

Búsqueda de la asociación de los polimorfismo rs1884614 y rs2144908 del gen HNF4- α con la diabetes gestacional

Tte. Q.B. Andrés **Balderas-Cornelio**,* Tte. Cor. M.C., M. en C. Sergio Gabriel **Martínez-Salas**,**
Tte. Q.B., M. en C. José Manuel **Campos-Peralta**,*** Tte. Q.B. Lucila Maritza **Lozano-Trenado**,***
Tte. Q.B. Margarita Nora **González-Ruiz**,*** Tte. Q.B. Pascual Francisco **Lucio-Monter**,***
Cap. 2/o. Q.B. Dra. en C. Virginia **Sánchez-Monroy*****

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. La diabetes gestacional (DG) es un trastorno sistémico que genera cambios metabólicos en la madre y en el producto haciéndolos susceptible a múltiples padecimientos. Algunos genes se han asociados con la DM2, entre éstos el Factor Hepatocítico Nuclear 4- α (HNF4- α), el cual es una proteína que forma parte de una red de transcripción importante para el desarrollo, diferenciación y función de las células b-pancreáticas y es dirigida casi exclusivamente por el promotor 2 (P2).

Objetivo. Búsqueda de la asociación de los polimorfismos rs1884614 y rs2144908 en el promotor 2 del gen HNF4- α con la DG.

Material y métodos. Se analizó el material genético de 80 pacientes, obtenido del raspado de carrillo bucal. Las variantes rs1884614 y rs2144908 se amplificaron por PCR y se secuenciaron para la obtención de electroferogramas, se determinó el grado de asociación entre las poblaciones de estudio, a través de las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y la significancia estadística empleando la prueba de la χ^2 .

Resultados. No se encontró relación entre las variables de estudio y la DG

Palabras clave: Diabetes, diabetes gestacional, polimorfismo, gen HNF4- α , variantes, promotor 2.

Search for the association of the polymorphism rs1884614 and rs2144908 gene HNF4- α with gestational diabetes

SUMMARY

Introduction. Gestational diabetes (GD) is a systemic disorder that produces metabolic changes in the mother and the product making them susceptible to multiple diseases. Some genes have been associated with T2DM among them the Hepatocyte Nuclear Factor 4- α (HNF4- α), which is a protein that is part of a network of transcription important for the development, differentiation and function of b-pancreatic cells and is directed almost exclusively by the promoter 2 (P2).

Objective. Search for the association of rs1884614 and rs2144908 polymorphisms in the promoter 2 of HNF4- α gene with the DG.

Material and methods. We analyzed the genetic material of 80 patients, obtained from buccal cheek scraping. rs1884614 and rs2144908 variants were amplified by PCR and sequenced to obtain electropherograms, we determined the degree of association between the study populations, through allele frequencies, genotype, haplotype and statistical significance using the χ^2 test.

Results. No relationship was found between the study variables and DG.

Key words: Diabetes, gestational diabetes, polymorphism, HNF4- α gene, variants, promoter 2.

* Maestro en Ciencias Biomédicas en el Área de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Director de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. *** Investigadores de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Correspondencia:

Tte. Quím. Biol. Andrés Balderas-Cornelio

Escuela Militar de Graduados de Sanidad Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N, Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F.

Correo electrónico: diamat69@yahoo.com.mx

Recibido: Febrero 8, 2012.

Aceptado: Marzo 23, 2012.

Introducción

La diabetes es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y en la cual participan diversos factores.¹

Para fines de clasificación y diagnóstico y de acuerdo con la modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, la diabetes es clasificada como:

- Diabetes tipo 1.
- Diabetes tipo 2.
- Otros tipos específicos.
- Diabetes gestacional (DG).¹

Diabetes tipo 1 (DM1): Es el resultado de la deficiencia completa o casi total de la insulina.

Diabetes tipo 2 (DM2): Es un grupo heterogéneo de trastornos que se caracterizan por grados variables de resistencia a la insulina y una mayor producción de glucosa.

Otros tipos específicos de diabetes: Se encuentran los defectos genéticos en la función de las células beta, la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, etc.²

Diabetes gestacional (DG): Es la condición patológica que se define como intolerancia a los carbohidratos y se inicia o identifica durante el embarazo.³⁻⁵

La Clínica de Especialidades de la Mujer (CEM) lleva a cabo su propio protocolo⁶ para la detección de la DG, el cual contempla a las pacientes con posibilidades de ser portadoras de diabetes no diagnosticadas, lo que podría generar DG.

La DG genera múltiples padecimientos a la madre y al producto, entre las principales complicaciones para la madre se encuentran: hipoglicemia, cetoacidosis, alteraciones micro y macrovasculares, complicaciones metabólicas, retinopatía² y tendencia a desarrollar DM2⁷ entre los nueve meses y los nueve años posteriores al parto.⁸

Los hijos de mujeres con DG tienen una importante morbilidad en el periodo perinatal, esto es entre las semanas 28 de gestación y los siete días de vida,⁹ síndrome de dificultad respiratoria, la macrosomía fetal que es la complicación más frecuente definida como un peso mayor a 4,000 g al nacer,¹⁰ retardo del crecimiento fetal y complicaciones metabólicas.^{5,7}

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calculó que el número de personas con diabetes en el mundo es de 171 millones y pronostica que aumentará a 334 millones en el año 2030.¹⁰

En nuestro país la Encuesta Nacional de Salud Pública del año 2000 calculó que la prevalencia en la población se encontraba entre 8 y 9% y que podría llegar a 12.3% en el año 2025.¹¹

En el año 2005 fue la primera causa de muerte en mujeres y hombres con 16.3 y 11.3%,¹² respectivamente.

Respecto a la DM2 en nuestro Instituto Armado, en el año 2009 el Hospital Central Militar tuvo una morbilidad entre hombres y mujeres de 3.2% (660 casos) y una mortalidad de 23.5% (261 casos).¹³

En nuestro país se ha reportado que la DG afecta al 7% de las mujeres embarazadas^{3,14} y en nuestro Instituto Armado en el año 2009 la CEM reportó un porcentaje de 4.3% en mujeres que presentaron DG.¹⁵

Muchas enfermedades multifactoriales y complejas se agrupan en patrones que demuestran que el componente genético de los individuos juega algún papel en la susceptibilidad a padecer alguna de estas enfermedades. A nivel individual, el riesgo de que un familiar presente una patología es una medida del componente de la probable influencia genética que tiene dicha enfermedad sobre el individuo.¹⁶

En lo que respecta a la diabetes, éste es un padecimiento heterogéneo, por lo que se han realizado estudios que buscan relacionar este padecimiento con los factores genéticos,¹⁷ entre éstos se encuentran los polimorfismos genéticos.

Los polimorfismos son variantes del genoma que aparecen en la población a través de la evolución por mutaciones o recombinaciones genéticas, las que se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia tras múltiples generaciones y tiene una frecuencia mayor al 1% en la población;¹⁸ su estudio permite identificar genes con susceptibilidad a presentar enfermedades,¹⁹ por lo que la identificación y caracterización del riesgo (o protección) permiten una comprensión de la etiología y generar el desarrollo de técnicas basadas en la información genética.²⁰

Entre los polimorfismos que se estudian se encuentran el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que se genera cuando un alelo sufre un cambio en uno de sus nucleótidos, éstos se distribuyen de manera heterogénea por todo el genoma y se encuentran tanto en las regiones codificantes (exones) como no codificantes (intrones y la región promotora) de los genes.

Son varios los genes que se han asociados con la diabetes entre los que se encuentra el Factor Hepatocítico Nuclear 4- α (HNF4- α), el cual se localiza en el locus 13.12 del brazo largo del cromosoma 20 (20q13.12).^{21,22} Este gen está compuesto por 42,417,855 pares de bases (pb), y codifica a una proteína de 465 aminoácidos con cuatro dominios funcionales: A/B a F, dos subunidades de activación AF1 Y AF2 en seis dominios A-F, un sitio de unión al ADN y un sitio de unión al ligando de dimerización²³ (Figura 1).

El gen HNF4- α es parte de una red de factores de transcripción importante para el desarrollo, la diferenciación y la función de las células β -pancreáticas que regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y de la secreción de insulina,²⁴ ácidos grasos, colesterol y es esencial para el desarrollo del hígado, colon y páncreas.²⁵⁻²⁷

El gen HNF4- α se encuentra regulado por dos promotores: el promotor 1 (P1) que es específico para regular la transcripción en el hígado y el promotor 2 (P2) que regula

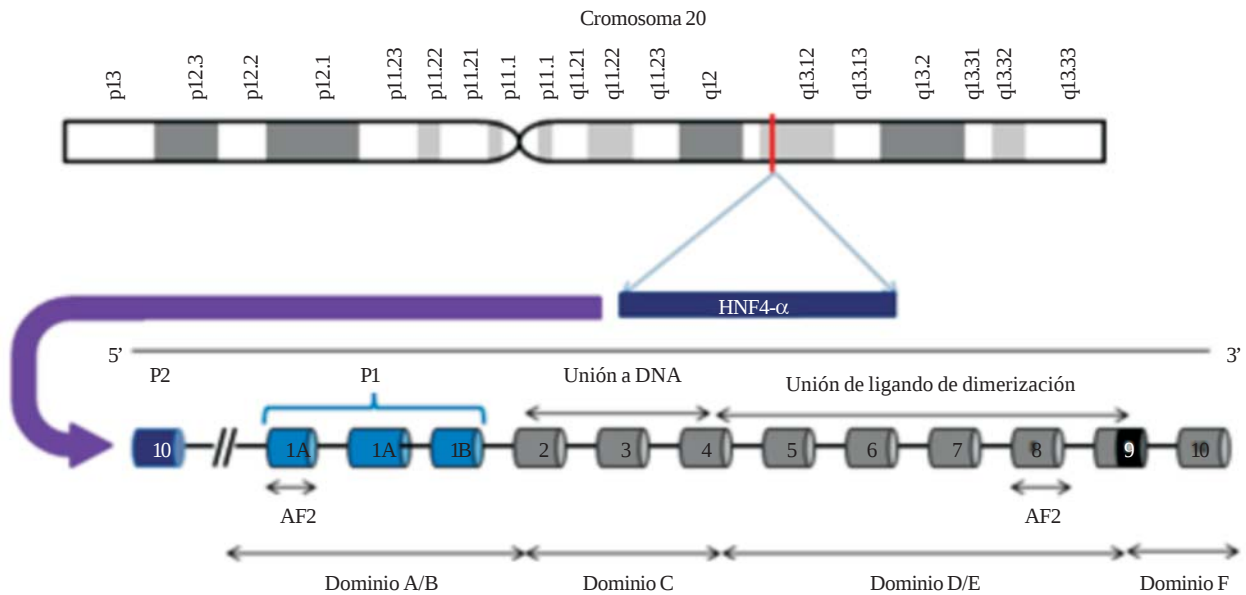


Figura 1. Representación de la ubicación cromosómica y características del gen HNF4- α . Fuente: Directa

principalmente la transcripción de las células β -pancreáticas y los polimorfismos de éstas.^{21,26}

Diversos estudios en poblaciones han asociado al gen HNF4- α con la DM2,²⁷ entre las que se encuentran la de los indios Pima,²⁸ la escandinava²² y la mexicana.²⁹

Respecto a la región promotora del gen HNF4- α se han realizado estudios explorando las variantes del P2 rs188614 y rs2144908 asociándolas con la DM2 en los que se encuentran Johansson y col. (2007)³⁰ en la población escandinava, Lehman y col. (2007)³¹ en la población de México-americanos con DM2, Tokunaga y col. (2008) en la población japonesa,³² entre otros.

Sin embargo, sólo existe un estudio realizado por Shaat y col.,³³ quienes exploraron la variante rs2144908 en la población sueca con DG, quienes concluyeron que esta variante no se encuentra asociada con la diabetes gestacional.

En la población mexicana a la fecha, no existen reportes que exploren alguna variante de tipo SNP en pacientes con DG, por lo que este estudio tiene como objetivo buscar la asociación de los polimorfismos rs1884614 y rs2144908 de la región promotora del gen HNF4- α con la DG.

Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio en 80 pacientes femeninas, originarias de diez diferentes estados de la República Mexicana, las cuales fueron atendidas en la Clínica de Especialidades de la Mujer (CEM). Se formaron dos grupos, uno de pacientes con embarazo normal que se emplearon como controles y otro de pacientes embarazadas con diabetes gestacional que se emplearon como casos. Ambos grupos se reclutaron en la sala de alojamiento conjunto de la CEM. Las muestras fueron recabadas por raspado de carrillos superiores e inferiores del lado izquierdo y derecho de la boca con

un cepillo (citobrush), una vez realizado lo anterior el cepillo se depositó en un tubo de plástico de 1.5 mL con buffer de fosfatos (PBS 1X) y se trasladó al laboratorio para su preservación resguardándola en refrigeración a 4 °C.

Genotipificación

La extracción de ADN se realizó a partir de muestra de raspado de carrillos con el Kit DN Blood & Tissue (Cat. 69506 de QIAGEN), el ADN fue cuantificado en el equipo Nanodrop, marca Thermo Scientific, modelo Nanodrop 1000, serie 1371, posteriormente, para evaluar la pureza y la integridad las muestras se visualizaron en un gel de Agarosa (Invitrogen™) al 1% teñidos con Bromuro de Etidio (J.T. Baker®).

El ADN genómico fue usado como templado en una reacción de PCR. Los cebadores utilizados se diseñaron con el programa Primer Express 2.0© desarrollado por Applied Biosystem™, los cuales fueron: 5'CTGAGGCTCAGAGCAGGGTG3' y 5'TTGGCCTGAGGGAC TCTCT3' para la variante rs1884614 y 5'TTATGTCATCATTGCTGAGG3' y 5'GCAGAGGCTGAAACC A3' para la variante rs2144908 ubicadas en el promotor 2 del gen HNF4- α ; estas variantes fueron amplificadas mediante la técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR), la reacción se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR system 9700 de Applied Biosystem™, las condiciones de la PCR para la variante rs1884614 fueron de 94 °C 5', 94 °C 30", 66 °C 15" y 72 °C 30" y para la variante rs2144908 fue de 94 °C 5', 94 °C 30", 64 °C 15" y 72 °C 30" Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa, posteriormente los fragmentos fueron purificados con el kit ExoSAP-IT® y secuenciados el secuenciador automático AVANT 3100 de Applied Biosystems™. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor©.

Análisis estadístico de los datos

Se emplearon los programas GENETICS V 4.05.2 y FS-TAT V 2.9.3.2. para determinar las frecuencias alélicas, el desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg entre las poblaciones de casos y controles y para comparar las frecuencias entre las poblaciones de casos vs. controles se empleó el programa EPIINFO V 6.

Resultados

La *figura 2* resume las características más sobresalientes de la población de estudio, en las que se encontró que las pacientes con DG presentaron mayor edad y un mayor número de productos microsómicos en relación con las pacientes control.

La genotipificación se realizó mediante el análisis de electroferogramas obtenidos en el secuenciador automático AVANT 3100 de Applied Biosystems™, como se muestra en la *figura 3*. La distribución genotípica de los dos SNP's en la población de estudios, se encontró en equilibrio con respecto a la ecuación de Hardy-Weinberg, así como en desequilibrio de ligamiento. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de ambas variantes que se resumen en el *cuadro 1*, en el cual se observa para la variante rs1884614 que el alelo reportado como el más común (C) en otras poblaciones, se encuentra disminuido para ambos grupos y el genotipo C/C se presenta con ma-

yor frecuencia en los casos que en los controles; sin embargo, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Respecto a la variante rs2144908, se encontraron datos similares a la variante antes citada, es decir, el alelo más común (G) en otras poblaciones, se encuentra de igual forma disminuido en nuestra población y en los genotipos no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

En el *cuadro 2* se resumen las frecuencias haplotípicas de las variantes de estudio, en donde se observó que el haplotipo CG se encuentra con mayor frecuencia en los casos que en los controles.

Discusión

Se reclutaron un total de 80 pacientes, las cuales fueron originarias de diferentes estados de la República Mexicana, por lo que consideramos que el estudio no fue centralizado, es decir, que la población no era originaria en su totalidad del Distrito Federal y Estado de México, lo que se esperaba, ya que la CEM se encuentra ubicada en el Distrito Federal.

Las edades de las pacientes con diagnóstico de DG tuvieron un intervalo de edad más amplio (19-42 años) en comparación con las del grupo control (18-33 años), similar a lo que se reporta en la bibliografía quienes consideran la edad mayor a 35 años como un factor de riesgo para padecer DG.¹³

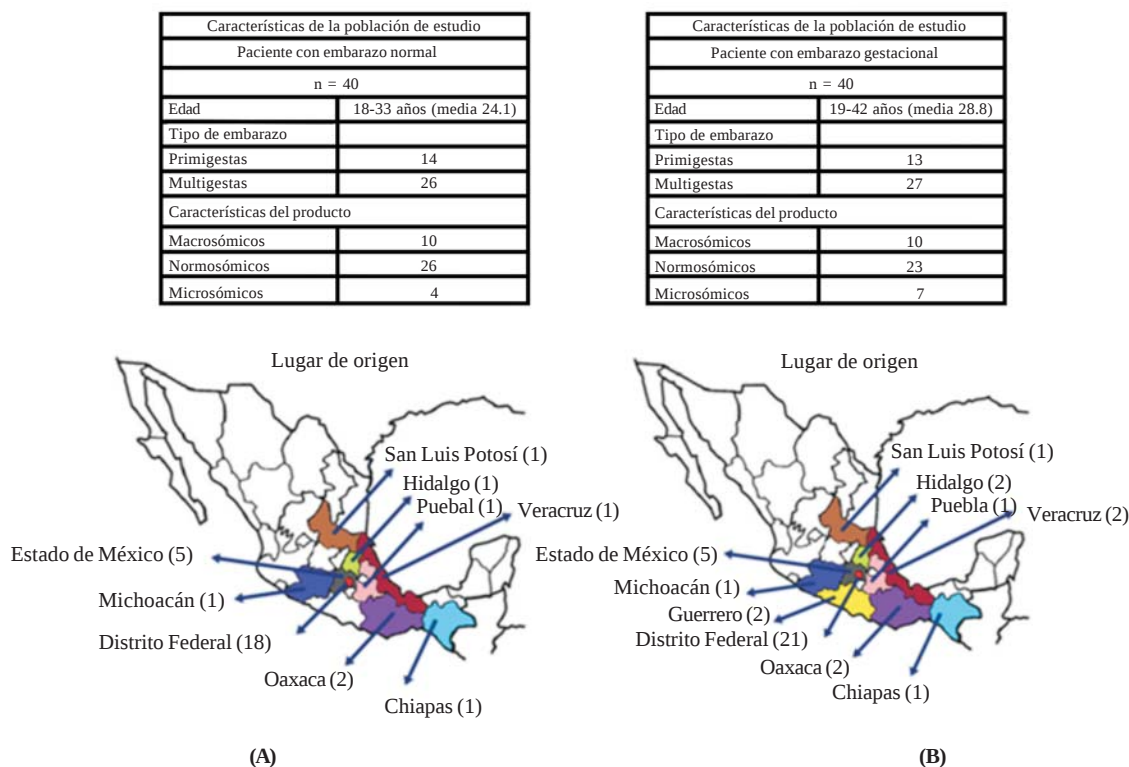


Figura 2. Características generales de la población de estudio. **A)** Características generales de las pacientes con diabetes gestacional. **B)** Características generales de las pacientes con embarazo normal. Fuente: Directa.

Cuadro 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de estudio.

SNP	Alelos y genotipos	Casos	Controles	OR	RR	p
rs1884614	C	30	25	1.32	4.2	0.4067
	T	50	55			
	C/C	4	1	4.33	4	0.1685
	C/T	22	14	0.9	0.96	0.8227
	T/T	23	16	0.81	0.88	0.6462
rs12144908	A	27	22	1.34	1.23	0.3926
	G	53	58			
	A/A	16	21	0.6	0.76	0.2652
	A/G	21	17	1.5	1.24	0.3735
	G/G	3	2	1.54	1.5	0.6462

Cuadro 2. Frecuencias haplotípicas relativas de las variantes rs188614 y rs2144908.

Haplotipo	Pacientes	Total	OR	RR	p
TA	Casos	79	0.77	0.88	0.2321
	Controles	90			
TG	Casos	23	1.32	1.15	0.52
	Controles	20			
CA	Casos	27	0.93	0.96	0.8494
	Controles	28			
CG	Casos	31	1.99	1.41	0.0818
	Controles	22			

En relación con los productos macrosómicos la bibliografía cita que ésta es una característica de las pacientes con DG, sin embargo, en este estudio se observó igual número de productos macrosómicos en ambos grupos. Por otra parte, las pacientes con DG presentaron mayor cantidad de productos microsómicos que las pacientes control, esto podría deberse a diversos factores, como lo reportan Rodríguez y col.,³⁴ así como Batista y col.,³⁵ quienes citaron que la edad, las complicaciones obstétricas, tabaquismo, estrés, entre otras, son factores de riesgo relacionados con la microsomía.

Con respecto a la asociación del HNF4- α con la DM2, se han realizado estudios en diversas poblaciones en las que se ha establecido su asociación, entre las que se encuentran: los indios Pima,²⁸ escandinavos²² y los mexicanos,²⁹ entre otros. Diversos investigadores han relacionado las variantes rs1884614 y rs2144908 del promotor 2 este gen con la DM2 en los estudios realizados por Muller y col. en la población Pima,²⁸ por otra parte, Weedon y col.³⁷ establecieron la asociación de los haplotipos de las variantes rs2144908 y rs4810424 en la población caucásica del Reino Unido con la DM2, asimismo, Lheman y col.,³¹ en la población de México-Americanos, concluyeron que los haplotipos de las variantes rs4810424, rs1884613, rs1884614 y rs2144908 incrementan el riesgo de padecer DM2, sin embargo, Tokunaga y col. realizaron estudios en la población japonesa reportando que no encontraron diferencias genotípicas significativas entre las variables de estudio y la DM2. Por otra parte, a la fecha sólo se cuenta con un estudio de la variante rs2144908 y la DG realizado

por Shaat y col., quienes mostraron que esta variable no tiene relación con la DG.

Por lo que respecta a este estudio, se observó que el genotipo CC de la variante rs1884614, el cual es considerado como el más común en diversas poblaciones, tuvo un RR más elevado (RR = 4.0, P = 0.1685) que las del resto de los genotipos de ambas variantes, lo que nos sugiere que las pacientes que lo porten tiene cuatro veces mayor riesgo de padecer DG en comparación con las que no lo porten.

Con respecto a los estudios de asociación genética, se observó que la población de estudio, se encuentra en equilibrio con respecto a la ecuación de Hardy-Weinberg, es decir, que la población de estudio es homogénea, el apareamiento es al azar, no hay migración ni mutación,^{20,38,39} asimismo, la población de estudio se encontró en desequilibrio de ligamiento, lo que indica que las dos variables de estudio se segregan juntas, ya que éstas se encontraron en el mismo cromosoma.

La determinación de los haplotipos de las variantes de estudio mostró que el haplotipo CG presentó una OR mayor en comparación con el resto de los haplotipos (OR = 1.91, P = 0.0818), lo que es indicativo que las pacientes que portan este haplotipo tienen una mayor predisposición a padecer DG.

Se sugiere que la continuación de este trabajo de investigación requiere de un incremento en el tamaño de la muestra y que se exploren otras variantes asociadas a la DM2, de tal forma que los estudios de asociación genética tengan un mayor poder de discriminación.

Variante rs1884614

Variante rs2144908

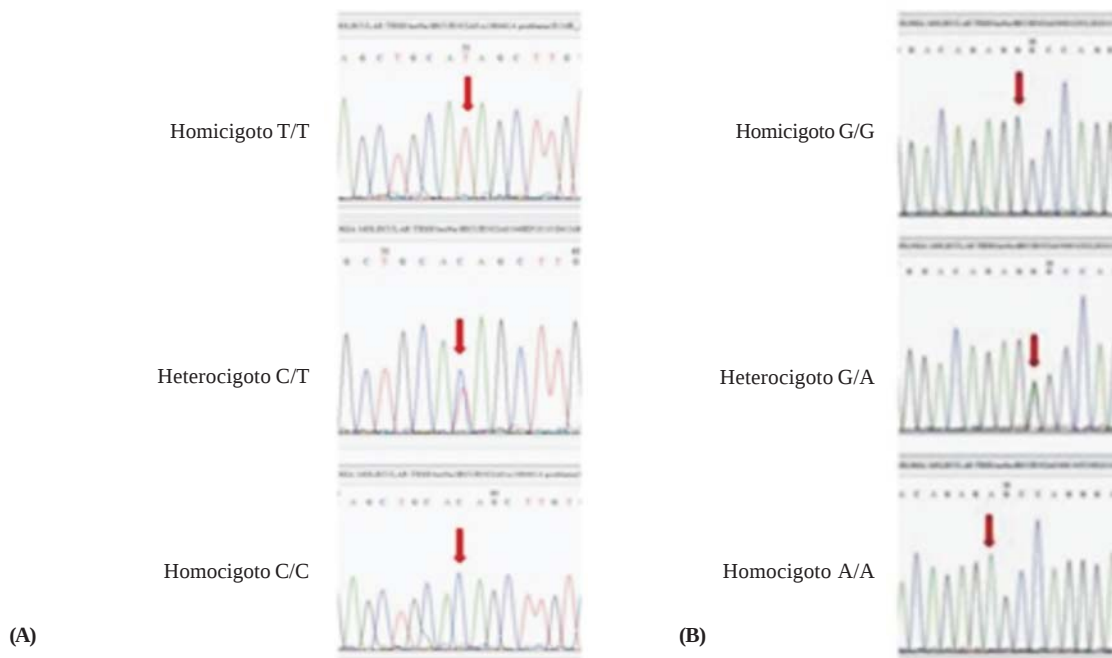


Figura 3. Electroferogramas representativos de las variantes rs1884614 y rs2144908. **A)** Electroferogramas de los homocigotos (T/T y C/C) y heterocigoto (C/T) de la variante rs1884614. **B)** Electroferogramas de los homocigotos (G/G y A/A) y heterocigoto (G/A) de la variante rs2144908. Fuente: Directa

Conclusión

No hay asociación entre las variantes rs1884614 y rs2144908 del promotor 2 del gen HNF4- α y la diabetes gestacional.

Referencias

1. Secretaría de Salud. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria para quedar como Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes México; 1999, p. 1-34.
2. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscano J. Harrison Principios de medicina interna. 17a. Ed. España: Mc. Graw Hill educación; 2008, p. 2275-82.
3. Grupo Español de Diabetes y Embarazo (GEDE). Guía asistencial de diabetes mellitus y embarazo. Diabetol 2006; 22: 73-87.
4. Hernández-Valencia M, Zárate A. Conceptos recientes en la etiopatología de la diabetes gestacional. Ginecol Obstet Mex 2005; 73: 371-7.
5. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom ST, Hauth JC, Gilstrap L, Wensstrom KD. Obstetricia de Williams. 22a. Ed. Mc Graw Hill/Interamericana de México; 2006; 1169-73.
6. Dirección General de Sanidad-Clínica de Especialidades de la Mujer. Protocolo de la diabetes gestacional. Clave: PTO-OBS-URG-06. México: 2008, p. 1-11.
7. Contreras-Zúñiga E, Guillermo-Arango L, Zuluaga-Martínez SJ, Ocampo V. Diabetes y embarazo. Rev Colomb Obstet Ginecol 2008; 59(1): 38-45.
8. Feig DS, Zinman B, Wang X, Hux JE. Risk of development of diabetes mellitus after diagnosis of gestational diabetes. CMAJ 2008; 179(3): 229-34.
9. Valdez GR, Meza VR, Nuñez CJO, Ocampo AM. Etiología de la mortalidad perinatal. Perinatol Reprod Hum 2009; 23: 1-4.
10. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes-estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27(5): 1047-53.
11. Olaiz-Fernández G, Rojas R, Aguilar-Salinas, Rauda J, Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. Sal Púb Méx 2007; 49(3): S331-S337.
12. Secretaría de Salud. Programa Nacional de Salud 2007-2012. México: 2007, p. 28-31.
13. Secretaría de la Defensa Nacional-Dirección General de Sanidad-Hospital Central Militar. Anuario estadístico 2009. México 2009, p. 86-7.
14. García GC. Diabetes mellitus gestacional. Med Int Mex 2008; 24(2): 148-56.
15. Dirección General de Sanidad-Clínica de Especialidades de la Mujer. Anuario estadístico 2009. México: 2009, p. 30-6.
16. Sevilla SD. Metodología de los estudios de asociación genética. Rev Insuf Cardíaca 2007; 2(3): 111-14.
17. Stumvol MI, Goldstein BJ, Haeften TWV. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet 2005; 365: 1333-46.
18. Lewin B. Genes IX. 1a. Ed. México: 2008, p. 55-67.
19. Iniestra R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit 2005; 19(4): 333-41.
20. Little J, Higgins JPT, Ioannidis JPA, Moher D, Gagnon F, Elm EV, Khoury MJ, et al. STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA)-An Extension of the STROBE Statement. Genetic Epidemiology 2009; 33: 581-98.
21. Weissglas-Volkov D, Huertas-Vazquez A, Suviolahti E, Lee J, Plaisier C, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna T, et al. Common Hepatic Nuclear Factor-4a Variants Are Associated With High Serum Lipid Levels and the Metabolic Syndrome. Diabetes 2006; 55: 1970-7.
22. Winckler W, Graham RR, De Bakker PIW, Sun M, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, et al. Association Testing of Variants in the Hepatocyte Nuclear Factor 4a Gene With Risk of Type 2 Diabetes in 7,883 People. Diabetes 2000; 54: 886-92.
23. Harries LW, Locke JM, Shields B, Hanley NA, Hanley KP, Steele A, Njølstad PA, et al. The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4-a isoforms from the P1 promoter during fetal development. Diabetes 2008; 57: 1775-52.
24. Zouali H, Vaxillaire M, Lesage S, Sun F, Velho G, Vionnet N, K Chiu, et al. Linkage analysis and molecular scanning of glucokinase gene in NIDDM families. Diabetes 1993; 42(9): 1238-45.

25. Thomas H, Jaschowitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell S MS, Rossen S, et al. A distant upstream promoter of the HNF4a connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Gen* 2001; 10(19): 2089-97.
26. Lu P, RhaG B, Melikishvili M, Wu G, Adkins BC, Fried MG, Young-In C. Structural basis of natural promoter recognition by a unique nuclear receptor HNF4a. *J Boil Chem* 2008; 283(48): 33685-97.
27. Holmkvist J, Almgren P, Lysenko V, Lindgren CM, Eriksson Karl-Fredrik, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Groop L. Common Variants in Maturity-Onset Diabetes of the Young Genes and Future Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 1738-44.
28. Muller YL, Infante AM, Hanson RL. Variants in Hepatocyte Nuclear Factor 4a are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 2005; 54(10): 3035-9.
29. Menjivar M, Granados-Silvestre MA, Montufar-Robles I, Herrera M, Tusie-Luna MT, Canizales-Quintero S, Aguilar-Salinas C A, et al. High frequency of T130I gene in mexican patiens with early-onset type 2 diabetes. *Clin Genet* 2008; 73: 185-7.
30. Johansson S, Ræder H, Eide SA, Midthjell K, Hveem K, Søvik O, Molven A, et al. Studies in 3,523 norwegians and meta-analysis in 11,571 subjects indicate that variants in the Hepatocyte Nuclear Factor 4a (HNF4-a) P2 region are associated with type 2 diabetes in Scandinavians. *Diabetes* 2007; 56: 3112-17.
31. Lehman DM, Richardson DK, Jenkinson CP, Hunt KJ, Dyer TD, Leach RJ, Arya R, Abboud HE, Blangero J, Duggirala R, and Stern MP. P2 promoter variants of the Hepatocyte Nuclear Factor-4a gene are associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* 2007; 56: 513-17.
32. Tokunaga A, Wa YH, Fukuda-Akita E, Iwashii I, Shimomura I, Take-da J, Yamagata K. A common P2 promoter polymorphism of the Hepatocyte Nuclear Factor-4alpha gene is associated with insulin secretion in nonobese Japanese with type 2 diabetes. *Endoc J* 2008; 55(6): 999-1004.
33. Shaat N, Karlsson E, Lernmark Å, Ivarsson S, Lynch K, Parikh H, Almgren P, Berntorp K, Groop L. Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetología* 2006; 49: 1545-51.
34. Rodríguez DPL, Hernández CJ, Reyes PA. Bajo peso al nacer, algunos factores asociados a la madre. *Rev Cub Obstet Ginecol* 2008; 32(3): 1-5.
35. Batista MAI, Nestora VP, Hernández M. Incidencia de los factores de riesgo maternos en bajo peso al nacer. *Policlínica Pedro Díaz Coello. Correo Científico Médico de Holguín* 2010; 14(2).
36. Niu XM, Yang H, Zhang HY, Li NJ, Qi XM, Chang Y, Chang Z, Zhang Y. Study on association between gestational diabetes mellitus and sulfonylurea receptor-1 gene polymorphism Chinese. *J Obstet Gynecol* 2005; 40(3): 159-63.
37. Weedon MN, Owen KR, Shields B, Hitman G, Walker M, McCarthy MI, Love-Gregory LD, et al. Common Variants of the Hepatocyte Nuclear Factor-4a P2 Promoter Are Associated With Type 2 Diabetes in the UK. *Population Diabetes* 2004; 53: 3002-6.
38. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, Dierssen-Sotos T, Berciano J. Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. *Gac SaniteEspaña* 2005; 19(4): 321-4.

