



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

La proteína de unión al retinol se asocia a la diabetes gestacional como un factor de riesgo directo para el desarrollo de diabetes 2.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

RENATA PATRICIA SAUCEDO GARCIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ARTURO ZARATE TREVIÑO

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
DR. SERGIO AGUSTIN ISLAS ANDRADE

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SAUCEDO GARCÍA RENATA PATRICIA** con número de cuenta **91370091** con la tesis titulada: **"LA PROTEÍNA DE UNION AL RETINOL SE ASOCIA A LA DIABETES GESTACIONAL COMO UN FACTOR DE RIESGO DIRECTO PARA EL DESARROLLO DE DIABETES 2"** realizada bajo la dirección de : **DR. ARTURO ZÁRATE TREVIÑO.**

Presidente:	DRA.	MARCIA HIRIART URDANIVIA
Voçal:	DRA.	ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ
Secretario:	DR.	SERGIO AGUSTÍN ISLAS ANDRADE
Suplente:	DR.	MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Suplente:	DRA.	MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de octubre de 2011

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

*“Knowing is not enough; we must apply.
Willing is not enough; we must do.”*
—Goethe

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme realizar mis estudios con excelentes profesores y por el apoyo recibido por parte del personal administrativo.

Al CONACYT y al IMSS por los financiamientos recibidos para la realización del estudio “Asociación de la proteína de unión al retinol y sus polimorfismos con la resistencia a la insulina en la diabetes gestacional” (IMSS, PRT080; CONACYT, 2007-C01-69232)

Al Dr. Arturo Zárate por sus valiosas enseñanzas.

A la Dra. Patricia Ostrosky por sus sugerencias para mejorar el proyecto y por su apoyo para la realización de los estudios de polimorfismos en el Laboratorio de Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Al Dr. Sergio Islas por las opiniones brindadas para el enriquecimiento del proyecto.

Al Dr. Edgardo Puella Tamara de la UMAE Hospital de Gineco-Obstetrica No 3 “La Raza”, IMSS, por las facilidades otorgadas para la realización del proyecto.

A la Dra. Lourdes Basurto Acevedo por su valiosa asesoría durante el desarrollo del estudio.

Al Dr. Marcelino Hernández Valencia por el apoyo brindado en el reclutamiento de pacientes.

A la Dra. Patricia Mendoza por sus enseñanzas en la determinación de polimorfismos.

A Sandy y Erika por su tenacidad en el seguimiento de las participantes y por la calidez brindada a las mismas.

A las participantes del estudio que mostraron un interés especial en participar y en conocer los riesgos de la diabetes gestacional y de la diabetes tipo 2.

Al personal de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Endocrinas, IMSS y del Laboratorio de Genómica y Toxicología Ambiental, UNAM por las facilidades otorgadas para la realización del estudio.

Dedicatoria

A mi hermana Aurora, quien con gran entusiasmo y cariño me motivó y preparó para el ingreso al Posgrado en Ciencias Biológicas.

A mis padres por su valioso apoyo y ejemplo de vida.

A mi hermana Gaby por la inspiración de fortaleza que me ha contagiado ante cualquier circunstancia.

A mi hermana Mariana por ser mi modelo de preparación y por el cariño que compartimos desde pequeñas “mi muñequita”.

A mis hermosos sobrinos Monis y Yaushu quienes con sus bellas sonrisas iluminan mi existencia.

A mi esposo Edgar, por su valiosa compañía, apoyo incondicional y por el permitirme retomar al viaje juntos para continuar la senda con amor.

A mis amigas Ely, Tere, Silvia, Sarita, Sandy, Erika, Rosy, Nidia y Lucy por los bellos momentos compartidos y por su inmenso apoyo.

A Yadira Dávila, amiga, joven investigadora y ejemplo de superación, que aun con su ausencia física mantiene viva su presencia inigualable en nuestros corazones.

A “mi corazón”, mi pequeña Alhelí quien desde hace 18 años ha inspirado cada peldaño de mi vivir.

INDICE

Indice de tablas.....	9
Indice de figuras.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción.....	13
Antecedentes.....	15
Diabetes gestacional.....	18
Etiología de la diabetes gestacional.....	23
Aspectos genéticos.....	23
Participación del tejido adiposo.....	26
Fisiopatología de la diabetes gestacional.....	38
Evaluaciones postparto en mujeres con DMG.....	44
Riesgos en el hijo de madre con diabetes gestacional.....	46
Planteamiento del problema.....	49
Hipótesis.....	49
Objetivo general.....	49
Objetivos específicos.....	49
Metodología.....	50
Mediciones de laboratorio.....	51
Evaluación de polimorfismos de RBP4.....	52
Análisis estadístico.....	52
Resultados.....	54
a) Evaluación de adipocinas.....	55
b) Polimorfismos de RBP4.....	60
c) Incidencia de alteración de la glucosa en DMG previa...	64
d) Recién nacido e infante.....	67
Discusión.....	69
Conclusiones.....	76

Referencias.....	77
Anexos.....	89
1. Autorización del Comité de Investigación.....	89
2. Carta de consentimiento informado.....	90
3. Hoja de recolección de datos.....	91
4. Inmunoensayos.....	92
5. Determinación de polimorfismos.....	99
6. Derivados de la tesis.....	100
Reconocimiento.....	100
Presentación de avances en Congresos y Sesiones.....	100
Capítulo de libro.....	101
Financiamientos obtenidos.....	101
Formación de alumnos.....	101
7. Publicaciones.....	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diagnóstico de DMG.....	20
Tabla 2. Criterios de IADPSG para el diagnóstico de DMG.....	21
Tabla 3. Metas de glucemia en diabetes gestacional.....	22
Tabla 4. Variantes genéticas evaluadas en DMG.....	24
Tabla 5. Principales adipocinas.....	27
Tabla 6. Efectos de la insulina.....	41
Tabla 7. Criterios para el diagnóstico de DM2.....	45
Tabla 8. Características previas a la gestación.....	54
Tabla 9. Características generales de las participantes en la semana gestacional 30.....	56
Tabla 10. Variables clínicas en pacientes con y sin DMG, 6 semanas y 6 meses después del alumbramiento.....	60
Tabla 11. Análisis de χ^2 de los polimorfismos de RBP4 entre pacientes con DMG y embarazo normal.....	61
Tabla 12. Asociaciones entre los SNP's y las características clínicas de los dos grupos de estudio en el postparto.....	63
Tabla 13. Características de las mujeres con diabetes gestacional en el seguimiento.....	65
Tabla 14. Características de los recién nacidos.....	67
Tabla 15. Características de los infantes de mujeres con DMG.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de RBP4.....	31
Figura 2. Mecanismo de acción de RBP4.....	33
Figura 3. Mapa del gen de RBP4.....	35
Figura 4. Acción de TNF α y adiponectina en DMG.....	37
Figura 5. Secreción de insulina en la célula beta del páncreas.....	40
Figura 6. Esquema de la señalización de insulina.....	43
Figura 7. HOMA-IR y concentraciones de insulina.....	57
Figura 8. Concentración de adipocinas.....	58
Figura 9. Tolerancia a la glucosa en el postparto de DMG.....	66

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la asociación entre las adipocinas: factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), adiponectina, leptina, proteína de unión al retinol (RBP4), y los polimorfismos de RBP4 rs3758539, rs34571439 y rs116736522 con la resistencia a la insulina durante el embarazo y postparto en mujeres con diabetes gestacional (DMG). Además, determinar la incidencia de alteración en la tolerancia a la glucosa durante el primer año postparto.

Material y métodos. Se realizó un estudio con una cohorte inicial de 100 mujeres con DMG y 100 con un embarazo normal quienes fueron evaluadas en el tercer trimestre de gestación y durante el primer año postparto. Se les determinó la concentración sérica de adiponectina, leptina y RBP4 por radioinmunoanálisis y de $TNF\alpha$ por quimioluminiscencia; se les analizó la resistencia a la insulina por el modelo HOMA (homeostasis model assessment) y se determinaron los polimorfismos de RBP4 por PCR en tiempo real con sondas TaqMan. Además, se determinó la tolerancia a la glucosa postparto en mujeres con DMG.

Resultados. Las mujeres con DMG presentaron mayor grado de resistencia a la insulina en comparación con las mujeres con embarazo normal (2.3 ± 2.3 vs. 1.3 ± 0.95). No se observó diferencia en los niveles de las adipocinas entre los dos grupos; sin embargo en las mujeres con embarazo normal la RBP4 se asoció con resistencia a la insulina ($r= 0.47$, $p<0.05$) y esta asociación también se observó en el postparto ($r= 0.51$, $p<0.05$). En el periodo postparto las mujeres con DMG tuvieron mayor concentración de leptina y resistencia a la insulina. Los tres polimorfismos analizados no se asociaron con la DMG, sin embargo algunas variantes se asociaron con niveles de insulina y el grado de resistencia a la insulina. Además, se identificó una alteración progresiva en la tolerancia a la glucosa postparto de mujeres con DMG que se asoció al peso y a la edad ($t=2.8$, $p=0.007$; $t=2.6$, $p=0.012$, respectivamente).

Conclusión. La DMG se asocia con mayor resistencia a la insulina que en las mujeres con embarazo normal; sin embargo, las adipocinas son similares en ambos grupos. Los niveles de RBP4 se asocian significativamente con resistencia a la insulina en mujeres sanas en el embarazo y postparto. No hay una asociación entre los polimorfismos de RBP4 y la DMG, no obstante algunas variantes se asocian con insulina y resistencia a la insulina. En el postparto de mujeres con DMG la leptina y resistencia a la insulina permanecen elevadas y se incrementa la incidencia de alteración de la tolerancia a la glucosa durante el primer año postparto principalmente en mujeres obesas.

ABSTRACT

Aim. To assess the relationship between circulating adipokines tumor necrosis factor alpha, adiponectin, leptin, retinol binding protein 4 (RBP4); the RBP4 polymorphisms (SNPs) rs3758539, rs34571439, rs116736522 and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes mellitus (GDM). In addition, investigate the incidence of glucose intolerance postpartum in women with gestational diabetes after delivery.

Methods. This was a prospective study of 100 women with GDM and 100 participants with normal gestation who were evaluated at gestational week 30, 6 weeks and 6 months postpartum. The circulating adipokines leptin, adiponectin, and RBP4 were evaluated by radioimmunoassay, and TNF α by chemiluminescent immunoassay; the degree of insulin resistance was estimated by the homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR). Genotyping of selected SNPs was done using the TaqMan assay. Moreover, postpartum evaluations in the GDM group included glucose tolerance.

Results. Women with GDM showed higher insulin resistance measured by HOMA-IR than participants with normal gestation (2.3 ± 2.3 vs. 1.3 ± 0.95). There was no difference between the two groups in adipokines; however, in women with a healthy pregnancy, RBP4 was associated with insulin resistance ($r= 0.47$, $P<0.05$). At 6 weeks and 6 months postpartum, women with previous GDM exhibited persistent elevated leptin and insulin resistance; and RBP4 was associated with insulin resistance only in women with a previous healthy pregnancy ($r= 0.51$, $p<0.05$). The SNPs evaluated were not associated with GDM. However genetic variants were associated with insulin and insulin resistance. In addition, progressively impaired glucose tolerance was observed after delivery in women with previous GDM and it was associated with body weight and age ($t=2.8$, $p=0.007$; $t=2.6$, $p=0.012$, respectively).

Conclusions. It was demonstrated that GDM is associated with greater insulin resistance than that observed in normal pregnancy; however, adipokines are similar in both groups. RBP4 levels are significantly associated with insulin resistance in healthy women during pregnancy and postpartum. The SNPs evaluated were not associated with GDM and some variants were associated with insulin and insulin resistance. After a pregnancy complicated by GDM, leptin and insulin resistance remains elevated and glucose tolerance worsens mainly in obese women.

INTRODUCCIÓN

Durante el embarazo se presentan diversas adaptaciones en el metabolismo de la mujer dirigidas a proveer un suministro preferencial y sin interrupción de nutrientes al feto que se está desarrollando. Uno de los cambios metabólicos más notorios en la gestación es la resistencia a la insulina que inicia cerca de la mitad del embarazo y progresa hasta el tercer trimestre. La resistencia a la insulina del embarazo puede resultar de una combinación de un incremento de la adiposidad materna y a los efectos desensibilizadores a la insulina de las hormonas placentarias.

En respuesta a la resistencia a la insulina, el páncreas con una adecuada reserva de células beta incrementa la secreción de insulina en un intento de vencer o superar la resistencia a la insulina periférica. Esta respuesta compensatoria tiende a regresar los niveles de glucosa a la normalidad a costa de niveles elevados de insulina tanto en ayuno como después de ingerir alimento. Sin embargo, cuando la capacidad secretora pancreática no es suficiente se presenta una intolerancia a los carbohidratos y, en consecuencia, la diabetes gestacional (DMG).

La diabetes gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. Es importante su reconocimiento porque las mujeres con DMG tienen un riesgo elevado de resultados adversos en el embarazo, relacionados a mortalidad y morbilidad perinatal. Además tiene un valor predictivo en el desarrollo ulterior de diabetes tipo 2; ya que aunque la mayoría de las mujeres que tuvieron DMG muestran una tolerancia normal a la glucosa en el postparto, alrededor del 50% desarrolla diabetes tipo 2 en la primera década después del parto.

El mecanismo por el cual se desarrolla la DMG aún se encuentra en discusión y se han propuesto varias teorías; una de ellas se refiere a la participación de factores derivados del adipocito, particularmente los ácidos grasos libres y las adipocinas

como son factor de necrosis tumoral- α ($TNF\alpha$), interleucina-6, adiponectina y leptina. Así mismo se ha propuesto a la proteína de unión al retinol (RBP-4) como una nueva adipocina que juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina fuera del embarazo. Por lo cual es interesante evaluar a estas adipocinas, particularmente a la RBP4 en el embarazo y postparto y conocer si se asocian con la DMG y con las alteraciones de la glucosa que se pudieran presentar en el postparto.

ANTECEDENTES

El embarazo se caracteriza por una serie de cambios en el metabolismo de lípidos y carbohidratos para asegurar un suministro continuo de nutrientes al feto que se está desarrollando. Las alteraciones en el metabolismo de lípidos incluyen principalmente una estimulación progresiva de la lipólisis y cetogénesis conforme avanza la gestación y un aumento en la concentración circulante de triglicéridos¹. Las hormonas placentarias promueven lipólisis durante el ayuno e hipertrigliceridemia después de ingerir alimentos. Estos cambios le permiten a la madre usar las grasas como reserva energética y preservan la glucosa y aminoácidos para uso fetal².

En relación al metabolismo de los carbohidratos, uno de los mayores cambios se presenta en la producción y acción de la insulina. La concentración de insulina circulante incrementa durante el embarazo³. Al inicio del embarazo, la respuesta de insulina a los nutrientes, en particular, la glucosa parece estar elevada, sin embargo, al final del embarazo predomina resistencia a la insulina⁴. La resistencia a la insulina se caracteriza por una marcada disminución en la capacidad de una cantidad fija de insulina para estimular la utilización de glucosa por el músculo o los adipocitos. Ante la resistencia a la insulina inducida por la gestación hay un incremento progresivo en la capacidad de respuesta de las células beta, por lo que se presenta la hiperinsulinemia gestacional⁵.

No se conocen a fondo los mecanismos que llevan a una mayor secreción de insulina en el embarazo. Un posible factor contribuyente es el aumento de la masa de células beta, que según estudios realizados en animales, parece resultar de una combinación de hipertrofia e hiperplasia de dichas células⁶. En el embarazo humano, también se ha observado hiperplasia de los islotes pancreáticos⁷. Así mismo, no se han identificado completamente los mecanismos celulares de la mayor capacidad de las células beta, se han aportado pruebas de una mayor actividad de proteincinasa A o C en tejido pancreático de ratas preñadas, en

comparación con ingravidas y una mayor comunicación intercelular en los islotes pancreáticos de hembras gestantes en comparación con no gestantes⁸; sin embargo, aún no se conoce la relación de estos fenómenos con una mayor secreción de insulina in vivo durante el embarazo.

La resistencia a la insulina en el embarazo avanzado es la resistencia fisiológica a la insulina más pronunciada que se ha observado en el humano; la sensibilidad corporal total a la insulina durante el tercer trimestre de gestación disminuye 45-70% con respecto a las cifras fuera de la gestación⁹.

Estudios observacionales y experimentales han indicado que los cambios hormonales del embarazo contribuyen a la aparición de la resistencia a la insulina¹⁰. Estos estudios se han basado en que la resistencia a la insulina tiende a aumentar durante la gestación, en paralelo con el aumento de la secreción de hormonas maternas circulantes, como lactógeno placentario, progesterona, prolactina y cortisol. Además, se ha señalado que la administración de lactógeno placentario humano, progesterona o glucocorticoides a mujeres ingravidas produce los cambios metabólicos que indican trastorno de la acción de la insulina y la exposición in vitro del tejido adiposo o músculo estriado a las hormonas que aumentan su concentración durante el embarazo, impide la captación de glucosa mediada por insulina en dichos tejidos, en particular cuando tal exposición incluye varias de ellas¹¹⁻¹³.

Estudios prospectivos recientes han implicado la participación del tejido adiposo en la resistencia a la insulina del embarazo¹⁴. Durante el embarazo ocurren cambios importantes en la composición corporal de la mujer, caracterizados principalmente por un incremento de la masa grasa que puede variar de 2 a 6 kg¹⁵. En este sentido, al considerar que el tejido adiposo funciona como un órgano endocrino, el incremento en los depósitos de masa grasa se han relacionado con una mayor producción de citocinas y hormonas conocidas como adipocinas que

contribuyen a la resistencia a la insulina del embarazo. Estas adipocinas son adiponectina, leptina, $TNF\alpha$ y recientemente RBP4¹⁶⁻¹⁸.

El mecanismo que causa la resistencia a la insulina en el embarazo no está completamente dilucidado. Un estudio comparó la función del receptor de insulina en adipocitos abdominales obtenidos de mujeres embarazadas y no embarazadas, los receptores estuvieron significativamente disminuidos en las células de las embarazadas (20000 vs 58000 receptores por célula). La actividad de la cinasa del receptor de insulina fue similar en adipocitos de embarazadas y no embarazadas. Sin embargo las embarazadas tuvieron una disminución significativa en el transporte de glucosa estimulado por insulina GLUT4¹⁹⁻²¹. Estos resultados sugieren que ambas, una disminución en el número de receptores de insulina y un defecto postreceptor en la acción de la insulina, son las causas clave de la resistencia a la insulina inducida por el embarazo.

En la mayoría de las mujeres después del alumbramiento, la dinámica glucosa-insulina regresa rápidamente a la normalidad, ya que las células beta del páncreas de la madre incrementaron durante la gestación de manera adecuada la secreción de insulina para contrarrestar la falta de sensibilidad a la insulina para mantener un control de glucosa apropiado. Sin embargo en aquellas mujeres que durante la gestación son incapaces de incrementar la producción de insulina para compensar la resistencia a la insulina se presenta la diabetes gestacional.

Diabetes gestacional

La diabetes gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. La definición se aplica si la condición persiste aun después del embarazo y no excluye la posibilidad de que sea una intolerancia a la glucosa no reconocida antes del embarazo o a que haya iniciado de manera concomitante con la gestación²².

La DMG parece ser una manifestación temprana de diabetes tipo 2 (DM2). Su identificación temprana permite la valoración longitudinal de parámetros metabólicos que llevan a DM2 y se considera un modelo excelente para estudios de prevención de DM2. Se conoce que después de 10 años de concluido el embarazo, el 50% de las mujeres desarrollarán DM2²³⁻²⁵.

A semejanza de lo que ocurre en la DM2, la frecuencia de DMG se incrementa con la edad y el índice de masa corporal (IMC), y se observa con mayor frecuencia en poblaciones afroestadunidenses, latinas, asiáticas sudorientales e hindúes orientales. Además es más probable que se presente en aquellas mujeres con historia familiar de diabetes, producto previo macrosómico y diabetes gestacional previa²⁶⁻²⁸; a este respecto se ha reportado que la tasa de recurrencia de DMG varía de un 30 a un 84%²⁹.

La frecuencia de DMG depende de la población estudiada y a los criterios diagnósticos utilizados. En nuestro país se ha informado una prevalencia entre 3 y 19.6%, con un promedio de 7% y se considera que más del 90% de los casos de diabetes que complican un embarazo se tratan de diabetes gestacional³⁰⁻³². En Estados Unidos la prevalencia es del 7% y se ha duplicado en los últimos 8 años en paralelo al incremento de la obesidad³³, en ese país incluso se ha evaluado que la prevalencia de DMG varía geográficamente y racialmente³⁴.

La hiperglucemia ocasionada por la DMG es un factor de riesgo de complicaciones para la madre y el feto. Las complicaciones maternas más frecuentes son hipertensión arterial durante el embarazo, infección de vías urinarias y polihidramnios³⁵. Sin embargo, el riesgo de complicaciones perinatales es mucho mayor en el producto, y se ha demostrado que la presencia de hiperglucemia se relaciona con un aumento en el riesgo de muerte fetal intrauterina en las últimas 4 a 8 semanas de gestación³⁶. El feto de la paciente con DMG está expuesto a un medio metabólico con exceso de glucosa y ácidos grasos libres, ya que se transportan en abundancia de la circulación materna a la fetal, lo que produce sobrealimentación. Por consiguiente, la concentración de insulina en líquido amniótico se incrementa, como un índice de compensación fetal ante un mayor aporte de nutrimentos. Así, los cambios metabólicos globales afectan el desarrollo y la madurez y llevan a una diversidad de resultados mórbidos fetales. El recién nacido tiene mayor riesgo de algunas complicaciones metabólicas, la más frecuente es la hipoglucemia. Esto se debe a la hiperinsulinemia que se desarrolló in útero. Las principales complicaciones fetales de la hiperglucemia no tratada durante el embarazo incluyen macrosomía y sus consecuencias: traumatismos obstétricos, luxación de hombro, fracturas de clavícula, parálisis de los nervios del plexo braquial; anomalías congénitas, hipocalcemia, ictericia, enfermedad de membrana hialina con insuficiencia respiratoria secundaria, taquipnea y policitemia³⁷⁻³⁹. El control estricto de la glucemia es indispensable para reducir el riesgo de estas complicaciones.

El primer criterio para el diagnóstico de la DMG fue establecido hace más de 40 años⁴⁰. Este criterio se eligió para identificar a mujeres con riesgo elevado de desarrollar diabetes después del embarazo. En la actualidad, no hay un consenso internacional de los criterios diagnósticos de DMG; sin embargo en la mayoría de los países la detección se hace entre las semanas 24-28 de gestación utilizando ya sea la prueba de dos pasos o la de un solo paso⁴¹⁻⁴². En la de dos pasos primero se realiza una carga de 50 g de glucosa a cualquier hora del día y se determina la glucemia una hora después, si el valor excede 140 mg/dL se

programa una carga de 100 g durante tres horas (criterio de la ADA, Asociación Americana de Diabetes) y en la de un paso se realiza una carga de 75 g durante 2 horas (criterio de la OMS, Organización Mundial de la Salud), utilizando los puntos de corte que se muestran en la Tabla 1. Además, en aquellas mujeres con glucemia plasmática en ayunas de 126 mg/dL (7.0 mmol/L) o glucemia plasmática casual de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) comprobada 24 horas después, se cumplen los criterios diagnósticos de DMG, lo que elimina la necesidad de realizarles la prueba de estimulación con carga de glucosa.

Tabla 1. Diagnóstico de DMG utilizando una carga de 100 g o de 75 g de glucosa⁴¹⁻⁴²

	mg/dL	mmol/L
Ayuno	95	5.3
1-h	180	10.0
2-h	155	8.6
3-h	140	7.8

Los valores normales son cifras menores a las mostradas en la tabla, para un diagnóstico positivo se deben exceder dos o más de los puntos de corte. La prueba se realiza por la mañana después de un ayuno de 8 a 14 h y después de tres días de dieta sin restricciones (≥ 150 g de carbohidratos/día) y sin limitaciones en la realización de actividad física.

Algunas organizaciones nacionales han creado sus propios criterios en base a su experiencia y a la organización de sus sistemas de salud⁴³⁻⁴⁴. Sin embargo, ninguno de los criterios mencionados se asocia a las aberraciones metabólicas de la DMG en el riesgo de resultados adversos en el feto y en el recién nacido.

Se ha observado que con menores grados de hiperglucemia a los requeridos para el diagnóstico de DMG, se incrementa el riesgo de resultados perinatales adversos⁴⁵. Por ello, recientemente un grupo de expertos que forman parte de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio en Diabetes y Embarazo (IADPSG) propuso nuevos criterios para el diagnóstico de la DMG (Tabla 2). Propusieron dos fases de detección, la primera en etapas tempranas del embarazo para detección de mujeres con diabetes manifiesta, es decir, para aquellas mujeres con alteración de la glucosa no detectada previamente al embarazo y la segunda es la

realización de una prueba de 75 g durante 2 horas entre las 24-28 semanas de gestación a toda mujer no diagnosticada previamente con diabetes manifiesta o DMG⁴⁶.

Tabla 2. Criterios de IADPSG para el diagnóstico de DMG⁴⁶.

Tiempo	Diagnostico	Prueba	Puntos de corte
Primera visita prenatal	Diabetes manifiesta	Glucosa de ayuno	126 mg/dL (7.0 mmol/L)
		HbA1C	≥ 6.5%
		Glucemia casual confirmada	200 mg/dL (11.1 mmol/L)
24-28 semanas	Diabetes gestacional	Glucosa de ayuno	92 mg/dL (5.1 mmol/L)
		75g OGTT-1h	180 mg/dL (10.0 mmol/L)
		75g OGTT-2h	153 mg/dl (8.5 mmol/L)

El diagnostico de DMG es cuando en etapas tempranas del embarazo la mujer tiene cifras de glucemia en ayuno > 92 mg/dL (5.5 mmol/L) o cuando al realizar la OGTT (*oral glucose tolerance test*, carga de glucosa) entre las semanas 24-28 de gestación se excede solo uno de los puntos de corte. HbA1C, hemoglobina glicosilada.

Sin embargo, la propuesta de la IADPSG aún no es un consenso y se requiere sea analizada, ya que con los criterios propuestos se va a incrementar el número de casos. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos ha estimado que con los nuevos criterios el 18 % de todos los embarazos estarían afectados por la DMG⁴⁷.

El tratamiento de la DMG incluye monitoreo de los niveles de glucosa, dieta, ejercicio e insulina si se requiere⁴⁸. El plan de nutrición es un recurso fundamental en el manejo de la DMG y se inicia a partir de que se confirma el diagnóstico. Las recomendaciones nutrimentales son 28 a 32 cal/kg de peso por día en el primer trimestre y 36 a 38 cal/kg por día en el segundo y tercer trimestre del embarazo, consumiendo 40 a 45 % de carbohidratos del total de calorías, 20 a 25 % de proteínas, y 30 a 40 % de grasas. Si el plan de nutrición no logra alcanzar o mantener las metas de glucemia por automonitoreo que se muestran en la Tabla 3 se recomienda la administración de insulina⁴⁹.

Tabla 3. Metas de glucemia en diabetes gestacional⁴⁹.

	Glucosa capilar mg/dL (mmol/L)	Glucosa en plasma mg/dL (mmol/L)
Antes de las comidas	≤ 95 (5.3)	≤ 105 (5.8)
1 hora después de las comidas	≤ 140 (7.8)	≤ 155 (8.6)
2 horas después de las comidas	≤ 120 (6.7)	≤ 130 (7.2)

Existen diferentes métodos para iniciar la aplicación de insulina, uno de estos consiste en calcular la dosis por kilogramos de peso ideal. Otro método se denomina escala por deslizamiento; es un método retrospectivo y consiste en aumentar la dosis de insulina a partir de la cifra previa de glucemia. Es el método más utilizado para corregir la glucemia en pacientes con diabetes, aunque no toma en cuenta el consumo de carbohidratos de la comida siguiente. El tercer método se denomina ajuste por patrones y se basa en la identificación de cifras mayores o menores que las metas de glucemia en un horario constante (patrón de hiperglucemia o de hipoglucemia), para proceder a calcular las dosis de ajuste de insulina con base en la cantidad de carbohidratos que la paciente consumirá en la comida siguiente, y de la actividad física por realizar⁵⁰.

Todos estos métodos se basan en el uso de combinaciones de insulina de acción rápida o corta, e insulinas de acción intermedia o prolongada⁵¹. La dosis de insulina de acción intermedia o prolongada suele aplicarse por la mañana, para mantener niveles basales durante el desayuno y la comida. A medida que avanza el embarazo es necesario valorar el crecimiento fetal por ultrasonido para descartar la presencia de macrosomía, y es necesario reforzar la frecuencia del automonitoreo para evitar los episodios de hipoglucemia.

Hasta la fecha, no está autorizado el uso de antidiabéticos orales en el manejo de la diabetes gestacional, aunque se han valorado en este campo desde hace muchos años. Los principales argumentos que han impedido su uso en este grupo de pacientes ha sido el riesgo de efectos fetales por el paso de estos fármacos a través de la membrana placentaria. Sin embargo, estudios recientes han

demostrado que el uso de glibenclamida y metformina pueden ser una alternativa eficaz a la aplicación de insulina⁵²⁻⁵³.

Etiología de la diabetes gestacional

El embarazo se acompaña de un desequilibrio metabólico que conduce a un estado de diabetes en aquellas mujeres genéticamente predispuestas para desarrollarla. Esta DMG se acompaña de una resistencia a la insulina crónica y es más frecuente en mujeres obesas, por lo que se ha sugerido que diversos genes y el tejido adiposo participan en el desarrollo de la DMG.

a) Aspectos genéticos

La DMG comparte características clínicas y factores de riesgo con la DM2⁵⁴⁻⁵⁵; debido a este estrecho paralelismo en trabajos recientes acerca de la etiología de la DMG se ha evaluado el papel de las variantes de genes que predisponen a la DM2⁵⁶⁻⁵⁸.

Se ha sugerido que en la DM2 diversas variantes en múltiples genes interactúan con los factores ambientales para causar la enfermedad. Los genes de susceptibilidad para la DM2 se han identificado a través de estudios de agregación familiar, de genes candidatos y de asociación del genoma completo GWA (Genome Wide Association). El conocimiento actual de los genes asociados a la DM2 explica solo del 5 al 10% de la base genética de la DM2⁵⁹.

Las variantes genéticas de riesgo para DM2 que han sido estudiadas en DMG han sido agrupadas como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Variantes genéticas evaluadas en DMG

Genes que participan en la secreción de insulina
ABCC8: proteínas del cartucho de unión a ATP, subfamilia C, miembro 8 KCNJ11: canal de potasio sensible a ATP, subfamilia J, miembro 11 UCP2: proteína desacoplante 2 ND1: parte de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria TCF7L2: factor de transcripción 7 similar al 2 WFS1: síndrome de Wolfram CDKAL1: cinasa dependiente de ciclina regulatoria de CDK5 asociada a la proteína 1 CDKN2A-CDKN2B: cinasa dependiente de ciclina inhibidora 2B, isoforma 2 SLC30A8: transportador de solutos, familia 30 (transportador de zinc), miembro 8 HHEX: homeobox expresada hematopoyeticamente
Gen de insulina y genes que participan en la señalización de insulina
INS: insulina IGF2BP2: proteína de unión 2 al factor de crecimiento similar a la insulina 2 IRS1: sustrato de receptor de insulina INSR: receptor de insulina
Genes del metabolismo de glucosa y lípidos
PPARG : receptores activados por la proliferación del peroxisoma PPARGC1: coactivador transcripcional de PPAR ADRB3: receptor beta 3 adrenérgico GLUT1: transportador de glucosa 1 ADIPOQ: adiponectina FOXC2: caja saeta C2FTO: asociado al tejido adiposo y obesidad
Genes MODY
HNF4A: factor nuclear del hepatocito 4 GCK: glucocinasa HNF1A. factor nuclear del hepatocito 1A HNF1B: factor nuclear del hepatocito 1B
Otros
MBL2: lectina de unión a manosa 2 TNF α : factor de necrosis tumoral alfa CAPN10: calpaina 10 PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno 1 RBP4: proteína transportadora del retinol

La mayoría de estos estudios se han realizado en poblaciones con ancestros europeos y pocos han evaluado asociaciones en poblaciones de alto riesgo como la amerindia, esto resalta la necesidad de extender los estudios a poblaciones diferentes, ya que aunque la variación genética a través del tiempo es menor, los grupos ancestrales que se separaron geográficamente hace muchos años pueden tener diferentes resultados.

Algunos genes han mostrado asociaciones similares en diferentes poblaciones, pero la mayoría han sido estudiados en una única población. También se han encontrado inconsistencia entre las asociaciones en diferentes poblaciones, esto se puede deber a diferencias genéticas, ambientales, de estilo de vida, al uso de distintos criterios de selección para los sujetos de estudio y al tamaño de muestra.

En uno de los estudios se analizó la combinación de los alelos de riesgo encontrando un efecto aditivo combinado de todos los alelos de riesgo de DM2; además se desarrollaron curvas ROC (receiver operating characteristics, curvas de características operativas para el receptor) para evaluar la precisión discriminativa de estas variantes génicas, encontrando que con la prueba genética se obtenía un área bajo la curva 0.62 y cuando se combinaba con edad e índice de masa corporal era de 0.73. Se encontró además la misma prevalencia de alelos de riesgo de DM2 en DMG⁵⁶.

La aplicación clínica de esta información genética es poder predecir el riesgo de DM2 (particularmente antes de la aparición de otros factores de riesgo) y el poder predecir tanto las complicaciones asociadas a la enfermedad como la respuesta al tratamiento a través de la farmacogenómica y el lograr modificar los hábitos asociados a un mayor riesgo de DM2⁵⁹. Respecto a este último punto, recientemente se ha sugerido que con la información de susceptibilidad genética se puede motivar a las personas en riesgo a modificar sus hábitos; hasta el momento no se han realizado estudios en individuos con predisposición a DM2, pero en pacientes con variantes de riesgo asociadas a Alzheimer y en pacientes

con riesgo a desarrollar hipercolesterolemia, el conocer sus resultados genéticos logró que modificaron mejor sus hábitos que los que no conocían su riesgo⁶⁰⁻⁶¹; por lo que se sugiere que el conocimiento de esta información puede tener una influencia positiva sobre la percepción de la paciente para tener un mejor control de su salud.

b) Participación del tejido adiposo

El tejido adiposo además de ser un depósito de energía en la forma de triacilglicerol, posee actividad de célula secretora y endocrina, con producción de numerosas sustancias hormonales.

Existen dos tipos de tejido adiposo. El tejido adiposo pardo o marrón que es el encargado de la termogénesis; su color se debe a la gran cantidad de hemoproteína citocromo oxidasa, y las mitocondrias que posee expresan altas cantidades de UCP (uncoupling protein), proteínas desacoplantes que producen una fosforilación oxidativa desacoplada con la consecuente disipación de energía en forma de calor⁶². El tejido adiposo blanco que es el más abundante del organismo humano adulto y por lo tanto el mayor reservorio energético (alrededor de 200.000-300.000 Kcal en el adulto no obeso), en forma de triacilglicerol, provenientes de los quilomicrones y VLDL circulantes. Debido a su amplia distribución, es un excelente aislante térmico y desempeña un papel relevante en la conservación de la temperatura corporal considerándose como el principal sistema amortiguador del balance energético.

Con el descubrimiento de su capacidad para secretar varias sustancias llamadas adipocinas de forma general, se ha revolucionado el concepto de su función biológica, consolidándose la idea de que no es sólo un órgano que almacena y moviliza energía, sino que es un tejido dinámico y regulador central del metabolismo. Es en este tejido adiposo blanco donde se manifiesta como órgano productor de sustancias con acción endocrina, paracrina y autocrina. El tejido adiposo blanco libera productos de secreción que intervienen en la regulación de

la ingestión, el gasto energético y la homeostasis de la glucosa (leptina, adiponectina, resistina, visfatina, proteína estimulante de la acilación o ASP), en la respuesta inmune-inflamatoria ($TNF\alpha$, IL-6, IL-1, proteína C reactiva, amiloide sérico A, haptoglobina, proteína 1 quimioatrayente de los monocitos), en la función vascular (angiotensinógeno, angiotensina, resistina), coagulación sanguínea (PAI-1, factor tisular), vía del complemento (adipsina), factores de crecimiento ($TGF-\beta$), en la angiogénesis (VEFG) y función reproductiva (estrógenos)⁶³⁻⁶⁴. Las principales adipocinas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales adipocinas⁶⁴.

Adiponectina	VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular)
Leptina	MCP-1 (Proteína quimioatrayente de los monocitos)
$TNF\alpha$	MIP (Proteína inflamatoria de macrófagos)
RBP4	Adipsina
Resistina	PCR (Proteína C reactiva)
Visfatina	Angiotensinógeno
Omentina	PAI-1 (Inhibidor del activador del plasminógeno)
Apelina	Factor tisular
IL-6	$TGF-\beta$ (Factor de crecimiento transformante)

El tejido adiposo, además de adipocitos, contiene una matriz de tejido conectivo (colágeno y fibras reticulares), nervios, estroma vascular, nódulos linfáticos, células inmunes (leucocitos, macrófagos), fibroblastos y preadipocitos⁶⁵.

Leptina

La leptina, hormona de 16 kDa, producto del gen *ob*, es tal vez la adipocina más estudiada hasta el momento; fue descrita inicialmente como la hormona de la obesidad porque sus niveles se correlacionan estrechamente con la cantidad de grasa corporal del individuo y con la circunferencia abdominal⁶⁶; sin embargo, con el paso del tiempo, la investigación en torno a esta hormona ha definido su

participación en gran diversidad de procesos, desde la regulación de la inmunidad hasta la modulación del eje hormonal reproductivo⁶⁷.

El receptor de la leptina es producto del gen *db* y existen al menos seis isoformas nombradas LRA-f, producto de múltiples combinaciones de diferentes segmentos del gen, siendo el LRb el único que se asocia con respuestas intracelulares. LRb activa preferentemente JAK2 (Janus kinase 2), la cual induce autofosforilación del complejo LRb-JAK2 iniciando una cascada de fosforilación en la que participan diferentes sistemas enzimáticos⁶⁸. Como todas las cinasas de tirosina, JAK2 fosforila proteínas que contienen dominios SH2, en este caso las proteínas ERK (extracellular-signal regulated kinase), las proteínas STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3) y las proteínas IRS (insulin receptor substrate), grupo de moléculas que también es regulado por la insulina. Esta confluencia de las señales susceptibles de ser activadas por leptina y por insulina, plantea un interesante caso de señalización cruzada (cross-talk). Lo que puede tener implicaciones metabólicas importantes en el contexto de la obesidad, en la que hay una hiperleptinemia por el incremento de tejido adiposo, asociada con una resistencia a la leptina, lo cual la inhabilita para ejercer su efecto inhibitor del apetito a nivel hipotalámico. LRb parece ser expresado en todos los tejidos⁶⁹, lo cual es evidencia de la importancia de la leptina como hormona reguladora de diversos procesos fisiológicos, muchos de ellos aún no comprendidos en su totalidad⁷⁰.

Adiponectina

La adiponectina es una proteína de 30 kDa, con homología estructural con el colágeno VIII y IX y el factor del complemento C1q⁷¹, sintetizada principalmente por el adipocito y con acciones metabólicas muy notorias en los tejidos, que consisten en incremento de la oxidación de ácidos grasos y reducción de la gluconeogénesis⁷². Sus acciones se realizan a través de dos receptores denominados adipoR1 y adipoR2, el primero de expresión general y el segundo

primordialmente de expresión hepática⁷³. Sus efectos están mediados por el incremento de la actividad de la PKA (proteína cinasa dependiente de AMP cíclico). La activación de la PKA induce la expresión de PPARg (peroxisome proliferator-activated receptor g)⁷⁴, así como de las enzimas de la cascada de la oxidación de ácidos grasos y de otras proteínas involucradas en la captación de glucosa, lo cual explica el incremento de la actividad de insulina inducido por esta hormona⁷⁵. Por el mismo mecanismo se produce inhibición de las enzimas de la vía de la gluconeogénesis⁷⁶.

Los niveles en plasma de la adiponectina son inversamente proporcionales a la masa de tejido adiposo y están reducidos en los pacientes con síndrome metabólico que presentan resistencia a la insulina y en DM2⁷⁷; más aún, sus niveles aumentan con el ejercicio, la pérdida de peso y la terapia con tiazolidinedionas⁷⁸. La secreción de adiponectina disminuye por efectos de insulina, leptina y citocinas proinflamatorias, lo cual podría explicar su relación con la obesidad en la cual hay hiperinsulinemia, hiperleptinemia y un estado de inflamación crónica inducida por el incremento de la masa de tejido adiposo⁷⁹.

A su vez, la adiponectina modula la producción de citocinas por parte del tejido adiposo y otras células⁸⁰. La expresión de los receptores para adiponectina también está reducida en la obesidad. La hipoadiponectinemia también es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades asociadas con el síndrome metabólico, tales como hipertensión, enfermedad coronaria y otras complicaciones micro y macrovasculares⁸¹. Diversos estudios demuestran que la adiponectina frena el proceso inflamatorio desencadenado en la aterosclerosis, disminuyendo la migración y proliferación de células inmunes y la secreción de citocinas, así como la adhesión plaquetaria y la formación de placas ateroscleróticas⁸².

Factor de necrosis tumoral alfa

El $\text{TNF}\alpha$, es una citocina proinflamatoria liberada principalmente por macrófagos y linfocitos y, aunque puede también ser liberada por el adipocito, estudios recientes demuestran que los macrófagos son los que producen la mayor parte del $\text{TNF}\alpha$ liberado en el tejido adiposo⁸³⁻⁸⁴. El $\text{TNF}\alpha$ cumple sus funciones a través de dos receptores, ambos pertenecientes a la familia de receptores tipo citocina⁸⁵. El $\text{TNF}\alpha$ está aumentado en la obesidad y se asocia con la resistencia a la insulina⁸⁶; por otra parte, sus niveles disminuyen con la pérdida de peso⁸⁷. Uno de los mecanismos por los que produce sus efectos es la fosforilación inhibitoria de IRS-1, por lo cual se impide la producción y la traslocación del transportador GLUT4⁸⁸. El $\text{TNF}\alpha$ impide también la diferenciación de los adipocitos y bloquea la absorción y el almacenamiento de ácidos grasos al disminuir la expresión y la actividad de la lipasa de lipoproteínas (LPL)⁸⁹. Asimismo, aumenta la producción de leptina, disminuye la producción de adiponectina en adipocitos y aumenta la producción de resistina en leucocitos de sangre periférica. A su vez, la adiponectina disminuye la producción de $\text{TNF}\alpha$ en adipocitos y macrófagos al inhibir el factor de transcripción NF- κ B (nuclear factor κ B) a través del PPAR γ . De igual forma, el $\text{TNF}\alpha$ promueve la infiltración de células inflamatorias en el tejido adiposo y es un factor de riesgo para aterosclerosis al aumentar la expresión de factores promotores del depósito de placa⁹⁰.

RBP4

Es un polipéptido de 21 kDa codificado en el cromosoma 10q 23-24⁹¹. Se sintetiza principalmente en el hígado y en menor proporción en el tejido adiposo, por lo que recientemente se le nombro adipocina. Sin embargo, en estados de resistencia a la insulina el tejido adiposo produce la misma cantidad que el hígado⁹².

Su estructura primaria se compone de 182 aminoácidos formando 8 cadenas β dispuestas de un modo antiparalelo unidas entre sí por puentes de hidrógeno y 2

cadena α . En su estructura secundaria, el extremo amino terminal de la proteína le hace adoptar una forma de cúpula y la presencia de una serie de aminoácidos bastante constante le confiere un dominio hidrofóbico al interior de la estructura, lo que permite alojar en su interior al trans retinol⁹³. La conformación terciaria se estabiliza mediante puentes disulfuro, adoptando una morfología de cilindro octogonal con forma de cáliz que da nombre a una superfamilia de lipoproteínas, las lipocalinas⁹⁴ (Figura 1).

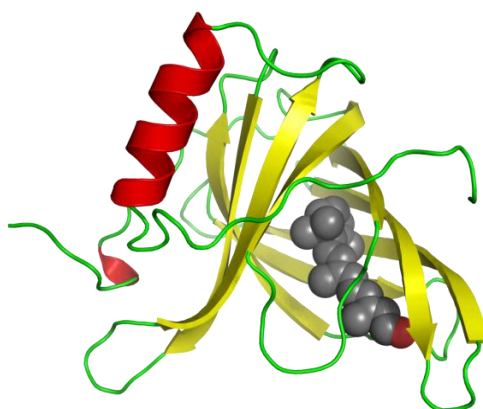


Figura 1. Estructura de RBP4. Las cadenas beta se muestran en color amarillo, la alfa hélice en color rojo y el retinol en color gris⁹⁴.

La RBP4 transporta el retinol de los almacenes hepáticos a los tejidos periféricos. La unión del retinol a la RBP4 garantiza la regulación homeostática de los niveles de retinol en plasma, los cuales son esenciales para diversos procesos fisiológicos de la visión, inmunidad, reproducción, embriogénesis y proliferación y diferenciación celular. La RBP4 circula en suero, formando un complejo 1:1:1 con el retinol y la transtirretina (TTR), una proteína transportadora de la tiroxina. La afinidad del enlace RBP4-TTR es muy fuerte, y se conoce que hay poca RBP4 libre. La unión de RBP4 con la TTR previene su filtración glomerular y catabolismo en el riñón⁹⁵. Las alteraciones en hígado y riñón influyen en el metabolismo de RBP4 a través de su acción en la síntesis o catabolismo⁹⁶.

Se han descrito dos mecanismos por los que RBP4 libera al retinol para su acción celular, el más conocido es el mecanismo de acción retinol dependiente de RBP4

en el que la liberación del retinol al citosol celular se realiza por difusión pasiva a través de la membrana celular. En el citosol, el retinol puede esterificarse por la retinol lecitil acil transferasa para su almacenamiento u oxidarse a ácido retinoico. El ácido retinoico se une a sus receptores nucleares, que se denominan RAR. Se distinguen RAR α , RAR β y RAR γ y RARx α , RARx β y RARx γ , actuando todos ellos como factores de regulación de la transcripción. De este modo algunos de estos receptores promueven y otros inhiben la expresión de diferentes genes⁹⁷.

Recientemente ha sido descrita la posibilidad de un mecanismo de acción retinol independiente, directamente derivado de la unión del RBP4 a un receptor de membrana denominado STRA6. Este receptor se expresa en músculo e hígado y no se ha encontrado en páncreas o en las células beta⁹⁸.

La identificación de RBP4 como adipocina se logró a través de los estudios en ratones knock-out del transportador de glucosa-4 (GLUT4) en tejido adiposo. En este modelo de experimentación, la disminución en la expresión de GLUT4 se acompañó de un incremento en la expresión de RBP4 en el adipocito asociada a un incremento de resistencia a la insulina en músculo e hígado⁹⁹.

Se propuso que la RBP4 producía resistencia a la insulina en músculo e hígado a través de una alteración en la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) en respuesta a la insulina en músculo, disminuyendo la utilización de glucosa en este órgano y a una modulación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) en hígado, alterando la gluconeogénesis⁹⁹. La consecuente reducción en el consumo de glucosa por el músculo y el incremento en la liberación de glucosa por el hígado provocan un incremento en los niveles de glucosa en la circulación (Figura 2).

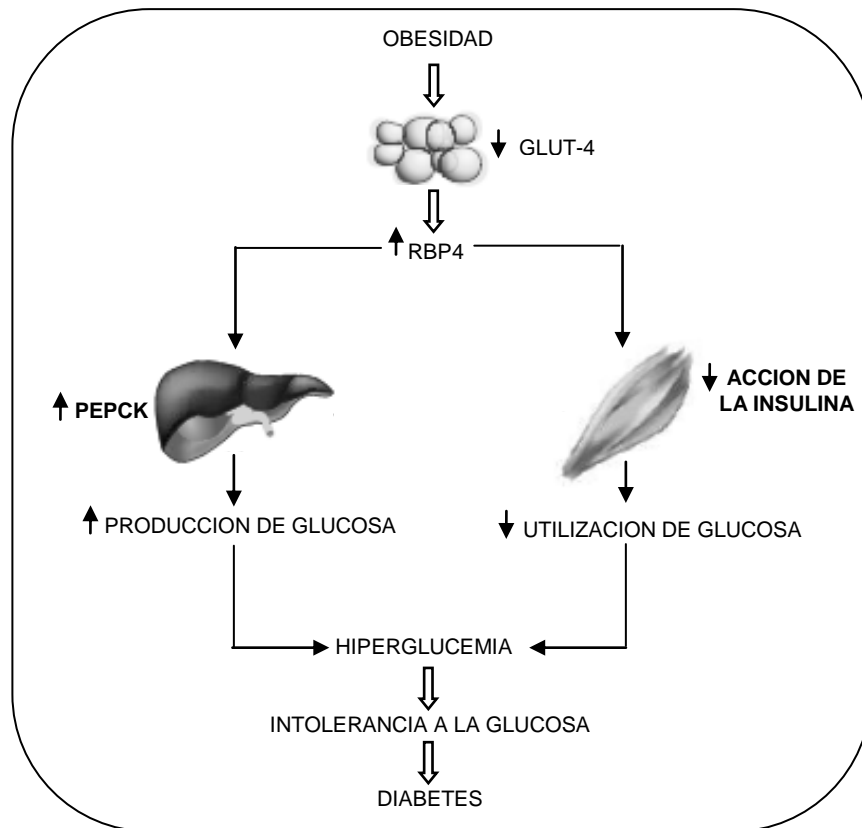


Figura 2. Mecanismo de acción de RBP4. En el tejido adiposo de personas obesas hay una disminución en la expresión de GLUT4 que se acompaña de un incremento en la secreción de RBP4. Esta proteína altera la señalización de insulina en músculo inhibiendo la utilización de glucosa e interfiere con la supresión mediada por insulina sobre la producción hepática de glucosa, originando un incremento de los niveles de glucosa⁹⁹.

Además, en los animales de experimentación se encontró que la rosiglitazona, un fármaco con propiedades sensibilizadora a la insulina, disminuía los niveles elevados de RBP4 en tejido adiposo y suero y normalizaba la sensibilidad a la insulina y que el tratamiento del ratón con el retinoide sintético fenretinida, que incrementa la excreción de RBP4 disminuyendo sus niveles en sangre, disminuía la resistencia a la insulina causada por una dieta alta en grasas⁹⁹. También se demostró que los niveles circulantes de RBP4 estaban incrementados no solo en modelos de ratones de obesidad y resistencia a la insulina, también en personas con estas condiciones. Se observó que los niveles séricos de esta proteína se encontraban elevados en pacientes con DM2 y en personas no obesas con resistencia a la insulina que aún no habían desarrollado este padecimiento,

además los niveles de RBP4 se asociaron con la adiposidad total, obesidad abdominal y resistencia a la insulina en personas aparentemente sanas¹⁰⁰.

Sin embargo, mientras que los primeros estudios apuntaban un papel importante de RBP4 en el desarrollo de diabetes, estudios recientes no han sido tan alentadores. Algunos investigadores han mostrado una asociación positiva entre RBP4 y resistencia a la insulina¹⁰¹⁻¹⁰³, mientras que otros no han demostrado dicha asociación¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Recientemente, se ha considerado que el grado de daño renal probablemente confunde cualquier relación entre RBP4 circulante y resistencia a la insulina. La disfunción glomerular en la falla crónica renal puede llevar a niveles elevados de RBP4 y la disfunción tubular puede llevar a una resorción disminuida de RBP4 y una excreción elevada de RBP4, por lo tanto compromete los niveles séricos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

A partir de la publicación de la asociación entre los niveles séricos de la RBP4 con la resistencia a la insulina y la DM2 se ha sugerido una predisposición genética. El gen de la RBP4 se localiza cerca de una región asociada a niveles elevados de glucosa de ayuno y a DM2 en Europeos-Caucásicos y en México-Americanos. Este gen se localiza entre el gen de la GPR120 (proteína G acoplada al receptor 120) y el de PDE6C (fosfodiesterasa 6C, c-GMP-específica, alfa)¹¹⁰⁻¹¹¹.

Diversos estudios han reportado variaciones del gen (SNPs: polimorfismos de un solo nucleótido) y la mayoría de estas variantes genéticas han sido localizadas en regiones no codificantes^{91,112-115} (Figura 3).

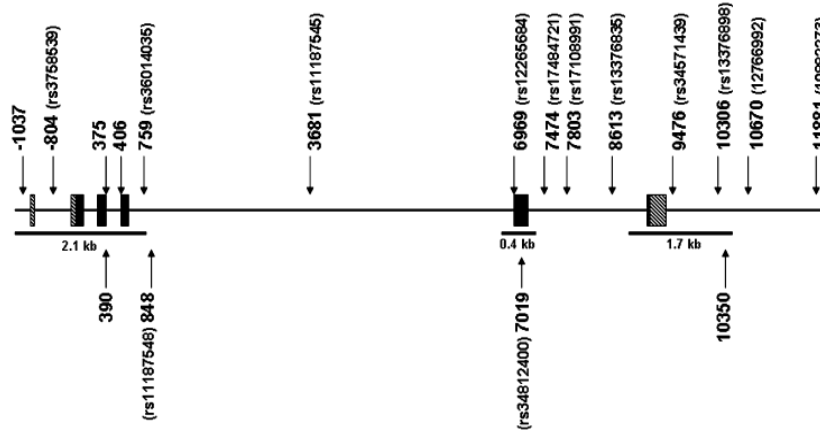


Figura 3. Mapa del gen de RBP4 con las variantes genotificadas. Las cajas representan los exones, la línea horizontal los intrones. La secuencia traducida se muestra en los exones de color negro y la no traducida en color gris. Las flechas representan la ubicación de los polimorfismos.

En algunos estudios, una única variante se ha asociado con el IMC (*rs10882283*, *rs10882273*), con los ácidos grasos libres (-804 ó *rs3758539*, *rs12265684*), con la concentración de RBP4 en circulación (-804, +2333, +5388, +8201, +8204), con el péptido C (+5388), con los niveles de insulina de ayuno (*rs10882273*, -804, +9476 ó *rs34571439*) con la resistencia a la insulina (+390 ó *rs116736522*); y en la mayoría de ellos una única variante no se ha asociado con el riesgo de DM2; sin embargo algunos haplotipos si se han asociado con este riesgo y también con los niveles de RNAm de la RBP4 en tejido adiposo visceral^{91,112-115}. Por lo que indican un papel de la variación genética de la RBP4 en la susceptibilidad a la resistencia a la insulina y a la DM2, probablemente a través de un efecto en la expresión de la proteína¹¹⁴.

De las variaciones genéticas evaluadas al momento es la *rs3758539*, que se encuentra en la región promotora del gen, con el alelo de riesgo A, la que se ha asociado a mayores niveles séricos de la proteína, y se ha encontrado que este alelo induce una mayor actividad transcripcional que el alelo G en células hepáticas (HepG2)¹¹². La mayoría de los estudios en que se reportan haplotipos del gen de RBP4 asociados a DM2 contienen esta variación y en un estudio longitudinal prospectivo el riesgo de DM2 con esta variante fue de 1.83 con un intervalo de confianza al 95% de 1.26 a 2.66¹¹⁵.

Como los niveles séricos de la RBP4 pueden estar influidos tanto por los factores genéticos como por factores ambientales⁹⁹⁻¹⁰⁰, en un estudio realizado en gemelos se evaluó la influencia de estos factores en la regulación de los niveles en plasma de la RBP4 y se encontró que en las personas jóvenes la heredabilidad o variación atribuida a factores genéticos fue del 63%; sin embargo la influencia genética disminuyó con el incremento de la edad, sugiriendo que los factores ambientales pueden ser los reguladores importantes de los niveles plasmáticos de la proteína conforme se incrementa la edad de los individuos¹¹⁶.

Como se ha señalado anteriormente, uno de los principales efectos de las adipocinas es la homeostasis metabólica ya sea sensibilizando o desensibilizando la acción de la insulina en los diferentes tejidos blanco. En la DMG en la que se presenta una mayor resistencia a la insulina comparada con mujeres con un embarazo normal, se ha propuesto una participación importante del tejido adiposo a través de la producción de estas adipocinas.

Se han encontrado mayores concentraciones de $TNF\alpha$ y leptina en el tercer trimestre de gestación de mujeres obesas con DMG comparadas con embarazadas delgadas y sin alteración en el metabolismo de glucosa¹¹⁷⁻¹¹⁸. Además, el incremento en la concentración de $TNF\alpha$ del inicio del embarazo al tercer trimestre ha sido el mejor predictor de resistencia a la insulina en el embarazo, comparado con leptina, cortisol, y otras hormonas derivadas de la placenta como lactógeno placentario, gonadotrofina coriónica, estradiol, progesterona y prolactina, independientemente de la grasa corporal. También se ha observado una disminución de adiponectina desde el primer trimestre de gestación en aquellas mujeres que desarrollaran DMG¹¹⁹⁻¹²².

Las adipocinas pueden ejercer su efecto sobre la resistencia a la insulina al interferir con la señalización de insulina en el músculo esquelético¹²³. $TNF\alpha$ puede inducir resistencia a la insulina al disminuir la fosforilación de serina de la cinasa

del receptor de insulina. Además, promueve la fosforilación de serina del sustrato de receptor de insulina-1, lo cual bloquea la unión de esta molécula al receptor de insulina¹²⁴. La adiponectina por su parte actúa sobre AMPK que es un regulador negativo de mTOR, molécula que participa en la degradación de IRS¹²⁵, por lo que en las mujeres con DMG quienes tienen menor concentración de adiponectina, se incrementa la activación de la ruta de mTOR contribuyendo a la degradación de IRS (Figura 4). La interleucina 6 también induce resistencia a la insulina al inhibir la síntesis de GLUT-4¹²⁶.

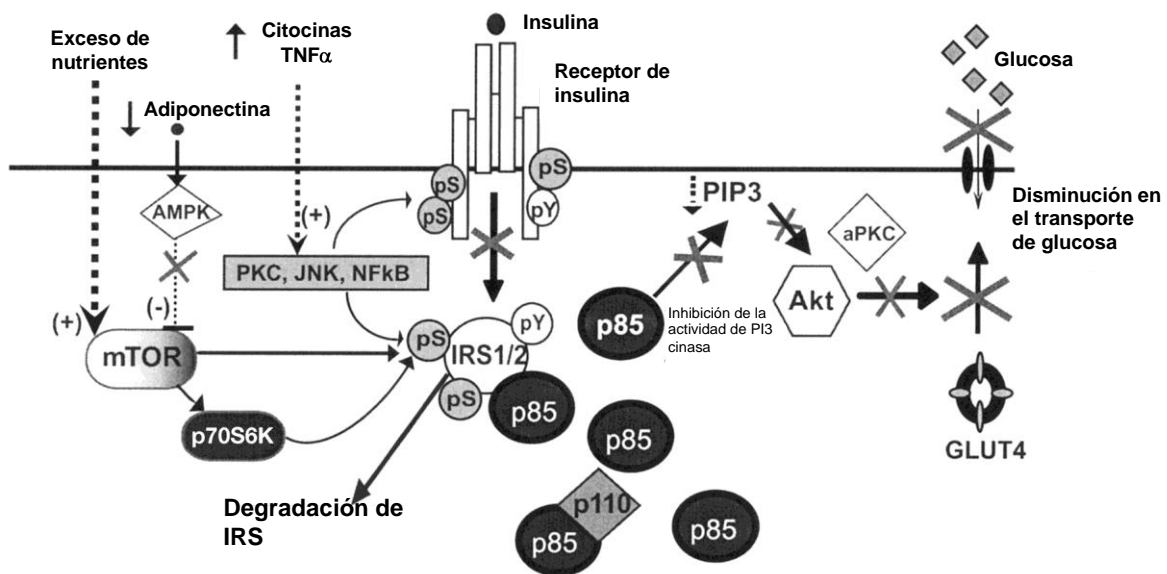


Figura 4. Efecto de $TNF\alpha$ y adiponectina en la DMG. Se muestra como el incremento de $TNF\alpha$ y la disminución de adiponectina altera la señalización de insulina, ocasionando una disminución en la actividad del GLUT4, disminuyendo la entrada de glucosa a la célula¹²⁴.

En relación a la RBP4 son pocos los estudios que la han evaluado en DMG y los resultados han sido contradictorios. Recientemente se observó un incremento de RBP4 del inicio al final del embarazo y una mayor concentración de la proteína en mujeres con DMG que en mujeres con tolerancia normal a la glucosa¹²⁷⁻¹²⁹. Sin embargo en otro estudio no se encontró dicha diferencia en los niveles de RBP4 pero si se encontró diferencia en la relación RBP4:retinol, que fue mayor en DMG y que además se asoció a los valores de glucosa de ayuno; por lo que se sugirió

que éste índice pudiera brindar mayor información que la única medición de la RBP4 para la evaluación de la homeostasis de glucosa en el embarazo¹³⁰.

En un estudio longitudinal prospectivo realizado en mujeres con DMG re-evaluadas nuevamente 8 semanas después del parto, se encontró que el principal determinante de los niveles séricos de la proteína fue el grado de severidad de intolerancia a la glucosa; ya que las mujeres con tolerancia normal tenían una menor concentración; pero conforme se avanzaba de intolerancia a DM2 los niveles se incrementaban¹³¹.

Los estudios iniciales de la RBP4 asociados a resistencia a la insulina apuntaban hacia un papel interesante de la RBP4 en el metabolismo de glucosa; se supuso que la RBP4 podría ser el puente entre obesidad y resistencia a la insulina; sin embargo actualmente el papel de la proteína en la fisiología normal y anormal permanece en discusión, por lo cual se requieren más estudios para clarificarlo.

Fisiopatología de la diabetes gestacional

El control de los niveles de glucosa en circulación depende de la acción eficiente de la insulina. El hígado, músculo y tejido adiposo son los principales sitios para las acciones metabólicas de la insulina. La insulina regula la homeostasis de glucosa disminuyendo la producción de glucosa hepática e incrementando la utilización de glucosa por el músculo esquelético y el tejido adiposo¹³².

La insulina es secretada por las células beta del páncreas directamente hacia la sangre porta hepática. Se eleva por reacción a hiperglucemia, aminoácidos y ácidos grasos no esterificados, así como a la estimulación parasimpática¹³³.

La glucosa es el principal regulador de la secreción de insulina. Las concentraciones de glucosa que pasan de 3.9 mmol/L (70 mg/100 mL) estimulan la síntesis de insulina primordialmente al intensificar la traducción y el

procesamiento de la proteína. La glucosa comienza a estimular la secreción de insulina cuando aquélla es introducida en la célula beta por el transportador de glucosa (GLUT1 en humanos, GLUT2 en roedores). La fosforilación de la glucosa por glucocinasa es el paso limitante de la velocidad que controla la secreción de insulina regulada por glucosa (Figura 5).

El metabolismo ulterior de la glucosa 6-fosfato por la vía de la glucólisis genera trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate, ATP), que inhibe la actividad de un canal de K^+ sensible a ATP. Este canal consiste en dos proteínas separadas: una es el receptor a sulfonilureas SUR, que une sulfonilureas y meglitinidas, y el otro es una proteína de canal de K^+ rectificador hacia el interior. La inhibición de este canal de K^+ induce la despolarización de la membrana de la célula beta, lo que abre canales de calcio dependientes de voltaje (con entrada consecuente de calcio en la célula) y estimula la secreción de insulina¹³⁴.

Las características de la secreción de insulina revelan un patrón pulsátil de descarga de la hormona, con pequeños incrementos de secreción de aproximadamente cada 10 min, superpuestos a oscilaciones de mayor amplitud de 80 a 150 min. La glucosa y otros secretagogos inducen grandes descargas (incrementos de cuatro a cinco veces el valor basal) de secreción de insulina que suelen durar 2 a 3 h antes de volver a la cifra de referencia¹³⁵. Los trastornos de estos patrones secretores normales constituyen uno de los signos más tempranos de disfunción de la célula beta en la diabetes mellitus¹³⁶.

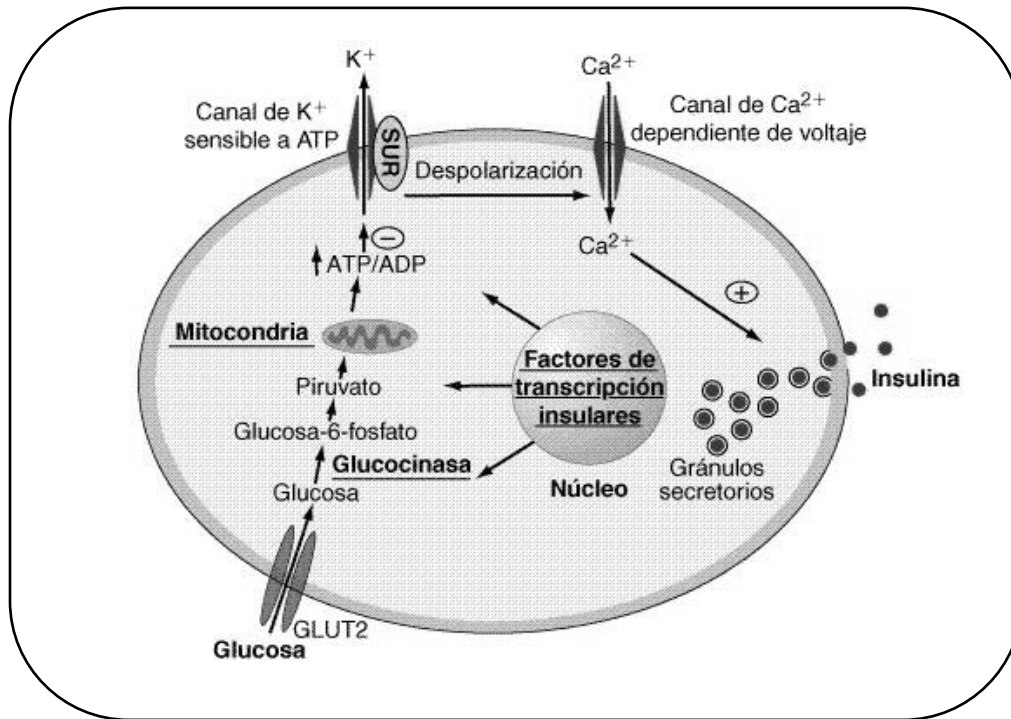


Figura 5. Secreción de insulina en la célula beta del páncreas. La glucosa difunde hacia el interior de la célula a través del transportador GLUT2. El incremento de glucosa en la célula estimula las vías metabólicas de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico, y aumenta la producción de ATP. Cuando el ATP se une al canal K_{ATP} , la compuerta que comunica con el canal se cierra, evitando la salida de K^+ . La retención de K^+ despolariza a la célula, lo que entonces produce la apertura de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje. Los iones de calcio ingresan a la célula y se unen a proteínas que inician la exocitosis de las vesículas que contienen insulina, y la insulina se libera hacia el espacio extracelular. El receptor SUR es el sitio de fijación para fármacos que actúan como secretagogos de la insulina. SUR, receptor de sulfonilurea (sulfonilurea receptor); ATP, trifosfato de adenosina; ADP, difosfato de adenosina¹³⁴.

La insulina ejerce diversos efectos en el metabolismo¹³⁷ (Tabla 6).

Tabla 6. Efectos de la insulina¹³⁷.

En el metabolismo de carbohidratos
Aumenta la rapidez de transporte de glucosa a través de la membrana celular en el tejido adiposo y en el músculo
Aumenta la tasa de glucólisis en el tejido muscular y adiposo
Estimula la tasa de síntesis de glucógeno en diversos tejidos, como tejido adiposo, músculo e hígado. También disminuye la tasa de degradación de glucógeno en músculo e hígado
Inhibe la tasa de glucogenolisis y gluconeogénesis
En el metabolismo de lípidos
Inhibe la tasa de lipolisis en tejido adiposo
Estimula la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol en tejido adiposo e hígado
Aumenta la tasa de formación de lipoproteína de muy baja densidad en hígado
Aumenta la actividad de la lipoproteinlipasa en el tejido adiposo, lo cual incrementa la captación de triglicéridos de la sangre hacia el tejido adiposo
Disminuye la tasa de oxidación de ácidos grasos en músculo e hígado
En el metabolismo de proteínas
Aumenta la rapidez de transporte de algunos aminoácidos hacia músculo, tejido adiposo, hígado y otras células
Incrementa la tasa de síntesis de proteína en músculo, tejido adiposo e hígado
Reduce la tasa de degradación de proteína en músculo

Los efectos de la insulina en el metabolismo de la glucosa son inmediatos; se presentan en un lapso de pocos segundos a minutos. Los efectos intermedios y a largo plazo de la insulina en las células incluyen regulación de la captación de iones y aminoácidos, síntesis y degradación de proteína, transcripción génica y

recambio de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), así como proliferación y diferenciación celulares.

La acción de la insulina inicia cuando se une a su receptor específico en la superficie celular. El receptor de insulina es una glucoproteína transmembrana que consta de dos subunidades alfa (135 kDa) y dos subunidades beta (95 kDa) ligadas en forma covalente a través de enlaces de disulfuro para formar un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$. La subunidad alfa es completamente extracelular y contiene los sitios para la fijación de la insulina, mientras que la subunidad beta tiene una pequeña porción extracelular, un dominio transmembrana y una actividad de cinasa de tirosina intracelular regulada por insulina¹³⁸.

La unión de insulina a su receptor induce un cambio conformacional en el receptor señalizando el “encendido” de la cinasa de tirosina de la subunidad β , de tal manera que el receptor activado se autofosforila y, a su vez, fosforila varias proteínas en secuencia, las cuales inducen todos los efectos celulares de la insulina. Las principales proteínas fosforiladas por el receptor son las IRS (insulin receptor substrate, sustrato de receptor de insulina), de las cuales se han descrito cuatro, con diferente distribución tisular. Estas IRS, a su vez, activan otras proteínas entre las cuales se incluyen una que es homóloga del colágeno (SHC), el Gab 1 (proteína asociada al receptor del factor de crecimiento Grb2), la subunidad reguladora (p85) del fosfatidilinositol-3-cinasa tipo 1 (PI3K), las dos isoformas de proteincinasa C ($PKC\gamma$ y $PKC\zeta$) y la cinasa B de proteína (PKB/Akt) que desencadenan una cascada de eventos moleculares mitogénos y metabólicos, incluyendo, entre otros, la translocación de las vesículas intracelulares que contienen al transportador de glucosa GLUT4¹³⁹. Esta exocitosis de las vesículas incrementa momentáneamente el número de GLUT4 en la membrana del miocito o del adipocito y por consiguiente la entrada de glucosa a estas células (Figura 5). Cuando el estímulo cesa se desencadena la endocitosis, la cual involucra la formación de trisqueliones de clatrina y la participación del citoesqueleto celular¹⁴⁰⁻¹⁴¹.

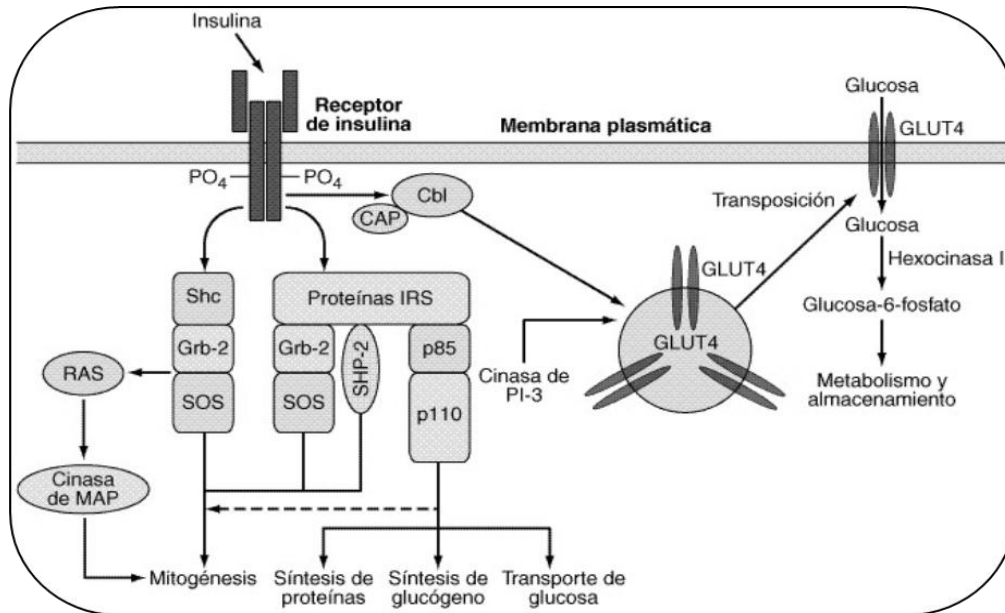


Figura 6. Esquema de la señalización de insulina. La insulina que se fija a su receptor estimula la actividad intrínseca de cinasa de tirosina, lo que da por resultado autofosforilación del receptor y reclutamiento de moléculas de señalización intracelulares, como los sustratos del receptor de insulina (insulin receptor substrates, IRS). Estas proteínas adaptadoras y otras inician una cascada compleja de reacciones de fosforilación y desfosforilación, que en último término provocan los amplios efectos metabólicos y mitógenos de la insulina¹³⁹.

En la diabetes gestacional el paso inicial en la señalización del receptor de insulina esta alterado. Se ha observado una menor fosforilación de tirosina del receptor comparado con mujeres con tolerancia normal a la glucosa en el embarazo. Además se ha encontrado un incremento en la fosforilación de serina del IRS1, lo cual disminuye la asociación del IRS1 al receptor de insulina¹⁴²⁻¹⁴⁴. Estas alteraciones se han asociado a una disminución en la traslocación de GLUT4 y a un consecuente incremento de la resistencia a la insulina principalmente en el tejido adiposo¹⁴⁵.

Esta resistencia a los efectos de la insulina en la captación de glucosa y en la supresión de ácidos grasos se acompaña de un decremento en la capacidad compensatoria de las células beta, se ha determinado que la función de la célula beta está disminuida en un 41% durante el embarazo, y en un 50% en el posparto de mujeres con DMG¹⁴⁶. Los estudios acerca de que la obesidad y embarazos adicionales favorecen la aparición de diabetes en mujeres con antecedente de

DMG sugieren que su defecto de células beta puede empeorar con la resistencia a la insulina¹⁴⁷. No se han identificado con claridad los determinantes del efecto en la célula beta, pero se ha sugerido que la exposición crónica a concentraciones altas de ácidos grasos podría ser un factor contribuyente a la disfunción de las células beta en presencia de resistencia a la insulina¹⁴⁸⁻¹⁴⁹.

Evaluaciones postparto en mujeres con DMG

La mayoría de las mujeres que cursaron con DMG tienen tolerancia normal a la glucosa en el posparto; pero el riesgo de padecer alteraciones en la tolerancia a la glucosa y DM2 aumenta considerablemente, el riesgo reportado es de 17% a 63% después de un periodo de 5 a 16 años del embarazo, dependiendo del grupo étnico y de otros factores de riesgo¹⁵⁰. En un artículo reciente de revisión sistemática y meta-análisis se evaluó la fuerza de asociación entre DMG y DM2 y se describió que el riesgo de DM2 en mujeres que cursaron con DMG comparadas con mujeres que cursaron con tolerancia normal a la glucosa en el embarazo es de 7.43 con un intervalo de confianza de 4.79 a 11.51¹⁵¹. Cabe mencionar que en esta revisión y meta-análisis se incluyó la cohorte de mayor tamaño de muestra (65,9164 mujeres; 9502 casos de DM2) que es en la que se ha reportado el mayor riesgo de DM2 (RR=12.6; IC95% 12-19)¹⁵¹.

Con estos resultados se recomienda el uso de dietas adecuadas, cambios de estilos de vida e intervenciones farmacológicas que puedan prevenir o retardar el inicio de DM2 en mujeres afectadas¹⁵².

Además, la incidencia de DMG y DM2 se está incrementando alrededor del mundo, con altos costos económicos para el cuidado de la salud.

La Asociación Americana de Diabetes recomienda evaluar nuevamente a las mujeres que cursaron con DMG después de por lo menos 6 semanas de concluida la gestación¹⁵³. Sugiere que la clasificación del estado glucémico se realice de

acuerdo a las guías del “Reporte del Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes mellitus” ¹⁵³(Tabla 7).

Tabla 7. Criterios para el diagnóstico de DM2¹⁵³.

Normoglucemia	IFG e IGT	DM2*
FPG <100 mg/dL	FPG >100 mg/dL y <125 mg/dL (IFG)	FPG ≥ 126 mg/dL
2h PG < 140 mg/dL	2h PG >140 mg/dL y < 199 mg/dL (IGT)	2h PG ≥ 200 mg/dL y Síntomas de DM2 y glucosa casual > 200 mg/dL
A1C < 5.6%	A1C 5.7-6.4%	A1C ≥6.5%

FPG: glucosa plasmática de ayuno (el ayuno se define como el no ingerir calorías durante por lo menos 8 horas; 2h PG, 2 horas posteriores a una carga de glucosa de 75 g disuelta en agua; A1C, hemoglobina glicosilada; FPG, glucosa de ayuno alterada; IGT intolerancia a la glucosa. *El diagnóstico de DM2 debe ser confirmado con la toma de muestra en otro día¹⁵³.

Si los valores de glucosa a las 6 semanas son normales, se recomienda la re-evaluación de la glucosa cada 3 años. Las mujeres con glucosa de ayuno alterada o con intolerancia a la glucosa deben ser evaluadas anualmente; estas pacientes deben recibir una dieta adecuada, reduciendo el consumo de carbohidratos y se les debe recomendar el hacer ejercicio de manera regular por su riesgo elevado de desarrollar DM2. Se recomienda tomar en cuenta el grupo étnico que también podría determinar el nivel de progresión de la enfermedad¹⁵⁴.

La Asociación también recomienda que todas las mujeres que cursaron con DMG deben ser motivadas a que modifiquen sus estilos de vida que les permitan disminuir la resistencia a la insulina, como son: mantenimiento del peso adecuado y la realización de ejercicio. Recomienda además que se deba evitar en lo posible el uso de medicamentos que empeoren la resistencia a la insulina (glucocorticoides). Se les debe insistir en que acudan al médico si presentan síntomas sugestivos de hiperglucemia. Además se les debe insistir en la

necesidad de planificación familiar para asegurar una regulación de glucosa óptima antes del inicio de un futuro embarazo¹⁵⁴.

A pesar de las recomendaciones descritas previamente, se ha reportado que la tasa de reevaluación de la glucosa en pacientes que cursaron con DMG es muy baja y se ha determinado que los predictores de la reevaluación postparto son edad, grupo étnico, nivel educativo, diagnóstico temprano de DMG, administración de insulina durante el embarazo, obesidad y paridad¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Estos estudios han destacado que ni los médicos ni las pacientes dan la importancia pertinente a la DMG como factor de riesgo para DM2; por lo que la oportunidad de promover la salud en estas pacientes y de esta forma prevenir la DM2 está fallando.

Se debe recordar que además, la identificación temprana y el tratamiento adecuado podrían ayudar a reducir la enfermedad cardiovascular y renal prematura en estas pacientes y tomar en cuenta que la realización de estas re-evaluaciones es de bajo costo.

La resolución de los cambios metabólicos después del embarazo podría brindar una oportunidad para probar la efectividad de las intervenciones para la prevención primaria de DM2 con cambios en la dieta, estilos de vida y tratamientos farmacológicos. La efectividad y costo efectividad de estas intervenciones deben ser evaluadas en ensayos clínicos y de ser adecuadas tendrían un efecto importante en la salud de las mujeres.

Riesgos en el hijo de madre con DMG

Durante la gestación, la mezcla de nutrientes contenida en el plasma materno determina en alto grado el ambiente metabólico del feto en desarrollo. La glucosa fetal procede totalmente de la madre a través de la circulación placentaria, la glucosa atraviesa la placenta por un sistema de difusión facilitada¹⁵⁸. La placenta

tiene altas concentraciones de moléculas de transporte de glucosa independientes de insulina GLUT-1 y GLUT-3 que participan en el transporte facilitado de glucosa de madre a feto¹⁵⁹. La tasa de transporte por estas sustancias es proporcional a la concentración de glucosa en circulación, de manera que su aumento o disminución producen cambios paralelos en el aporte de glucosa al feto. El GLUT1 es el principal transportador de glucosa presente en el tejido vellosos placentario, el cual se encuentra en su mayoría en el sincitiotrofoblasto. La distribución del GLUT1 dentro de éste es asimétrica, con un mayor grado de expresión en las microvellosidades que en la membrana basal¹⁵⁹.

En diabéticas pregestacionales y en DMG se han observado cambios en GLUT-1, pero no en GLUT-3. Se ha observado un aumento significativo de la presencia de GLUT-1 en la membrana basal y en la actividad del transporte de glucosa de la membrana sincitial basal por el estímulo de IGF-1¹⁶⁰⁻¹⁶¹. Este estímulo positivo, el cual aumenta la presencia de transportadores de glucosa en la membrana basal puede persistir el incremento en el nivel de transporte de glucosa y la producción de factores de crecimiento, llevando a la alteración sostenida del eje de crecimiento fetal.

Los periodos de hiperglucemia materna conducen a hiperglucemia fetal. Si estos niveles se mantienen persistentemente elevados, estimulan al páncreas fetal¹⁶². Los islotes de Langerhans se diferencian durante las semanas 10 a 11 de desarrollo y, según estudios realizados con tejidos pancreáticos fetales humanos in vitro, empiezan a secretar insulina por reacción a nutrimentos desde las 11 a 15 semanas del desarrollo¹⁶³. Las respuestas de insulina a la glucosa maduran lentamente en el embarazo normal y se mantienen relativamente bajas durante el periodo neonatal temprano; sin embargo cuando hay exposición fetal a hiperglucemia se promueve: la proliferación de los islotes, mayor secreción de insulina e hiperplasia de los islotes pancreáticos, lo que origina un crecimiento somático excesivo¹⁶⁴.

La exposición a diabetes durante la gestación tiene consecuencias a largo plazo en los hijos; la descendencia tiene mayor peso para la edad gestacional y talla que la de aquellas mujeres no diabéticas de edad e índice de masa corporal similares¹⁶⁵. Esta obesidad neonatal crea alteraciones, que al parecer, los hijos de mujeres diabéticas son incapaces de superar. Conforme avanzan en su edad los hijos de las diabéticas tienen mayor prevalencia de obesidad que los de madres sin alteraciones en el metabolismo de glucosa. De manera similar, la descendencia de mujeres con DMG tiene concentraciones más elevadas en las curvas de tolerancia a la glucosa y una mayor prevalencia de DM2 que sus contrapartes¹⁶⁶⁻¹⁶⁷.

El efecto a largo plazo del ambiente intrauterino sobre el desarrollo antropomórfico y metabólico de la descendencia se ha explicado a través de mecanismos fisiológicos y recientemente por modificaciones epigenéticas¹⁶⁸. Se ha propuesto que el ambiente en el que se desarrolla el feto actúa a través de un proceso epigenético ejerciendo una fuerte influencia sobre la composición corporal y la función metabólica postnatal, esto basado en la observación de que ciertas mediciones epigenéticas evaluadas al momento del nacimiento predicen adiposidad en la etapa prepuberal. Por ello se menciona que las mediciones epigenéticas al momento del nacimiento pueden tener un valor pronóstico y podrían ser de utilidad para monitorear programas que optimicen la salud materna y el estado nutricional para beneficios a largo plazo en la descendencia. Sin embargo, la evaluación de esta posibilidad requerirá de futuras investigaciones.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DMG se considera como un factor de riesgo importante para el desarrollo de DM2. Se ha intentado encontrar algún marcador bioquímico que aumente el valor predictivo. Existen estudios a este respecto con la determinación de diversas adipocinas como adiponectina, leptina y $TNF\alpha$. Se desconoce si la adipocina RBP4, la cual fue descrita recientemente, pudiera tener una participación en la diabetes gestacional y en el riesgo a desarrollar DM2.

HIPOTESIS

Una mayor concentración de RBP4 se asocia con la resistencia a la insulina en la DMG lo que podría indicar un mayor riesgo para el desarrollo de DM2. A su vez el incremento en RBP4 circulante se asocia con los polimorfismos *rs3758539*, *rs34571439* y *rs116736522* del gen de esta proteína.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la asociación entre las adipocinas: $TNF\alpha$, adiponectina, leptina, RBP4, y los polimorfismos de RBP4 *rs3758539*, *rs34571439* y *rs116736522* con la resistencia a la insulina durante el embarazo y posparto en mujeres con DMG.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la asociación entre $TNF\alpha$, adiponectina, leptina y RBP4 con resistencia a la insulina en el tercer trimestre de gestación y a las 6 semanas y 6 meses postparto en mujeres con DMG y mujeres con embarazo normal.

Determinar la asociación entre los polimorfismos de RBP4 *rs3758539*, *rs34571439* y *rs116736522* con la resistencia a la insulina durante el embarazo y posparto en mujeres con DMG y mujeres con embarazo normal.

Determinar la incidencia de alteración en la tolerancia a la glucosa durante el primer año postparto de mujeres con DMG.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio prospectivo en 100 mujeres con DMG y 100 embarazadas sanas. La diabetes gestacional se diagnosticó por una prueba de tolerancia oral a la glucosa de 2 h con 75 g de glucosa a las 24-28 semanas de gestación, los valores de corte fueron de $> 5,2$ mmol / L en ayunas, $> 10,0$ mmol /L al 1-h, y $> 7,8$ mmol / L en 2 h¹⁵⁴. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 La Raza, IMSS (R-2007-3504-12) y todas las participantes dieron su consentimiento informado por escrito. Las mujeres con hipertensión arterial, enfermedad renal, enfermedad hepática, trastornos de la tiroides, o enfermedades crónicas fueron excluidas. Por la mañana, en la semana gestacional 30 y antes del inicio de la terapia de insulina en las mujeres con diabetes gestacional tratadas con insulina, se obtuvieron las medidas antropométricas de peso y talla y se tomaron muestras de sangre.

Se les evaluó la presión arterial, y se les realizó una historia clínica para conocer si tenían familiares con diabetes y sus antecedentes obstétricos y médicos. Se les solicitó a las participantes del estudio que regresaran a evaluación de la tolerancia a la glucosa por medio de una prueba de 2 h con 75 g de glucosa a las 6 semanas y 6 meses después del alumbramiento y únicamente a las que tuvieron DMG se les solicito que regresaran al año.

A través de los expedientes de las pacientes se obtuvieron los datos del recién nacido y en sus evaluaciones postparto se les hizo la invitación para que acudieran con sus hijos para sus mediciones antropométricas como parte de una colaboración con el proyecto “Seguimiento a largo plazo del crecimiento y desarrollo del recién nacido, hijo de madre con diabetes tipo 2”. El peso al

nacimiento se clasifico en bajo, adecuado o alto de acuerdo a tablas de percentiles de Lubchenco, en niños menores de 2 años se utilizó el índice de peso para la talla y en mayores a dos años el IMC¹⁶⁹.

Mediciones de laboratorio

Se obtuvieron muestras de sangre venosa para los análisis bioquímicos. Por la mañana entre las 7:30 y 8:30 AM y después de un ayuno de 10 horas, se tomó sangre de una vena antecubital. Las muestras fueron centrifugadas a 400 g durante 15 minutos y se hicieron alícuotas que fueron conservadas a -70C hasta la realización de los inmunoensayos. El mismo día de la toma de muestra se realizó la medición de glucosa, triglicéridos y colesterol total por ensayos enzimáticos con un analizador Roche Cobas Mira usando kits comerciales (Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA). Insulina, leptina, adiponectina, y RBP4 se evaluaron por radioinmunoanálisis (RIA); la insulina se midió con reactivos de Siemens Healthcare Diagnostics (Los Angeles, CA, USA), la sensibilidad fue 8.3 pmol/L y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo (CVs) fueron 5.2 and 7.3% respectivamente. Leptina y adiponectina se cuantificaron usando kits comerciales de Millipore Co. (Billerica, MA, USA). La sensibilidad de adiponectina fue 1ng/mL y los CVs fueron 3.9 and 8.5%; la sensibilidad de leptina fue 0.5 ng/mL y los CVs fueron 5 and 4.5%. RBP4 se determinó usando reactivos de Phoenix Pharmaceuticals (Belmont CA, USA); la sensibilidad fue de 6.4 pg/mL y los CVs fueron 4.9 and 8.3%. TNF α se determinó por un ensayo quimioluminiscente (Immulite Analyzer, Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), la sensibilidad fue 1.7 pg/mL, y los CVs fueron 3.2 y 5.2%. El índice de masa corporal se calculó como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros. El grado de resistencia a la insulina se estimó por el modelo de homeostasis para la evaluación de resistencia a la insulina (HOMA-IR) con la fórmula: glucosa de ayuno (mmol/L) x insulina de ayuno (mU/L)/22.5¹⁷⁰.

Evaluación de polimorfismos de RBP4

El DNA genómico se obtuvo de sangre anticoagulada usando los kits comerciales GFX Genomic Blood DNA Purification de Amersham Biosciences y se conservó a -70C . La genotipificación de los SNPs se realizó usando sondas TaqMan de Applied Biosystems. Las reacciones de genotipificación se desarrollaron de acuerdo al protocolo del ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov–Smirnov para evaluar la distribución de los datos y se eligió realizar análisis no paramétricos. Para comparar diferencias entre los grupos se usaron las pruebas de Friedman y de Kruskal-Wallis. La corrección por variables confusoras se realizó con un análisis de covarianza. Para evaluar correlaciones se utilizó la prueba de Spearman, y se realizó un análisis de correlación parcial para ajustar por edad e IMC. Se usaron modelos de regresión múltiple para evaluar la influencia de las adipocinas sobre la resistencia a la insulina, considerando factores asociados con esta variable como la edad y el IMC. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Statistica versión 8 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Se considero significancia estadística un valor de $p < 0.05$.

En el análisis de los polimorfismos se evaluó la D' de Lewontin y el coeficiente de desequilibrio de unión r^2 entre todos los pares de loci bialélicos. El análisis de haplotipos se hizo usando el algoritmo desarrollado por el Instituto Broad, Haploview¹⁷¹. La distribución de los alelos de los polimorfismos entre las pacientes con DMG y las de embarazo normal, se evaluó con modelos de χ^2 calculando la razón de momios (ORs), los intervalos de confianza al 95% y los valores de p correspondientes. Se hicieron regresiones múltiples para evaluar asociaciones de fenotipos relacionados con la DMG ajustando por edad e IMC como covariables.

Además se hizo un análisis de regresión logística para estimar si la edad, el IMC, y el genotipo de RBP4 eran factores pronósticos de la DMG.

RESULTADOS

Las características de las participantes previas al embarazo se muestran en la Tabla 8. Las mujeres que desarrollaron DMG eran de mayor edad y peso que las mujeres del grupo control, además presentaron varios factores de riesgo para la aparición de DMG.

Tabla 8. Características previas a la gestación.

	Embarazo normal (n=100)	DMG (n=100)
Edad (años)	24.8 ± 6.4	31.9 ± 5.6*
Peso (kg)	58.1 ± 11.4	72.7 ± 13.6*
IMC (kg/m ²)	24.0 ± 4.1	30.1 ± 4.8*
Talla (m)	1.54 ± 0.07	1.55 ± 0.06
Multigesta (%)	72.0	92.7*
Macrosomías (%)	0	15.0*
Obitos (%)	0	2*
Diabetes en familiares directos (%)	24.2	64.0*
DMG previa (%)	0	39.0*
Tabaquismo (%)	25.0	26.0

Los datos se muestran como M ± DE
*p<0.05

a) Evaluación de adipocinas

Durante el embarazo

Las características de las participantes en el tercer trimestre de gestación se muestran en la Tabla 9. Todas las mujeres con DMG fueron controladas con dieta de 1800 kcal y 37 pacientes requirieron la administración de insulina. La Figura 7 ilustra que la insulina de ayuno y el valor de HOMA-IR fueron mayores en DMG; la diferencia permaneció después de los ajustes por peso y edad. En contraste, las concentraciones de las adipocinas fueron similares en los dos grupos (Figura 8). La resistencia a la insulina se asoció con el IMC ($r=0.65$, $p<0.05$; $r=0.43$, $p<0.05$) en los dos grupos y con triglicéridos ($r=0.21$, $p<0.05$) en el grupo control.

La relación entre las adipocinas y la resistencia a la insulina fue diferente entre los 2 grupos, siendo únicamente significativa en el grupo de embarazo normal. Se encontró una asociación positiva entre los valores séricos de RBP4 y la insulina de ayuno ($r= 0.48$, $p<0.05$) y el valor de HOMA-IR ($r= 0.47$, $p<0.05$). Estas asociaciones permanecieron significativas aun después del ajuste por el peso y la edad. En el análisis de regresión múltiple incluyendo covariables, la concentración de RBP4 fue un predictor estadísticamente significativo de HOMA-IR ($\beta=0.52$, $p<0.001$) y de los valores de insulina ($\beta=0.51$, $p<0.05$).

Tabla 9. Características generales de las participantes en la semana gestacional 30.

	Control	DMG
Peso (kg)	67.8 ± 14.1	79.0 ± 12.8*
Talla (m)	1.55 ± 0.07	1.55 ± 0.06
IMC (kg/m ²)	28.4 ± 7.3	30.2 ± 4.9*
Ganancia de peso (kg)	8.5 ± 4.2	6.2 ± 5.9
Presión arterial sistólica (mmHg)	104.6 ± 10.7	108.6 ± 14.0*
Presión arterial diastólica (mmHg)	66.8 ± 8.2	71.8 ± 6.6*
Insulina (pmol/l)	50.7 ± 33.3	61.1 ± 40.3*
Glucosa (mmol/l)	3.89 ± 0.61	5.38 ± 1.18*
HOMA-IR	1.3 ± 0.95	2.3 ± 2.3*
Triglicéridos (mmol/l)	2.65 ± 1.11	3.25 ± 1.15*
Colesterol (mmol/l)	6.86 ± 1.57	6.89 ± 1.37
Adiponectina (ng/mL)	12.0 ± 6.0	8.6 ± 4.0
Leptina (ng/mL)	23.3 ± 12.0	22.7 ± 4.9
RBP4 (µg/mL)	5.3 ± 1.76	4.7 ± 1.9
TNF α (pg/mL)	10.1 ± 3.2	10.4 ± 2.1

Los datos son M ± DE. *p <0.05

IMC: Índice de masa corporal; HOMA-IR: resistencia a la insulina evaluada por el modelo HOMA

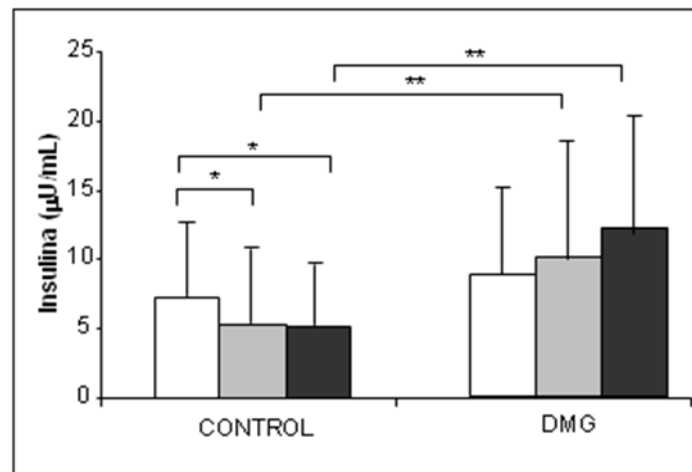
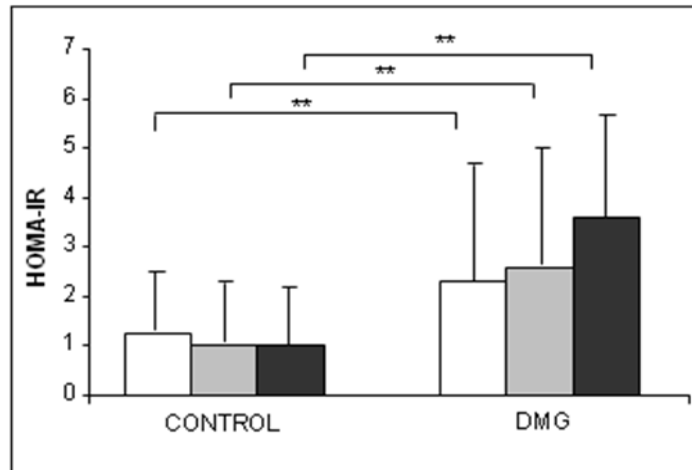


Figura 7. HOMA-IR y concentraciones de insulina en el tercer trimestre de gestación (30 semanas: □); 6 semanas ■, y 6 meses postparto ■ en mujeres con tolerancia normal a la glucosa y mujeres con DMG. Los datos se presentan como $M \pm DE$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

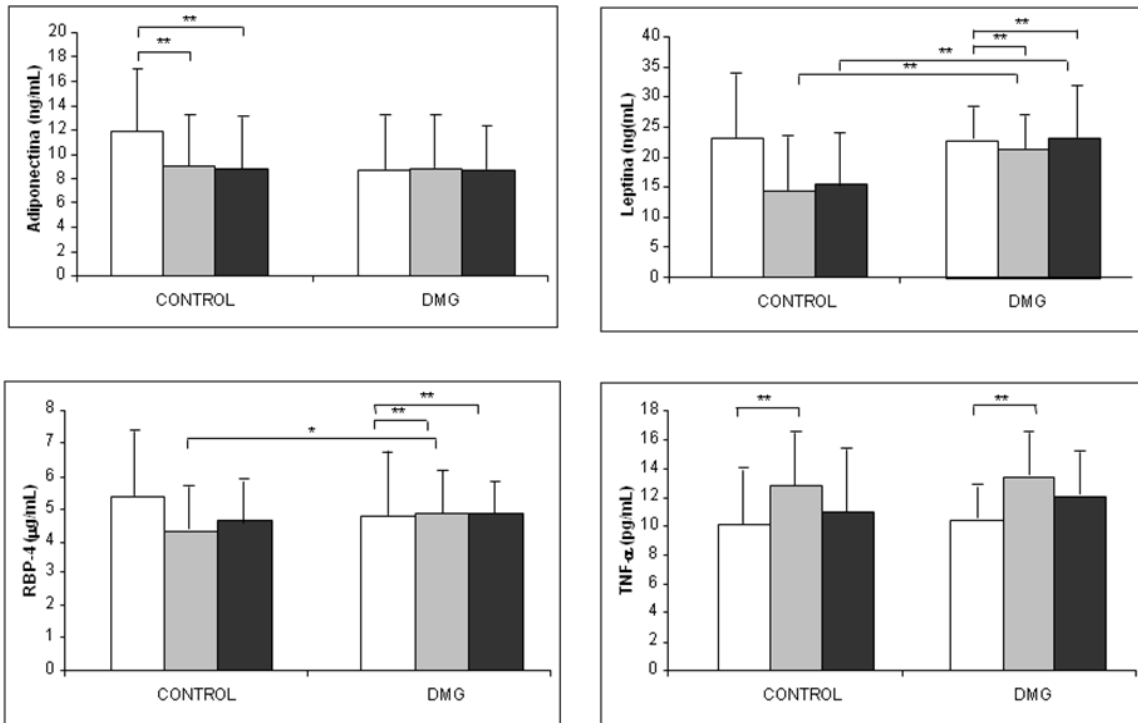


Figura 8. Concentración de adipocinas durante el tercer trimestre de gestación (30 semanas; □); 6 semanas ■, y 6 meses postparto ■ en mujeres con tolerancia normal a la glucosa y con DMG. Los datos se presentan como $M \pm DE$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Período postparto

Después del alumbramiento, los triglicéridos y el colesterol total disminuyeron significativamente y los niveles de glucosa incrementaron en ambos grupos. En el grupo con embarazo normal disminuyó el IMC. Las mujeres con diabetes gestacional previa tuvieron mayor IMC, glucosa de ayuno, colesterol total y triglicéridos que el grupo control (Tabla 10). El valor de HOMA-IR permaneció elevado y fue mayor en las mujeres con DMG previa que en grupo control durante el seguimiento (Figura 7). La resistencia a la insulina se asoció con el IMC ($r=0.43$, $p<0.05$; $r=0.56$, $p<0.05$), edad ($r=0.24$, $p<0.05$; $r=0.32$, $p<0.05$) y triglicéridos ($r=0.41$, $p<0.05$; $r=0.45$, $p<0.05$) en los dos grupos. Además, en las mujeres con DMG previa los valores de $TNF\alpha$ incrementaron significativamente, mientras que no se observó cambio en leptina, adiponectina y RBP4. Por otro lado, las concentraciones de leptina, adiponectina y RBP4 disminuyeron después del alumbramiento en el grupo control, mientras que los valores de $TNF\alpha$ se incrementaron significativamente; además la resistencia a la insulina también disminuyó (Figura 8). Se encontró una asociación entre RBP4 y los valores de insulina ($r=0.52$, $p<0.05$) y HOMA-IR ($r=0.51$, $p<0.05$). Además, el cambio de RBP4, del embarazo a las 6 semanas postparto se asoció positivamente al cambio en los niveles de insulina ($r=0.35$, $p<0.05$) y de HOMA-IR ($r=0.32$, $p<0.05$). Usando el análisis de regresión múltiple, se encontró a RBP4 como un predictor independiente de resistencia a la insulina ($\beta=0.49$, $p=0.01$).

Comparando los dos grupos, los niveles de leptina permanecieron elevados en las mujeres con DMG previa y se observó una asociación positiva entre la concentración de leptina e insulina ($r=0.49$, $p<0.05$); sin embargo, esta relación no fue significativa después del ajuste por el peso y la edad.

Al hacer el análisis de correlación entre las adipocinas se encontró una asociación entre RBP4 y $TNF\alpha$ ($r=-0.188$, $p<0.05$), RBP4 y leptina ($r=0.21$, $p<0.05$), $TNF\alpha$ y adiponectina ($r=-0.23$, $p<0.05$).

Tabla 10. Variables clínicas en pacientes con y sin DMG, 6 semanas y 6 meses después del alumbramiento.

	Grupo control		Diabetes gestacional	
	6 semanas	6 meses	6 semanas	6 meses
Peso (kg)	61.3±10.5*	59.9±9.7*	72.7±12.6 [†]	73.5±13.5 [†]
IMC (kg/m ²)	25.6±4.5*	24.89±4.2*	30.08±4.2 [†]	30.4±5.2 [†]
Lactancia (%)	87.9	58.7	86.2	50.0
Glucosa (mmol/L)	4.22±0.54*	4.37±0.58*	6.05±2.01 [†]	7.3±3.5* [†]
Triglicéridos (mmol/L)	1.73±0.92*	1.64±1.01*	2.31±1.09* [†]	2.21±1.22* [†]
Colesterol (mmol/L)	5.63±1.29*	5.23±1.15*	6.05±1.27	5.96±1.68* [†]

Los datos se muestran como M ± DE

*p<0.05 vs durante el embarazo; [†]p<0.05 vs grupo control

IMC: Índice de masa corporal

b) Polimorfismos de RBP4

Los genotipos y la frecuencia de los alelos se muestran en la tabla 11. Todas las variantes se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y no se observó diferencia significativa en la frecuencia de los polimorfismos entre los dos grupos estudiados.

Tabla 11. Analisis de χ^2 de los polimorfismos de RBP4 entre pacientes con DMG y embarazo normal.

Loci	Alelo	Grupo control		DMG		OR (IC 95%)	χ^2	p
		n	frecuencia	n	frecuencia			
<i>rs3758539</i>	G	91	0.91	93	0.93	1.39 (0.68-2.87)	0.83	0.36
	A	9	0.09	7	0.07			
<i>rs116736522</i>	C	96	0.96	97	0.97	1.07 (0.32-3.57)	0.01	0.91
	G	4	0.04	3	0.03			
<i>rs34571439</i>	T	88	0.88	91	0.91	1.44 (0.76-2.74)	1.28	0.26
	G	12	0.12	9	0.09			

OR: razón de momios; IC: intervalo de confianza; χ^2 : chi cuadrada

Así mismo, no se encontró diferencia en la frecuencia de haplotipos entre las mujeres con DMG y las de embarazo normal.

Entre los polimorfismos *rs34571439* y *rs3758539* se encontró desequilibrio de ligamiento LD=23.25, D' de Lewontin 0.898 y coeficiente r^2 de 0.622.

En el análisis de regresión logística, la asociación de DMG con edad y peso fue significativa (OR 1.11, IC 95% 1.01–1.22, p =0.04; OR 0.16, IC 95% 0.03– 0.87, p=0.03, respectivamente); sin embargo los polimorfismos no se asociaron con el riesgo de DMG ni con mediciones bioquímicas y antropométricas.

En el postparto de las mujeres con DMG, los niveles de insulina y el valor de HOMA-IR fue diferente entre las homocigotas G/G y las portadoras del alelo A para el polimorfismo *rs3758539*; y entre las homocigotas T/T y las portadoras del alelo G del polimorfismo *rs34571439*; las portadoras del alelo A y las del alelo G respectivamente, tuvieron mayor nivel de insulina y mayor HOMA-IR. Estas diferencias permanecieron significativas después del ajuste por peso y edad (Tabla 12).

En el postparto del grupo control, el colesterol total fue diferente entre las homocigotas G/G y las portadoras del alelo A del SNP *rs3758539*, y entre las homocigotas C/C y las portadoras del alelo G para el SNP *rs116736522*; las portadoras del alelo A para el *rs 3758539*, y las portadoras del alelo G para el *rs 116736522* tuvieron mayor concentración. Además, los valores de RBP4 fueron estadísticamente diferentes entre las homocigotas C/C y las portadoras del alelo G para el SNP *rs116736522*; las portadoras del alelo G tuvieron mayor concentración. Sin embargo, la diferencia no persistió después del ajuste por el peso y edad de las participantes (Tabla 12).

Tabla 12. Asociaciones entre los SNP's y las características clínicas de los dos grupos de estudio en el postparto.

	<i>rs 3758539</i>				<i>rs 34571439</i>				<i>rs 116736522</i>			
	Grupo control		DMG		Grupo control		DMG		Grupo control		DMG	
	G/G	A/A y G/A	G/G	A/A y G/A	T/T	G/G y G/T	T/T	G/G y G/T	C/C	G/G y G/C	C/C	G/G y G/C
Edad (años)	24.4±6.5	25.6±5.3	32.6±5.3	29.7±6.1	24.2±6.4	26.0±5.6	32.9±5.2	28.8±5.7	24.7±6.4	25.3±6.8	32.0±5.6	30.6±3.2
IMC	27.2±11.0	23.1±1.9	30.3±3.9	29.0±5.2	27.5±11.6	23.8±2.0	30.5±3.9	28.6±5.2	26.5±10.7	28.3±6.2	30.3±4.1	27.6±3.7
Glucosa	76.5±9.8	75.8±5.4	106.7±33.9	116.4±40.9	76.7±1.0	75.4±7.1	108.4±34.1	110.5±41.7	76.8±9.6	73.6±6.2	108.8±37.0	105.4±22.4
Insulina	6.1±7.4	4.8±1.2	10.8±13.4*†	17.0±12.9	6.6±7.7	3.8±2.7	10.7±13.7*†	16.4±12.5	5.6±6.7	10.1±10.0	12.4±14.0	9.2±5.7
RBP4	4.3±1.0	4.6±0.7	4.9±1.0	4.4±0.9	4.3±1.0	4.4±0.8	4.9±1.0	4.4±1.0	4.2±0.9*	4.9±0.3	4.9±1.0	4.2±0.4
HOMA-IR	1.2±1.6	0.9±0.2	2.7±3.5*†	5.8±7.2	1.3±1.7	0.7±0.5	2.7±3.5*†	5.4±7.0	1.1±1.5	1.7±1.6	3.5±5.0	2.5±1.5
Colesterol	212.6±49.6*	248.4±35.5	234.3±46.9	232.7±58.8	212.5±50.3	233.7±43.5	234.7±45.1	226.5±60.7	212.8±48.7*	269.5±42.4	234.3±48.7	206.6±47.0
Triglicéridos	159.6±95.0	127.0±26.2	201.8±95.2	220.2±105.4	166.3±97.3	118.5±41.0	194.5±92.6	227.5±96.5	149.0±83.6	213.6±117.3	207.7±98.1	205.0±106.5

Los datos se muestran como M ± DE

IMC: índice de masa corporal; HOMA-IR: resistencia a la insulina

*p<0.05

† p< 0.05 ajustada por edad e IMC

c) Incidencia de alteración de la glucosa en el grupo con DMG previa

De las 100 mujeres con DMG, únicamente la mitad (52.0%) tuvieron las 3 evaluaciones durante el periodo de 1 año postparto. De las 48 restantes, 4 mujeres fueron evaluadas dos veces durante el seguimiento, 5 fueron evaluadas una vez y 39 no regresaron. Sin embargo, las mujeres que regresaron a sus evaluaciones postparto fueron similares respecto a las características clínicas durante el embarazo, que las mujeres que no regresaron a sus evaluaciones.

De las 52 mujeres que completaron el estudio, 24 (46.2%) fueron clasificadas con tolerancia normal a la glucosa, 19 (36.5%) como glucosa de ayuno alterada (GAA)/intolerancia a la glucosa (IG), y 9 (17.3%) como diabéticas a las 6 semanas postparto. En la segunda visita, a los 6 meses postparto, de las 24 mujeres que tenían tolerancia normal a la glucosa en la primera visita, 15 presentaron GAA/IG y 3 desarrollaron diabetes; de las 19 mujeres con GAA/IG a las 6 semanas postparto, 5 desarrollaron diabetes, de tal forma que la incidencia de GAA/IG fue de 55.8% y de diabetes 32.7% a los 6 meses postparto. Al año postparto, 3 mujeres que tenían tolerancia normal a la glucosa a los 6 meses presentaron al año GAA/IG, y 8 mujeres que tenían GAA/IG a los 6 meses desarrollaron diabetes al año. Las incidencias fueron de 46.2% y 48% para GAA/IG y diabetes respectivamente (Figura 9).

La tabla 13 muestra las características de las participantes previas al embarazo y en el seguimiento de un año postparto, estratificadas en los siguientes grupos basados en el estado de tolerancia a la glucosa en el postparto: normal, GAA/IG, y diabetes. Las características clínicas como edad, peso y paridad fueron mayores en las mujeres que desarrollaron GAA/IG o diabetes durante el seguimiento que las mujeres con tolerancia normal a la glucosa.

Tabla 13. Características de las mujeres con diabetes gestacional en el seguimiento durante un año postparto clasificadas por su estado de tolerancia a la glucosa.

	Normal	GAA/IG	Diabetes
Previo al embarazo			
Edad (años)	26.6±1.5*†	31.5±3.2	33.5±4.7
Peso (kg)	63.3±14.0*†	75.1±14.8	79.3±13.1
IMC (kg/m ²)	28.2±4.5†	31.3±4.7	32.8±4.5
Paridad (%)			
Nuliparas	34.0*†	19.0	14.2
1	66.0*†	28.6	17.9
>1	0*†	52.4	67.9
Historia familiar de diabetes (%)	33.3*†	66.6	70.4
DMG previa (%)	0*†	9.5	29.6
Durante el embarazo			
Tx insulina (%)	0*†	47.6	75.0
6 semanas postparto			
Peso (kg)	74.5±0.7	74.7±12.3	77.0±14.8
Glucosa (mg/dL)	67.5±14.6†	84.4±11.1	114.8±21.8
Triglicéridos (mg/dL)	178.7±35.7	173.7±62.5	223.4±120.8
Colesterol (mg/dL)	231.9±38.7	192.0±42.0	236.0±35.0
6 meses postparto			
Peso (kg)	67.8±14.6*†	76.0±7	76.3±10.3
Glucosa (mg/dL)	76.8±14.0*†	103.2±5.4	149.3±55.7
Triglicéridos (mg/dL)	111.2±28.8*†	163.6±72.6	267.0±164.8
Colesterol (mg/dL)	191.2±59.5†	196.5±55.7	257.4±83.4
12 meses postparto			
Peso (kg)	65.3±14.5*†	75.5±15.2	79.0±16.2
Glucosa (mg/dL)	79.9±7.6*†	123.5±47.0	152.9±77.7
Triglicéridos (mg/dL)	147.8±11.2*†	181.3±85.9	230.9±90.9
Colesterol (mg/dL)	184.8±41.3†	200.6±66.9	236.3±34.9

Los datos son M ± DE

*p<0.05 vs IFG/IFT; †p<0.05 vs diabetes

GAA: glucosa de ayuno alterada; IG: intolerancia a la glucosa

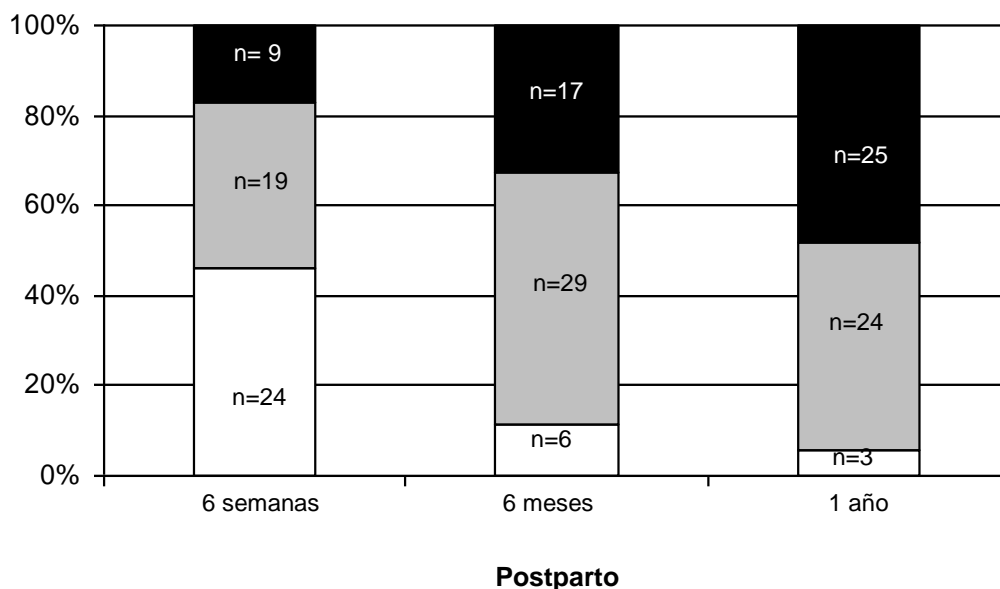


Figura 9. Tolerancia a la glucosa en el postparto de DMG. Se ilustra el estado de tolerancia a la glucosa en mujeres con DMG previa en cada período de evaluación; tolerancia normal a la glucosa □; glucosa de ayuno alterada/intolerancia a la glucosa ▒; y diabetes ■. También se muestra un incremento en la incidencia de alteraciones en el metabolismo de glucosa durante un año postparto.

El análisis de regresión múltiple demostró que el peso previo al embarazo y la edad se asociaron con los niveles de glucosa en el postparto ($t=2.8$, $p<0.01$; $t=2.6$, $p<0.05$, respectivamente); en contraste, otros factores de riesgo como la ganancia de peso en el embarazo, la paridad, historia familiar de diabetes y el peso del recién nacido (corregido por la edad gestacional), así como la lactancia, no mostraron asociación con los niveles de glucosa en el postparto.

También se demostró una elevación de la concentración de triglicéridos en las mujeres que presentaron intolerancia a la glucosa comparadas con aquellas mujeres con tolerancia normal a la glucosa.

Se intentó conocer las razones por las que la mitad de las participantes no regresaron a sus evaluaciones postparto, por lo que se hizo un análisis comparativo entre las que regresaron y las que no regresaron respecto a diversas variables que se han asociado a la reevaluación en estudios previos

como edad, semana de diagnóstico de DMG, tratamiento con insulina en el embarazo, peso previo al embarazo, número de hijos, familiares directos con DM2, tabaquismo, alcoholismo; y ninguna de ellas se asoció a la tasa de reevaluación.

d) Recién nacido e infante

Las características de los recién nacidos de los dos grupos de estudio se muestran en la Tabla 14. Un gran porcentaje de los hijos de madres con DMG nacieron por cesárea y aunque tuvieron un peso y talla similar que los de las madres con embarazo normal, al hacer el ajuste por semana de gestación al momento del nacimiento hay una mayor proporción de niños grandes para su edad gestacional.

Tabla 14. Características de los recién nacidos.

	Control	DMG
Edad gestacional (semanas)	38.5 ± 2.0	36.1 ± 1.8*
Parto (%)	85	4.3*
Cesárea (%)	15	95.7*
Peso (kg)	3.0 ± 0.6	3.1 ± 0.7
Talla (cm)	49.6 ± 2.9	49.1 ± 4.4
GEG (%)	4.7	20.9*
AEG (%)	88.2	74.4
PEG (%)	7.05	4.65
Mortalidad perinatal (n)	1	1
Mortalidad neonatal (n)	0	2

GEG: grande para edad gestacional; AEG: adecuado para edad gestacional; PEG: pequeño para edad gestacional. Los datos son M ± DE
*p<0.05

El peso de la madre previo a la gestación también influyó en algunas características. En el grupo control el peso de la madre se asoció con el peso del producto ($r=0.3$, $p<0.05$) y en el grupo con DMG el peso de la madre se asoció inversamente con la semana de gestación al momento del alumbramiento ($r= - 0.23$, $p<0.05$) y con la frecuencia de cesáreas ($\chi^2=6.91$, $p<0.05$).

En relación a la valoración de los infantes, se evaluó a 22 niños con un rango de edad de 5 meses a 3 años y se encontró que únicamente el 36% tenían un peso normal (Tabla 15).

Tabla 15. Características de los infantes de mujeres con DMG

	Mujeres n=10	Hombres n=12
Desnutrición (n)	3	5
Peso normal (n)	4	4
Sobrepeso (n)	1	2
Obesidad (n)	2	1
Glucosa (mg/dL)	81.5±5.7	83.7±10.6
Colesterol (mg/dL)	144.5±28.5	139.8±27.5
Triglicéridos (mg/dL)	90.0±31.0	57.1±14.0

Los datos son M ± DE

DISCUSIÓN

Se demostró que los niveles de adipocinas no son estadísticamente diferentes entre las mujeres con DMG y las de embarazo normal¹⁷². Por el contrario, estudios previos han mostrado concentraciones elevadas de RBP4, leptina y $TNF\alpha$, así como menores concentraciones de adiponectina en DMG^{117,128-129,173-176}. Una de las razones de la discrepancia de los resultados obtenidos en este estudio con las publicaciones previas, puede ser el elevado IMC de las mujeres con DMG. Esta interpretación se apoya por estudios previos realizados en mujeres obesas con DMG, donde no se observó diferencia en los niveles de RBP4^{130,177}. Las discrepancias también pueden deberse a la semana de gestación a la que se tomó la muestra, a los métodos usados para la evaluación de las adipocinas, al tamaño de la muestra y a diferencias entre las poblaciones.

Los valores de adiponectina fueron menores en las mujeres con DMG de forma limítrofe. A este respecto, se ha sugerido que bajos niveles de adiponectina pueden inducir una severa resistencia a la insulina antes de la aparición de la DMG, y que la adiponectina puede relacionarse con la patogénesis de un metabolismo anormal de la tolerancia a la glucosa durante el embarazo¹¹⁹⁻¹²².

La RBP4 se asoció con insulina y HOMA-IR en el grupo de embarazo normal, mientras que no se encontró asociación en las mujeres con DMG. Se ha demostrado que la expresión de RBP4 está regulada por el grado de obesidad y resistencia a la insulina^{130,177}. Así, en este estudio la mayor resistencia a la insulina y obesidad en el grupo con DMG pudiera explicar una regulación anormal de RBP4.

Se ha sugerido que las adipocinas pudieran contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina. Por lo tanto, para analizar si los cambios en los niveles de adipocinas son reversibles en mujeres con DMG, las mujeres fueron evaluadas en el postparto. En las mujeres con DMG previa, se observó que la resistencia a la insulina persistió en el postparto en asociación con alteración en la tolerancia a la glucosa; los niveles de adiponectina, leptina y RBP4

permanecieron sin cambio. Sin embargo, los valores de leptina fueron elevados comparados con el grupo control. Es posible que la resistencia a la insulina en el postparto pudiera contribuir a estos niveles elevados. Se ha demostrado una asociación positiva entre leptina e insulina en numerosos estudios realizados en personas obesas y no obesas¹⁷⁸⁻¹⁷⁹. De manera experimental, los niveles elevados de insulina pueden estimular la producción de leptina en adipocitos, y viceversa, un incremento de los niveles de leptina puede llevar a resistencia a la insulina y alterar la capacidad secretora de la célula beta¹⁸⁰⁻¹⁸¹. En este estudio, se observó una correlación positiva entre los niveles de insulina y leptina; sin embargo, esta relación no permaneció significativa después del ajuste por el peso y la edad.

En contraste, en mujeres sin DMG se encontró una disminución de los valores de insulina, leptina, adiponectina y RBP4 a las 6 semanas postparto. En estudios recientes, se demostraron mayores niveles de leptina y adiponectina durante el embarazo normal debido a cambios en el IMC, a mayores niveles de insulina en el embarazo y a la síntesis placentaria de estas adipocinas¹⁸².

Por otra parte, el cambio en los valores de RBP4 se asoció con el cambio en los niveles de insulina y de HOMA-IR. A este respecto, se ha sugerido que la expresión de RBP4 puede ser una consecuencia directa de hiperinsulinemia. Sin embargo, las mujeres con DMG previa tuvieron mayores niveles de insulina y mayor HOMA-IR que las mujeres sanas. Además, RBP4 e insulina no se asociaron en mujeres con DMG, quienes además no mostraron una mejoría en su sensibilidad a la insulina en el postparto. Por lo tanto, un incremento en los niveles de insulina y en HOMA-IR no determina los valores de RBP4. Aunque, se ha sugerido que pudiera haber un umbral en el cual los niveles de insulina sean permisivos para un incremento en la expresión de RBP4¹⁰⁰.

En relación a la evaluación de los SNPs de RBP4, se decidió su análisis debido a que la región del DNA donde se encuentra el gen de RBP4 se ha asociado a un mayor riesgo de diabetes¹¹⁰⁻¹¹¹ y a que en algunos estudios se ha evaluado la relación entre diversos polimorfismos de RBP4, que se ubican en regiones

no codificantes, con el riesgo de diabetes^{91,112-115}; sin embargo hasta el momento no hay publicaciones en las que se valore su relación con la DMG.

Las frecuencias de los tres SNPs evaluados fueron similares a las reportadas en otras poblaciones afroamericanas y caucásicas^{91,112-115}. No se encontró asociación entre los SNPs y la DMG; sin embargo algunas variantes se asociaron a resistencia a la insulina e insulina únicamente en el postparto, similar a lo reportado por otros autores en personas con DM2, quienes inclusive han mostrado una asociación entre las variantes y los niveles de péptido C en circulación¹¹³, IMC, ácidos grasos libres, e inclusive con el RNAm de RBP4 en tejido adiposo visceral¹¹⁴.

Los dos SNPs que se asociaron con niveles de insulina y el grado de resistencia a la insulina están en LD. El SNP *rs3758539* se encuentra en la región promotora y se ha determinado que el alelo A induce una mayor actividad transcripcional que el alelo G en hepatocitos pero se desconoce en adipocitos¹¹². El cambio de la base altera la afinidad del factor de transcripción HNF1a (hepatocyte nuclear factor 1) a la región promotora. Este factor de transcripción se ha implicado en el metabolismo de glucosa y se ha asociado con la actividad de la G6Pasa, enzima clave de la gluconeogénesis y del transportador de glucosa GLUT2. El cambio de G por A tiene mayor afinidad por HNF1a y se asocia con una mayor expresión de RBP4 y un mayor riesgo de diabetes¹¹⁵, sin embargo en este estudio no se asoció a niveles séricos de RBP4, que como ya se ha mencionado pueden estar influidos por diversos factores.

La asociación entre las variantes del SNP *rs116736522* desapareció después del ajuste por el peso y la edad, lo que sugiere una mayor influencia por el estado metabólico. Además el tamaño de la muestra probablemente influyó para no detectar diversas asociaciones.

En algunos estudios se han asociado los SNPs evaluados en este estudio y ciertos haplotipos con SNPs que no fueron determinados en este estudio, con

resistencia a la insulina e insulina; sin embargo las diferencias étnicas y la exposición a factores ambientales pueden explicar las diferencias

La participación de RBP4 y particularmente algunas de sus variantes sobre el riesgo de DM2 se ha explicado a través de dos mecanismos, un mecanismo retinol dependiente y un mecanismo retinol independiente. En el mecanismo retinol dependiente, una vez que la RBP4 lo transporta a tejidos específicos el retinol es activado a isómeros de ácido retinoico, los cuales tienen una gran variedad de efectos pleiotrópicos a través de interacciones con receptores de ácido retinoico X (RXRs) y receptores de ácido retinoico, regulando la transcripción de 300 genes aproximadamente, entre los que se encuentra PEPCCK, enzima gluconeogénica y PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor), factor de transcripción que promueve la expresión de genes implicados en homeostasis energética, metabolismo de lípidos y control de la inflamación⁹⁷. Por lo que algunos ácidos retinoicos se han asociado con resistencia a la insulina, mientras que otros con sensibilidad a la insulina.

El otro mecanismo retinol independiente es a través de la unión de RBP4 a receptores de membrana celular como Stra6⁹⁸. RBP4 puede afectar directamente la señalización de insulina al bloquear la fosforilación de IRS1 en adipocitos¹⁸³. Además RBP4 puede modular la función de la transtirretina que recientemente se asoció con la secreción y estímulo a la célula beta¹⁸⁴⁻¹⁸⁵.

Otra adipocina evaluada fue TNF α , cuyos niveles séricos se incrementaron a las 6 semanas postparto en ambos grupos. TNF α es una citocina asociada con resistencia a la insulina y es considerada una citocina proinflamatoria porque estimula la síntesis de óxido nítrico y otros mediadores inflamatorios que conducen a una respuesta inflamatoria crónica. Se ha demostrado que al final del embarazo, comparado con el postparto, disminuye la capacidad de los monocitos (~40%), para la producción de TNF α y esto se ha asociado con el incremento de cortisol, estradiol y progesterona durante el embarazo¹⁸⁶.

Las limitaciones del estudio fueron las diferencias en el peso y edad entre las mujeres con DMG y las de embarazo normal, aunque se hicieron los ajustes pertinentes por estas variables. Una segunda limitación es que no se evaluó la resistencia a la insulina mediante el clamp, el estándar de oro para la evaluación de resistencia a la insulina¹⁸⁷. Aunque se ha mostrado que el HOMA-IR puede ser una medida precisa al final del embarazo¹⁸⁸. En relación a los hallazgos de RBP4 es importante señalar que no se midieron los niveles de vitamina A en circulación ni se realizó un cuestionario para conocer su ingesta, lo que pudiera haber influido en los niveles de RBP4 en circulación; sin embargo por el momento no se ha encontrado relación entre su ingesta y el riesgo de DM2¹¹⁵.

En relación al riesgo de desarrollar DM2 en mujeres con DMG, en este estudio se confirma que las mujeres con DMG tienen un riesgo elevado de desarrollar alteración en la tolerancia a la glucosa durante el primer año postparto. Aber et al, en una cohorte de tipo retrospectivo mostraron una incidencia de intolerancia a la glucosa de 31% al año postparto¹⁸⁹; Metzger et al en una cohorte prospectiva encontraron una incidencia de diabetes de 38% y de intolerancia a la glucosa de 19% en el mismo periodo de observación¹⁹⁰. Recientemente, Retnakaran et al, en una cohorte prospectiva describieron una incidencia de intolerancia a la glucosa de 27% y diabetes de 5.8% a los 3 meses postparto¹⁹¹. Además, otros estudios con diferentes periodos de observación después de la DMG (2-30 años) señalan un amplio rango de incidencia, de 19 a 87% para intolerancia a la glucosa¹⁵¹.

La incidencia de GAA/IG y diabetes inmediatamente después de la DMG fue elevada en nuestra población; cerca del 90% de las mujeres que regresaron a sus evaluaciones postparto al año presentaron GAA/IG o diabetes. Las explicaciones a la elevada incidencia de intolerancia a la glucosa en este estudio incluyen la elevada prevalencia de obesidad en mujeres en edad reproductiva, la edad avanzada para embarazarse, la poca actividad física que se realiza, así como la elevada carga genética de diabetes tipo 2 en nuestra población¹⁹²⁻¹⁹³. Los hallazgos también pueden asociarse al uso de la carga oral de tolerancia a la glucosa de 75-g en el postparto, debido a que esta

prueba identifica una mayor proporción de mujeres con intolerancia a la glucosa comparada con la glucosa de ayuno¹⁹⁴. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que algunos casos de DMG pudieran representar una diabetes previa al embarazo no reconocida, y es probable que algunas mujeres asintomáticas con tolerancia normal a la glucosa en el posparto acudieran con menor probabilidad a las 3 evaluaciones del postparto.

La asociación significativa entre el peso previo al embarazo y la edad con la intolerancia a la glucosa en el postparto confirma observaciones previas en las cuales se demostró que el incremento del tejido adiposo contribuye a una disminución de la compensación de la célula beta para la resistencia a la insulina a través de alteraciones en los niveles de adipocinas y por la elevación de triglicéridos en suero y tejidos¹⁹⁵⁻¹⁹⁶. Se ha descrito que el incremento en triglicéridos interfiere con el metabolismo de glucosa en músculo disminuyendo la sensibilidad a la insulina.

Además, la obesidad en la mujer gestante la ubica en un mayor riesgo de diversas complicaciones perinatales. En este estudio se encontró una asociación positiva entre el peso y la frecuencia de cesáreas y negativa entre el peso y la edad gestacional a la que se resolvían los embarazos; es decir, a mayor peso previo a la gestación, el embarazo fue finalizado a una edad gestacional mas temprana, lo cual es un riesgo de morbimortalidad perinatal.

La obesidad materna también le confiere riesgos al producto, ya que son más proclives a desarrollar obesidad en la infancia y adolescencia; en el estudio se observó una asociación entre el peso materno y el del recién nacido. Se ha propuesto que el ambiente en desarrollo a través de las modificaciones epigenéticas como metilación del DNA o modificación de histonas modula la transcripción de genes que participan en la composición corporal y en diversas funciones metabólicas; es así como el ambiente prenatal puede predisponer a una mayor adiposidad y alteraciones metabólicas en el futuro.

La obesidad de la gestante aunada a la alteración metabólica en DMG tuvo un efecto en el peso del recién nacido, el 20% de los productos tuvieron un mayor

peso que el que les correspondía para su edad gestacional; inclusive en la evaluación de los infantes se encontró una frecuencia de sobrepeso/obesidad del 27%. Sin embargo, además de este trastorno, una tercera parte de los infantes presentó desnutrición, por lo que se requirió una valoración de su estado nutricional para corregir este trastorno.

En relación a las evaluaciones postparto realizadas en mujeres con DMG, únicamente la mitad de las mujeres evaluadas en el embarazo regresaron a las evaluaciones postparto, al igual que en estudios realizados en otras poblaciones. Sin embargo, las mujeres que no regresaron fueron similares a las que regresaron respecto a las características clínicas y demográficas como historia familiar de diabetes, IMC, edad y paridad. El cálculo del tamaño de muestra previo al inicio del estudio sugirió que con 73 mujeres con DMG, el estudio tendría un poder del 80% para detectar una incidencia de intolerancia a la glucosa de 30-50%¹⁹⁷. Sin embargo, la incidencia en nuestra población fue del 94% y el cálculo del poder basado en esta observación es de 90%.

Aunque las evaluaciones en el postparto se han incrementado durante los últimos años, todavía es deficiente, y las bajas tasas de atención en el postparto indican que los profesionales del área de salud y las mujeres que presentaron DMG no le dan la importancia pertinente a este padecimiento como una señal de susceptibilidad para el desarrollo de DM2 en el futuro. En este estudio no se logró identificar las razones por las cuales las mujeres no acudían a sus evaluaciones postparto, sin embargo no se evaluaron variables socioeconómicas y psicológicas que pudieran haberse asociado¹⁹⁸.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de adipocinas fueron similares entre las mujeres con DMG y las de embarazo normal. Las mujeres con DMG presentan mayor resistencia a la insulina evaluada por HOMA-IR, y esta persistió en el postparto a diferencia del grupo control que disminuyó la resistencia a la insulina y este decremento se asoció a una menor concentración de RBP4.

Los polimorfismos de RBP4 no se asocian con el riesgo de DMG, pero algunas variantes se asocian tanto con los niveles de insulina como con el grado de resistencia a la insulina.

Las mujeres con DMG presentaron un deterioro progresivo de la tolerancia a la glucosa durante el primer año postparto, principalmente aquellas con mayor peso y edad.

REFERENCIAS

1. Homko CJ, Sivan E, Reece EA, Boden G. Fuel metabolism during pregnancy. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 119–125.
2. King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl 2): 1218S–1225S.
3. Phelps RL, Bergenstal R, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. Relationships between plasma insulin and proinsulin during late pregnancy in normal and diabetic subjects. *Clin Endocrinol Metab* 1975; 41: 1085.
4. Ryan EA, O'Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy: studies with the euglycemic glucose clamp technique. *Diabetes* 1985; 34: 380.
5. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1667.
6. Aerts L, Van Assche FA. Ultrastructural changes of the endocrine pancreas in pregnant rats. *Diabetologia* 1975; 11: 285.
7. Van Assche FA, Aerts L, De Prins FA. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1978; 85: 818.
8. Hubinot CJ, Dufrane SP, Malaisse WJ. Effect of pregnancy upon the activity of protein kinase A and C in rat pancreatic islets. *Horm Metab Res* 1985; 17: 104.
9. Bergman RN. Toward a physiological understanding of glucose tolerance: minimal model approach. *Diabetes* 1989; 38: 1512.
10. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:341.
11. 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: 879–887.
12. Beck P, Daughaday WH. Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. *J Clin Invest* 1967; 46:103–110.
13. Barbour LA, Shao J, Qiao L, Pulawa LK, Jensen DR, Bartke A, Garrity M, Draznin B, Friedman JE. Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 512–517.
14. Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Kaszas E, Palik E, Winkler G. Plasma adiponectin and pregnancy-induced insulin resistance. *Diabetes Care* 2004; 27: 274–275.
15. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl 1):1256S–1261S
16. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002; 51: 2207–2213.
17. Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston- Presley L, Bernard S, Kalhan S, Hauguel- De Mouzon S. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 2006; 49:1677–1685.

18. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436: 356–362.
19. Ciraldi TP, Kettel M, El-Roeiy A. Mechanisms of cellular insulin resistance in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 635.
20. Damm P, Handberg A, Kuhl C. Insulin receptor binding and tyrosine kinase activity in skeletal muscle from normal pregnant and women with gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 251.
21. Okuno S, Akazawa S, Yasuhi I, Kawasaki E, Matsumoto K, Yamasaki H, Matsuo H, Yamaguchi Y, Nagataki S. Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy. *Horm Metab Res* 1995; 27:231–234.
22. Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What Is Gestational Diabetes?. *Diabetes Care* 2007; 30 (suppl 1): S105-S111.
23. Bellamy L, Casa JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009; 373: 1773-1779.
24. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1862-1868.
25. Ben Haroush A, Yogev Y, Hod M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004; 21: 103-113.
26. Kuhl C: Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21 (suppl 2):B19 –B26.
27. Kaira S, Malik S, John M. Gestational diabetes mellitus: a window of opportunity. *Indian J Endocrinol Metab* 2011; 15; 149-151.
28. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 2009; 373: 1789-1797.
29. Botallo JN. Recurrent gestational diabetes: risk factors, diagnosis, management, and implications. *Semin Perinatol* 2007; 31: 176-184.
30. Contreras SJ, Forsbach G, Vazquez RJ, Alvarez GC, García G. Non-insulin dependent diabetes mellitus and pregnancy in Mexico. *Int J Gynaecol Obstet* 1991; 34: 205-210.
31. Forsbach G, Contreras J, Fong G, Flores G, Moreno O. Prevalence of gestational diabetes and macrosomic newborns in a Mexican population. *Diabetes Care* 1998; 11:235-238.
32. Meza E, Barraza L, Martínez G, Fernández V, Ramos E, Cano C, Valdez A, Izaguirre R. Gestational diabetes in a Mexican-U.S. border population: Prevalence and epidemiology. *Rev Inv Clin* 1995; 47: 433-438.
33. Ferrara A. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. *Diabetes Care* 2007; 30 (suppl 2): S141-146.
34. Lawrence JM, Contreras R, Chen W, Sacks DA. Trends in the Prevalence of Preexisting Diabetes and Gestational Diabetes Mellitus Among a Racially/Ethnically Diverse Population of Pregnant Women, 1999–2005. *Diabetes Care* 2008; 31: 899–904.
35. Forsbach G, Tamez PH, Vazquez LJ. Diabetes and pregnancy. *Arch Med Res* 2005; 36: 291-299.

36. Mendestin MA, Annanth CV, Smulian JC, Vintzileos AM. Birth weight and fetal death in the United States: the effect of maternal diabetes during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 922-926.
37. Forsbach G, Tamez PH, Vazquez LJ. Glucose intolerance in pregnant women and its effects on newborn outcomes. *Diabetes Care* 1998; 21: 873-874.
38. Obershain SS, Adam PA, King KC. Human fetal insulin response to sustained maternal hyperglycemia. *N Engl J Med* 1970; 283: 566.
39. Bo S, Menato G, Gallo ML, Bardelli C, Lezo A, Signoule A, Gambino R, Cassades M, Massobrio M, Pagano G. Mild gestational hyperglycemia, the metabolic syndrome and adverse neonatal outcomes. *Acta Obstet Gynaecol Scand* 2004; 83: 335-340.
40. O'Sullivan J, Mahan CM. Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes* 1964; 13: 278-285.
41. Blayo A, Mandelbrot L. Screening and diagnosis of gestational diabetes. *Diabet Metab* 2004; 30: 575-580.
42. Schaefer-Graf UM, Kleinwechter H. Diagnosis and new approaches in the therapy of gestational diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2006; 2: 343-352.
43. Berger H, Crane J, Farine D. Screening for gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynecol Can* 2000; 24: 894-912.
44. Erem C, Cihanyurdu N, Deger O, Karahan C, Can G, Telatar M. Screening for gestational diabetes mellitus in northeastern Turkey. *Eur J Epidemiol* 2003; 18: 39-43.
45. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008; 358: 1991-2002.
46. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care* 2010; 33: 676-682.
47. Moses RG. New consensus criteria for GDM. Problem solved or a Pandora's box?. *Diabetes Care* 2010; 33:690-691.
48. Gunderson E. Intensive nutrition therapy for gestational diabetes. *Diabetes Care* 1997; 20: 221-226.
49. Langer O. Maternal glycemic criteria for insulin therapy in gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21(suppl 2): 91- 98.
50. Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30: 251-260.
51. Font LK, Cejudo CE, López CA, Peralta PM, Diaz VM, Puella TE, Ramirez TA. Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010; 48: 676-684.
52. Kremer CJ, Duff P. Glyburide for the treatment of gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1438-1439.
53. Goh JE, Sadler L, Rowan J. Metformin for gestational diabetes in routine clinical practice. *Diabet Med* 2011; 28: 1082-1087.

54. Albareda M, Caballero A, Badell G, et al. Diabetes and abnormal glucose tolerance in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1199–205.
55. Åberg A, Jönsson E, Eskilsson I, Landin-Olsson M, Frid A. Predictive factors of developing diabetes mellitus in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 11–16.
56. Lauenborg J, Grarup N, Damm P. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 145–50.
57. Cho YM, Kim TH, Choi SH, et al. Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes in the Korean population. *Diabetologia* 2009; 52: 253–61.
58. Watanabe RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA. Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 134-140.
59. Grant RW, Moore AF, Florez JC. Genetic architecture of type 2 diabetes: recent progress and clinical implications. *Diabetes Care* 2009; 32:1107-14.
60. Chao S, Roberts JS, Marteau TM, Silliman R, Cupples LA, Green RC. Health behavior changes after genetic risk assessment for Alzheimer disease: The REVEAL Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2008; 22: 94-7.
61. Marteau T, Senior V, Humphries SE, Bobrow M, Cranston T, Crook MA, Day L, Fernandez M, Horne R, Iversen A, Jackson Z, Lynas J, Middleton-Price H, Savine R, Sikorski J, Watson M, Weinman J, Wierzbicki AS, Wray R; Genetic Risk Assessment for FH Trial Study Group. Psychological impact of genetic testing for familial hypercholesterolemia within a previously aware population: a randomized controlled trial. *Am J Med Genet* 2004; 128A:285-93.
62. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359.
63. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60:349 – 356.
64. Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA: Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* 2003; 144: 2195–2200.
65. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
66. Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1500: 88-96.
67. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004; 53: 1285-1292.
68. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359.
69. Fruhbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzabal J, Burrel MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2001; 280: 827-847.
70. Fonseca-Alaniz MH. Adipose tissue: an endocrine organ. *J Pediatr* 2007; 83 (suppl 2): S192-S203.

71. Caballero AE. Endotelial dysfunction in obesity and insulin resistance: A road to diabetes and heart disease. *Obes Res* 2003; 11: 1278-1289.
72. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 305-313.
73. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 2031-2041.
74. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Int Med* 2000; 247:349-358.
75. Yamagishi S, Nakamura K, Jinnouchi Y, Takenaka K, Imaizumi T. Molecular mechanisms for vascular injury in metabolic syndrome. *Drugs Exptl Clin Res* 2005; 31: 123-129.
76. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 911-919.
77. Martínez-González J, Llorent-Cortés V, Badimón L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 218-231.
78. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003; 108: 1772-1778.
79. Moreno PR, Fuster V. The year in atherothrombosis. *JACC* 2004; 44: 2099- 2110.
80. Weisberg SP, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808.
81. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-1830.
82. Blüher M, Wilson-Fritch L, Leszyk J, Laustsen PG, Corvera S, Kahn. Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 31902-31909.
83. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, et al. Role of the Toll-like receptor 4/ NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 84-91.
84. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 4-12.
85. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-867.
86. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 939-949.
87. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 772-783.
88. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-198.
89. Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: 1220-1225.

90. Moreno-Aliaga MJ, Campion J, Milagro F, Berjon A, Martinez JA. Adiposity and proinflammatory state: the chicken or the egg. *Adipocytes* 2005; 1: 1-13.
91. Craig RL, Chu WS, Elbein SC. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mol Genet Metab* 2007; 90: 338-345.
92. Klötting N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M, Kahn BB. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 2007; 6: 79-87.
93. Paci E, Greene LH, Jones RM, Smith LJ. Characterization of the molten globule state of retinol-binding protein using a molecular dynamics simulation approach. *FEBS Journal* 2005; 272: 4826–4838.
94. Van Dam R, Hu FB. Lipocalins and insulin resistance: etiological role of retinol-binding protein 4 and lipocalin-2? *Clin Chem* 2007; 53: 5-7.
95. Sivaprasadarao A, Findlay JB. Structure-function studies on human retinol-binding protein using site-directed mutagenesis. *Biochem J* 1994; 300: 437-442.
96. Frey SK, Nagl B, Henze A, Raila J, Schlosser B, Berg T, Tepel M, Zidek W, Weickert MO, Pfeiffer AF, Schweigert FJ. Isoforms of retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver. *Lipids Health Dis* 2008; 7: 29.
97. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996; 10: 940-954.
98. Blaner WS. STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metab* 2007; 5: 164-6.
99. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436: 356–362.
100. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006; 354: 2552–2563.
101. Polonsky KS. Retinol-binding protein 4, insulin resistance, and type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2006; 354: 2596-8.
102. Lee DC, Lee JW, Im JA. Association of serum retinol binding protein 4 and insulin resistance in apparently healthy adolescents. *Metab Clin Exp* 2007; 56: 327–331.
103. Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan MA. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1886–1890.
104. Janke J, Engeli S, Boschmann M, Adams F, Bohnke J, Luft FC. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 2006; 55: 2805–2810.
105. Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1168-71.
106. Vitkova M, Klimcakova E, Kovacikova M, Valle C, Moro C, Polak J, Hanacek J, Capel F, Viguierie N, Richterova B, Bajzova M, Hejnova J, Stich V, Langin D. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during

calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2330-2335.

107. Raila J, Henze A, Spranger J, Mo hlig M, Pfeiffer AF, Schweigert JF. Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2007; 72: 505–511.

108. Jaconi S, Rose K, Hughes GJ, Saurat JH, Siegenthaler G. Characterization of two post-translationally processed forms of human serum retinol-binding protein: altered ratios in chronic renal failure. *J Lipid Res* 1995; 36: 1247–1253.

109. Gavrilov V, Yermiahu T, Gorodischer R. Renal pathology and retinol status in multiple myeloma patients. *Kidney Int* 2006; 69: 173–177.

110. Meigs JB, Panhuysen CI, Myers RH, Wilson PW, Cupples LA. A genome-wide scan for loci linked to plasma levels of glucose and HbA(1c) in a community-based sample of Caucasian pedigrees: the Framingham offspring study. *Diabetes* 2002; 51: 833–840.

111. Duggirala R, Blangero , Almasy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP. Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1127–1140.

112. Munkhtulga L, Nakayama K, Utsumi N, Yanagisawa Y, Gotoh T, Omi T, Kumada M, Erdenebulgan B, Zolzaya K, Lkhagvasuren T, Iwamoto S. Identification of a regulatory SNP in the retinol binding protein 4 gene associated with type 2 diabetes in Mongolia. *Hum Genet* 2007; 120: 879-888.

113. Hu C, Jia W, Zhang R, Wang C, Lu J, Wu H, Fang Q, Ma X, Xiang K. Effect of RBP4 gene variants on circulating RBP4 concentration and type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabet Med* 2008; 25: 11-8.

114. Kovacs P, Geyer M, Berndt J, Klötting N, Graham TE, Böttcher Y, Enigk B, Tönjes A, Schleinitz D, Schön MR, Kahn BB, Blüher M, Stumvoll M. Effects of genetic variation in the human retinol binding protein-4 gene (RBP4) on insulin resistance and fat depot-specific mRNA expression. *Diabetes* 2007; 56: 3095-100.

115. van Hoek M, Dehghan A, Zillikens MC, Hofman A, Witteman JC, Sijbrands EJ. An RBP4 promoter polymorphism increases risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51: 1423-8.

116. Ribel-Madsen R, Friedrichsen M, Vaag A, Poulsen P. Retinol-binding protein 4 in twins: regulatory mechanisms and impact of circulating and tissue expression levels on insulin secretion and action. *Diabetes* 2009; 58: 54-60.

117. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002; 51: 2207–2213.

118. Festa A, Shnawa N, Krugluger W, Hopmeier P, Schernthaner G, Haffner SM. Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 1999; 16: 656-662.

119. Worda C, Leipold H, Gruber C, Kautzky-Willer A, Knofler M, Bancher-Todesca D: Decreased plasma adiponectin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:2120– 2124.

120. Williams MA, Qiu C, Muiy-Rivera M, Vadachkoria S, Song T, Luthy DA: Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2306–2311.

121. Ranheim T, Haugen F, Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Drevon CA: Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83:341–347.
122. Thyfault JP, Hedberg EM, Anchan RM, Thorne OP, Isler CM, Newton ER, Dohm GL, deVente JE. Gestational diabetes is associated with depressed adiponectin levels. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12:41– 45.
123. Ategbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4137– 4143.
124. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665–668.
125. 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; 27:1721– 1727.
126. Garvey WT, Maianu L, Hancock JA, Golichowski AM, Baron A: Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin resistant patients with obesity, IGT, GDM, and NIDDM. *Diabetes* 1992; 41:465– 475.
127. Ueland T, Dalsoren T, Voldner N, Godang K, Henriksen T, Bollerslev J. Retinol-binding protein-4 is not strongly associated with insulin sensitivity in normal pregnancies. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 49-54.
128. Chan TF, Chen HS, Chen YC, Lee CH, Chou FH, Chen IJ, Chen SY, Jong SB, Tsai EM. Increased serum retinol-binding protein 4 concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Reprod Sci* 2007; 14: 169-74.
129. Lewandowski KC, Stojanovic N, Bienkiewicz M, Tan BK, Prelevic GM, Press M, Tuck S, O'Hare PJ, Randeve HS. Elevated concentrations of retinol-binding protein-4 (RBP-4) in gestational diabetes mellitus: negative correlation with soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1). *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 300-305.
130. Krzyzanowska K, Zemany L, Krugluger W, Schernthaner GH, Mittermayer F, Schnack C, Rahman R, Brix J, Kahn BB, Schernthaner G. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia* 2008; 51: 1115-1122.
131. Choi SH, Kwak SH, Youn BS, Lim S, Park YJ, Lee H, Lee N, Cho YM, Lee HK, Kim YB, Park KS, Jang HC. High plasma retinol binding protein-4 and low plasma adiponectin concentrations are associated with severity of glucose intolerance in women with previous gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3142-8.
132. Plum L, Belgardt BF, Bruning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2007; 116: 1761-1766.
133. Patrick E, Jamie W, Patrik R. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic b-cells. *Phil Trans R Soc B* 2005; 360: 2211–2225
134. Hiriart M, Aguilar-Bryan L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E1298-1306.
135. Grill V. Time and dose dependencies for priming effect of glucose on insulin secretion. *Am J Physiol* 1981; 240: 24.

136. Ward WK, Berad JC, Porte D. Clinical aspects of islet beta-cell function in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1986; 2: 297.
137. Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 2011; 121 :2118-2125.
138. White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR: A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem* 1988; 263:2969–2980.
139. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:85-96.
140. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4902-4911.
141. Kahn BB. Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 1996; 45: 1644-1654.
142. 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: 603– 610.
143. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, De la Houssaye BE, Draznin B, Friedman JE. Reduced IRS-1 and increased serine IRS-1 phosphorylation in skeletal muscle of women with GDM. *Diabetes* 2006; 55 (suppl. 1):A39.
144. Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, Catalano P: Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 1999; 48:1807–1814.
145. McCurdy BL, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JF. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30 (suppl 2): s112-s119.
146. 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; 180:903–916.
147. Buchanan TA, Xiang AH, Kjos SL, Trigo E, Lee WP, Peters RK. Antepartum predictors of the development of type 2 diabetes in Latino women 11–26 months after pregnancies complicated by gestational diabetes. *Diabetes* 1999; 48:2430–2436.
148. 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: E522–E533.
149. Roden M, Price TB, Perseghin G. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996; 97:2859-2865.
150. Löbner K, Knopff A, Baumgarten A, Mollenhauer U, Marienfeld S, Garrido-Franco M, Bonifacio E, Ziegler AG. Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 2006; 55: 792-7.
151. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009; 373: 1773-1779.

152. Feig DS, Zinman B, Wang X, Hux JE. Risk of development of diabetes mellitus after diagnosis of gestational diabetes. *CMAJ* 2008; 179: 229-234.
153. 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: 1183-1199.
154. Gestational Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2003; 26: 103-105
155. Kim C, Tabaei BP, Burke R. Missed opportunities for type 2 diabetes mellitus screening among women with a history of gestational diabetes mellitus. *Am J Public Health* 2006; 96: 1643-1648.
156. Blatt AJ, Nakamoto JM, Kaufman HW. Gaps in diabetes screening during pregnancy and postpartum. *Obstet Gynecol* 2011; 117: 61-68
157. Kim C, McEwen LN, Piette JD. Risk perception for diabetes among women with histories of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30: 2281-2286
158. Hay WW Jr, Sparks JW. Placental, fetal, and neonatal carbohydrate metabolism. [*Clin Obstet Gynecol*. *Clin Obstet Gynecol* 1985; 28: 473-85.
159. Illsley NP. Glucose Transporters in the Human Placenta. *Placenta* 2000; 21: 14-22.
160. Illsley N, Sellers M, Wright R. Glycemic regulation of glucose transporter expression and activity in the human placenta. *Placenta* 1998; 19: 517-524.
161. Nelson D, Smith R, Jarret L. Nonuniform distribution and grouping of insulin receptors of the surface of human placental syncytial trophoblast. *Diabetes*. 1978; 27:530-538.
162. Ogata ES. Carbohydrate metabolism in the fetus and neonate and altered neonatal glucoregulation. *Pediatr Clin North Am*. 1986;33:25-45.
163. Reiher H, Fuhrmann K, Noack S, Woltanski KP, Jutzi E, Hahn von Dorsche H, Hahn HJ. Age-dependent insulin secretion of the endocrine pancreas in vitro from fetuses of diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care* 1983;6:446-51.
164. Combs CA, Gunderson E, Kitzmiller JL, Gavin LA, Main EK. Relationship of fetal macrosomia to maternal postprandial glucose control during pregnancy. *Diabetes Care* 1992;15:1251-7.
165. Catalano PM, Drago NM, Amini SB. Fetus-placenta newborn: maternal carbohydrate metabolism and its relationship to fetal growth and body composition. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 1464-1470.
166. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T. High prevalence of type 2 diabetes and prediabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 2008; 31: 340-346.
167. Dabelea D, Knowler WC, Pettitt DJ. Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow up research in Pima Indians. *J Matern Fetal Med* 2000; 9: 83-86.
168. Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD, Lillycrop KA, Burdge GC, McLean C, Rodford J, Slater-Jefferies JL, Garratt E, Crozier SR, Emerald BS, Gale CR, Inskip HM, Cooper C, Hanson MA. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* 2011; 60: 1528-1534.
169. American Academy of Pediatrics. Prevention of pediatric overweight and obesity. *Pediatrics* 2003; 112: 424-430.

170. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: cell function from fasting plasma glucose and insulin?insulin resistance and concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.
171. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263-265.
172. Saucedo R, Zarate A, Basurto L, Hernández M, Puello E, Galvan R, Campos S. Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. *Arch Med Res* 2011; 42: 318-323.
173. Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, et al. Reduced adiponectin concentration in women with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 799-800.
174. Gao XL, Yang HX, Zhao Y. Variations of tumor necrosis factor- α , leptin and adiponectin in mid-trimester of gestational diabetes mellitus. *Chin Med J* 2008; 121: 701-705.
175. Klein K, Bancher-Todesca D, Leipold H, et al. Retinol-binding protein 4 in patients with gestational diabetes mellitus. *J Womens Health* 2010; 19: 517-521.
176. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Mirzaei K, et al. Association between retinol-binding protein 4 concentrations and gestational diabetes mellitus and risk of developing metabolic syndrome after pregnancy. *Reprod Sci* 2010; 17: 196-201.
177. Tepper BJ, Kim YK, Shete V, et al. Serum retinol-binding protein 4 (RBP4) and retinol in a cohort of borderline obese women with and without gestational diabetes. *Clin Biochem* 2010; 43: 320-323.
178. Saad MF, Khan A, Sharma A, et al. Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 1998; 47: 544-549.
179. Utriainen T, Malmstroem R, Maekimattila S, et al. Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4h in normal subjects. *Diabetes* 1996; 45: 1364-1366.
180. Zeigerer A, Rodeheffer MS, McGraw TE, et al. Insulin regulates leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes by a PI 3 kinase independent mechanism. *Exp Cell Res* 2008; 314: 2249-2256.
181. Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E1-E14.
182. Vitoratos N, Deliveliotou A, Vlahos NF. Serum adiponectin during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes and normal controls. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 614-619.
183. Ost A, Danielsson A, Liden M, Eriksson U, Nystrom FH, Stralfors P (2007) Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *FASEB J* 21:3696–3704.
184. Monaco HL, Rizzi M, Coda A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science* 1995; 268:1039–1041.
185. Refai E, Dekki N, Yang SN. Transthyretin constitutes a functional component in pancreatic beta-cell stimulus secretion coupling. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:17020–17025.
186. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, et al. IL-12, TNF- α , and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4933-4938.

187. Uwaifo GI, Fallon EM, Chin J. Indices of insulin action, disposal, and secretion derived from fasting samples and clamps in normal glucose-tolerant black and white children. *Diabetes Care* 2002; 25: 2081-2087.
188. Kirwan JP, Huston-Presley L, Kalhan SC, et al. Clinically useful estimates of insulin sensitivity during pregnancy: validation studies in women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2001; 24: 1602-7.
189. Aberg A, Johnson E, Eskilsson I, Landin-Olsson M, Frid A. Predictive factors of developing diabetes mellitus in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 11-16
190. Metzger BE, Bybee DE, Freinkel N, Phelps RL, Radnavy RM, Vaisrub N. Gestational diabetes mellitus: correlations between the phenotypic and genotypic characteristics of the mother and abnormal glucose tolerance during the first year postpartum. *Diabetes* 1985; 34: 111-115
191. Retnakaran R, Qi Y, Seremer M, Connelly PW, Hanley AJ, Zinman B. Glucose intolerance in pregnancy and future risk of pre-diabetes or diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31: 2026-2031
192. Xiang AH, Wang C, Peters RK, Trigo E, Kjos SL, Buchanan TA. Coordinate changes in plasma glucose and pancreatic function in latino women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 1074-1079
193. García-García E, De la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, Tusié-Luna MT, Calzada-León R, Vázquez-Velázquez V, Barquera-Cervera S, Caballero-Romo Ade J, Orozco L, Velázquez-Fernández D, Rosas-Peralta M, Barriguete-Meléndez A, Zacarías-Castillo R, Ortega-González C, Sotelo-Morales J. Obesity and metabolic syndrome. A challenge for the Mexican Institutes of Health. *Rev Invest Clin* 2009; 61: 337-346.
194. Kwong S, Mitchell RS, Senior PA, Chik CL. Postpartum diabetes screening: adherence rate and the performance of fasting plasma glucose versus oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 2009; 32 : 2242-2244.
195. Xiang AH, Kawakubo M, Trigo E, Kjos SL, Buchanan TA. -cell compensation for?Declining insulin resistance in Hispanic women with recent gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33: 396-401.
196. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel- Hook G, Wallace P, Baron AD: Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest* 1998; 101: 2377– 2386.
197. Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK. The incidence rate; in: Lemeshow S (ed): *Adequacy of sample size in health studies*. Chichester, England: John Wiley & Sons, 1990, pp 29-35
198. Bennett WL, Ennen CS, Carrese JA, Hill-Briggs F, Levine DM, Nicholson WK, Clark JM. Barriers to and facilitators of postpartum follow-up care in women with recent gestational diabetes mellitus: a qualitative study. *J Womens Health* 2011; 20:239-245.

ANEXOS

1. Autorización del Comité de Investigación

Carta Dictamen

Página 1 de 2



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Solicitud de número de registro para protocolos de investigación autorizados

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3504

FECHA 16/05/2007

Estimado Dr. (a).

P R E S E N T E

Informo a usted que el protocolo de investigación en salud titulado:

Asociación de la proteína de unión del retinol y sus polimorfismos con la resistencia a la insulina en la diabetes gestacional.

fue sometido a consideración de este Comité Local de Investigación en Salud por el **Renata Patricia Saucedo García.**

De acuerdo con las recomendaciones emitidas por los revisores e integrantes del CLIS y tomando en cuenta que el protocolo de investigación cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, el dictamen fue: **A U T O R I Z A D O.**

Para dar cumplimiento a la normativa vigente, el protocolo de investigación fue enviado para su evaluación y dictamen a los Comités Locales de Investigación en Salud, que a continuación se enlistan:

Comité Local de Investigación en Salud Núm.	Unidad Sede del CLIS
3504	HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NUM. 3, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

En consecuencia, solicito a usted que una vez recibido el dictamen de autorización de los CLIS antes señalados, notifique a este Comité, el número de registro asignado.

Atentamente

Dr(a). 
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 3504

2. Carta de consentimiento informado

México DF a _____ de _____ de _____

Por medio de la presente _____ acepto participar en el protocolo de investigación titulado: Asociación de la proteína de unión del retinol y sus polimorfismos con la resistencia a la insulina en la diabetes gestacional, registrado ante el Comité Local de Investigación con el número: R-2007-3504-12, el objetivo del estudio es medir la concentración de la proteína de unión del retinol en la diabetes gestacional y en el embarazo normal e identificar la asociación de la resistencia a la insulina con la concentración de esta proteína y sus polimorfismos. Se me ha explicado que mi participación consistirá en tomas de sangre venosa en el último trimestre del embarazo, en la sexta semana posparto y después de 6 meses del parto. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: los riesgos y molestias asociados con la toma de la muestra sanguínea son desmayo o sensación de mareo, hematoma (acumulación de sangre bajo la piel) y punciones múltiples para localizar las venas. Los beneficios de mi participación es que se evaluará continuamente mis niveles de glucosa y mi riesgo a desarrollar diabetes en el futuro.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma

Investigador Responsable
Renata Patricia Saucedo García
Matrícula 99091877

Médico responsable
Armando Cruz Rodríguez

Los números telefónicos a los cuales puedo comunicarme en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio son el 56276900 Ext. 21479 y el 57662232

3. Hoja de recolección de datos

Referida por: _____ Folio: _____
 Nombre: _____ Fecha: _____ Edad: _____ Num. _____
 Afiliación: _____ Teléfono: _____ Ocupación: _____

Semana 24-36 de embarazo:

FUR: _____
 Edad gestacional (semanas): _____ Fecha probable de parto: _____
 Peso previo al embarazo: _____ Peso actual: _____ Talla: _____
 Ganancia de peso en el embarazo: _____ IMC previo al embarazo: _____
 TA (1): _____ TA (2): _____
 HAS previa al embarazo: NO _____ SI _____ controlada: _____
 HAS durante el embarazo: No _____ SI _____ Tiempo de evolución _____ Tx. _____

Controlada: SI _____ No _____
 Paridad Gestas: _____ Partos: _____ Cesáreas: _____ Abortos: _____
 Parto previo de un bebé por encima de 4 Kg. de peso: SI _____ No _____
 Peso de bebé(s) previo(s): _____
 Muerte de un bebé o recién nacido: SI _____ No _____
 Bebé anterior con una malformación: SI _____ No _____
 Diabetes gestacional previa: SI _____ No _____
 Familiar en primer grado con DM: No _____ SI _____ (quien) _____
 Tabaquismo: Nunca: _____ Actual: _____ Previo al embarazo: _____ Duración: _____
 Cantidad: _____
 Alcoholismo: Nunca: _____ Actual: _____ Previo al embarazo: _____ Duración: _____
 Cantidad: _____
 Actividad física actual: ligera: _____ moderada: _____ severa: _____
 Act. física previa al embarazo: _____
 Glucosa previa y fecha: _____
 Toma vitaminas (cuáles): _____

Tx para la diabetes gestacional: Dieta: _____

Insulina: _____ Dosis: _____ Tiempo: _____
 Cuando le Dx la DMG: _____
 Motivo de internamiento: _____

Semana 6 posparto:

Edad gestacional al momento del parto o cesárea: _____
 Parto o cesárea: _____ Motivo: _____
 Peso del bebé al nacimiento: _____ Talla del bebé: _____
 Peso actual del bebé: _____
 Amamanta a su bebé: _____
 Peso: _____ Talla: _____ IMC: _____ TA (1): _____ TA (2): _____

6 meses posparto:

Peso: _____ Talla: _____ IMC: _____ TA (1): _____ TA (2): _____
 Peso actual del bebé: _____
 Amamanta a su bebé: _____

Resultados:

	Semana 24-36 de embarazo	Semana 6 posparto	6 meses posparto
Glucosa			
Colesterol			
Triglicéridos			
LDL			
HDL			
Insulina			
RBP-4			
Polimorfismo -804			
Polimorfismo +9476			
Polimorfismo +390			

4. Inmunoensayos

a) Determinación de $TNF\alpha$

Medición realizada en el analizador automatizado para inmunoensayos enzimáticos con detección por quimioluminiscencia Immulite de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles USA).

1. Calibrar el equipo de Immulite siguiendo las indicaciones del programa que especifica el equipo.
2. Colocar el reactivo para la determinación de $TNF\alpha$ en el carrusel de reactivos del equipo y presionar GO.
3. Programar el equipo para la realización de la curva estándar de $TNF\alpha$
4. Colocar al menos 100 μ L del estándar bajo en una copa para estándar y 100 μ L de estándar alto en una copa para estándar.
5. Presionar GO para iniciar el análisis.
6. Cuando ya se obtiene la curva de calibración por el equipo se procede a correr las muestras y controles. Se colocan al menos 100 μ L de estas muestras en sus copas correspondientes y se colocan en el equipo.

b) Determinación de RBP4

Medición por radioinmunoanálisis (RIA) con estuche comercial de Phoenix Pharmaceuticals, Inc (Burlingame, California USA).

1. Etiquetar dos tubos de polipropileno para las cuentas totales y dos para el enlace no específico.
2. Etiquetar 16 tubos para los estándares por duplicado (A-H) y para los controles y muestras de los pacientes

Estándar	ng/mL
A	250
B	125
C	62.5
D	31.25
E	15.63
F	7.81
G	3.91
H	1.95

3. Diluir las muestras de suero 1:1000 con buffer
4. Pipetear 200 μ L de buffer en los tubos de unión no específica y 100 μ l a los tubos de unión total
5. Pipetear 100 μ L de cada estándar A a H a sus tubos correspondientes
6. Pipetear 100 μ L de cada control y muestras de pacientes a sus tubos correspondientes.
7. Pipetear 100 μ l del anticuerpo primario en todos los tubos, excepto los de cuentas totales y unión no específica
8. Agitar los tubos
9. Cubrir los tubos y mantenerlos a 4°C 16-24 horas
10. Reconstituir I^{125} -RBP4 con 13 mL de buffer y mezclar. Ajustar la solución con buffer hasta que las cuentas por minuto en el contador de rayos gamma sea de 8000-10000 cpm/100 μ L

11. Adicionar 100 μL de $\text{I}^{125}\text{-RBP}^4$ a cada tubo y agitar
12. Cubrir los tubos y mantenerlos a 4°C 16-24 horas
13. Reconstituir el segundo anticuerpo con 13 mL de buffer y el suero de conejo con 13 mL de buffer
14. Adicionar 100 μL del segundo anticuerpo y 100 μL de suero de conejo a todos los tubos excepto a los de cuentas totales
15. Agitar los tubos y mantenerlos a temperatura ambiente durante 90 minutos
16. Adicionar 500 μL de buffer a cada tubo excepto a los de cuentas totales y agitarlos
17. Centrifugar los tubos a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C
18. Decantar los tubos excepto los de cuentas totales
19. Contar la radioactividad de cada tubo en un contador de radiaciones gamma durante 1 minuto.

c) Determinación de leptina

Medición por RIA con estuche comercial de Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)

1. Etiquetar dos tubos de polipropileno para las cuentas totales y dos para el enlace no específico.
2. Etiquetar 16 tubos para los estándares por duplicado (A-H) y para los controles y muestras de los pacientes.

Estándar	ng/mL
A	0.5
B	1.0
C	2.0
D	5.0
E	10.0
F	20.0
G	50.0
H	100.0

3. Pipetear 300 μ L de buffer en los tubos de unión no específica, 200 μ L a los de unión total y 100 μ L a los tubos restantes excepto a los de cuentas totales
4. Pipetear 100 μ L de los estándares, controles y muestras de pacientes a sus tubos correspondientes.
5. Adicionar 100 μ L de I^{125} -leptina a cada tubo y agitar
6. Adicionar 100 μ L de anticuerpo a todos los tubos excepto a los de cuentas totales y a los de unión no específica
7. Agitar y mantener los tubos 20-24 horas a 4°C
8. Adicionar 1.0 mL de reactivo precipitante a todos los tubos (excepto cuentas totales)
9. Agitar y mantener los tubos a 4°C durante 20 minutos
10. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C
11. Decantar todos los tubos excepto los de cuentas totales
12. Contar la radioactividad de cada tubo en un contador de radiaciones gamma durante 1 minuto.

d) Determinación de adiponectina

Medición por RIA con estuche comercial de Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)

1. Etiquetar dos tubos de polipropileno para las cuentas totales y dos para el enlace no específico.
2. Etiquetar 16 tubos para los estándares por duplicado (A-I) y para los controles y muestras de los pacientes.

Estándar	ng/mL
A	0.938
B	1.88
C	3.75
D	7.5
E	15.0
F	30.0
G	60.0
H	120.0
I	240.0

2. Diluir las muestras de suero 1:500 con buffer
3. Pipetear 300 μ L de buffer en los tubos de unión no específica, 200 μ L a los de unión total y 100 μ L a los tubos restantes excepto a los de cuentas totales
4. Pipetear 100 μ L de los estándares, controles y muestras de pacientes a sus tubos correspondientes.
5. Adicionar 100 μ L de I¹²⁵-adiponectina a cada tubo y agitar
6. Adicionar 100 μ L de anticuerpo a todos los tubos excepto a los de cuentas totales y a los de unión no específica
7. Agitar y mantener los tubos 20-24 horas a temperatura ambiente
8. Adicionar 10 μ L de suero de conejo a todos los tubos excepto a los de cuentas totales

9. Adicionar 1.0 mL de reactivo precipitante a todos los tubos (excepto cuentas totales)
10. Agitar y mantener los tubos a 4°C durante 20 minutos
11. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C
12. Decantar todos los tubos excepto los de cuentas totales
13. Contar la radioactividad de cada tubo en un contador de radiaciones gamma durante 1 minuto.

e) Determinación de insulina

Medición por RIA con estuche comercial de Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)

1. Etiquetar dos tubos de polipropileno para las cuentas totales y dos para el enlace no específico.
2. Etiquetar 14 tubos para los estándares por duplicado (A-G) y para los controles y muestras de los pacientes.

Estándar	$\mu\text{U/mL}$
A	2.0
B	5.0
C	10.0
D	20.0
E	50.0
F	100.0
G	200.0

3. Pipetear 300 μL de buffer en los tubos de unión no específica, 200 μL a los de unión total y 100 μL a los tubos restantes excepto a los de cuentas totales
 3. Pipetear 100 μL de los estándares, controles y muestras de pacientes a sus tubos correspondientes.
 4. Adicionar 100 μL de $\text{I}^{125}\text{-insulina}$ a cada tubo y agitar
 5. Adicionar 100 μL de anticuerpo a todos los tubos excepto a los de cuentas totales y a los de unión no específica
 6. Agitar y mantener los tubos 20-24 horas a temperatura ambiente
 7. Adicionar 1.0 mL de reactivo precipitante a todos los tubos (excepto cuentas totales)
 8. Agitar y mantener los tubos a 4°C durante 20 minutos
 9. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C
 10. Decantar todos los tubos excepto los de cuentas totales
 11. Contar la radioactividad de cada tubo en un contador de radiaciones gamma durante 1 minuto.

5. Determinación de polimorfismos

1. Se extraen 5 mL de sangre periférica colocándose en un tubo con EDTA.
2. Se aísla el DNA de los leucocitos de sangre periférica utilizando el kit GFX Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences, NJ, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.
3. Se cuantifica el DNA obtenido, en un espectrofotómetro ND-1000, NanoDrop.
4. Se determina la integridad del DNA, a través de geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y TBE como amortiguador. La visualización del desplazamiento se realiza en un transiluminador.
5. Se diluyen las muestras de los pacientes con agua para obtener una concentración de DNA de 20 ng/mL
6. Se preparan las reacciones de discriminación alélica con las sondas TaqMan para cada polimorfismo de la siguiente forma:

TaqMan universal PCR Master Mix	10.0 μ L
Sondas	0.5 μ L
Agua	4.5 μ L
DNA (20 ng/ μ L)	5.0 μ L

7. Se colocan 20 μ L de la reacción de cada muestra a los pozos de la placa.
8. En tres pozos de la placa se colocan 5 μ L de agua para controles de amplificación (NTC, no template control).
9. Se coloca la placa en el ABI PRISM 7000 y se programa para la amplificación del DNA y para la discriminación alélica.

6. Derivados de la tesis

Reconocimiento

Primer lugar en la modalidad de cartel

4to Congreso Nacional de Obesidad, Academia Mexicana para el Estudio de la Obesidad. Tema: Obesidad materna, diabetes gestacional y peso del producto, septiembre 2010.

Presentación de avances en congresos y sesiones

XXXII Congreso Nacional de Bioquímica Clínica y Expolab, Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Conferencista: Resistencia a la insulina en el embarazo, marzo 2009.

Sesión General UMAE Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS, Conferencista: Disglucemia postparto, abril 2010.

XXX Jornadas de Investigación UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS. Presentación cartel: Factor de necrosis tumoral en diabetes gestacional, mayo 2010.

XIX Foro Nacional de Investigación en Salud IMSS. Presentación cartel: Adipocinas en DMG y postparto, septiembre 2010.

Sesión general UMAE Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS. Conferencista: Alteración metabólica en diabetes gestacional, mayo 2011.

XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica Clínica y Expolab Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Conferencista: Interacción entre el metabolismo óseo y energético en la diabetes gestacional y síndrome metabólico, julio 2011.

30º Coloquio de Investigación Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
Conferencista: Diabetes gestacional, septiembre 2011.

Capítulo de libro

Diabetes mellitus. Bases terapéuticas del Dr. Arturo Zárate. Editorial Trillas.
Tercera edición, 2011. Capítulo: Diabetes y embarazo.

Financiamientos obtenidos

Apoyo Financiero para el Desarrollo de Proyectos de Investigación en Salud del
IMSS, 2007 (FIS/IMSS/PROT 080).

Apoyo Financiero del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad
Social 2007, SSA/ IMSS/ ISSSTE-CONACYT (2007-C01-69232).

Formación de alumnos

Servicio Social de Licenciatura de Química: Factor de necrosis tumoral en
diabetes gestacional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM,
2009.

Colaboración en un Diplomado en Epidemiología Clínica: Evaluación del estado
nutricional del hijo de madre con diabetes tipo 2 y gestacional que nacieron
del 2007- 2010, IMSS 2011.

7. Publicaciones

Saucedo R, Zarate A, Basurto L, Hernández M, Puello E, Galvan R, Campos S. Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. Arch Med Res 2011; 42: 318-323.

Saucedo R, Zarate A, Basurto L, Hernández M, Puello E, Campos S, Moreno E. Women with gestational diabetes develop glucose intolerance with high frequency within one year postpartum Gyn Obstet Invest (en prensa).

Zárate A, Saucedo R, Basurto L, Hernández M. El nuevo enfoque hacia la diabetes gestacional. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2011; 49: 1-3.

Zárate A, Hernández-Valencia M, Basurto L, Saucedo R. Tratamiento de la diabetes en mujeres embarazadas. Ginecol Obstet Mex 2008; 76: 211-6.

ORIGINAL ARTICLE

Relationship Between Circulating Adipokines and Insulin Resistance During Pregnancy and Postpartum in Women with Gestational Diabetes

Renata Saucedo,^a Arturo Zarate,^a Lourdes Basurto,^a Marcelino Hernandez,^a Edgardo Puello,^b Rosa Galvan,^a and Sandra Campos^a

^aEndocrine Research Unit, National Medical Center, ^bHospital of Gynecology and Obstetrics, Medical Center La Raza, Mexican Social Security Institute, Mexico City, Mexico

Received for publication March 23, 2011; accepted June 14, 2011 (ARCMED-D-11-00152).

Background and Aims. We undertook this study to assess the relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes mellitus (GDM).

Methods. This was a prospective study including 60 women with GDM and 60 subjects with normal gestation who were evaluated at gestational week 30, 6 weeks and 6 months postpartum. Circulating adipokines that were evaluated during the study were leptin, adiponectin, retinol-binding protein-4 (RBP4), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).

Results. Women with GDM showed higher insulin resistance measured by HOMA-IR than subjects with normal gestation (2.3 ± 2.3 vs. 1.3 ± 0.95). There was no difference between groups in adipokines; however, in women with a healthy pregnancy, RBP4 was associated with insulin resistance ($r = 0.47$, $p < 0.05$). At 6 weeks and 6 months postpartum, women with previous GDM exhibited persistent elevated leptin and insulin resistance. RBP4 was associated with insulin resistance only in women with a previous healthy pregnancy ($r = 0.51$, $p < 0.05$). In addition, progressively impaired glucose tolerance was observed after delivery in women with previous GDM.

Conclusions. It was demonstrated that GDM is associated with greater insulin resistance than observed in normal pregnancy; however, adipokines are similar in both groups. RBP4 levels are significantly associated with insulin resistance in healthy women during pregnancy and postpartum. After a pregnancy complicated by GDM, leptin and insulin resistance remain elevated and glucose tolerance worsens. © 2011 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Gestational diabetes mellitus, Adiponectin, Leptin, Retinol-binding protein-4, Insulin resistance.

Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) is described as glucose intolerance of variable intensities that begins or is first diagnosed during pregnancy and usually resolves during the first postpartum weeks (1). It is generally accepted that women with GDM exhibit eminent insulin resistance and are at high risk for developing type 2 diabetes (T2D) after delivery (2). The mechanism responsible

for the development of T2D is unclear, but obesity and overweight-related factors are strongly implicated (3).

Adipocyte-derived cytokines (adipokines) provide an important link between obesity-related disorders and insulin resistance. Insulin resistance during pregnancy has been partially explained by the influence of cytokines derived from fat tissue, mainly tumor necrosis factor- α (TNF- α), adiponectin and leptin (4–6); however, recent studies have shown that another adipokine known as retinol-binding protein-4 (RBP4) may play a role in regulating glucose metabolism and insulin sensitivity (7). Overexpression of RBP4 induces systemic insulin resistance in normal mice, whereas genetic disruption of RBP4 increases

Address reprint requests to: Renata Saucedo, Endocrine Research Unit, National Medical Center, Cuauhtemoc 330, Mexico City 06720, Mexico; Phone: (+52) (55) 55887521; E-mail: sgreata@yahoo.com

insulin sensitivity (7). In humans, several studies have shown that circulating RBP4 levels are related to insulin resistance (8–9). However, other studies have reported controversial findings (10–11).

Only a few studies have addressed adipokine levels in GDM and postpartum, and the reports are scarce and yield conflicting results. Thus, we investigated the relationship between insulin resistance and some adipokines in gestational diabetes during pregnancy and postpartum.

Materials and Methods

This is a prospective study conducted with 60 women with GDM and 60 pregnant healthy controls. GDM was diagnosed by a 2-h 75-g oral glucose tolerance test (OGTT) at 24–28 weeks of gestation, the cut-off values being >5.2 mmol/l fasting, >10.0 mmol/l at 1 h and >7.8 mmol/l at 2 h (1). The protocol was approved by the Hospital Research Ethics Board and all participants provided written informed consent. Women with arterial hypertension, renal disease, liver disease, thyroid disorders or other endocrine or chronic diseases were excluded. In the morning, at gestational week 30 and before initiation of insulin therapy in those women with GDM treated with insulin, anthropometric measurements of height and weight were obtained using a medical scale. Blood samples were also taken. A physical examination including measurement of blood pressure and a detailed history including family history of diabetes and obstetrical and medical information were obtained. After delivery, women with GDM and women with normal pregnancy returned to the clinical investigation unit for a 2-h 75-g OGTT at both 6 weeks and 6 months postpartum.

Laboratory Measurements

Venous blood samples for biochemical analysis were obtained in the morning, after an overnight fast, from an antecubital vein between 7:30 AM and 8:30 AM using vacuum tubes. Samples were centrifuged at 400 g for 15 min, and aliquots were obtained and stored at -70°C until assayed in a single run. Plasma glucose, triglycerides and total cholesterol were measured by enzymatic assays with a Roche Cobas Mira analyzer using commercial kits (Stanbio Laboratory, Boerne, TX). Insulin, leptin, adiponectin, and RBP4 concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA); insulin was measured using reagents from Siemens Healthcare Diagnostics (Los Angeles, CA). Sensitivity was 8.3 pmol/l and intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 5.2 and 7.3%, respectively. Leptin and adiponectin were quantified using commercial kits from Millipore Co. (Billerica, MA). Adiponectin sensitivity was 1 ng/mL and CVs were 3.9 and 8.5%; leptin sensitivity was 0.5 ng/mL and CVs were 5 and 4.5%.

RBP4 was determined using reagents from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA). Sensitivity was 6.4 pg/mL and CVs were 4.9 and 8.3%. TNF- α was measured by chemiluminescent immunoassay (Immulite Analyzer, Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Sensitivity was 1.7 pg/mL, and CVs were 3.2 and 5.2%. BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. The degree of insulin resistance was estimated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as follows: fasting glucose (mmol/L) x fasting insulin (mU/L)/22.5 (12).

Statistical Analysis

The Kolmogorov–Smirnov statistical test was used to test the normality of the distributions, and a nonparametric statistical analysis was performed. To compare differences between groups, we used Friedman and Kruskal–Wallis tests. Correction for potential confounders was performed with analysis of covariance. Spearman test was used to evaluate correlation values, and partial correlation analyses were performed to adjust for age and BMI. Multiple regression models were used to assess the influence of adipokines on insulin resistance, considering potential factors associated with this variable such as BMI and age. Statistical analyses were carried out using Statistica v.8 (StatSoft, Tulsa, OK). Significance was achieved at $p < 0.05$.

Results

During Pregnancy

Baseline participant characteristics are shown in Table 1. It is noteworthy that pregnant GDM women were older and

Table 1. General characteristics of participants at gestational week 30

	GDM (n = 60)	Control (n = 60)
Age (year)	31.9 \pm 5.6 ^a	24.8 \pm 6.4
Weight (kg)	79.0 \pm 12.8 ^a	67.8 \pm 14.1
Height (m)	1.55 \pm 0.06	1.55 \pm 0.07
BMI (kg/m ²)	30.2 \pm 4.9 ^a	28.4 \pm 7.3
Systolic blood pressure (mmHg)	108.6 \pm 13.9 ^a	104.6 \pm 10.7
Diastolic blood pressure (mmHg)	71.8 \pm 6.6 ^a	66.8 \pm 8.2
Fasting insulin (pmol/l)	61.1 \pm 40.3 ^a	50.7 \pm 33.3
Fasting glucose (mmol/l)	5.38 \pm 1.18 ^a	3.89 \pm 0.61
HOMA-IR	2.3 \pm 2.3 ^a	1.3 \pm 0.95
Triglycerides (mmol/l)	3.25 \pm 1.15 ^a	2.65 \pm 1.11
Total cholesterol (mmol/l)	6.89 \pm 1.37	6.86 \pm 1.57
Adiponectin (ng/mL)	8.6 \pm 4.0	11.96 \pm 5.86
Leptin (ng/mL)	22.7 \pm 4.9	23.3 \pm 11.7
RBP-4 ($\mu\text{g/mL}$)	4.7 \pm 1.9	5.3 \pm 1.76
TNF- α (pg/mL)	10.4 \pm 2.1	10.1 \pm 3.2

Data are mean \pm SD.

^a $p < 0.05$.

more overweight than women in the control group. The two groups had an equal proportion of women who were smokers before pregnancy (26% in the GDM group, 25% in the control group), and none reported maternal smoking during pregnancy. All women with GDM were diet controlled and 37 patients required insulin therapy. Figure 1 illustrates that fasting plasma insulin and HOMA-IR were higher in GDM; the difference remained after adjustments for age and body weight. By contrast, adipokine concentrations were similar in both groups (Figure 2). Insulin resistance was associated with BMI ($r = 0.65$, $p < 0.05$; $r = 0.43$, $p < 0.05$) in both groups and with triglycerides ($r = 0.21$, $p < 0.05$) in control group.

The relationship between adipokines and insulin resistance appeared different between groups, being only significantly associated in the healthy pregnancy group. There was a positive correlation between serum levels of RBP4 and fasting insulin ($r = 0.48$, $p < 0.05$) and HOMA-IR ($r = 0.47$, $p < 0.05$). These observed associations remained significant after adjusting for age and weight. In a multivariate regression analysis including potential covariates, serum RBP4 concentration was a statistically significant predictor of HOMA-IR ($\beta = 0.52$, $p = 0.001$) and insulin levels ($\beta = 0.51$, $p = 0.02$).

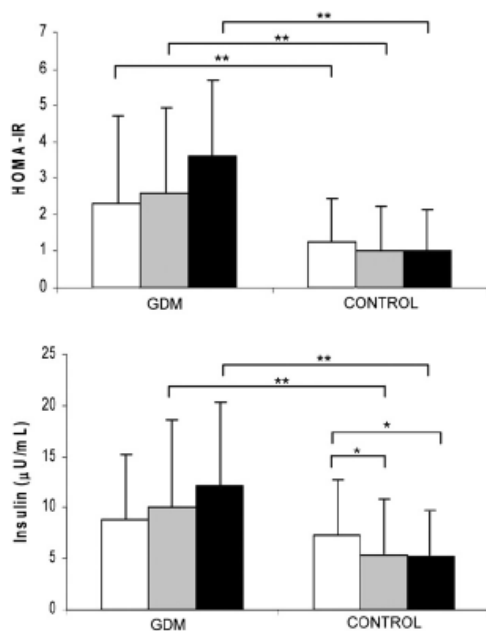


Figure 1. HOMA-IR and insulin levels during late pregnancy (30 weeks, □); 6 weeks ■; and 6 months ■ postpartum in women with GDM and women with normal glucose tolerance. Data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Postpartum Period

After delivery, triglycerides and total cholesterol decreased significantly and fasting glucose increased in both groups. In healthy pregnant controls, BMI decreased. Women with gestational diabetes had elevated BMI, fasting glucose, triglycerides and total cholesterol compared with controls (Table 2). HOMA-IR remained elevated and higher in women with previous GDM than in the control group during the postpartum period up to 6 months (Figure 1). Insulin resistance was associated with BMI ($r = 0.43$, $p < 0.05$; $r = 0.56$, $p < 0.05$), age ($r = 0.24$, $p < 0.05$; $r = 0.32$, $p < 0.05$) and triglycerides ($r = 0.41$, $p < 0.05$; $r = 0.45$, $p < 0.05$) in both groups. Moreover, in women with previous GDM, TNF- α levels increased significantly, whereas no significant change was observed in leptin, adiponectin and RBP4 levels. On the other hand, leptin, adiponectin, and RBP4 concentrations decreased after delivery in the control group, whereas TNF- α levels increased significantly; in addition, insulin resistance also decreased (Figure 2). There was a correlation between RBP4 and insulin levels ($r = 0.52$, $p < 0.05$) and HOMA-IR ($r = 0.51$, $p < 0.05$). Furthermore, the change in RBP4 from pregnancy to 6 weeks postpartum was positively related to the corresponding change in insulin levels ($r = 0.35$, $p < 0.05$) and HOMA-IR ($r = 0.32$, $p < 0.05$). Using multiple regression analysis, RBP4 was found to be an independent predictor of insulin resistance ($\beta = 0.49$, $p = 0.01$).

Comparing the two groups, leptin levels were remarkably elevated in women with previous GDM and a positive correlation was observed between leptin and insulin levels ($r = 0.49$, $p < 0.05$); however, this relationship was no longer significant after adjustment for BMI and age.

In the postpartum period of women with GDM, the percentage of women with impaired glucose tolerance and diabetes increased with time (Figure 3).

Discussion

In this report we demonstrate that adipokine levels are not significantly different between GDM patients and pregnant controls. By contrast, previous reports have shown elevated RBP4, leptin and TNF- α concentrations as well as lower adiponectin levels in GDM (4–6,13–16). We speculate that one of the reasons for the discrepancy of our data with previously published reports could be the elevated BMI in our GDM group. This interpretation is supported by previous studies of obese women with GDM where no difference was observed in RBP4 levels (17–18). The discrepancies may also be due to the time of maternal blood collection, the methods used to measure adipokines, sample size, and population differences.

We also observed that adiponectin levels tended to be lower among GDM subjects, although not statistically

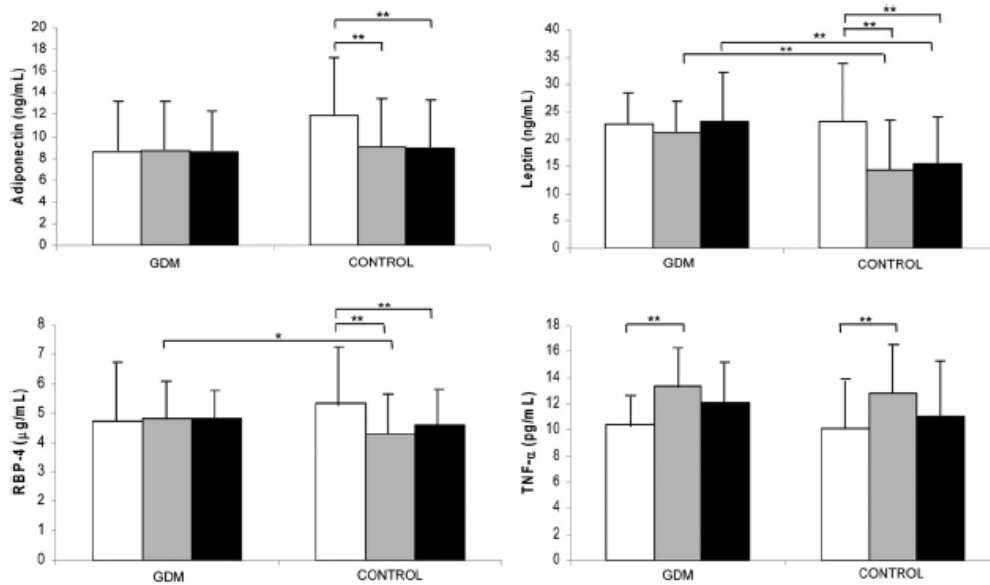


Figure 2. Adipokines during late pregnancy (30 weeks, □); 6 weeks ■; and 6 months ■ postpartum in women with GDM and women with normal glucose tolerance. Data are presented as mean \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01.

significantly. In this regard, it has been suggested that the low levels of adiponectin may induce severe insulin resistance prior to the onset of GDM, and that adiponectin may be related to the pathogenesis of abnormal glucose metabolism during pregnancy (4–5).

We found that RBP4 was strongly associated with insulin and HOMA-IR in healthy pregnant controls, whereas no relationship could be observed in GDM. Previous data indicate that RBP4 expression is regulated by the degree of obesity and insulin resistance (17–18). Thus, in this study, the increase in insulin resistance and obesity could explain an abnormal regulation of RBP4.

It has been suggested that serum adipokines may contribute to the development or worsening of insulin

resistance. Therefore, to explore whether the changes in adipokine levels are reversible in women with GDM, the women were followed longitudinally postpartum. In women with previous GDM, it was observed that insulin resistance persisted in the postpartum period in association with impaired glucose tolerance; adiponectin, leptin and RBP4 levels also remained unchanged. However, leptin levels were remarkably elevated compared with the control group. It is possible that insulin resistance postpartum may be contributing to these elevated levels. A positive association between leptinemia and insulinemia has been reported in numerous studies of obese and nonobese humans (19–20). Experimentally, increased insulin levels may stimulate leptin production in adipocytes, and vice versa,

Table 2. Clinical parameters in patients with and without gestational diabetes mellitus at 6 weeks and 6 months after delivery

	Gestational diabetes		No gestational diabetes	
	6 weeks	6 months	6 weeks	6 months
Weight (kg)	72.7 \pm 12.6 ^b	73.5 \pm 13.5 ^b	61.3 \pm 10.5 ^a	59.9 \pm 9.7 ^a
BMI (kg/m ²)	30.08 \pm 4.2 ^b	30.4 \pm 5.2 ^b	25.6 \pm 4.5 ^a	24.89 \pm 4.2 ^a
Fasting glucose (mmol/l)	6.05 \pm 2.01 ^b	7.3 \pm 3.5 ^{a,b}	4.22 \pm 0.54 ^a	4.37 \pm 0.58 ^a
Triglycerides (mmol/l)	2.31 \pm 1.09 ^{a,b}	2.21 \pm 1.22 ^{a,b}	1.73 \pm 0.92 ^a	1.64 \pm 1.01 ^a
Total cholesterol (mmol/l)	6.05 \pm 1.27	5.96 \pm 1.68 ^{a,b}	5.63 \pm 1.29 ^a	5.23 \pm 1.15 ^a

Data are mean \pm SD.

^a p < 0.05 vs. during pregnancy.

^b p < 0.05 vs. no gestational diabetes.

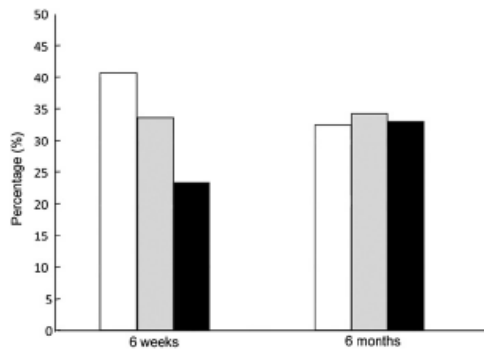


Figure 3. Prevalence (%) of glucose tolerance status in previous GDM; normal glucose tolerance □; impaired glucose tolerance ■; and diabetes ■.

an increase in leptin levels may lead to insulin resistance and alter β -cell secretory capacity (21–22). In this study, a positive correlation was observed between leptin and insulin levels; however, this relationship was no longer significant after adjustment for BMI and age.

In contrast, in women without GDM we found decreased insulin, leptin, adiponectin and RBP4 concentrations at 6 weeks postpartum. In recent studies, higher leptin and adiponectin levels were observed during normal pregnancy, explained as due to changes in BMI, fasting insulinemia, and adipokine synthesis in placenta (23). In addition, the change in RBP4 levels was associated with changes in insulin levels and HOMA-IR. It has been suggested that RBP4 expression may be a direct consequence of hyperinsulinemia. However, women with previous GDM had higher fasting plasma insulin levels and HOMA-IR than healthy women. Moreover, RBP4 and insulin levels were not associated in women with GDM who did not show an improvement in insulin sensitivity at postpartum. Therefore, an increase in plasma insulin levels and HOMA-IR does not determine RBP4 levels. Nevertheless, it has been suggested that there may be a threshold at which plasma insulin is permissive for increased RBP4 expression (8).

Serum TNF- α levels increased at 6 weeks postpartum in both groups. TNF- α is a cytokine that is linked to insulin resistance and is considered a major proinflammatory cytokine because it stimulates the synthesis of nitric oxide and other inflammatory mediators that drive chronic delayed inflammatory response. It has been demonstrated that during late pregnancy, compared with the postpartum period, the capacity of monocytes to produce TNF- α is reduced by ~40%, and this is paralleled by increases in cortisol, estradiol and progesterone during pregnancy (24).

To the best of our knowledge this is the first report comparing various adipokines in pregnancy and postpartum. However, this study has some potential limitations, the first being the differences in age and weight between

women with GDM and women with normal pregnancy, although adjustments for these variables were made. A second limitation is that we did not assess insulin resistance with clamp studies, the gold standard for analyzing insulin resistance (25). Although HOMA-IR can provide an accurate measure of insulin resistance even during late pregnancy, clamp measurements may have increased our sensitivity for detecting insulin resistance (26).

In summary, adipokine levels were similar between GDM and normal pregnancy. Women with GDM exhibited a higher index of insulin resistance measured by HOMA-IR, which persisted in the postpartum period, in association with the occurrence of deterioration in glucose tolerance. Leptin levels remained elevated in this group after delivery. By contrast, women with a previous normal pregnancy showed a decrease in insulin, adiponectin, leptin and RBP4 concentrations at postpartum. Only RBP4 levels correlated with insulin resistance and changes in insulin sensitivity in healthy women.

Acknowledgments

This work was supported by scientific grants from IMSS (FIS/IMSS/PROT 080) and CONACYT (2007-01-69232). This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

AZ, LB, MH and RG hold a fellowship from the National System of Investigators. We thank the Hospital of Gynecology and Obstetrics, Medical Center La Raza, Mexican Social Security Institute, for providing patient care services. We also thank Edgar Castelan, Labtec Laboratory, Evangelina Enriquez, ISSSTE Hospital, and Erika Moreno, UNAM, for performing the biochemistry assays, and Dr. Armando Cruz for providing access to patients.

References

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (Position Statement). *Diabetes Care* 2010;33(suppl 1): 62–69.
2. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, et al. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009;373:1773–1779.
3. Löbner K, Knopff A, Baumgarten A, et al. Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 2006;55:792–797.
4. Remakaran R, Hanley AJ, Raif N, et al. Reduced adiponectin concentration in women with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2004;27: 799–800.
5. Gao XL, Yang HX, Zhao Y. Variations of tumor necrosis factor- α , leptin and adiponectin in mid-trimester of gestational diabetes mellitus. *Chin Med J* 2008;121:701–705.
6. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepage J, et al. TNF- α is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002; 51:2207–2213.
7. Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436:356–362.

8. Graham TE, Yang Q, Bluher M, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552–2563.
9. Gavi S, Stuart LM, Kelly P, et al. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1886–1890.
10. Janke J, Engeli S, Boschmann M, et al. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 2006;55:2805–2810.
11. Yao-Borengasser A, Vama V, Bodles AM, et al. Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2590–2597.
12. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419.
13. Chan TF, Chen HS, Chen YC, et al. Increased serum retinol-binding protein 4 concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Reprod Sci* 2007;14:169–174.
14. Klein K, Bancher-Todesca D, Leipold H, et al. Retinol-binding protein 4 in patients with gestational diabetes mellitus. *J Womens Health* 2010;19:517–521.
15. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Mirzaei K, et al. Association between retinol-binding protein 4 concentrations and gestational diabetes mellitus and risk of developing metabolic syndrome after pregnancy. *Reprod Sci* 2010;17:196–201.
16. Lewandowski KC, Stojanovic N, Bienkiewicz M, et al. Elevated concentrations of retinol-binding protein-4 (RBP-4) in gestational diabetes mellitus: negative correlation with soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1). *Gynecol Endocrinol* 2008;24:300–305.
17. Tepper BJ, Kim YK, Shete V, et al. Serum retinol-binding protein 4 (RBP4) and retinol in a cohort of borderline obese women with and without gestational diabetes. *Clin Biochem* 2010;43:320–323.
18. Krzyzanowska K, Zemany L, Krugluger W, et al. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia* 2008;51:1115–1122.
19. Saad MF, Khan A, Sharma A, et al. Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 1998;47:544–549.
20. Utriainen T, Malmstrom R, Maekimattila S, et al. Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes* 1996;45:1364–1366.
21. Zeigerer A, Rodeheffer MS, McGraw TE, et al. Insulin regulates leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes by a PI 3 kinase independent mechanism. *Exp Cell Res* 2008;314:2249–2256.
22. Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E1–E14.
23. Vitoratos N, Deliveliotou A, Vlahos NF, et al. Serum adiponectin during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes and normal controls. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:614–619.
24. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, et al. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4933–4938.
25. Uwaifo GI, Fallon EM, Chin J. Indices of insulin action, disposal, and secretion derived from fasting samples and clamps in normal glucose-tolerant black and white children. *Diabetes Care* 2002;25:2081–2087.
26. Kirwan JP, Huston-Presley L, Kalhan SC, et al. Clinically useful estimates of insulin sensitivity during pregnancy: validation studies in women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2001;24:1602–1607.

Ms. No. 201101029, Gynecologic and Obstetric Investigation

martes, julio 19, 2011, 3:37 am

De: "goi@karger.ch" <goi@karger.ch>

A: sgrenata@yahoo.com

July 19, 2011

Gynecologic and Obstetric Investigation

Manuscript No.: 201101029

Title: WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES DEVELOP GLUCOSE INTOLERANCE WITH HIGH FREQUENCY WITHIN ONE YEAR POSTPARTUM

Saucedo R, Zarate A, Basurto L, Hernandez M, Puello E, Campos S, Moreno E

Dear Ms. Saucedo,

Thank you for submitting a second revised version of your manuscript to Gynecologic and Obstetric Investigation.

We thank you for including all suggestions. Figure one clearly explains the increased incidence of diabetes and glucose intolerance in the different time periods.

We are pleased to inform you that this version of your paper has been accepted for publication and forwarded to the Editing and Production Department who will be contacting you shortly.

We hope you will continue to submit work from your group to Gynecologic and Obstetric Investigation in the future.

With kind regards,

Susan Aeschbach

Editorial Office

"Gynecologic and Obstetric Investigation"

S. KARGER AG - Medical and Scientific Publishers

e: goi@karger.ch

f: +41 61 306 1434

t: +41 61 306 1344

w: www.karger.com/goi