9.
362. Winzer C, Wagner O, Festa A, Schneider B, Roden M, Bancher-Todesca D, Pacini G, Funahashi T, Kautzky-Willer A. Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27(7):1721-7.
363. World Health Organization (WHO). 2007. <http://www.who.int/diabetes/preventionflyer/en/>
364. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest* 1998;101(1):22-32.
365. Xiang AH, Peters RK, Trigo E, Kjos SL, Lee WP, Buchanan TA. Multiple metabolic defects during late pregnancy in women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48(4):848-54.
366. Xiang K, Wang Y, Zheng T, Jia W, Li J, Chen L, Shen K, Wu S, Lin X, Zhang G, Wang C, Wang S, Lu H, Fang Q, Shi Y, Zhang R, Xu J, Weng Q. Genome-wide search for type 2 diabetes/impaired glucose homeostasis susceptibility genes in the Chinese: significant linkage to chromosome 6q21-q23 and chromosome 1q21-q24. *Diabetes* 2004;53(1):228-34.
367. Xiong X, Saunders LD, Wang FL, Demianczuk NN. Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;75(3):221-8.
368. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 1996;384:458-60.
369. Yamagata K, Nammo T, Moriwaki M, Ihara A, Iizuka K, Yang Q, Satoh T, Li M, Uenaka R, Okita K, Iwahashi H, Zhu Q, Cao Y, Imagawa A, Tochino Y, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes* 2002;51(1):114-23.

370. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241(2):270-4.
371. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004;351(11):1106-18.
372. Zeggini E. A new era for Type 2 diabetes genetics. *Diabet Med* 2007;24(11):1181-6.
373. Zhang K, Calabrese P, Nordborg M, Sun F. Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *Am J Hum Genet* 2002;71(6):1386-94.
374. Zhang R, Hu C, Wang CR, Fang QC, Ma XJ, Jia WP, Xiang KS. Scanning the HNF4A gene mutation from Chinese pedigrees with early- and/or multiple-onset diabetes. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006;23(4):406-9.
375. Zimmet P, Shaw J, Alberti KG. Preventing type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. *Diabet Med* 2003;20:693-702.
376. Zisser H, Jovanovic L, Thorsell A, Kupperman A, Taylor LJ, Ospina P, Hod M. The fidgety fetus hypothesis: fetal activity is an additional variable in determining birth weight of offspring of women with diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(1):63-7.
377. Zouali H, Vaxillaire M, Lesage S, Sun F, Velho G, Vionnet N, Chiu K, Passa P, Permutt A, Demenais F, et al. Linkage analysis and molecular scanning of glucokinase gene in NIDDM families. *Diabetes* 1993;42(9):1238-45.