

00381

6
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS DEL GENE DE LA ENZIMA GLUCOCINASA EN
FAMILIAS MEXICANAS CON DIABETES NO DEPENDIENTE
DE INSULINA DE APARICIÓN TEMPRANA INCLUYENDO
TIPO " MODY "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A
L A U R A D E L B O S Q U E P L A T A
DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA TUSIÉLUNA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ANÁLISIS DEL GENE DE LA ENZIMA
GLUCOCINASA EN FAMILIAS MEXICANAS
CON DIABETES NO DEPENDIENTE DE
INSULINA DE APARICIÓN TEMPRANA
INCLUYENDO TIPO “MODY”**

**Laura del Bosque Plata.
Tesis de Doctorado.**

**Director de Tesis:
Dra. Ma. Teresa Tusié Luna**

SINODALES:

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE:	DRA.	MARÍA TERESA TUSIE LUNA
PRIMER VOCAL:	DR.	ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ
SEGUNDO VOCAL:	MED. CIR.	RUBEN LISKER YORKOWITZK
TERCER VOCAL:	MED.	SUSANA KOFMAN EPSTEIN
SECRETARIO.	MED. CIR	JOSÉ VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ
SUPLENTE	DRA.	LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO
SUPLENTE	DRA.	MARTHA MENJIVAR IRAHETA

Con todo mi amor a mis padres.

Agradezco de manera especial a mi Tutora la Dra. Ma. Teresa Tusié Luna su gran paciencia y apoyo durante la realización de éste trabajo.

Gracias a CONACyT por haberme becado durante el doctorado.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

	Página
A. Definición.	1
B. Criterios de diagnóstico.	1-2
C. Clasificación de la diabetes.. . . .	3-5
D. Insulina.	5-6
E. Péptido C.	6
F. Dificultades en el estudio de la diabetes.. . . .	6-7
a) Individuo afectado.	
b) Variabilidad Clínica.	
c) Prevalencia.	
d) Defecto básico.	
G. Evidencias de heterogeneidad en diabetes.	7-9
a) Diferentes enfermedades genéticas raras.	
b) Heterogeneidad genética en distintos modelos animales	
c) Variabilidad genética en la prevalencia y en las características clínicas.	
d) Variabilidad clínica.	
e) Variabilidad fisiológica.	
H. Diagnostico diferencial entre diabetes mellitus tipo 1 y 2.	9
I. Etiología y fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2.	9-10
J. Factores maternos en la DMNID.	10-11
K. Mecanismos bioquímicos de la enfermedad en DMNID.	11
L. Diabetes no dependiente de insulina tipo MODY.	11-17
a) Herencia autosómico dominante.	
b) Expresión fenotípica e historia natural.	
c) Distribución y prevalencia.	
d) Diabetes mellitus dependiente de insulina en familias MODY.	
1.- HLA	

- 2.- ICAs.
- 3.- Presencia de DMID en familias MODY.
- e) Peso corporal-obesidad.
- f) Secreción de insulina y la heterogeneidad en la DMNID tipo MODY.
- g) Insensibilidad a la insulina o resistencia a la insulina.
- h) Complicaciones a largo plazo.
 - 1.- Enfermedad vascular.
 - 2.- Neuropatía.

M. Heterogeneidad genética en la DMNID tipo MODY.	17-20
a) MODY 1	
b) MODY 2	
c) MODY 3	
N. Glucocinasa.	20-24
a) Características cinéticas.	
b) Mutaciones.	
c) Anormalidades fisiológicas.	
d) Expresión tisular.	
O. Diabetes mellitus tipo 2 de aparición temprana.	25

OBJETIVOS

A. Principal.	26
B. Secundarios.	26

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

A. Sujetos estudiados.	27
B. Diagramas de flujo	29-35
a) Metodología utilizada. (Figura 2)	
b) Transformación de linfocitos. (Figura 2A)	
c) Obtención de ADN a partir de sangre total. (Figura 2B)	
d) Extracción fenólica. (Figura 2C)	
e) Técnica de PCR-SSCP. (Figura 2D)	
f) Técnica de Secuenciación. (Figura 2E)	
C. Determinación de anticuerpos anti-islole.	36

D. Determinación de anticuerpos anti-GAD.	36
E. Curvas de Tolerancia a la Glucosa.	36

**CAPÍTULO III
RESULTADOS**

A. Recolección de familias.	38
B. Sujetos y familias de estudio.	38
C. Curvas de tolerancia a la glucosa.	39
D. Determinaciones de insulina y péptido C.	39
E. Anticuerpos anti-islote pancreático.	42
F. Anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico.	42
G. Arboles genealógicos. (Figura 3)	44-48
a) Diabetes tipo MODY: 1, 2, 3, 4.	
b) DMNID de aparición temprana: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22.	
c) Diabetes dependiente de insulina: 23, 24.	
H. Familias clasificadas como MODY.	49
I. Herencia materna.	49
J. Perfil clínico y bioquímico de los pacientes estudiados.	49-51
K. Búsqueda de mutaciones.	51-68
a) Controles positivos. (Figura 4)	
b) PCR-SSCP con glicerol y sin glicerol exones 1-10. (Figuras 5 a 16)	
c) Polimorfismo. (Figura 17)	
d) Controles no diabéticos. (Figura 18)	
e) Secuenciación exón 7. (Figura 19)	

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES.	69-70
DISCUSIÓN.	71-78
PERSPECTIVAS.	78-80

REFERENCIAS.	81-105
ANEXO 1.	106-117
Técnicas	
Inmortalización de linfocitos.	106-108
Extracción de ADN.	108-110
a) Técnica larga.	
b) Técnica corta.	
Técnica de Secuenciación.	110-111
Técnica de PCR-SSCP.	111-114
Preparación de geles.	114-117
a) Geles poliacrilamida (secuenciación).	
b) Geles poliacrilamida (PCR-SSCP).	
c) Minigel de poliacrilamida.	
d) Geles de agarosa (ADN).	
e) Purificación de productos de PCR en agarosa.	

ANEXO 2.	
Publicación de artículo.	

RESUMEN

La diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNID) es la forma más común de diabetes que afecta aproximadamente al 5% de la población general. En México su prevalencia es cercana al 8 %. Los factores genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Mientras que en otras poblaciones la DMNID se diagnostica frecuentemente después de la quinta o sexta década de vida, en México una proporción grande de pacientes desarrollan la enfermedad a una edad temprana (entre la tercera y cuarta década). En población caucásica se han identificado mutaciones en el gen de la glucocinasa, en los genes TCF1, TCF14 y en el gen IPF1 en un subgrupo de DMNID denominado MODY (maturity onset diabetes of the young), el cual muestra un tipo de herencia autosómico dominante. Como primera etapa de la caracterización molecular de las familias mexicanas que presentan DMNID de aparición temprana se buscaron mutaciones en el gen de la glucocinasa a través de análisis de SSCP y/o secuenciación directa en 24 individuos de 24 familias independientes, en donde al menos 4 pueden clasificarse como MODY. No se detectaron mutaciones en los exones ni en la regiones intrón-exon del gen en ninguno de los individuos analizados, lo que sugiere que en población mexicana el gen de la enzima glucocinasa no se encuentra asociado a esta enfermedad.

El fenotipo y el perfil clínico de algunos de los pacientes estudiados es compatible con el reportado para los pacientes portadores de mutaciones en los genes TCF1, TCF14 y en el gen IPF1, mientras que otros pudieran tener mutaciones en otros loci. Debido a la heterogeneidad genética de MODY, esta entidad representa un modelo atractivo para la búsqueda e identificación de genes involucrados en la etiopatología en la DMNID.

ABSTRACT

Non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) is the most common form of diabetes affecting 5% of the general population. Genetic factors play an important role in the development of the disease. In Mexico its prevalence reaches 8%. While in other populations NIDDM is usually diagnosed after the fifth decade of life, in Mexico a large proportion of patients develop the disease at an early age (between the third and fourth decade). In Caucasian population mutations in the glucokinase, the TCF1, TCF14 and IPF1 genes have been identified in a subgroup of early onset NIDDM patients denominated MODY (maturity onset diabetes of the young), which show an autosomal dominant pattern of inheritance.

As the first step in the molecular characterization of Mexican families displaying early onset NIDDM mutations in the glucokinase gene have been searched through SSCP analysis and/or direct sequencing in 24 individuals from 24 independent families, where at least 4 can be classified as MODY. No mutations were detected in the exons or the intron-exon boundaries of the gene in any of the screened individuals; this suggests that in Mexican population the glucokinase gene is not associated with this disease.

The phenotype and clinical profile of some of the studied patients is compatible with that of patients carrying mutations in the TCF1, TCF14 or IPF1 genes, while others may carry mutations in different loci.

Due to the genetic heterogeneity of MODY, it represents an attractive model to identify new genes involved in the development of NIDDM.

RESUMEN

La diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNID) es la forma más común de diabetes que afecta aproximadamente al 5% de la población general. En México su prevalencia es cercana al 8 %. Los factores genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Mientras que en otras poblaciones la DMNID se diagnostica frecuentemente después de la quinta o sexta década de vida, en México una proporción grande de pacientes desarrollan la enfermedad a una edad temprana (entre la tercera y cuarta década). En población caucásica se han identificado mutaciones en el gen de la glucocinasa, en los genes TCF1, TCF14 y en el gen IPF1 en un subgrupo de DMNID denominado MODY (maturity onset diabetes of the young), el cual muestra un tipo de herencia autosómico dominante. Como primera etapa de la caracterización molecular de las familias mexicanas que presentan DMNID de aparición temprana se buscaron mutaciones en el gen de la glucocinasa a través de análisis de SSCP y/o secuenciación directa en 24 individuos de 24 familias independientes, en donde al menos 4 pueden clasificarse como MODY. No se detectaron mutaciones en los exones ni en la regiones intrón-exon del gen en ninguno de los individuos analizados, lo que sugiere que en población mexicana el gen de la enzima glucocinasa no se encuentra asociado a esta enfermedad.

El fenotipo y el perfil clínico de algunos de los pacientes estudiados es compatible con el reportado para los pacientes portadores de mutaciones en los genes TCF1, TCF14 y en el gen IPF1, mientras que otros pudieran tener mutaciones en otros loci. Debido a la heterogeneidad genética de MODY, esta entidad representa un modelo atractivo para la búsqueda e identificación de genes involucrados en la etiopatología en la DMNID.

ABSTRACT

Non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) is the most common form of diabetes affecting 5% of the general population. Genetic factors play an important role in the development of the disease. In Mexico its prevalence reaches 8%. While in other populations NIDDM is usually diagnosed after the fifth decade of life, in Mexico a large proportion of patients develop the disease at an early age (between the third and fourth decade). In Caucasian population mutations in the glucokinase, the TCF1, TCF14 and IPF1 genes have been identified in a subgroup of early onset NIDDM patients denominated MODY (maturity onset diabetes of the young), which show an autosomal dominant pattern of inheritance.

As the first step in the molecular characterization of Mexican families displaying early onset NIDDM mutations in the glucokinase gene have been searched through SSCP analysis and/or direct sequencing in 24 individuals from 24 independent families, where at least 4 can be classified as MODY. No mutations were detected in the exons or the intron-exon boundaries of the gene in any of the screened individuals; this suggests that in Mexican population the glucokinase gene is not associated with this disease.

The phenotype and clinical profile of some of the studied patients is compatible with that of patients carrying mutations in the TCF1, TCF14 or IPF1 genes, while others may carry mutations in different loci.

Due to the genetic heterogeneity of MODY, it represents an attractive model to identify new genes involved in the development of NIDDM.

INTRODUCCIÓN

A. DEFINICIÓN.

El nombre de diabetes mellitus se deriva de las palabras griegas que significan sifón y se refieren al hecho que los pacientes presentan poliuria y glucosuria. Este es un síndrome heterogéneo que se caracteriza por hiperglicemia y una predisposición a las complicaciones crónicas como son retinopatía, neuropatía, nefropatía y enfermedad macrovascular. Existe un deseo de clasificar las formas de diabetes en función de definir subpoblaciones que sean más homogéneas con respecto a algunos aspectos de la enfermedad en lugar de basar la clasificación en la etiología. Ya que la causa precisa de la diabetes se desconoce en la mayoría de los pacientes, es imposible diseñar dicha clasificación. Alternativamente, un esquema de clasificación debe ser diseñado para definir subgrupos que tienen pronósticos e historia natural similares o para quienes requieren terapias similares. En 1979 se desarrolló un esquema de clasificación, el cual es un híbrido (*Conn y Fajans, NDDG -National Diabetes Data Group- y OMS-Organización Mundial de la Salud-*); que se basa en el tipo de tratamiento requerido por los pacientes o en el curso clínico de la enfermedad. En este año (Julio de 1997) el Comité de expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus de la Asociación Americana de Diabetes reportó el nuevo esquema de clasificación y principalmente trata de describir y definir la diabetes como se conoce actualmente, refleja la etiología y/o la patogénesis de la enfermedad, y provee una guía para el diagnóstico de la enfermedad, además recomienda los análisis que pudieran ayudar a reducir la morbilidad y mortalidad asociadas a la diabetes y revisa el diagnóstico de la diabetes gestacional.

B. CRITERIOS PARA DIAGNOSTICAR LA DIABETES MELLITUS 1997.

- 1.- Síntomas de diabetes más glucosa plasmática causal o superior a 200 mg/dl (11.1 mmol/l). Por casual se define como cualquier hora del día sin importar el lapso entre la última comida. Los síntomas clásicos de diabetes incluyen poliuria, polidipsia y pérdida inexplicada de peso.
- 2.- Glucosa plasmática en ayunas igual o superior a 126 mg/dl (7.0 mmol/l). Ayuno define como no alimento por al menos las últimas 8 horas.

3.- Dos horas postprandial igual o superior a 200 mg/dl durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (CTGVO) tal como la ha descrito la OMS, usando una carga de glucosa con el equivalente de la glucosa anhidra disuelta en agua.

En ausencia de síntomas inequívocos de hiperglicemia con descompensación aguda metabólica, estos criterios deben ser confirmados repitiendo la prueba en un día diferente. Una tercera medición de CTGVO no se recomienda como rutina para uso clínico.

Diabetes Mellitus Gestacional. Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. La definición se aplica sin tomar en cuenta si se utiliza como tratamiento insulina o solamente modificación de la dieta, o si la condición persiste después del embarazo. No excluye la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa existiera antes o se iniciara concomitantemente con el embarazo (*Metzger BE, 1991*).

ESCRUTINIO DE DIABETES GESTACIONAL

GLUCOSA EN AYUNAS	CARGA DE 50g ESCUTRINIO	CARGA DE 100g PRUEBA DIAGNOSTICA
AYUNAS	---	105mg/dl
1 hora	140 mg/dl	190 mg/dl
2 horas	---	165 mg/dl
3 horas	----	145 mg/dl

(The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification, 1997)

Intolerancia a la glucosa (IG). El grupo de NDDG recomienda que la categoría de intolerancia a la glucosa se debe establecer para individuos que tienen niveles de glucosa plasmática en ayunas y de tolerancia a la glucosa que están entre los valores normales y diabéticos. En algunos sujetos la intolerancia a la glucosa puede representar una etapa en la historia natural de la DMDI (*Fajans, 1978; Srikanta S 1985*) y mucho más frecuentemente de la DMNID (*Fajans, 1978; Harris, 1985; Stern MP, 1988*) como se ha reportado en estudios prospectivos. En dichos pacientes, la conversión de IG a DMNID y particularmente a DMNID con hiperglicemia en ayunas, toma años o décadas; se ha encontrado que dicha conversión ocurre en el 10% al 50% de los pacientes con IG que han sido seguidos por un período de 10 años. Para evitar el estigma psicológico y socioeconómico de un diagnóstico de diabetes

en dichos individuos se ha establecido la categoría de intolerancia a la glucosa (IG). Aunque las complicaciones renales y retinianas de la diabetes (microangiopatía) no existen o son muy raras en pacientes con IG, muchos estudios han demostrado en dichos grupos un incremento en la proporción de muertes y en la prevalencia de enfermedad arterial, anomalías electrocardiográficas, o susceptibilidad incrementada a la enfermedad arterioesclerótica asociada con otros factores de riesgo conocidos incluyendo hipertensión, hiperlipidemia y adiposidad. Entonces la intolerancia a la glucosa, particularmente en los individuos sanos y ambulatorios con menos de 50 años pueden tener implicaciones pronósticas y no deben ser ignoradas o tomadas a la ligera. La intolerancia a la glucosa está asociada también con numerosos síndromes genéticos.

C. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES (ADA).

En 1979 "The National Diabetes Data Group" publicó el esquema de clasificación y diagnóstico utilizado hasta 1997, y debido al mejor conocimiento de la etiología y patogénesis de la diabetes surgió la necesidad de desarrollar una clasificación con terminología apropiada, uniforme y funcional que reflejara el conocimiento actual de ésta enfermedad, fue así como en Julio de 1997, el Grupo de Consenso de la Asociación Norteamericana de Diabetes (ADA), publicó en la revista *Diabetes Care* los nuevos criterios diagnósticos y la reclasificación de los principales tipos de diabetes, los cuales se muestran a continuación, en ellos se define y describe a la diabetes como se conoce actualmente; este esquema de clasificación refleja la etiología y/o patogénesis de la enfermedad:

Grupo I. Diabetes tipo 1

Destrucción de células beta pancreáticas, generalmente con ausencia absoluta de insulina:

- A. Mediada por autoinmunidad.
- B. Idiopática.

Grupo II. Diabetes tipo 2

Varia entre predominantemente con resistencia a la insulina con deficiencia relativa en la secreción o a la inversa.

Grupo III. Otros tipo de diabetes.

A. Defectos genéticos sobre la función de las células β .

- 1.- Cromosoma 12, factor hepático nuclear (HNF)1 α (Anteriormente MODY3)
- 2.- Cromosoma 7, defecto en glucocinasa (Anteriormente MODY2).
- 3.- Cromosoma 20, factor hepático nuclear (HNF)4 α (Anteriormente MODY1).
- 4.- Mutaciones de DNA mitocondrial.

5.- Otras.

B. Defectos genéticos en la acción de la insulina.

- 1.- Resistencia a la insulina tipo A.
- 2.- Lepreuchanismo.
- 3.- Síndrome de Rabson-Mendehall
- 4.- Diabetes lipoatrófica
- 5.- Otras.

D. Asociada a endocrinopatías (Nota diferenciar si ya tenía o no previamente diabetes)

- 1.- Acromegalia.
- 2.- Síndrome de Cushing
- 3.- Glucoganoma.
- 4.- Feocromocitoma.
- 5.- Hipertiroidismo.
- 6.- Somatostinoma.
- 7.- Aldosteronoma.
- 8.- Otros.

E.- Mediada por drogas o tóxicos.

- 1.- Vacor.
- 2.- Pentamidina.
- 3.- Acido nicotínico.
- 4.- Glucocorticoides.
- 5.- Hormonas tiroideas.
- 6.- Diazoxido.
- 7.- Agonistas β adrenérgicos.
- 8.- Tiazidas.
- 9.- Dilantina (Difenilhidantoina)
- 10.- α Interferón
- 11.- Otras.

Nota: No señala L-asparaginasa.

F.- Infecciones.

- 1.- S. Rubeola congénita.
- 2.- Citomegalovirus.
- 3.- Otras.

G. Formas poco frecuentes de autoinmunidad.

- 1.- S. del "hombre rígido".
- 2.- Anticuerpos versus receptor de insulina.
- 3.- Otras.

H. Otros síndromes genéticos algunas veces asociados a diabetes.

- 1.- Down.
- 2.- Klinefelter.
- 3.- Turner.
- 4.- Wolfram.
- 5.- Ataxia de Friederich.
- 6.- Corea de Huntington.

- 7.- Lawrence Moon Biedl
- 8.- Distrofia miotónica.
- 9.- Porfiria.
- 10.- Prader-Willi.
- 11.- Otras.

Grupo IV.- Diabetes gestacional

Para fines de su estudio genético la diabetes mellitus puede clasificarse en Diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNID) o tipo II y Diabetes mellitus dependiente de insulina (DMID) o tipo I.

D. INSULINA.

La insulina es la hormona predominante en la regulación de el metabolismo de la glucosa, se secreta en las células beta de los islotes pancreáticos. De acuerdo con el papel central de la insulina en la regulación metabólica, existen muchos factores que regulan la función de la célula beta, entre los cuales se incluyen a la glucosa y a los aminoácidos (*Yalow RS, 1960a; Yalow RS, 1960b; Fajans SS, 1967; Fajans SS, 1972; Elrick D, 1964; Porte D Jr, 1969, Seltzer HS, 1967; Porte D Jr, 1970; Floyd JC Jr, 1968*), las hormonas como la epinefrina y el glucágon (*Fajans SS, 1967; Robertson RP, 1973; Samols E, 1965; Porte D Jr, 1966; Porte D Jr, 1967*), los neurotransmisores como la acetilcolina y la norepinefrina (*Fajans SS, 1972; Porte D Jr, 1970; Porte D Jr, 1966; Kajinuma H, 1968; Kaneto A, 1968*) y los agentes paracrinos como la somatostatina (*Samols E, 1976; Zyznar ES, 1981; Kawai K, 1982*). Algunos de los factores anterior estimulan la secreción de insulina (glucosa, aminoácidos, glucagon, acetilcolina y agentes beta-adrenérgicos), otros ejercen una acción inhibitoria (somatostatina y agentes alfa-adrenérgicos). La función de la célula beta pancreática es integrar todas estas vías reguladoras en orden de secretar la cantidad óptima de insulina para las necesidades metabólicas del organismo.

Cuando se inyecta intravenosamente un bolo de glucosa (como en el análisis de tolerancia a la glucosa intravenosa), la insulina se secreta con una cinética bifásica (*Porte D Jr, 1969; Seltzer HS, 1967; Porte D Jr, 1970; Porte D Jr, 1991; Gerich JE, 1976*). La primera fase de la secreción de la insulina es rápida con un pico en los niveles plasmáticos de insulina a los 3-5 minutos. Dentro de los siguientes 10 min. de la administración de glucosa, disminuye el primer pico, y se hace aparente la segunda fase de la secreción de insulina. La segunda fase de la secreción de insulina persiste tanto como la elevación de la glucosa plasmática, o aproximadamente 1 hr después de un bolo intravenoso de 20 g de glucosa. A un nivel dado de glucosa plasmática puede haber un mayor incremento en la secreción de insulina cuando la glucosa se administra oralmente que cuando se administra intravenosamente, se cree que este

efecto es causado por la secreción de péptidos gastrointestinales que actúan sobre la célula beta para potenciar la respuesta de glucosa (*Fajans SS, 1972; Elick D, 1964*). El péptido inhibidor gástrico es un ejemplo de este tipo de actividad de incretina. Entonces tenemos que la glucosa es un secretagogo que estimula directamente la secreción de insulina. La medición de insulina es una medida del metabolismo de la célula beta pancreática (*Creutzfeldt W, 1985*).

E. PÉPTIDO C.

La molécula de insulina se deriva de la proinsulina, la cual mediante un rompimiento proteolítico forma insulina y péptido C. Ya que el péptido C es empacado en los gránulos secretores junto con la insulina, las dos moléculas se pueden usar como un índice de la velocidad de secreción de la insulina (*Chance RE, 1968; Steiner DF, 1969*). Además el péptido C no se encuentra en las preparaciones farmacéuticas modernas de insulina, y los niveles de péptido C son útiles como un índice en la secreción endógena de insulina en los pacientes diabéticos quienes están siendo tratados con insulina (*Polonsky KS, 1986a; Polonsky KS, 1986b*).

F. DIFICULTADES EN EL ESTUDIO DE LA DIABETES.

Existen muchas dificultades en el estudio de la genética de la diabetes entre las cuales se incluye las diferencias en la definición de lo que es un individuo "afectado", la modificación de la expresión del genotipo diabético por factores ambientales, y la variabilidad en la edad de presentación de la enfermedad (penetrancia incompleta, penetrancia dependiente de la edad).

a) Individuo afectado. Una de las causas mayores de confusión es la definición de lo que es un individuo afectado. Algunos investigadores llaman a un individuo afectado solo si él/ella tiene síntomas clínicos de la enfermedad, mientras que otros aceptan como individuo afectado a aquél que tiene intolerancia a la glucosa.

b) Variabilidad clínica. Otro problema con la definición de un individuo afectado es la marcada variabilidad clínica de la diabetes. La expresión fenotípica del genotipo diabético puede estar modificada por una serie de factores ambientales, entre los que se incluyen dieta, obesidad, infección y actividad física, así como sexo y paridad. Por ejemplo, un diabético no dependiente de insulina obeso puede perder todos los signos de la enfermedad (clínicos y bioquímicos), si su peso regresa a lo normal. Debido a la alta variabilidad en la edad de aparición de la enfermedad, en un tiempo dado solamente son

reconocidos clínicamente una fracción de los individuos que poseen el genotipo diabético, lo que hace imposible decir en un momento dado, si un individuo que no está clínicamente afectado posee el genotipo diabético. Entonces, se requieren estudios longitudinales para detectar los miembros de las familias genéticamente afectados quienes eventualmente van a manifestar el fenotipo diabético.

c) Prevalencia. La alta prevalencia de diabetes en la población presenta dificultades adicionales para el genetista. Ya que es difícil saber si un familiar está afectado porque tiene el mismo genotipo, porque ha compartido el mismo ambiente, o porque tiene la probabilidad de tener la enfermedad por causas genéticas distintas por tratarse de una enfermedad tan común.

d) Defecto básico. El impedimento más importante para el análisis genético ha sido la falta de conocimiento del defecto básico de cada una de las causas que producen diabetes. Debido a ésta incapacidad no existe un método certero para detectar de manera presintomática todos los individuos con genotipos que predisponen a la enfermedad. (*Scriver CR, 1995*)

G. EVIDENCIA DE HETEROGENEIDAD EN LA DIABETES.

Gracias a los estudios de agregación familiar y con gemelos idénticos no hay duda que existen factores genéticos involucrados en la etiología de la diabetes, aunque por muchos años ha habido poco consenso sobre la naturaleza de los factores genéticos involucrados. Durante este periodo (varias décadas), se han propuesto todas las formas posibles de transmisión genética para la diabetes, e incluso a esta enfermedad la han llamado la pesadilla de los genetistas (*Neel JV, 1965*). Ahora sabemos que esta confusión se debe en gran parte a la heterogeneidad de la diabetes (*Rotter JI, 1981; Rotter JI, 1981; Creutzfeldt W, 1976; Fajans S, 1982; Kobberling J, 1982; Rotter JI, 1989a; Rotter JI, 1984; Freidman JM, 1980*).

En 1966, la hipótesis de la heterogeneidad genética se propuso basada en varias líneas de evidencia (*Rimoin DL, 1967*):

La evidencia indirecta incluye:

a) la existencia de distintas enfermedades genéticas raras (aproximadamente 60) que tienen intolerancia a la glucosa o diabetes como una de sus características (*Rotter JI 1981; Rimoin DL 1982*); entonces cada una de estas enfermedades genéticas son capaces de producir intolerancia a los carbohidratos a través de diferentes mecanismos patológicos;

b) heterogeneidad genética en distintos modelos animales; estos estudios no sólo documentan claramente la heterogeneidad genética para la intolerancia a la glucosa en roedores (*Coleman DL, 1982; Leiter EH, 1986; Jackson*

R,1988), sino que también demuestran que la expresión fenotípica del gen mutante está influenciada de gran manera por el genotipo total del animal; el locus H2 (el HLA en el roedor) (Leiter EH, 1989) y el sexo parecen ser componentes importantes. Entonces al menos en roedores la constitución genética total del individuo puede claramente influenciar la expresión fenotípica del gen mutado diabetogénico. Similarmente diferencias en el pool genético en humanos puede dar como resultado diferencias en la expresión clínica de la diabetes que se observan en diferentes grupos étnicos. También en modelos animales se ha reportado que la composición de la dieta tiene influencia en la necrosis de los islotes pancreáticos (Leiter EH 1981ab;Leiter EH, 1983). Por analogía la dieta puede modificar la expresión de la diabetes en humanos que están genéticamente predispuestos a la diabetes en diferentes grupos étnicos.

c) variabilidad genética en la prevalencia y en las características clínicas de la enfermedad entre diferentes grupos poblacionales; la variabilidad entre grupos étnicos puede ser secundaria tanto a factores genéticos como ambientales pero puede también indicar la presencia de heterogeneidad genética. Estudios epidemiológicos han demostrado diferencias entre diferentes poblaciones (Rimoin DL,1969,1971;Diabetes Epidemiology Research International Group,1988;West KM,1978); parece existir una correlación entre sobrenutrición y prevalencia de diabetes tipo 2 (Cohen AM,1961).

d) variabilidad clínica entre los pacientes; por ejemplo el desarrollo prematuro o no de complicaciones. Es claro que existe considerable variabilidad clínica entre y dentro de familias; los estudios iniciales de la diabetes tipo MODY, un subtipo de DMNID de aparición temprana (menor de 35 años) con herencia de tipo autosómico dominante, muestran que es una forma no agresiva de diabetes con una incidencia baja de complicaciones a largo plazo (Tattersall RB,1974;Barbosa J ab,1978), aunque otros grupos de investigación han sugerido que la incidencia baja de complicaciones solamente ocurre en las familias con herencia autosómico dominante (Tattersall RB,1982,Mohan B,1985). Ha sido sugerido que en indios asiáticos del sur de la India la retinopatía proliferativa y la neuropatía pueden tener menor incidencia en los diabéticos MODY con herencia de tipo autosómico dominante (Mohan B,1985). Recientemente se ha observado que los pacientes MODY caucásicos con mutaciones en los genes TCF1 y TCF14 parecen desarrollar complicaciones más severas y de forma prematura que los pacientes MODY con mutaciones en glucocinasa (Velho G, 1996;Yamagata K, 1996a,b;Vaxillaire M,1997).

e) variabilidad fisiológica. Existen evidencias de heterogeneidad fisiológica en diabetes tipo II, por ejemplo entre pacientes con diabetes tipo II moderada o con intolerancia a la glucosa en donde hay individuos con una respuesta temprana a la insulina que oscila en el rango de supranormal hasta baja o subnormal; se ha documentado una variabilidad similar para la respuesta tardía a la insulina. (Fajans SS, 1982ab,1985,1987)

Debido a la gran heterogeneidad en diabetes, a través de los años ha sido muy difícil el estudio de los genes involucrados en el desarrollo o la susceptibilidad a desarrollar DMNDI.

H. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y 2.

En algunos diabéticos distinguir entre diabetes tipo 1 (dependiente de insulina) y diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina) es muy difícil. Esta es una de las razones por lo que inicialmente no era claro si se trataba de dos enfermedades diferentes o era el espectro de una sola enfermedad. Algunos diabéticos jóvenes pueden llegar a requerir insulina, más no son dependientes de insulina. El requerimiento de insulina se define como la inhabilidad para prevenir la hiperglicemia en ayunas con una terapia de dieta y dosis máximas de drogas sulfonilureas, y este requerimiento no refleja un fenómeno autoinmune. Los pacientes que son requerientes de insulina, necesitan de la insulina cuando tienen algún descontrol metabólico pero sus células beta pancreáticas si producen insulina

Es particularmente difícil distinguir entre diabetes tipo 1 y 2 en personas con peso normal, y aquellos en quienes el diagnóstico se hace alrededor de los 30 años, en pacientes con sobrepeso y síntomas severos y en pacientes con DMNDI clásica pero con requerimientos de insulina bajos a un año o más después del diagnóstico (*Gorsuch AN, 1981; Wilson RM, 1985*). Se han sugerido varios métodos para distinguir entre diabetes tipo 1 y 2, incluyendo la tipificación de HLA, medición de anticuerpos anti-islole pancreático (ICAs), respuesta a insulina después de la administración intravenosa de glucosa, y la estimación de la producción de insulina endógena a través de la medición de péptido C plasmático o urinario (*Irvine WJ 1977; Laakso M, 1985; Groop LC, 1986; Kilvert A, 1986*).

Utilizando ICAs y péptido C (los primeros 2 años después del diagnóstico) se puede distinguir casi en un 100% si un individuo es insulino dependiente o no es. Los ICAs se encuentran positivos en el 90% de los individuos dependientes de insulina durante los primeros 3 años después del diagnóstico y la medición de péptido C es una medida de la síntesis de insulina, en los individuos dependientes de insulina se debe encontrar en valores cercanos o igual a cero.

I. ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGIA DE LA DIABETES MELLITUS NO DEPENDIENTE DE INSULINA (DMNDI).

La DMNDI se define por el hecho de que los pacientes no requieren insulina para prevenir cetoacidosis (*National Diabetes Data Group, 1979; Bennett PH, 1983*). A diferencia de la diabetes tipo 1 que es una enfermedad con un componente autoinmune, la tipo 2 no lo es. Existen evidencias disponibles que sugieren que la susceptibilidad a DMNDI está determinada primariamente por factores genéticos. Por ejemplo, los estudios con gemelos monocigotos demostraron una concordancia extremadamente alta (cerca al $\cong 90\%$) para DMNDI (*Pyke DA, 1979; Barnett AH, 1981*). La concordancia en gemelos monocigotos con DMNDI es substancialmente mayor que la concordancia correspondiente en DMDI (de alrededor de 50%) en el mismo estudio (*Barnett AH, 1981*). La concordancia entre gemelos monocigóticos con DMNDI es la más importante ya que ésta se desarrolla generalmente tarde en la vida cuando los gemelos usualmente viven separados y comparten pocos factores ambientales. Sin embargo los genes de susceptibilidad que predisponen a la DMNDI no se han identificado en la mayoría de los pacientes y un gran número de genes candidato se están investigando. Se cree que al menos algunos genes candidato deben estar involucrados en vías metabólicas relacionadas con la resistencia de insulina y/o con la secreción de insulina. Formas raras con aparición temprana se deben a genes dominantes, como lo es el subtipo MODY, y todavía más raras son las formas con insulinas anormales debido a las mutaciones en el gen de la insulina.

Además de los factores genéticos, la obesidad es el mayor factor de riesgo que predispone a la DMNDI; de hecho la mayoría de los pacientes con DMNDI son obesos. La obesidad se determina por factores tanto ambientales como de conducta (nutrición y actividad física), y además también se han reportado factores genéticos que predisponen a la obesidad. En varios modelos animales de DMNDI (ratón ob/ob, ratón db/db y rata fa/fa) existen mutaciones que simultáneamente causan obesidad y diabetes mellitus. (*Friedman JM, 1991; Weigle DS, 1996*)

Los estudios migratorios y poblacionales efectuados en países y regiones en vía de desarrollo indican que los cambios ambientales que acompañan el desarrollo y la occidentalización promueven la DMNDI en aquellos individuos que son genéticamente susceptibles (*Cohen AM, 1979; Modan M, 1986; Sievers ML, 1985; Schraer C, 1988; O'Dea K, 1984*).

J. EFECTOS MATERNOS EN DMNDI.

De sumo interés es la interacción entre susceptibilidad genética y efectos maternos en la DMNDI, presumiblemente debido a efectos metabólicos durante el embarazo. En los reportes iniciales de las familias con DMNDI tipo MODY, Dornier y col. (*Dornier GA, 1975, 1976*) encontraron evidencia de que la diabetes ocurre más frecuentemente en la rama materna que en la paterna lo cual se

determinó a través del probando diabético. Además significativamente más madres (18.2%) que padres (9.1%) de los propósitos eran diabéticas. Pettit y colaboradores reportaron en familias de Indios Pimas con DMNID evidencias que sostienen la importancia de la diabetes con herencia materna en determinar el riesgo para presentar diabetes en la descendencia. En esos estudios, el 45% de la descendencia de las madres diabéticas antes del embarazo eran diabéticos a la edad de 20-24 años, comparado respectivamente con 1.4% y 8.6% de la descendencia de las mujeres que no eran diabéticas ni "prediabéticas" (se hicieron diabéticos después). El estatus de diabetes paterna parece contribuir solamente con un pequeño riesgo adicional a la descendencia, después de corregir por factores de riesgo (*Pettitt DJ, 1986*).

K. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE LA ENFERMEDAD EN DMNID.

Se han descrito, algunos defectos bioquímicos en pacientes con DMNID, esos defectos contribuyen a la patogénesis, aunque es improbable que ellos, sean la causa primaria de la DMNID; entre ellos se encuentran, defectos en el gen de la insulina (*Steiner DF, 1990*), defectos en los receptores de insulina (*Kolterman Og, 1982; Olefsky JM, 1981; Rizza RA, 1981; Caro JF, 1986; Caro JF, 1987*), en los transportadores de glucosa: GLUT 1, GLUT 2, GLUT 3, GLUT4 (*Pessin JE, 1992; Burant CF, 1991*); defectos en las enzimas glucógeno sintetasa (*Bogardus C, 1984; Damsbo P, 1991*) y deshidrogenasa pirúvica (*Kelley DE, 1990*). En un estudio reciente se ha reportado que existe una correlación entre la sensibilidad a la insulina y el contenido de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga en las membranas fosfolipídicas (*Borkman, 1993*).

Se ha descrito defectos en el ADN mitocondrial asociados a DMNID y sordera los cuales son transmitidos por herencia materna (*Ballinger S, 1992*).

L. DIABETES MELLITUS NO DEPENDIENTE DE INSULINA (DMNID) TIPO MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young).

a) Herencia Autosómico Dominante. Este subtipo de diabetes se identificó en los años 70's, también se llama diabetes tipo Mason, diabetes no dependiente de insulina de la juventud (DMNIDJ) e hiperglicemia de la madurez de presentación temprana (MOHY) (*Tattersall RB, 1975; Johansen K, 1977*). Este subtipo representa entre el 1-2% de los casos de DMNID y se calcula que hasta en el 13% de las familias diabéticas de origen Caucásico en Francia son MODY (*Froguel P, 1991*).

Los diabéticos tipo MODY deben de reunir los siguientes criterios:

- (1) herencia autosómico dominante;
- (2) edad de aparición menor a 35 años en el paciente y en al menos un miembro de la familia,
- (3) corrección de hiperglicemia en ayuno por al menos 2 años sin insulina; (4) diabetes no cetótica (*Tattersall RB, 1982*).

Usando los criterios anteriores, se han identificado familias con herencia autosómico dominante clara. Sin embargo se ha observado en los últimos años una considerable heterogeneidad entre diabéticos clasificados como MODY/DMNIDJ (non insulin dependent diabetes of the young); por ejemplo se han reportado pacientes MODY que requieren insulina para su control metabólico e incluso algunos pacientes que desarrollan dependencia a la insulina con el paso de los años (*Fajans SS, 1985, 1987*). El término de DMNIDJ o diabetes no dependiente de insulina de la juventud no toma en cuenta el tipo de herencia autosómico dominante. Como en cualquier otra enfermedad genética, la DMNID de la juventud puede ocurrir también en la forma esporádica. (*Fajans SS, 1982; Fajans SS, 1985; Keen H, 1982; NDDG, 1979*).

b) Expresión fenotípica e historia natural. En años recientes se ha venido reconociendo un espectro amplio de características clínicas. Se puede hacer diagnóstico de MODY si la DMNID ocurre en 2 o más generaciones de acuerdo con un tipo de herencia autosómico dominante. Se puede diagnosticar antes de los 25 años de edad, frecuentemente temprano en la adolescencia (9-14 años de edad) y particularmente si se determina por análisis de glucosa plasmática de rutina en las generaciones más jóvenes de las familias con 1 ó más generaciones con DMNID (otros usan los límites superiores de 30 o 35 años de edad para la definición de DMNID en la juventud (*Jialal I, 1982, 1984*)). MODY es frecuentemente asintomático en los grupos jóvenes, aunque algunos pacientes pueden tener síntomas, los cuales son particularmente desencadenados por estrés o por infección. Frecuentemente el diagnóstico clínico de la diabetes en muchos miembros de las familias afectadas no se hace cuando inicia la hiperglicemia sino años después o hasta la edad adulta. Por análisis repetidos de glucosa de los miembros jóvenes de las familias MODY, se puede demostrar que hay una velocidad variable en la progresión de la enfermedad de tal manera que, de la forma no diagnóstica (pero no normal) a la intolerancia a la glucosa y también de la intolerancia a la glucosa a la diabetes franca con niveles de glucosa en ayunas normales pueden pasar hasta 18 años; y se observa que no hay progresión, o existe progresión lenta o rápida a una hiperglicemia en ayunas (0.5-27 años). La severidad de la intolerancia a la glucosa puede fluctuar por muchos años, particularmente en pacientes con anormalidades medias antes de la aparición persistente de la hiperglicemia en ayunas lo que representa variaciones en la expresión de la enfermedad. En contraste, otros individuos con MODY en el mismo pedigree pueden tener hiperglicemia en ayunas y/o una rápida progresión de la enfermedad a una edad temprana.

Se ha reportado que los pacientes MODY indios que residen en Sudáfrica y en el sureste de la India son primariamente sintomáticos con hiperglicemias al

diagnóstico. Las hiperglicemias en ayunas, a edad temprana (9-14 años), responden a terapia de dieta o de dieta más agentes hipoglucemiantes por años o décadas; sin embargo, en algunos pacientes jóvenes después de algunos años o décadas, las hiperglicemias en ayunas ya no responden a la terapia con sulfonilureas y progresan al requerimiento de insulina (no existe dependencia de insulina o cetosis) con la disminución o niveles basales bajos de insulina estimulada por nutrientes y también niveles bajos de péptido C.

También, en contraste con la aparición asintomática de la mayoría de los pacientes blancos. Winter y col. (1987) describieron un síndrome de diabetes sintomático atípico en jóvenes negros americanos que tienen características de MODY. Estos pacientes presentan síntomas diabéticos agudos que son reversibles con insulina pero meses o años después presentan un curso típico de DMNID; esta diabetes no autoinmune se puede confundir con DMID ya que su presentación clínica es aguda pero puede diferenciarse de la clásica DMID en base a sus características clínicas, familiares, inmunológicas, genéticas y metabólicas.

Las complicaciones típicas microangiopáticas y macroangiopáticas pueden ocurrir en una frecuencia similar a las reportadas en otros pacientes con DMNID. Entonces MODY no es necesariamente una forma inocua de hiperglicemia.

c) Distribución y prevalencia. La DMNID de aparición temprana y tipo MODY se han reportado en Europa (*Tattersal RB, 1974; Pyke DA, 1979; Bodansky JH, 1987; Nelson PG, 1976; Tulloch JA, 1976; Bell JI, 1983*), Estados Unidos (*Fajans SS, 1960, 1962, 1982, 1978, 1987; Tattersall RB, 1975; Lawson VK, 1981; Winter WE, 1987; Barbosa J, 1978a, b;*), Sudáfrica (*Jialal I, 1982a, b, 1984; Asmal AC, 1981*), India (*Mohan V, 1985*), Japón (*Ikeda Y, 1979; Kuzuya T, 1982; Hanaoka Y, 1985*), Australia (*Serjeantson SW, 1982*) y Sudamérica (*Durruty P, 1985*). En un estudio comunitario en la Ex-República Democrática Alemana se estimó su prevalencia en 0.15% de todos los pacientes diabéticos y 5.1% de los pacientes con DMNID menor de 30 años (*Panzram G, 1983*). En el Centro de Investigación de Diabetes en Madras, India, 4.8% de los pacientes diabéticos menores de 25 años de edad fueron clasificados como MODY (*Mohan V, 1985*). Entre pacientes con DMNIDJ en Sudáfrica en los pacientes Indios, la prevalencia de DMNID sintomática con edad de aparición antes de los 35 años de edad fue de 10% (*Asmal AC, 1981*). Con un criterio de selección similar, 18.5% de los pacientes Indios con DMNID en Madras fueron MODY (*Mohan V, 1985*). El síndrome de diabetes con características de MODY representa cerca del 10% de todos los casos de la diabetes de aparición temprana en negros americanos que residen en el sureste de los Estados Unidos (*Winter WE, 1987*). Froguel y col. reportaron que en población caucásica existe una prevalencia del 13% (*Froguel P, 1991*).

d) Diabetes Mellitus dependiente de Insulina en familias MODY.

1.- HLA. No se ha encontrado asociación entre los antígenos HLA y MODY en pacientes Caucásicos (*Nelson PG, 1976; Faber OK, 1978; Owerbach D, 1983*), ni en Negros Americanos (*Winter WE, 1987*) o en Indios con DMNIDJ (diabetes mellitus no dependiente de insulina de la juventud) (*Naidoo C, 1986*). En un estudio donde se analizaron 12 jóvenes negros americanos con el

síndrome de diabetes sintomática atípica que tiene características de MODY, 6 de los 12 propósitos fueron positivos para la asociación con el antígeno protector de la DMID HLA-DR2 (*Winter WE, 1987*). Por otra parte todos los miembros diabéticos de una familia Caucásica analizada que tiene características de MODY, con transmisión de tipo autosómico dominante poseen HLA-DR2 o HLA-DR7. El significado de la presencia de los antígenos protectivos contra la DMID en esos pacientes MODY si lo hay, se desconoce (*Bodansky JH, 1987*).

2.- ICAs. Los análisis para anticuerpos anti-islole reportados en los pacientes MODY han sido negativos (*Fajans SS, 1982; 1978, 1987; Winter WE, 1987; Bodansky JH, 1987; Beck-Nielsen H, 1988*).

3.- Presencia de DMID en familias MODY. En la familia RW existe la presencia de individuos con DMID (*Fajans SS, 1985*) y en otra familia MODY (Ha) también se han reportado la presencia de individuos con DMID (*Fajans SS, 1990*). Las posibles interpretaciones para la presencia de DMID en familias MODY podrían ser, uno, que la DMNID y la DMID son enfermedades comunes y se podría esperar una co-ocurrencia al azar, además ya que MODY no se asocia al HLA y no existen evidencias de factores inmunológicos, tiene factores patogénicos ambientales que difieren de la DMID (como, aumento de peso, y/o obesidad) y también difiere en la historia natural de progresión sería raro que MODY y la DMID tengan una etiopatología común.

e) Peso corporal-obesidad. La mayoría de los miembros (75%) de las familias MODY caucásicas no fueron obesos al diagnóstico, ni en la adolescencia, ni en la vida adulta (*Fajans SS, 1982*). En el 25% de las familias MODY reportadas la mayoría de los miembros con diabetes fueron obesos desde edad temprana. Entre las 23 familias MODY reportadas, 7 familias MODY (30%) se han reportado como obesas (*Tattersall RB, 1982*). Entre otros grupos de individuos de raza blanca con diabetes tipo MODY, el 52% (*Panzram G, 1983*) y 57% (*Durruty P, 1985*) fueron obesos. Se esperaría que en esas familias, conforme avanza la edad, de la niñez a la adolescencia y a la edad adulta, la prevalencia de la obesidad sea similar a la reportada en la población general. En 85 pacientes sudafricanos con DMNIDJ sintomática diagnosticados a una edad menor de los 35 años de edad, el 55% eran obesos (*Jialal I, 1982*) y entre 219 Indús con diagnóstico de MODY con una edad de diagnóstico menor de 25 años, el 32% eran obesos (*Mohan V, 1985*). En negros americanos con diabetes sintomática aguda de aparición temprana con características de MODY el 46% son obesos (*Winter WE, 1987*).

La frecuencia de la obesidad en pacientes jóvenes con diabetes tipo MODY (25-55%) parece ser mayor que en la población general. Entre los 20 y 24 años, el 12.7% de los hombres blancos y el 9.6% de las mujeres blancas tienen sobrepeso y existen datos similares en población negra, 5.5% y 23.7% respectivamente (*Van Itallie TB, 1985*). Entre los 25-34 años 20.9% de los hombres y 17.9% de las mujeres tienen sobrepeso en población blanca y el 17.5 y 33.5% respectivamente en población negra. La frecuencia de la obesidad en pacientes MODY jóvenes es menor que la reportada para

pacientes con DMNID. La presencia de obesidad en pacientes jóvenes con predisposición a la diabetes tipo MODY puede promover la hiperglicemia en ayunas y la sintomatología al diagnóstico.

f) secreción de insulina y heterogeneidad en MODY. Aunque MODY se hereda de modo autosómico dominante, existe una considerable heterogeneidad en las anomalías en la secreción de insulina entre familias y entre poblaciones con MODY. En pacientes de diferentes familias con MODY y con anomalías similares en la tolerancia a la glucosa y con hiperglicemias en ayunas medianamente elevadas, se ha encontrado un amplio espectro de la respuesta de insulina a la administración de glucosa, la cual oscila de valores muy bajos a muy altos (*Fajans SS, 1978, 1982, 1986, 1987*). En los pacientes MODY con respuestas retardadas y subnormales, la insuficiencia de insulina, aunque incompleta, parece ser el factor patogénico fundamental de los niveles anormales de glucosa sanguínea (*Fajans SS, 1960, 1976, 1974, 1978, 1982, 1986, 1987*). La respuesta secretora baja de insulina a nutrientes puede ocurrir desde la niñez y aún antes que aparezca intolerancia a la glucosa (*Fajans SS, 1960, 1985, 1982, 1978, 1981*). La respuesta de la secreción de insulina alterada puede ser una manifestación del defecto genético básico que lleva a la diabetes cuando se imponen factores ambientales (por ejem. disminución fisiológica en la sensibilidad de la insulina con el crecimiento y pubertad (*Fajans SS, 1982, 1986*). Se puede manifestar por una falla en las células beta pancreáticas para prevenir o compensar un aumento en la glucosa plasmática ante un estímulo oral o intravenoso, o una comida (*Fajans SS, 1981; Kosaka K, 1980*). Una respuesta insuficiente de la célula beta podría ser el defecto primario en MODY. (*Beck-Nielsen, 1988*)

En algunos pacientes MODY con el paso de los años las respuestas secretoras a la glucosa se empiezan a hacer muy bajas hasta que son muy parecidas a la de los pacientes con DMID (*Fajans SS, 1985, 1978, 1982, 1987*). Sin embargo la historia natural de la disminución de la respuesta secretora con el tiempo y la severidad de las anomalías metabólicas son diferentes entre estos dos tipos de diabetes. En MODY la descompensación de una respuesta baja de insulina y péptido C a un requerimiento de insulina exógena (definida como una inhabilidad para corregir la hiperglicemia en ayunas con dieta o sulfonilurea) puede ocurrir en varios años o hasta en varias décadas. (*Fajans SS, 1985, 1987*). En pacientes con DMID el requerimiento de insulina exógena es mucho más prematuro. Otros autores también han reportado respuestas retrazadas, subnormales o muy bajas de la insulina (*Tattersal RB, 1974; Tulloch JA, 1976; Johansen K; Carta G, 1985; Babosa J, 1978*) o del péptido C (*Bodansky JH, 1987; Ikeda Y, 1979*) a la glucosa en pacientes MODY.

En la India los individuos MODY obesos y no obesos tienen disminuidos los niveles de péptido C y la respuesta de insulina a la glucosa comparando con los sujetos no diabéticos (*Mohan V, 1985*). La diferencia entre individuos diabéticos y no diabéticos es más marcada en el grupo de MODY obesos y no obesos, aunque el grupo de MODY obesos tiene concentraciones menores de glucosa plasmática en ayunas (117 vs. 217 mg/dl) En 47 hijos de pacientes

con MODY, la media de la respuesta de la insulina inmunoreactiva no fue significativamente menor en 39 individuos no obesos, aunque fue menor en 8 individuos obesos que en los controles (*Mohan V, 1986*). El promedio de la respuesta de péptido C es menor en ambos grupos, la disminución es más pronunciada en los descendientes obesos. Con éstos hallazgos se interpretó que la secreción deficiente de insulina se puede detectar aún antes que la intolerancia a la glucosa en algunos descendientes de los individuos MODY. El gran potencial diferencial entre individuos diabéticos, individuos potencialmente diabéticos y en individuos obesos puede deberse al hecho de que la resistencia a la insulina en la obesidad trae consigo una respuesta compensatoria mayor de la secreción de insulina. Se ha reportado en dos estudios por extracción hepática que la secreción de insulina fue normal en los pacientes con MODY (*Carta G, 1985; Naidoo C, 1986*), lo que indica que la disminución y atenuación de la respuesta secretora de las células beta puede interpretarse como una deficiencia de insulina. Todos estos datos sugieren fuertemente que la deficiencia de insulina es la anomalía primaria.

En vista de la herencia autosómico dominante de MODY se espera que aproximadamente 50% de los individuos de cada generación no sean diabéticos y mantengan una respuesta normal de la insulina a la glucosa.

Factores ambientales superimpuestos sobre la susceptibilidad sin duda contribuyen a la aparición de la intolerancia a los carbohidratos en DMNID y en MODY. Algunos jóvenes no obesos miembros de las familias MODY primero desarrollan intolerancia a los carbohidratos entre los 9 y 12 años de edad (*Fajans SS, 1981, 1982*). Los niños normales tienen una respuesta menor de la insulina a la administración de glucosa que los adolescentes o los adultos, lo que implica una sensibilidad mayor en la niñez (*Rosenbloom AL, 1975; Lestrade H, 1976*). Entonces aun los individuos genéticamente predispuestos a una respuesta baja de la insulina a la glucosa, pueden mantener una tolerancia a los carbohidratos normal en la niñez. Con el incremento de la masa corporal debido al crecimiento y la aparición de la pubertad, la sensibilidad a la insulina disminuye fisiológicamente y trae consigo una respuesta secretora de insulina cuantitativamente mayor, y se podría especular que la incapacidad para incrementar los niveles de insulina en MODY a los niveles normales de los adolescentes puede ser al menos una causa del surgimiento de la intolerancia a los carbohidratos que se ve alrededor de la adolescencia (*Fajans SS 1981, 1982*).

g) Insensibilidad de la insulina o Resistencia a la Insulina. Se ha encontrado en la mayoría de los pacientes con DMNID o con intolerancia a la glucosa una disminución de la respuesta tejido-blanco a la insulina tanto in vivo como in vitro (*Beck-Nielsen H, 1988*). En muchos pacientes y familias MODY hay evidencias de resistencia a la insulina, lo que sugiere heterogeneidad no solamente en la secreción de insulina sino también en la resistencia a la insulina. Las pruebas de tolerancia a la insulina realizadas inmediatamente después del diagnóstico en 7 descendientes diabéticos de la familia RW mostraron una sensibilidad normal a la insulina y una vida media normal de la

insulina. Los requerimientos de insulina alcanzan al control normoglicémico en tres pacientes diabéticos de la familia RW. Entonces la resistencia a la insulina no es una característica que se presente constantemente en todos los pacientes MODY. Se ha reportado la resistencia a la insulina en miembros de familias MODY primariamente en aquellos con marcada hiperglicemia en ayuno. Beck-Nielson et al. (1988) investigaron un par de gemelos idénticos de una familia MODY, uno de ellos con intolerancia a la glucosa y el otro con diabetes franca. La producción de glucosa hepática basal, el efecto inhibitorio máximo de la insulina sobre la producción de glucosa hepática estimado como una euglicemia, y la captación máxima de glucosa mediada por la insulina en los tejidos periféricos fue normal en el gemelo intolerante, pero en el gemelo diabético fue muy reducida.

Aunque la resistencia a la insulina parece ser un mecanismo patogénico importante en individuos con intolerancia a la glucosa y MODY, las respuestas compensatorias de la insulina a los nutrientes son insuficientes para mantener una tolerancia normal a los carbohidratos, lo que indica que la diabetes se presenta solo en individuos que tienen un defecto adicional y probablemente primario en los islotes como podría ser una reserva insuficiente de la célula β pancreática y de la capacidad secretora (Fajans SS, 1990).

h) Tratamiento. Es de suma importancia lograr una euglicemia en los diabéticos no dependientes de insulina de aparición temprana y en los tipo MODY ya que la hiperglicemia en este tipo de diabetes será de duración más larga que en la DMNID de edad adulta. La considerable frecuencia de complicaciones en MODY dicta esta estrategia, en particular en familias en las cuales se han presentado las complicaciones neuropáticas y vasculares.

Los principios de la terapia para MODY son los mismos que para la DMNID del adulto. La reducción de peso en los MODY asociados con obesidad ha demostrado revertir la hiperglicemia en ayunas y las concentraciones elevadas de hemoglobina glucosilada, mejora o normaliza la tolerancia a la glucosa, revierte la hiperinsulinemia si está presente o mejora la hipoinsulinemia y disminuye la resistencia a la insulina (Lawson VK, 1981). En pacientes MODY delgados, particularmente aquellos sin hiperglicemia en ayunas, una dieta moderadamente restringida en carbohidratos, particularmente sucrosa, puede mantener las concentraciones de glucosa sanguínea posprandial dentro de los límites normales por años y aún por décadas. No han sido necesarias las recomendaciones de dietas específicas (ó terapia con drogas) para las posibles anormalidades de la concentración de lipoproteínas.

M. HETEROGENEIDAD GENÉTICA EN LA DMNID TIPO MODY.

Es ahora claro que existe más de una causa de MODY, cada una resulta de diferentes genes alterados. Se han reportado hasta el momento 3 genes asociados a la DMNID tipo MODY: MODY 1 (Yamagata K, 1996a), en la que el

defecto se localiza en el gene TNF1 que codifica para el factor nuclear de hepatocitos 4 α ; MODY 2 en el gen de la enzima glucocinasa (*Bell GI, 1991*), y MODY 3 en el gen TNF14 que codifica para el factor nuclear de hepatocitos 1 α (*Yamagata K, 1996b*).

El 50-60% de los pacientes MODY franceses tienen mutaciones en el gen de la glucocinasa (*Stoffel M, 1992; Froguel P, 1992, 1993*), en un 25% de las familias francesas restantes el gen afectado MODY3 (TCF1) se mapeo en el cromosoma 12q (*Vaxillaire M, 1995*). En el 25% restante de familias MODY francesas no se ha encontrado asociación con ningún gen, a pesar de que se ha analizado un gran número de genes candidato. El tercer gen (TCF14) se mapeo en el cromosoma 20 en una familia caucásica denominada RW (*Bell GI, 1991; Yamagata K, 1996b*) y es hasta el momento la única familia reportada con alteraciones en este gen.

En un estudio japonés, se analizaron mutaciones en el gen de la glucocinasa en un gran número de diabéticos con edades de presentación entre 30 y 40 años, incluyendo 3 individuos MODY (*Sakura H, 1992; Eto K, 1993*). Solo se identificó una mutación de un cambio de aminoácido por otro en el exón 7 en uno de los pacientes MODY, lo que apoya también el concepto de que MODY es una enfermedad genéticamente heterogénea dentro y entre diferentes poblaciones.

Llama particularmente la atención que los genes alterados en MODY1 y MODY3 son factores de transcripción hepáticos relacionados. Esto abre una nueva dimensión al conocimiento de la patogénesis de la diabetes y a la búsqueda de genes que predisponen a la forma más común de la enfermedad. Los efectos biológicos de las formas mutantes de dichos factores hepáticos (HNF-1 α y HNF-4 α) no se conocen y su función en las células β -pancreáticas se está investigando. Ratones knockouts homocigotos para HNF-1 α y HNF-4 α son letales; es importante analizar el metabolismo de la secreción de insulina en los ratones heterocigotos. Tampoco se sabe si las mutaciones en estos factores de transcripción predisponen a la DMNID del adulto.

Se han reportado 10 mutaciones diferentes en el gene HNF-1 α asociadas a MODY, y no existe relación entre la naturaleza de las mutaciones observadas o su localización en el gen con las características clínicas de la enfermedad. El mecanismo por el cual las mutaciones en el gen HNF-1 α causan diabetes mellitus no es claro pero se podría pensar en un desarrollo anormal de los islotes pancreáticos durante la vida fetal lo que limitaría su función posterior, así como la alteración de la regulación de la transcripción de genes que tienen un papel clave en la función normal de las células pancreáticas (*Vaxillaire M, 1997*).

Complicaciones. Se ha estudiado la prevalencia de complicaciones en familias francesas (*Velho G, 1996*) en grupos de individuos con MODY1, MODY2, MODY3 y DMNID, y se reporta una alta prevalencia de retinopatía proliferativa en MODY3 (21%), dicha prevalencia es parecida a la reportada en individuos con DMNID (23%) pero ambas son significativamente mayores a la reportada

en MODY deficiente de glucocinasa (3%) y a otros MODY (8%); la duración de la diabetes y la severidad de la hiperglicemia en los grupos MODY3 con retinopatía proliferativa esta implícita en la alta prevalencia de la retinopatía, esto es los sujetos con complicaciones tienen significativamente mayor edad, más tiempo de duración de la enfermedad y una presión sanguínea sistólica mayor, niveles de creatinina mayores que los sujetos MODY3 sin esta complicación. En dicho estudio se evaluaron 3 parámetros 1) niveles de glucosa plasmática y el estatus de la tolerancia a la glucosa 2) secreción de insulina durante la AGTT y 3) el efecto de la duración de la diabetes sobre el defecto en la secreción de la insulina y el estado de tolerancia a la glucosa. Los individuos MODY3 afectados tenían niveles de glucosa plasmática en ayuno significativamente mayores que los MODY deficientes de glucocinasa y otros MODY, y niveles similares a los individuos con DMNID. Los niveles de glucosa después de 2 horas eran significativamente mayores en los sujetos MODY3 que en los otros grupos. Esos datos concuerdan con la observación de la frecuencia significativamente alta en las familias MODY3 del estatus diabético, comparado con el estatus de hiperglicemia en ayuno moderada/IG; en este aspecto los sujetos MODY3 fueron tratados más a menudo con agentes hipoglucemiantes o con insulina que los sujetos de los otros grupos. El índice insulina/glucosa a las 2 horas fue significativamente más bajo en los sujetos MODY3 comparados con los otros grupos, lo que sugiere la presencia de un defecto más severo en la secreción estimulada por glucosa. La insulina plasmática en ayunas, así como la relación insulina/glucosa, no fue significativamente mayor en ningún grupo MODY, pero sí fue significativamente mayor en el grupo con DMNID, lo que quizás esté reflejando algún grado de resistencia a la insulina en el último grupo (DMNID). La duración de la diabetes fue significativamente mayor e independientemente asociada con la severidad del defecto secretor en los grupos MODY3 y el de DMNID. Los individuos MODY3 con una larga duración de la enfermedad presentan un defecto severo en la secreción de insulina y la curva de tolerancia a la glucosa se encuentra más severamente alterada, que en los sujetos con una corta duración de la enfermedad. Por otra parte el defecto en la secreción de la insulina y la tolerancia a la glucosa en los individuos deficientes de glucocinasa y en los otros MODY son relativamente más estables que los de MODY3.

Enfermedad vascular. En algunas familias MODY de raza blanca se han reportado con alta frecuencia las complicaciones típicas microvasculares y macrovasculares de la diabetes (*Fajans SS, 1982, 1978*), lo que puede sugerir heterogeneidad en la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad vascular dentro de MODY, como pueden ser las diferencias en el componente genético que predispone a la enfermedad vascular. Por otra parte lo poco frecuente de las complicaciones en algunas familias MODY puede ser debido a la hiperglicemia ligera por largos períodos de tiempo y/o a diferencias en la duración de la hiperglicemia en pacientes diabéticos en el momento de la

evaluación. Las complicaciones vasculares presentes en los pacientes MODY, se encuentran frecuentemente en la edad adulta o en la vejez, aunque se han reportado algunos casos con presentación en los treintas o más temprano (*Fajans SS, 1985, 1987; Mohan V, 1985; Bodansky JH, 1987; Bigler R, 1981*).

Neuropatía. Durruty y col. (1985) reportaron neuropatía en el 24% de 25 individuos con MODY. Entre Indios MODY se ha reportado entre 31-55% de los pacientes con esta complicación (*Asmal AC, 1981; Mohan V, 1985*) y en ellos no es rara la neuropatía autonómica subclínica. En vista de las diferencias en las edades de los pacientes, del criterio de selección de los pacientes, de la definición básica de neuropatía diabética y del criterio de diagnóstico, y de la duración de la hiperglicemia, es difícil hacer comparaciones en la prevalencia con esos estudios. Los síntomas y signos de la neuropatía se han reportado en el 10-62% de los pacientes diabéticos.

En el pedigree RW, la neuropatía periférica sintomática se presenta en 4 pacientes con diabetes entre los 20 y 30 años de edad. Dos de los cuatro pacientes fueron tratados con insulina. Se ha encontrado evidencias de neuropatía diabética moderadamente severa diagnosticada por estudios de la velocidad de conducción nerviosa en 5 pacientes asintomáticos adicionales con la misma duración de la diabetes, este estudio no se realizó en todos los pacientes.

Entonces tenemos que aunque la diabetes tipo MODY se ha considerado a menudo como una forma de hiperglicemia crónica no agresiva, en algunos pacientes su historia natural comparte algunas características con el fenotipo clínico severo de la DMNID de aparición tardía. Sin embargo, a diferencia de la diabetes de aparición tardía, el subtipo MODY3 está asociado con una baja prevalencia de obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial; a este respecto los individuos afectados de la familia RW en donde los individuos MODY se encuentran ligados a locus MODY1 presentan una forma severa de diabetes que requiere terapia con insulina en aproximadamente el 30% y están asociados con complicaciones microvasculares (*Fajans SS, 1994*)

La delineación de la heterogeneidad genética y la búsqueda de marcadores genéticos podría tener implicaciones importantes no solo para entender la genética y etiología de la diabetes, sino también para entender la diversidad de sus complicaciones. Solo cuando todos los desordenes que resultan en diabetes mellitus y/o intolerancia a la glucosa sean delineados tendremos pronósticos específicos y posibles terapias para todos los pacientes diabéticos.

N. GLUCOCINASA.

a) Características cinéticas. Después de que la glucosa entra a la célula, la etapa siguiente en su metabolismo es la adición de un grupo fosfato, lo que resulta en la formación de glucosa-6P (G6P). Esta reacción es catalizada por uno de los miembros de la familia de las hexocinasas. En la mayoría de los tejidos la enzima hexocinasa tienen una K_m baja, entonces la velocidad de la producción de glucosa-6-fosfato (G6P) es máxima dentro del rango fisiológico de la glucosa. La mayoría de las formas de la hexocinasas están sujetas a inhibición por retroalimentación por G6P. El hígado y la célula beta pancreática tienen una hexocinasa especializada (hexocinasa IV) o glucocinasa, con propiedades cinéticas marcadamente diferentes, su K_m es mucho mayor, por lo que la velocidad de producción de G6P está directamente relacionada a la cantidad de glucosa presentada a la enzima. Además la enzima no presenta inhibición de su producto G6P (Magnuson MA, 1992). Matschinsky y col. fueron los primeros en sugerir que la glucocinasa podría ser un buen candidato para actuar como el "sensor de la glucosa" pancreática (Bedoya FJ, 1986).

Por otra parte el hallazgo posterior de que mutaciones en el gen de la glucocinasa causan DMNID tipo MODY confirmó el papel de ésta enzima como regulador de la secreción de insulina. Además los ratones transgénicos que expresan hexocinasa B de levadura en células β pancreáticas muestran niveles más bajos de glucosa y aumento en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Epstein P, 1992). Inversamente, el ratón transgénico antisentido de glucocinasa, con una actividad plasmática disminuida, muestra niveles normales de glucosa y de insulina pero disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes aislados (Efrat S, 1994). Los estudios de la producción hepática de la glucosa en ratones *knock-out* heterocigotos para el gene de la glucocinasa sugieren que la deficiencia de la glucocinasa en el hígado juega un papel significativo en la homeostasis de la glucosa (Bali D, 1995). Por otra parte los ratones homocigotos para alteraciones en la glucocinasa pancreática presentan diabetes severa y mueren en la primera semana de vida (Grupe A, 1995). La inhibición de la glucocinasa pancreática por la expresión del RNA antisentido produce hiperglicemia, la cual depende de la cepa de ratón transgénico estudiado (Ishihara H, 1995). Se ha demostrado que la actividad de la glucocinasa hepática es menor en sujetos obesos con DMNID, que en los controles delgados y en los diabéticos no obesos, lo que sugiere que los cambios secundarios en la actividad de la glucocinasa hepática pueden jugar algún papel en la DMNID (Caro JF, 1995), y utilizando ratones transgénicos que expresan el gen de la glucocinasa hepática bajo el control del *enhancer* del gene de la apolipoproteína A-I el cual se expresa solamente en el hígado, se encontró que el RNAm en ayunas de glucocinasa hepática está incrementado 2 veces, lo que resulta en un incremento del 20% en la actividad de la glucocinasa en ayunas. Esos experimentos muestran que en ayunas, niveles bajos de glucosa, insulina, lactato y alteración en la tolerancia a la glucosa. Además estos animales pesan menos y tiene un IMC (índice de masa corporal) menor que los animales no transgénicos; con estos

animales transgénicos se demuestra que un modesto cambio en la actividad de la glucocinasa hepática puede regular el metabolismo de la glucosa (Hariharan N, 1997).

b) Mutaciones en el gen de la glucocinasa. Dado el enorme interés de los factores genéticos en la DMNDI, el ADNc de la glucocinasa se clonó y secuenció por Tanizawa en 1991. A principios de 1992 Froguel y col. reportaron unión génica de marcadores polimórficos cercanos al gen de la enzima glucocinasa en un grupo de familias francesas con DMNID tipo MODY (Froguel, 1992). Casi al mismo tiempo Hattersley y col. (1992) reportaron resultados similares en un árbol genealógico británico.

Se han identificado al menos 19 mutaciones en el gen de la enzima glucocinasa (Bell G, 1993) (Figura 1): 3 mutaciones sin sentido, 3 mutaciones que alteran el procesamiento a RNAm y 13 mutaciones que cambian un aminoácido por otro (FIGURA 1). Presumiblemente los alelos con mutaciones que alteran el procesamiento y/o causan terminación prematura codifican para proteínas anormales que no presentan actividad enzimática. Las enzimas con mutaciones de un cambio de aminoácido por otro han sido expresadas en un sistema de expresión bacteriano y se han estudiado los efectos de las mutaciones sobre la actividad enzimática. Cuatro de éstas mutaciones disminuyeron la Vmax de la enzima sin afectar significativamente la Km para la glucosa (Thr228→Met, Glu256→Lys, Gly261→Arg, Gly299→Arg, y Leu309→Pro); una incrementa la Km para la glucosa sin afectar significativamente la Vmax de la enzima (Glu300→Gln); y en 5 esta disminuida la Vmax de la enzima y se incrementa la Km para la glucosa (Gli175→Arg, Val182→Met, Val203→Ala, Glu279→y Glu300→Lys) (Gidh-Jain M, 1993).

Algunos estudios en pacientes con DMNID tipo MODY muestran que mutaciones en el gen de la enzima glucocinasa causan anomalías poco severas en el metabolismo de la glucosa (Froguel P, 1993). Aproximadamente 45% de los sujetos que son heterocigotos para las mutaciones tienen diabetes, 22% tienen intolerancia a la glucosa, y 33% tienen niveles de glucosa en ayunas mínimamente elevados (109.8 a 138.6 mg/dl) pero no reúnen los criterios para el diagnóstico de intolerancia a la glucosa. Una estimación verdadera de la penetrancia del fenotipo anormal podría requerir un estudio poblacional correlacionando tolerancia a la glucosa con el genotipo en el locus de la glucocinasa. Sin embargo, en las familias que se han estudiado todos los individuos con mutaciones en el gen de la enzima glucocinasa tienen al menos anomalías mínimas en el nivel de glucosa plasmática (Froguel P, 1993). Estas observaciones son consistentes con la conclusión de que existe una penetrancia alta del fenotipo anormal en población caucásica.

En prensa se encuentra el reporte de 14 mutaciones nuevas en el gen de la enzima glucocinasa asociadas a MODY (Velho G, 1997).

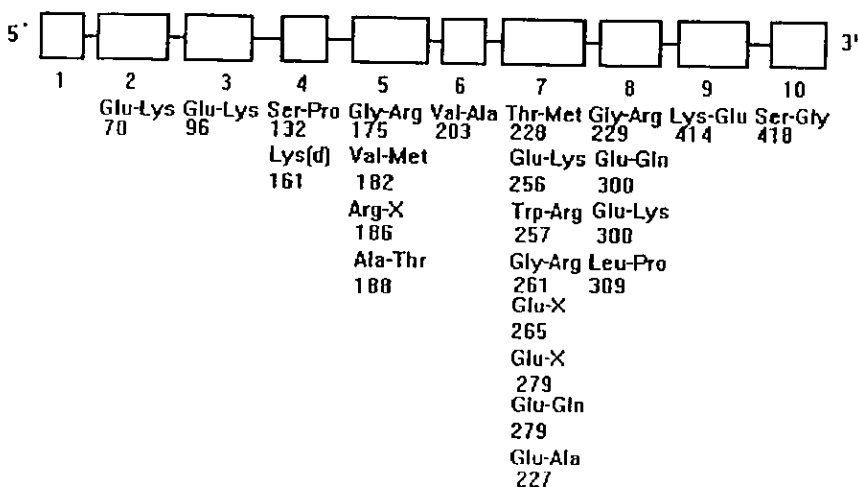


FIGURA 1. Mutaciones reportadas en diferentes exones del gen de la enzima glucocinasa. (Takeda J, 1993)

c) Anormalidades fisiológicas. Las anormalidades fisiológicas en algunos casos parecen ser detectables a una edad temprana, tan temprana como 16 meses de edad (Froguel P, 1993). A éste respecto no existen datos de estudios prospectivos; el promedio de edad de diagnóstico de los individuos afectados menores de 20 años fue de 8 años. A pesar de la edad temprana de la anormalidad en la homeostasis de glucosa (posiblemente tan temprana como la edad de nacimiento), la enfermedad no parece ser progresiva en la mayoría de los pacientes. El nivel promedio de glucosa plasmática en ayunas es de

126 ± 12.6 mg/dl en sujetos con una corta duración de la enfermedad (< 10 años) vs. 133.2 ± 27 mg/dl en sujetos con una larga duración de la enfermedad (> 10 años). Además la prevalencia de las complicaciones crónicas de la diabetes parece ser baja en ésta población (por ejem. retinopatía 3%, a pesar de que casi la mitad de los pacientes han sido hiperglicémicos por lo menos 10 años).

d) Expresión Tisular. La glucocinasa se encuentra presente en los islotes pancreáticos, en las células del parénquima hepático, en las células neuroendocrinas del tracto gastrointestinal y en el hipotálamo (*Matschinsky FM, 1996; Jetton TL, 1994*); se ha reportado la expresión de RNAm de glucocinasa en la pituitaria anterior, aunque el significado biológico de éste hallazgo se desconoce (*Hughes SD, 1991*). La presencia de glucocinasa en las células L enteroendocrinas dispersas a lo largo del epitelio medio y posterior del intestino y en las neuronas del hipotálamo ventromedial sugiere algún papel en la modulación de la conducta de la alimentación, captación y utilización de nutrientes (*Jetton TL, 1994*). La expresión en las células β pancreáticas y neuroendocrinas es dirigida por el promotor distal mientras que el promotor proximal dirige la expresión en las células del parénquima hepático. En ratón el exón 1 del gen de la glucocinasa está separado del exón 1 hepático por 35kb (*Postic, 1995*). La transcripción del gen de la glucocinasa hepática se estimula por la insulina mientras que la actividad de la glucocinasa pancreática se incrementa por la glucosa (*Iynedjian PB, 1989; Liang Y, 1991*).

La mayor parte de la glucocinasa se expresa en dos tipos celulares: hepatocitos y células beta pancreáticas (*Permutt MA, 1992; Matschinsky FM, 1990; Magnuson MA, 1989*) y todas las mutaciones reportadas han sido mapeadas en las porciones del gen de la glucocinasa que pueden disminuir la actividad de la enzima glucocinasa en ambos tejidos celulares. Ninguna de las mutaciones ha sido mapeada en los dominios tejido específicos del gene (exones 1a, 1b ó 1c), ni en las regiones reguladoras (*Bell GI, 1993; Froguel P, Vionnet N, 1992; Stoffel M, 1992; Sakura H, 1992; Katagiri H, 1992*). Entonces se puede predecir que las mutaciones en el gene de la enzima glucocinasa pueden disminuir la velocidad a la cual la glucosa es fosforilada en ambos tejidos. A cualquier concentración de glucosa, la velocidad del metabolismo de la glucosa podría predecirse que estará disminuida. Sin embargo ya que la glucocinasa tiene relativamente una Km alta para la glucosa (≈8 mM), el flujo a través de la enzima es sensible a cambios en el nivel de glucosa en el rango fisiológico (*Matschinsky FM, 1990; Gidh-Jain M, 1993*)

La relación entre la respuesta secretora de la insulina a la glucosa y el flujo de la glucosa a través de la enzima glucocinasa en las células beta pancreáticas in vivo, no depende solamente de la enzima glucocinasa, ya que estudios en donde se analiza esta relación con la enzima glucocinasa mutada demuestran que existe un mecanismo compensatorio y el grado de ésta compensación está directamente relacionado con la severidad de la mutación (*Sturis J, 1994*)

O. DIABETES MELLITUS NO DEPENDIENTE DE INSULINA DE APARICIÓN TEMPRANA (DMNIDJ).

Otro subtipo de DMNID se denomina de "aparición temprana" (early-onset type II diabetes) (Rotter *Jl*, 1992). Se ha reportado en individuos entre 25 y 40 años de edad y parece diferir de la diabetes tipo MODY genéticamente. Se caracteriza por una alta prevalencia de diabetes y de intolerancia a la glucosa en ambos padres (92%) y en hermanos (69%). Esto sugiere que los sujetos pueden heredar el gen o genes de la diabetes de ambos padres, lo que es compatible con una doble dosis génica. Los pacientes con diabetes tipo 2 de aparición temprana comúnmente requieren terapia con insulina después del tratamiento inicial con dieta y/o agentes hipoglucemiantes orales y pueden desarrollar complicaciones microvasculares severas lo que contrasta con los pacientes MODY con mutaciones en el gen de la glucocinasa, los cuales en su mayoría no presentan complicaciones. Existe un considerable solapamiento en la prevalencia de las complicaciones microvasculares y requerimiento de insulina entre éste síndrome y MODY.

La presencia de diabetes conyugal en pedigreos de 3 o 4 generaciones no excluye necesariamente el diagnóstico de MODY en favor de diabetes tipo 2 de aparición temprana. La prevalencia de intolerancia a la glucosa en los padres y hermanos de los diabéticos tipo 2 de aparición temprana es mayor del 50% esperado en la herencia de tipo autosómico dominante. El componente heredado en la diabetes tipo 2 puede ser la alteración de la respuesta secretora de insulina en las células β pancreáticas, el cual se exacerba con la edad y el incremento en las demandas en las células β , lo que ocurre cuando disminuye la sensibilidad a la insulina con el incremento de peso (la obesidad) y la inactividad. Los parientes intolerantes de los pacientes con diabetes tipo 2 de aparición temprana o tardía tienen reducciones similares en la secreción de insulina, lo que sugiere que quizás ambos tipos de diabetes podrían tener el mismo defecto hereditario en la secreción de las células β . La edad diferente de aparición puede ser parcialmente debida a la carga genética. Esta forma de diabetes parece ser poligénica y sujeta a la modificación de su expresión por diversos factores ambientales.

En México, debido a la alta prevalencia de diabetes (\cong 8%) es muy común encontrar familias donde existe diabetes en ambas ramas, y en donde la diabetes mellitus no dependiente de insulina de aparición temprana podría atribuirse al fenómeno de doble carga genética.

OBJETIVOS

A. Principal.

De las familias con diabetes mellitus no dependientes de insulina de aparición temprana incluyendo tipo MODY captadas en el laboratorio durante 2 años, determinar cuales tienen mutaciones en el gen de la enzima glucocinasa, así como el tipo de mutaciones presentes.

B. Secundarios.

a) Establecimiento de un repositorio de líneas linfocíticas inmortalizadas para el mapeo y caracterización de genes involucrados en el desarrollo de la DMNID.

b) A través de definir si el gen de la glucocinasa está involucrado en la diabetes no dependiente de insulina (DMNID) de aparición temprana y en la tipo MODY, determinar si marcadores asociados a este gen pudieran ser utilizados para el diagnóstico presintomático.

c) Establecimiento de una base de datos con las características clínicas y genealógicas de las familias para estudios genéticos y moleculares.

d) Definir en cuales familias es pertinente el estudio de otros genes, ya sea asociados a MODY o a la DMNID de aparición temprana y en cuales familias pudiera mapearse genes nuevos.

METODOLOGÍA

En el estudio participaron las siguientes instituciones:
Instituto Nacional de Pediatría, SSA,
Centro Médico Nacional, "La RAZA", IMSS,
Instituto Nacional de Pediatría "Salvador Zubirán", SSA,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A. SUJETOS ESTUDIADOS.

Se incluyeron en el estudio familias con diagnóstico de diabetes no dependiente de insulina de aparición temprana, posibles MODY. Los pacientes fueron captados en dos centros hospitalarios durante dos años: Instituto Nacional de Pediatría y el Centro Médico "LA RAZA". La obtención de las muestras de sangre se hizo con el consentimiento de los participantes a través de los médicos tratantes en cada institución;

Recolección de familias. Se colectó información genealógica así como datos clínicos de 24 familias con diabetes mellitus no dependiente de insulina de aparición temprana incluyendo tipo MODY

Curvas de Tolerancia a la Glucosa. Para establecer el patrón de herencia mendeliano típico de las familias MODY (un padre afectado y aproximadamente 50% de hermanos afectados y de tíos de la rama afectada. se procedió a hacerles una curva de tolerancia a la glucosa a los padres clínicamente no afectados y a los familiares que estuvieron dispuestos a que se les hiciera el estudio (Centro Médico "La Raza", IMSS; Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán")

Diagnóstico de la diabetes tipo MODY:

- 1) DMNID con herencia autosómico dominante en al menos dos generaciones consecutivas: un progenitor afectado y 50% de los hermanos y tíos afectados (rama afectada),
- 2) edad de diagnóstico igual o menor de 35 años
- 3) al menos otro miembro afectado menor de 35 años.

Determinación de anticuerpos. A todos los pacientes se les hizo la determinación de anticuerpos anti-islole pancreático (ICAs), y en algunos pacientes se determinó anticuerpos anti-GADs para investigar componente autoinmune.

Determinaciones Bioquímicas. En los pacientes en quienes se obtuvieron muestras, se determinó insulina y péptido C para evaluar la reserva pancreática.

Análisis de Mutaciones. Se analizaron mutaciones en el gen de la enzima glucocinasa a través de la técnica de PCR-SSCP ó secuenciación directa en al menos un miembro afectado de cada familia.

Controles.

Para la estandarización de la técnica de PCR-SSCP, se utilizó ADN de un paciente con una mutación heterocigota conocida, prolina→leucina en el exón 1 del gene de la enzima 21 hidroxilasa.

Para el análisis de PCR-SSCP se incluyeron 11 controles normales. Estos controles son personas mayores de 60 años no diabéticas que pertenecen a las ramas no afectadas de las familias MODY.

TRANSFORMACIÓN DE LINFOCITOS.

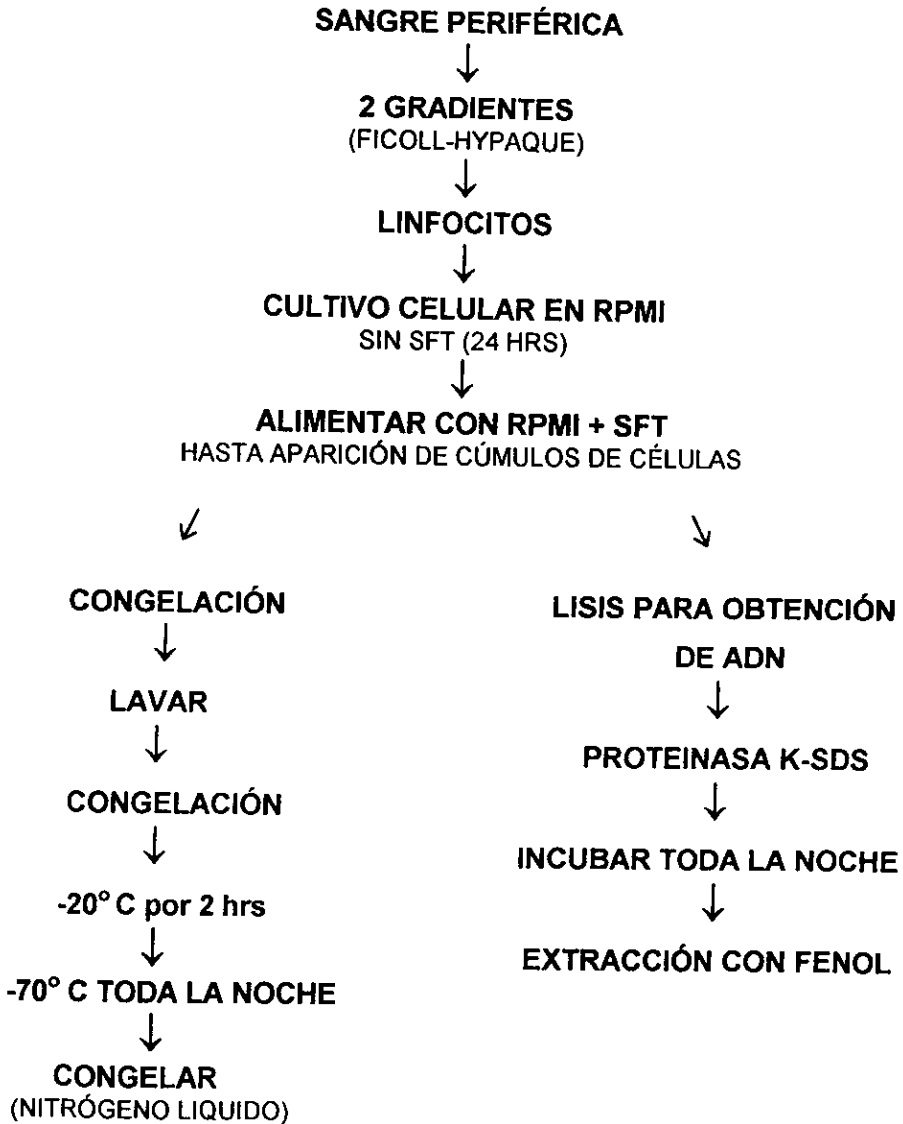


FIGURA 2A. Se muestra el diagrama de flujo de la transformación de linfocitos a partir de sangre periférica.

OBTENCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE TOTAL

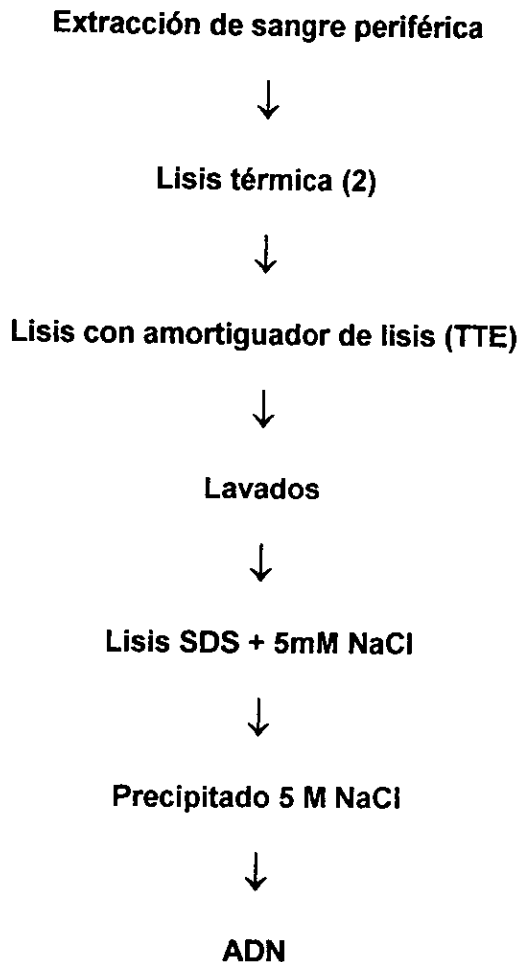


FIGURA 2B. Se muestra el diagrama de flujo de la obtención de ADN a partir de sangre total.

EXTRACCIÓN FENOLICA

LISIS DE CÉLULAS EN CULTIVO CON PROTEINASA K



FENOL EQUILIBRADO 1:1



CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMÍLICO



PRECIPITAR (Ac Na + Et-OH)



ADN



ANÁLISIS MOLECULARES



GUARDAR 4 °C

FIGURA 2C. Diagrama de flujo de la extracción con fenol.

TÉCNICA DE PCR-SSCP

ADN



AÑADIR:

buffer 10X

+

NTPs (G,A,T,C)

+

dilución de oligonucleotido sentido

+

dilución de oligonucleotido antisentido

+

albúmina



MEZCLAR



ENZIMA TAQ POLIMERASA



35 CICLOS DE AMPLIFICACIÓN
Específicos para cada exón (T_m)

FIGURA 2D. Diagrama de flujo de la técnica de PCR-SSCP.

SECUENCIACIÓN

DILUCIÓN DE ADN



oligonucleotido, dmsso



AGITAR



INCUBAR 95 °C



CONGELAR



DESCONGELAR



**amortiguador de secuensasasa +
DTT + mezcla de reacción diluida +
marca + enzima secuensasasa**



**INCUBAR A TEMPERATURA AMBIENTE
(MEZCLA DE REACCIÓN)**

CONTINUACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN

**INCUBACIÓN DE NUCLEOTIDOS
(POR SEPARADO)
(G,A,T,C)**



**AÑADIR MEZCLA DE REACCIÓN
(A CADA NUCLEOTIDO)**



**INCUBAR
3 min 48 °C**



**SOLUCIÓN DE PARO DE REACCIÓN
(a cada nucleotido)**



**CORRER EN GEL DE ACRILAMIDA
(desnaturalizar antes de correr a 95 °C)**



EXPONER Y REVELAR

FIGURA 2E. Diagrama de flujo de la técnica de Secuenciación.

C. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-ISLOTE (ICAs).

A todos los pacientes se les determinaron los anticuerpos anti-ICAs, mediante la técnica de ELISA (Estas determinaciones se llevaron a cabo por personal del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán").

El suero sin diluir se analiza para ICA-IgG convencional a través de inmunofluorescencia indirecta sobre secciones de 4 μm de páncreas humano, como se ha descrito previamente (*Bottazo et al, 1974*). El título de ICA en todos los sueros se mide a través de diluciones seriadas en buffer de fosfato salino. El mismo espécimen pancreático se utiliza para analizar todos los sueros del estudio. Cada ensayo incluye calibradores negativos, positivos y diluciones séricas ciegas del mismo suero control positivo y negativo. Se leen las secciones por dos miembros del laboratorio. En el caso de discrepancia en los lectores se hace una tercera lectura por un tercer miembro del laboratorio.

D. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GAD.

A todos los pacientes se les determinaron los anticuerpos anti-ICAs, mediante la técnica de ELISA (Estas determinaciones se llevaron a cabo por personal del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán").

Ácido glutámico-descarboxilasa marcada con biotina se fija a los pocillos de la placa de microdilución recubiertos de estreptavidina. Los anticuerpos de la muestra (suero o plasma) se fijan a la GAD. Se añaden anticuerpos anti-h-IgG marcados con peroxidasa (POD) que se fijan a los anticuerpos anti-GAD. Se añade una solución de sustrato (peróxido) y cromógeno (ABTS) que se oxida dependiente de la actividad POD del inmunocomplejo ABTS a un colorante cuya adsorción se mide con un lector de placas de microtitulación (ELISA Reader) a 405 nm y, si es posible, a la longitud de referencia de 492 nm (*Björk E, 1994*)

E. CURVAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

Algunos de los padres y familiares de los pacientes que clínicamente eran asintomáticos, se les hizo una curva de tolerancia a la glucosa, la cual se realizó en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"; se le dió al paciente o familiar en ayunas una carga de glucosa oral de 75 gr. Se tomó una muestra de sangre venosa en ayunas y cada 30 minutos se tomó una muestra (5 tomas en total), y se determinó la concentración de glucosa.

Por otro lado a algunos miembros de las familias estudiadas se les hizo curva de tolerancia a la glucosa en su domicilio, en estos casos las curvas sólo se hicieron con 2 tomas de sangre venosa, la primera en ayunas, y la segunda a las dos horas, y se determinó concentración de glucosa.

RESULTADOS

A. RECOLECCIÓN DE FAMILIAS.

Se colectó información genealógica así como datos clínicos de 24 familias con diabetes mellitus no dependiente de insulina de aparición temprana, probables MODY, lo que comprendió cerca de 1205 miembros. Se ha establecido hasta el momento un repositorio permanente de linfocitos inmortalizados de aproximadamente 150 líneas y se han extraído 230 muestras ADN.

B. SUJETOS Y FAMILIAS DE ESTUDIO.

El diagnóstico inicial de las familias estudiadas era de DMNID de aparición temprana, probables MODY. Sin embargo estas familias se incluyeron en 4 grupos distintos, después de analizar el tipo de herencia, presencia de DMNID y de anticuerpos (**FIGURA 2, TABLA 1, 2**):

- 1) familias con DMNID con un claro patrón de herencia mendeliana autosómico dominante (familias 1, 2, 3 y 4), MODY clásicas;
- 2) familias con DMNID de aparición temprana con posible herencia autosómico dominante y penetrancia incompleta (familias 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 5, 6, 7),
- 3) familias con DMNID de aparición temprana, en donde existen familiares con DMNID de edad adulta, tanto en la rama paterna como en la materna (familias 8, 9, 14, 15, 18, 19, 20, 22) y,
- 4) familias en donde el propósito presenta anticuerpos anti-islote pancreático (ICAs) y anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico (GADs), lo que indica que presentan DMID (familias 23, 24).

Las familias 1 y 2 tienen cerca del 50% de los miembros afectados al menos en dos generaciones lo que apoya el patrón de herencia autosómico dominante. En la familia 1 el padre del probando tiene DMNID de edad adulta, sin embargo la rama materna presenta DMNID tipo MODY. El patrón de transmisión en este pedigrée es también compatible con herencia materna (**FIGURA 2**).

De las familias diagnosticadas con DMNID de aparición temprana con posible herencia autosómico, 3 podrían ser clasificadas como MODY si el patrón de herencia autosómico dominante se confirma con la presencia de aproximadamente 50% de los miembros afectados a través de realizar curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) (pedigrées No. 5, 6, 7) (**FIGURA 2**). En las 15 familias restantes (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) no existe herencia autosómica dominante clara. En 8 de estas familias, ambos padres del propósito son diabéticos y la mayoría de los probandos tienen sobrepeso o son obesos (8, 9, 14, 15, 18, 19, 20, 22) (**TABLA 2**).

Los 2 probandos que se diagnosticaron con DMID (23, 24), requirieron rápidamente insulina después del diagnóstico y además tienen anticuerpos anti-islole pancreático (ICAs) positivos.

C. CURVAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

Se realizaron 94 curvas de tolerancia a la glucosa a padres y parientes, de las cuales 20 resultaron alteradas de acuerdo con el criterio de la ADA (1997), 11 de las personas analizadas se diagnosticaron como diabéticas y 9 como individuos intolerantes. Los individuos diagnosticados como afectados se canalizaron con los médicos endocrinólogos de cada institución para tratamiento.

En las familias 1, 3 y 4 la mayoría de los miembros de las generaciones más jóvenes no han sido estudiados por curva de tolerancia a la glucosa (CTG). Todos ellos son menores de 30 años y actualmente asintomáticos. (TABLA 1)

D. DETERMINACIONES DE INSULINA Y PÉPTIDO C.

Se hicieron determinaciones de insulina y péptido C en 15 de los 24 pacientes estudiados de acuerdo como se describe en material y métodos. Los valores obtenidos se muestran en la TABLA 3.

Los pacientes 1, 6, 13, 14, 15, 16, 20, 21 presentaron cierto grado de resistencia a la insulina lo cual está de acuerdo con el diagnóstico de diabetes no dependiente de insulina (DMNID), quienes en algún momento bioquímico de la enfermedad presentan esta característica. En el caso de la paciente No 8, no se hizo determinación de insulina porque requería insulina exógena lo que estaba de acuerdo con la poca reserva pancreática de la paciente (0.05 μ U, V.N.: 0.4 a 0.6 μ U); en los pacientes 7, 10, 11, 23, 24, los valores de insulina (> 25 μ U) y péptido C son normales (V.N: 0.4 a 0.6 μ U), lo que indica que tienen reserva pancreática, además no presentan hiperinsulinemia, lo que va de acuerdo con un tipo de diabetes no agresivo. El paciente 3 tiene insulina normal, y ICAs negativos; este paciente se clasificó como MODY clásico (herencia autosómico dominante).

TABLA 1
CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES
DIABETES TIPO MODY

PACIENTE	EDAD DX	TX INSULINA	OTROS T.	IMC	GLICEMIA EN AYUNAS AL DIAGNOSTICO (mg/dl)	GLICEMIA EN AYUNAS DURANTE TRATAMIENTO (mg/dl)	COMPLICACIONES	ICAs	CETOACIDOSIS
1.- CCE	13	-	dieta	22.6	250	180	-	-	-
2.- COM	13	-	dieta+ejercicio	18.3	364	85	-	-	-
3.- CTA	17	-	dieta	37.2	280	70	-	-	-
4.- MAG	14	-	ejercicio	17.2	210	120	-	+	-

TABLA 2
CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES
DMNID DE APARICION TEMPRANA

PACIENTE	EDAD DX	TX INSULINA	OTROS TX	IMC	GLICEMIA EN AYUNAS AL DIAGNOSTICO (mg/dl)	GLICEMIA EN AYUNAS DURANTE TRATAMIENTO (mg/dl)	COMPLICACIONES	ICAs	CETO-ACIDOSIS
5.- MSG	12	-	dieta	36.3	225	95	-	-	-
6.- SRM	15	+	-	18.4	400	120	-	-	-
7.- BCJ	13	+	dieta	18.5	360	80	-	-	+
8.- CVJ	11	+	-	28	250	90	-	-	+
9.- HJL	11	-	dieta	38.4	280	95	-	-	-
10.-CJC	12	+	hipoglucemiantes	23.8	500	90	cataratas	-	-
11.-MHH	13	-	dieta	25.9	342	95	-	-	-
12.-MBI	16	-	dieta+ejercicio	21.3	380	80	-	-	-
13.-QGR	10	+	-	25.6	444	180	-	-	+
14.-RGG	13	+	dieta	30.4	350	250	-	-	-
15.-AGF	09	+	-	19.5	398	62	-	-	-
16.-MCB	12	-	dieta	27.3	400	85	-	-	-
17.-SHG	15	-	hipoglucemiantes	28.2	300	145	-	-	-
18.-RZA	13	+	dieta	27.7	180	80	-	-	-
19.-SEJ	13	+	-	27.2	220	93	-	-	-
20.-SCW	14	+	-	26.1	750	80	-	-	-
21.-OJA	13	+	-	24.5	280	80	-	-	+
22.-STC	12	+	-	18.6	400	250	-	-	-

TABLA 3
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS
DE ALGUNOS PACIENTES

PACIENTE	INSULINA $\mu\text{U/ml}$		PEPTIDO C μU	AC.GAD	AC. ICAs
	endógena	exógena			
1.-CCE	18.9		1.2		-
2.-COM					-
3.-CTA	17.6	-			-
4.-MAG					+
5.-MSG					-
6.-SRM	29.4		0.66	-	-
7.-BCJ	19.7	+	0.51	-	-
8.-CVJ	-	+	0.05	+	-
9.-HJL					-
10.-CJC	12.2	+	0.42		-
11.-MHH	16.2		0.48	-	-
12.-MBI					-
13.-QGR	34.8	-	0.91	-	-
14.-RGG	37.3	+	0.94	-	-
15.-AGF	30.40	+	0.83		-
16.-MCB	29.2	-	0.65	-	-
17.-SHG					-
18.-RZA					-
19.-SEJ					-
20.-SCW	7.9		0.7	-	-
21.-OJA	32.2	+	0.85	-	-
22.-STC					-
23.-HAD	11.1		0.31	+	+
24.-RVJ	27.1	+	0.57	+	+

Valores Normales: Insulina en ayunas: $25 \mu\text{U}$; Péptido C: de 0.4 a $0.6 \mu\text{U}$;
 Ac-GAD, Ac-ICAs: Negativos

E. ANTICUERPOS ANTI-ISLOTE PANCREÁTICO (ICAs).

Se determinaron títulos de anticuerpos anti-islole pancreático a todos los pacientes y 3 fueron positivos (No. 4, 23, 24). Uno de los pacientes con ICAs positivos pertenece a una familia con patrón de herencia autosómico dominante (FIGURA 2, No. 4), los otros dos pacientes ICAs+ fueron diagnosticados como dependientes de insulina (No. 23, 24)

F. ANTICUERPOS ANTI-DECARBOXILASA DEL ÁCIDO GLUTÁMICO (GAD).

Se determinaron títulos de anticuerpos anti-GAD en 11 pacientes, 3 fueron positivos (8, 23, 24) (TABLA 3).

La paciente No. 8 aparentemente presenta herencia autosómico dominante, su madre y su abuela materna tienen diagnóstico de DMNID de edad temprana (FIGURA 2, No. 8), falta hacer curvas de tolerancia a la glucosa en algunos familiares para establecer si existe aproximadamente 50% de miembros afectados en la rama "MODY".

Los pacientes No. 23 y 24 también presentan los anticuerpos anti-islole pancreático positivos (ICAs), y presentaron características clínicas compatibles con DMNID, por lo cual se diagnosticaron con DMID.

G. ARBOLES GENEALÓGICOS.

Se hicieron 24 árboles genealógicos mediante el interrogatorio a los familiares del propósito, y se muestran en la FIGURA 3. En los árboles genealógicos se presentan los siguientes símbolos:

Individuo normal (sin manifestaciones clínicas de diabetes, sin curvas de tolerancia a la glucosa): □

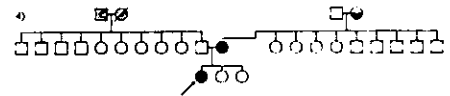
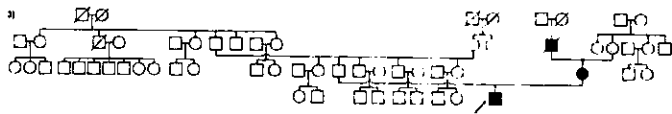
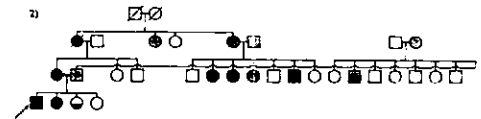
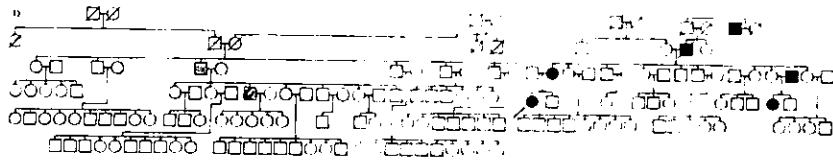
Individuo normal (con curvas de tolerancia a la glucosa): ▤

Individuo anormal: ■

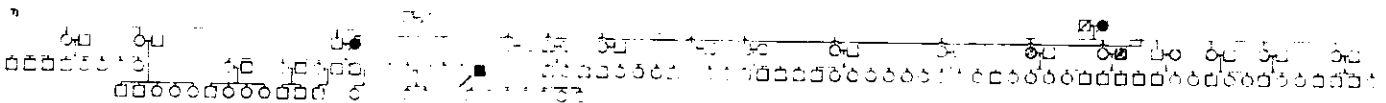
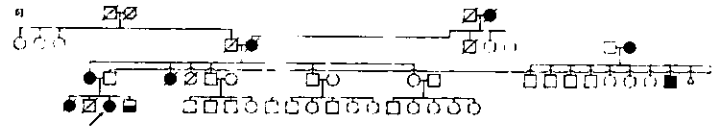
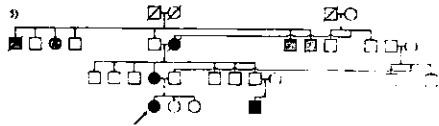
Individuo con DMNID de aparición tardía: ▨

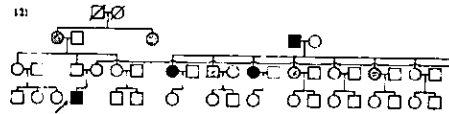
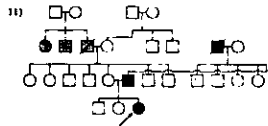
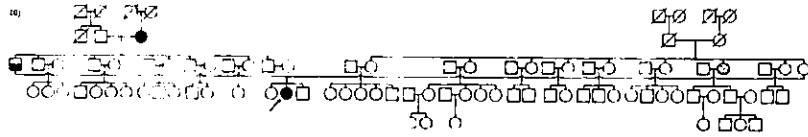
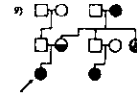
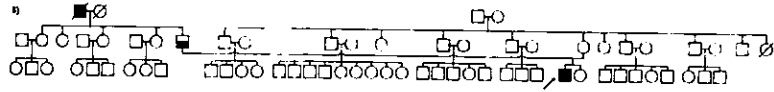
Individuo con DMNID de aparición temprana: ■
(incluye tipo MODY):

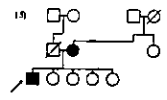
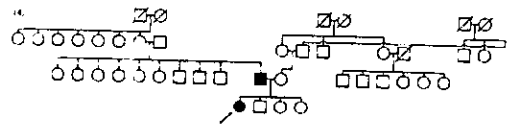
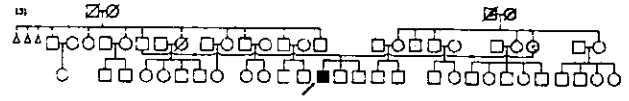
FIGURA 3. ARBOLES GENEALOGICOS

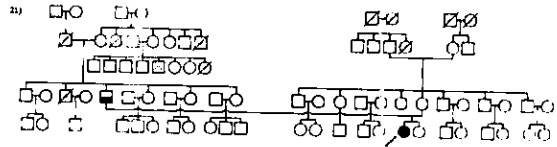
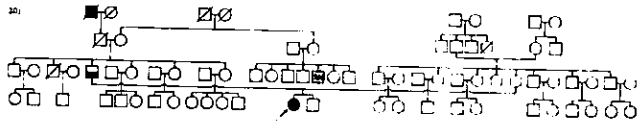
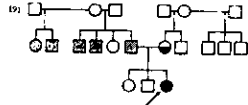
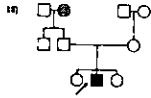
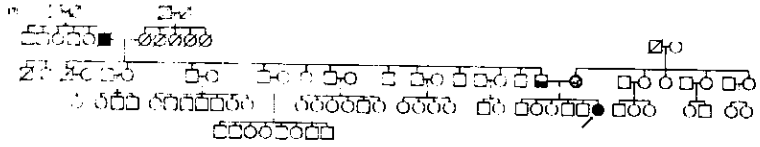
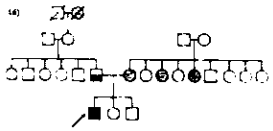


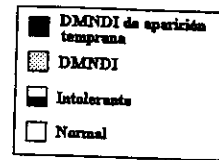
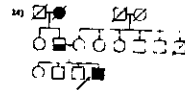
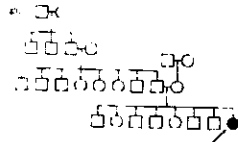
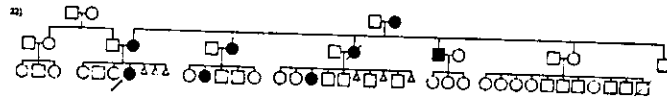
4











H. FAMILIAS CLASIFICADAS COMO MODY.

Al menos 4 de los 22 familias con DMNID de aparición temprana pueden clasificarse como MODY (Fajans., 1990) (1, 2, 3 y 4)(FIGURA 3), porque presentan los cuatro criterios necesarios para este diagnóstico.

En las familias 1, 3 y 4 la mayoría de los miembros de las generaciones más jóvenes no han sido estudiados por curva de tolerancia a la glucosa (CTG). Todos ellos son menores de 30 años y actualmente asintomáticos.

I. HERENCIA MATERNA.

De las 24 familias afectadas en 10 casos la madre es diabética (41.6%), en 7 casos el padre del probando es diabético o intolerante (29.1%), en 4 casos ambos padres están alterados (16.66%) y en tres casos aparentemente ninguno de los padres diabéticos es mayor, lo que va de acuerdo con lo reportado, aunque la frecuencia es mucho más alta en poblaciones caucásicas (18.2% en madres y 9.1% en padres)(Dormer GA, 1975,1976).

Entre las familias con madres diabéticas existen 4 en donde hay 3 generaciones de madres diabéticas, y el padecimiento no parece transmitirse vía paterna, lo que sugiere herencia mitocondrial (familias 1, 4, 5, 9) (FIGURA 3).

J. PERFIL CLÍNICO Y BIOQUÍMICO DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

El perfil clínico y fenotípico de los pacientes se muestra en la TABLA 1, en donde se presenta: edades de los pacientes, tratamiento/s, índice de masa corporal (IMC), glicemias al diagnóstico y durante el tratamiento, complicaciones, anticuerpos anti-islole, presencia o no de cetoacidosis. Los árboles genealógicos correspondientes a las familias estudiadas se muestra en la FIGURA 3 (24 árboles genealógicos).

Edad de diagnóstico.

El promedio de la edad de diagnóstico de todos nuestros pacientes es de 12.8 años. La edad promedio de diagnóstico del grupo de pacientes MODY (1, 2, 3, 4) es de 14.6 +/- 2.1 años, (TABLA 4). La edad promedio de diagnóstico de los pacientes mexicanos con DMNID de aparición temprana es de 12.7 +/- 1.6.

Hiperglicemias.

El valor promedio de las hiperglicemias al diagnóstico en el grupo de pacientes es de 344 mg/dl y durante el tratamiento es de 113 mg/dl; en el grupo de pacientes

MODY (1, 2, 3, 4) las hiperglicemias en ayunas tienen un promedio de 113.75 +/- 48.88 mg/dl, (TABLA 4).

En TABLA 4 se muestran los valores de edad de diagnóstico y de hiperglicemias de los pacientes MODY y de los diabéticos no dependientes de insulina de aparición temprana así como de los pacientes.

TABLA 4
Edades de diagnóstico e hiperglicemias
de pacientes con DMNID de aparición temprana y MODY

Característica	MODY mexicanos	DMNID aparición temprana
edad de diagnóstico (años)	14.6 ± 2.1	12.7 ± 1.65
hiperglicemia (mg/dl)	142.2 ± 55.8	113 ± 53.93

Presencia de obesidad

Más del 50% de los pacientes presentan obesidad o sobrepeso y del grupo de pacientes MODY solamente uno de ellos (No. 3) presenta obesidad. Once de los 18 pacientes no dependientes de insulina de aparición temprana son obesos o presentan sobrepeso (5, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20)(TABLA 2)

Tratamiento.

Tres pacientes MODY No. 1, 2, 3 no requieren insulina, tienen como tratamiento dieta y/o ejercicio; solamente la paciente No. 4 requiere insulina. De los 18 pacientes con DMNID de aparición temprana, 12 (66%) requieren o han requerido de insulina en algún momento de su enfermedad (6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22) y además el paciente No. 10 ha sido tratado con agentes hipoglucemiantes orales; el paciente No. 17 se trata con agentes hipoglucemiantes orales; los 5 pacientes no dependientes de insulina restantes (5, 9, 11, 12, 16) son tratados con dieta y/o ejercicio; los pacientes 23, 24 se diagnosticaron como dependientes de insulina (anticuerpos anti-islole y anti GAD positivos), en estos pacientes la función de los islotes se encuentra severamente dañada lo que hace que los niveles de insulina endógena estén reducidos o ausentes (TABLA 1, 2).

En la mayoría de los pacientes en quienes se ha requerido tratamiento eventual con insulina, se ha debido a que ellos no siguen adecuadamente la dieta prescrita, lo que hace difícil la interpretación del perfil bioquímico.

Diabetes tipo MODY con autoinmunidad asociada.

Sólo una paciente con diagnóstico de DMNID presenta autoinmunidad asociada (No. 8) (Tabla 2); tiene cerca de 9 años de evolución y por aproximadamente 4 años

ha requerido insulina; tiene disminuída la reserva pancreática (0.05 μ U de péptido C), lo que puede atribuirse al tiempo de evolución tan prolongado, además la paciente presentó anticuerpos anti-GAD positivos, habría que analizar cuidadosamente a la familia completa con curvas de tolerancia a la glucosa para confirmar el tipo de herencia autosómico dominante y además las características clínicas de los familiares afectados, para asegurarse que se trata de una paciente "tipo MODY" y no de una paciente con diabetes no dependiente de insulina de aparición temprana asociada a un componente autoinmune.

El perfil clínico de la paciente 4 (TABLA 1) es muy interesante, es un "MODY clásico" y presenta anticuerpos anti-islole (ICAs) positivos, además no requiere insulina desde el diagnóstico hace tres años, sin embargo habría observar como evoluciona con el transcurso del tiempo.

El fenotipo de las pacientes No. 4 podría ser una variante de los pacientes MODY clásicos descritos por Fajans (*Fajans, 1990*), miembros del pedigree caucásico RW, quienes no desarrollaron autoinmunidad, la cual fue medida por la presencia de ICAs

K. BÚSQUEDA DE MUTACIONES. ANÁLISIS DE PCR-SSCP.

Controles Positivos. Dado que no se contaba con controles positivos (muestras de ADN de pacientes con mutaciones en el gen de la glucocinasa para el análisis de PCR-SSCP, la sensibilidad de la técnica se probó utilizando ADN de un paciente portador de deficiencia de 21-hidroxilasa con una mutación heterocigota conocida en el exón 1 donde hay un cambio de una prolina \rightarrow leucina; en la FIGURA 4 podemos observar un experimento de PCR-SSCP en donde se observa la diferencia en migración del alelo mutado.

Por otra parte, el exón 7 es el exón con mayor incidencia de mutaciones (~50%) en el gen de la enzima glucocinasa en la población MODY francesa (*Froguel P, 1993*); se secuenció directamente éste exón en todos los pacientes y además se hizo técnica de PCR-SSCP para el mismo exón, y por medio de las dos técnicas no se encontraron mutaciones.

Al analizar la región 3' del gen de la glucocinasa en los pacientes, se encontró un cambio de migración. Se secuenció ésta región, y se identificó un cambio puntual de una G por A en el nucleótido 361 3' del codon de paro. Para diferenciar si se trataba de un polimorfismo o de una mutación asociada a la enfermedad. Se procedió a analizar con la técnica de PCR-SSCP a 11 personas "sanas" mayores de 60 años pertenecientes a la rama no afectada de las familias MODY para la presencia de ese cambio y encontramos el cambio en migración en 4 de 11 muestras, con lo cual se demostró que se trataba de un polimorfismo; además de ésta manera confirmamos que mediante el análisis de PCR-SSCP podíamos detectar cambios de secuencia (mutaciones y polimorfismos).

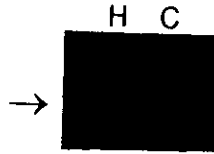


Figura 4. Detección de una mutación heterocigota conocida en el gen de la enzima 21 hidroxilasa por medio de la técnica de PCR-SSCP. ←:cambio en migración. H: paciente con mutación heterocigota, C: control normal. En el carril No. 1 se observa la muestra de un paciente heterocigoto y en el carril No. 2 se observa un control normal. El fragmento analizado es de 120 pb.

Todos los análisis de PCR-SSCP del gen de la glucocinasa se hicieron en dos condiciones, una con glicerol al 10% (A) y otra sin glicerol (B), ambas a temperatura ambiente.

De la **Figura 5** a la **13** se muestran los PCR-SSCP de los exones 1a, 1b, 1c, 2, 3, 4, 5, 6, 7 en 24 pacientes. En ningún caso se observó cambio en la migración de los pacientes comparandolos con la de los controles normales (N), C es el control sin desnaturalizar.

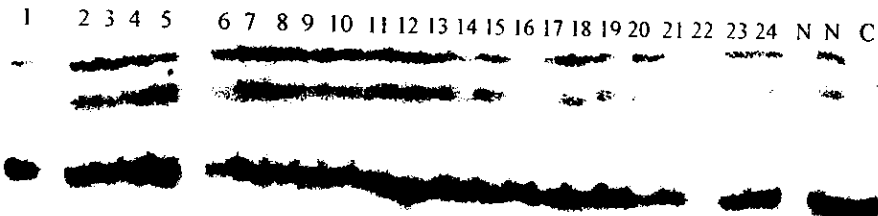
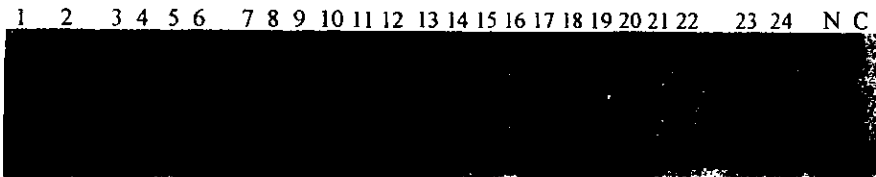


Figura 5.(A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 1a.



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 1a.

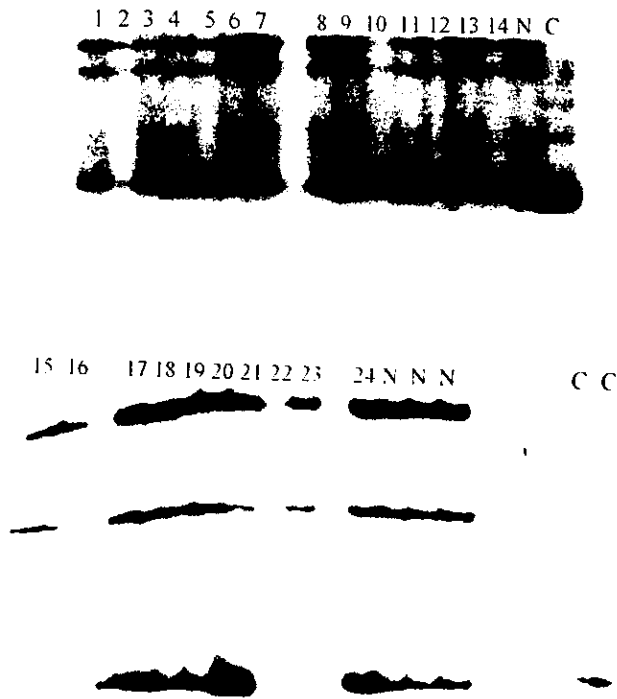
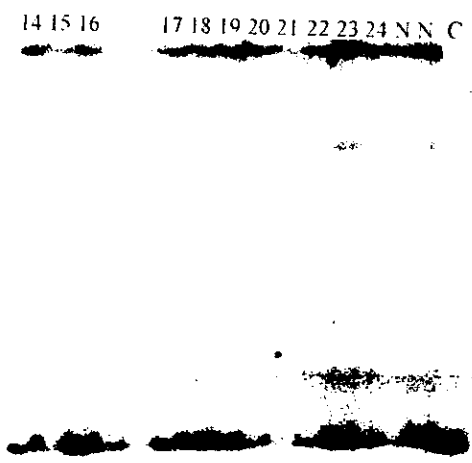
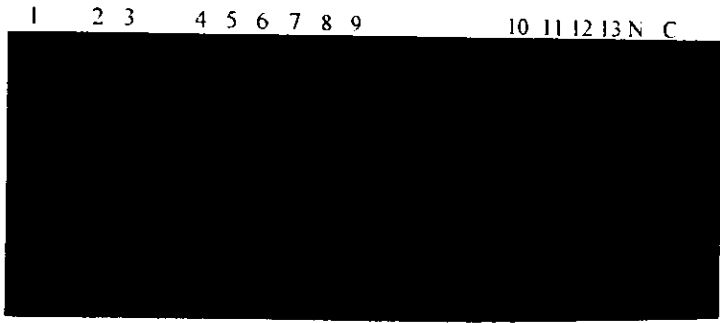


Figura 6. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 1b



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 1b.

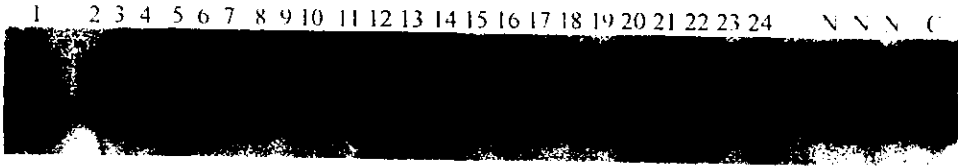
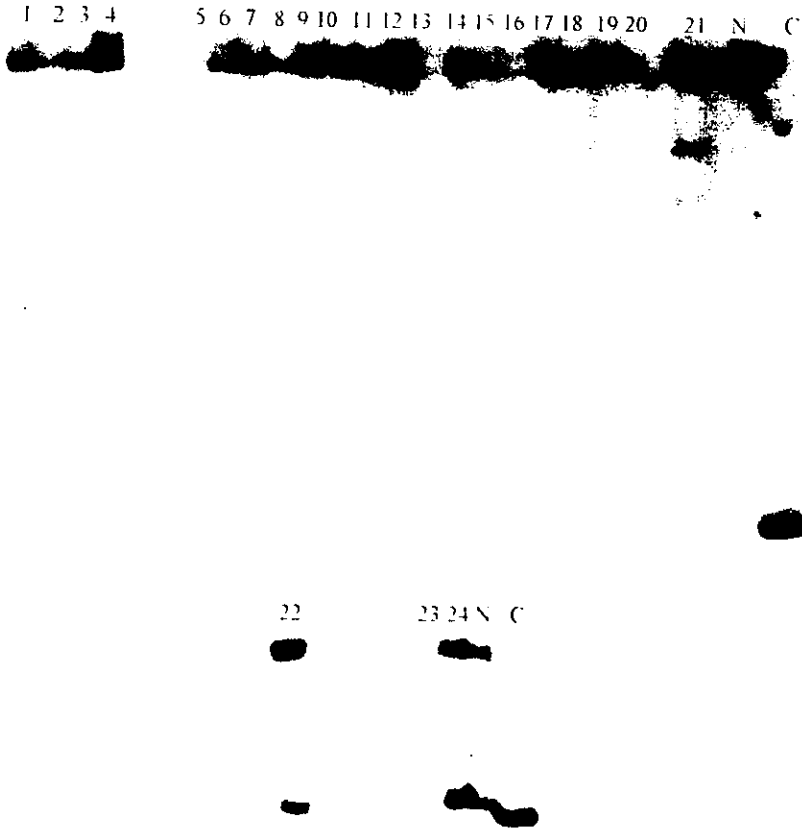


Figura 7. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 1c



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 1c

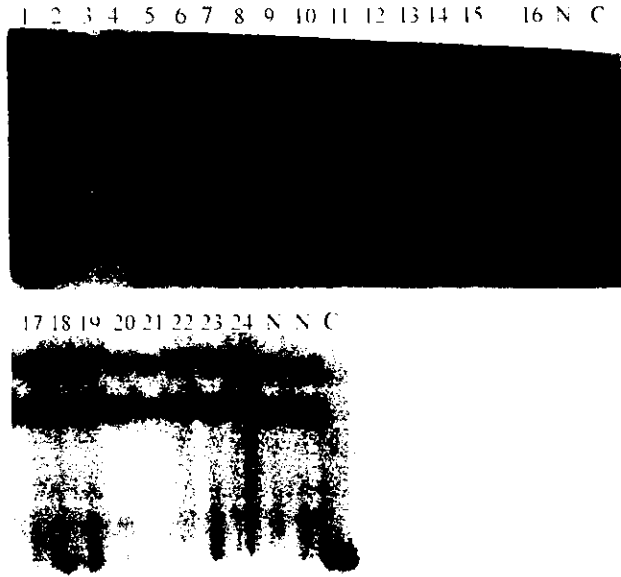


Figura 8 (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 2



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 2

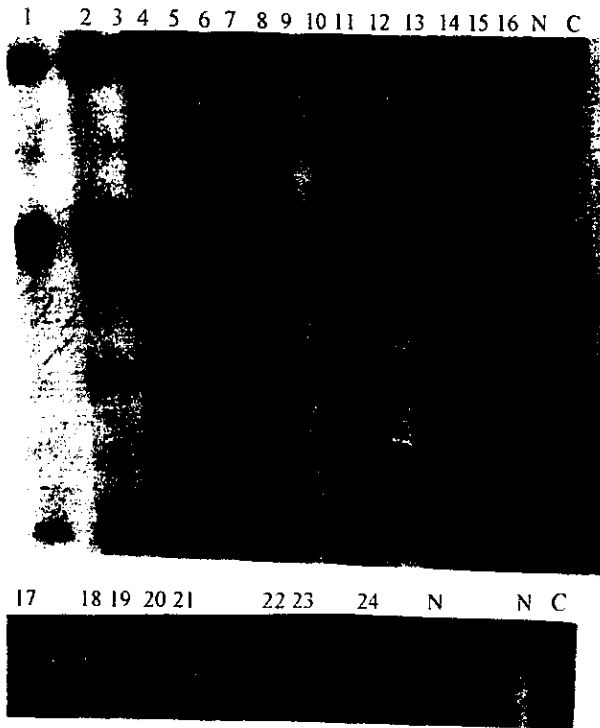


Figura 9. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 3.

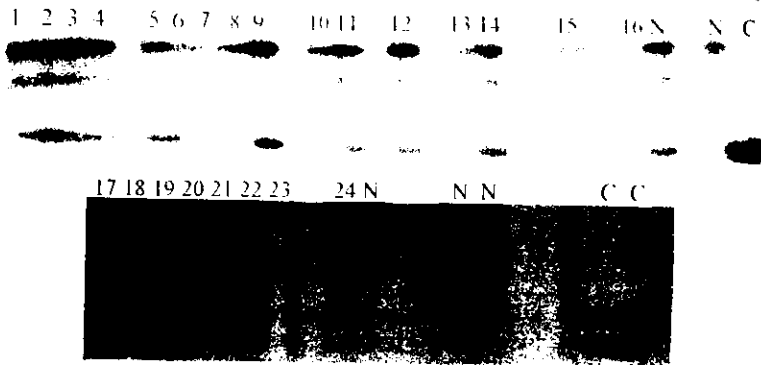
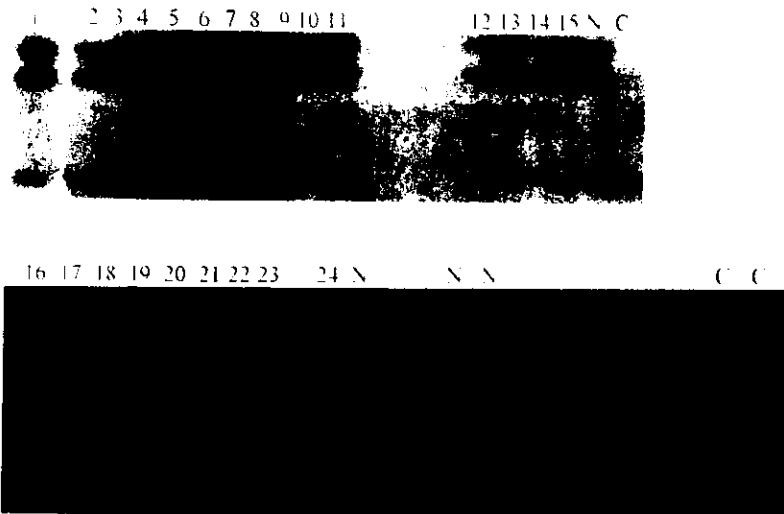


Figura 11 (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 5



(B) PCR-SSCP del EXÓN 5 sin glicerol

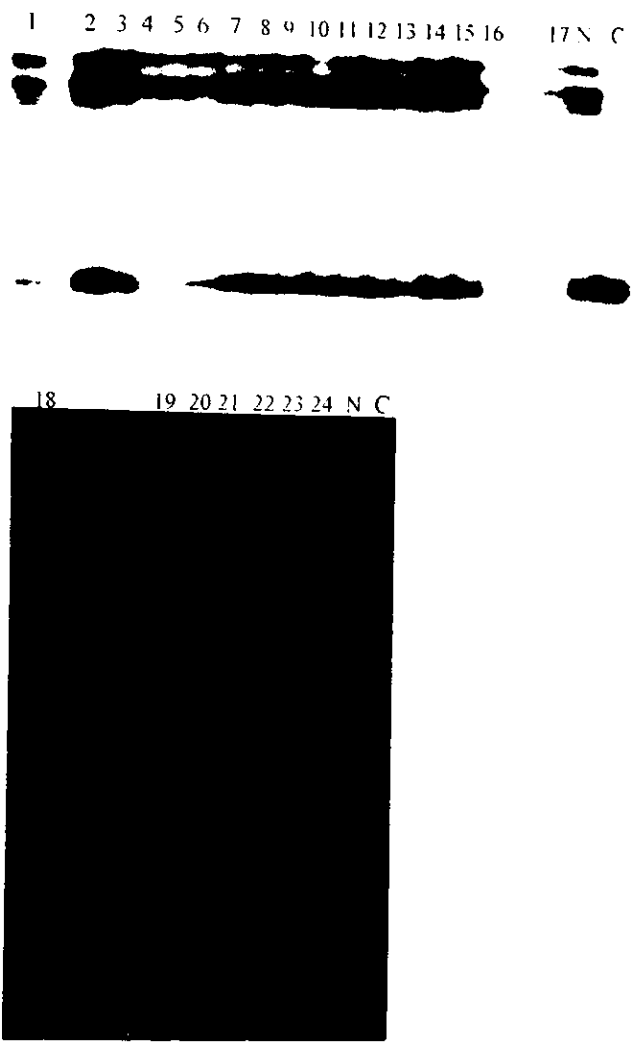
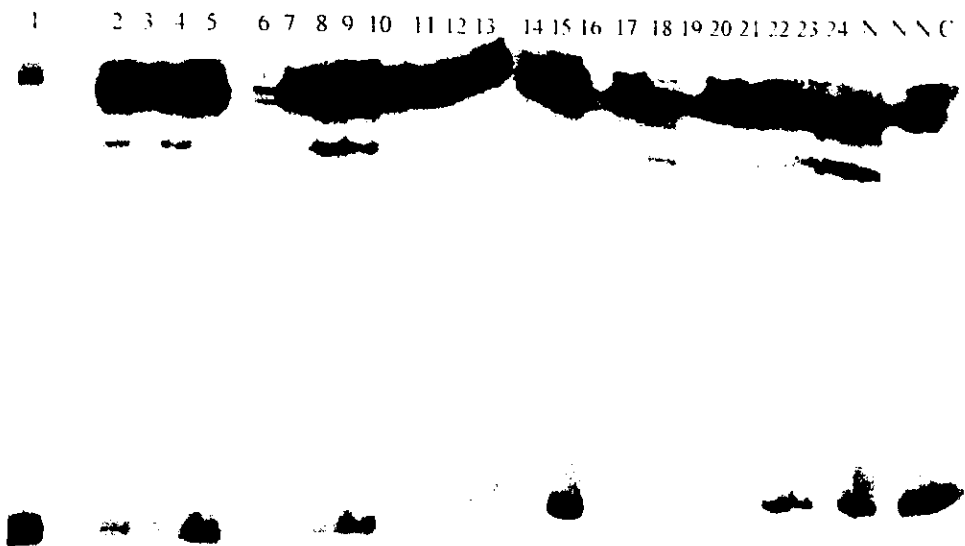


Figura 12. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 6



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 6

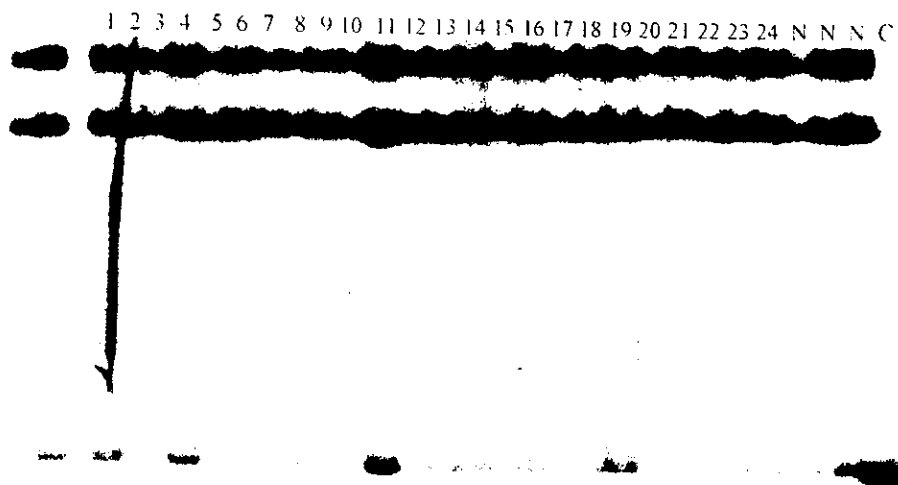
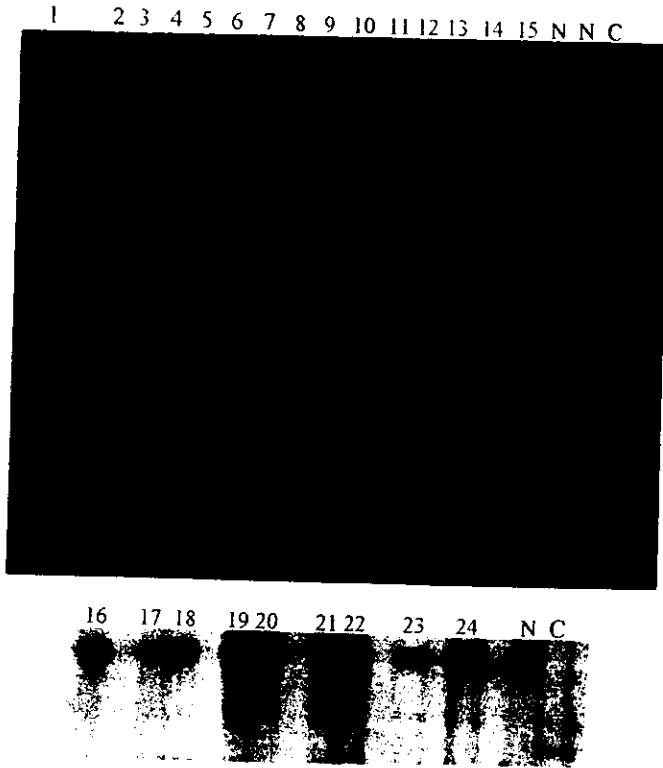


Figura 13. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 7.



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 3.

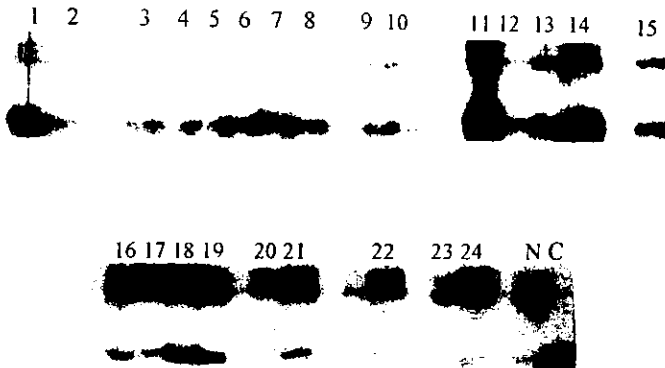
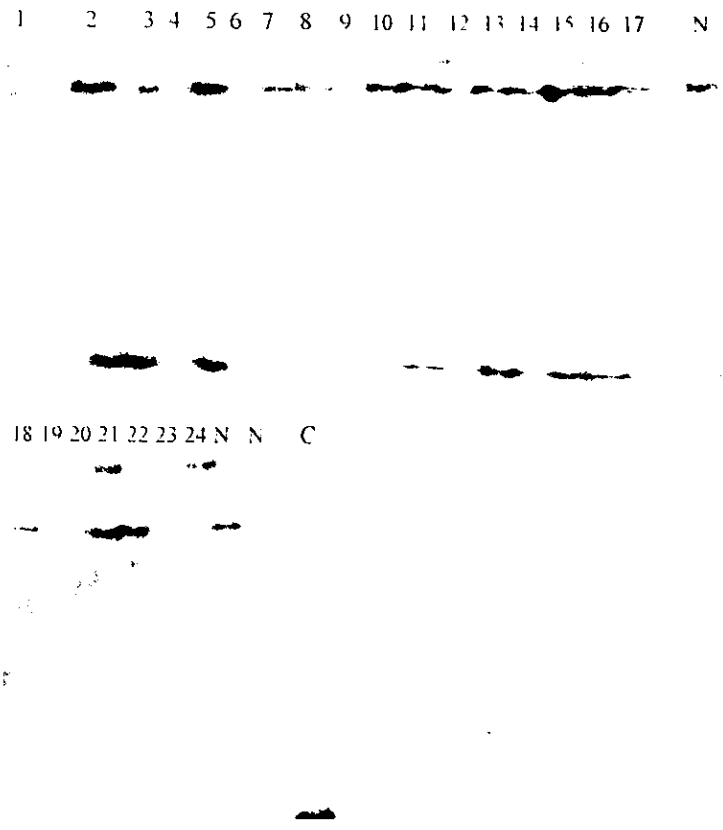
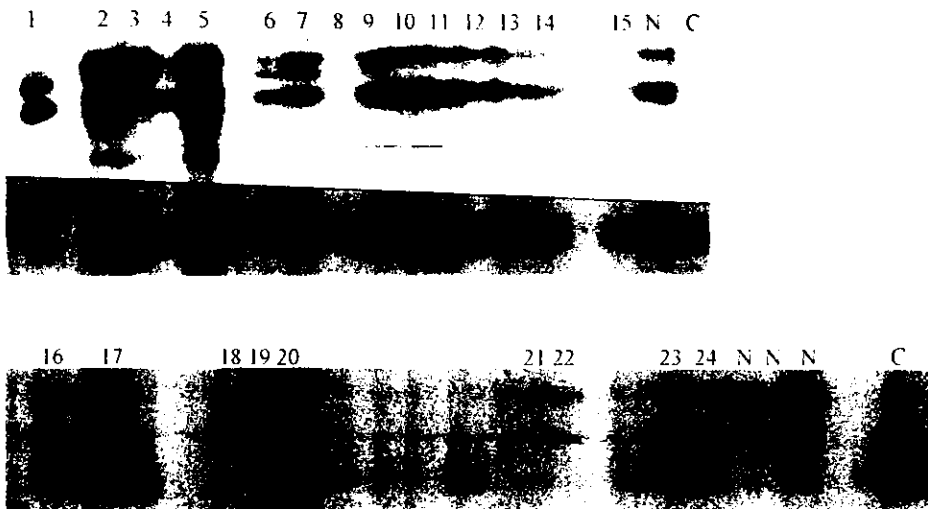


Figura 10. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 4.



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 4



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 7

De la **Figura 14** a la No. (A y B) se observan los experimentos de los exones 8, 9 y 10, en donde tampoco no detectamos ningún cambio en la migración de los alelos lo cual nos sugiere no existe mutaciones.

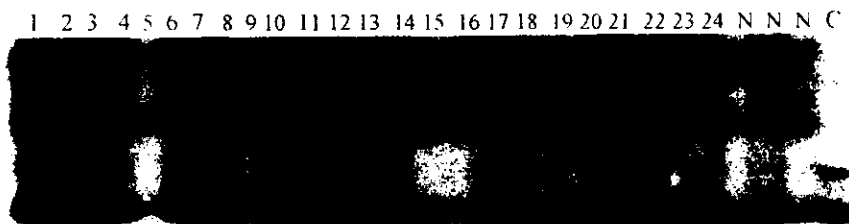
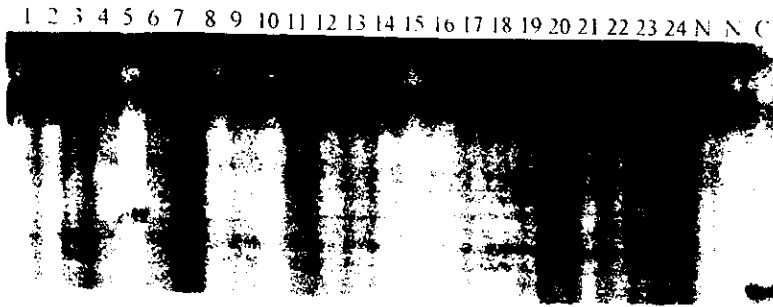


Figura 14. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 8.



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 8.

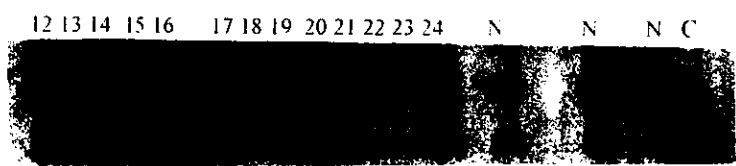
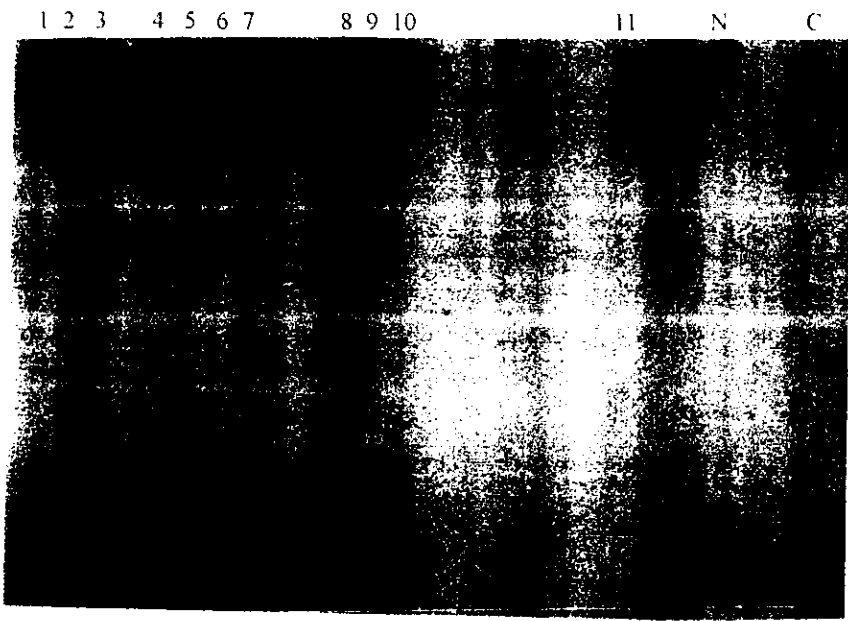
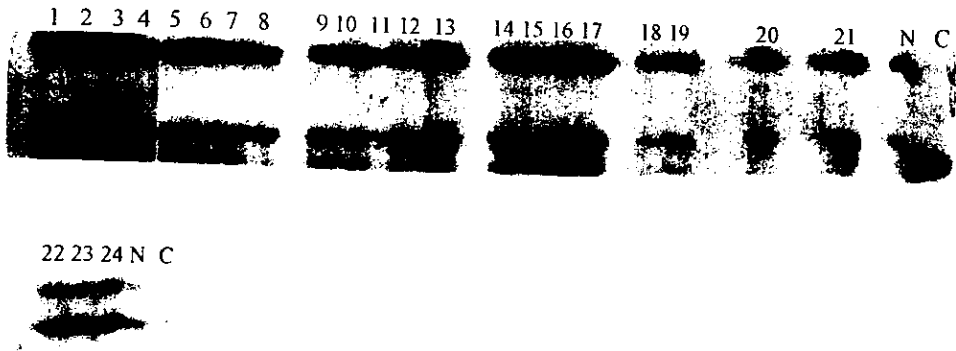


Figura 15. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 9.



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 9.

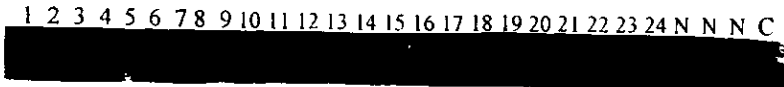
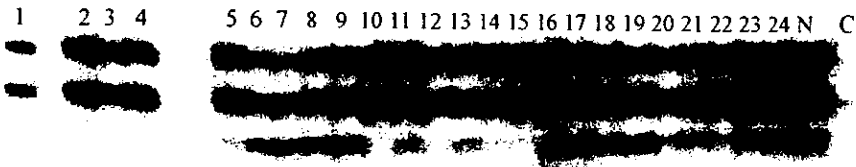


Figura 16. (A) PCR-SSCP con glicerol del EXÓN 10.



(B) PCR-SSCP sin glicerol del EXÓN 10.

El análisis de PCR-SSCP de al menos un individuo de cada familia demostró que no existen mutaciones en ninguno de los exones analizados o en la región de unión intrón/exón. Se detectó un polimorfismo en la región 3' (**Figura 17**) del gen (nucleótido 361 3' del codón de terminación) en 4 de los 24 pacientes y en 3 de 11 controles no diabéticos con edad de 60 años (**Figura 18**). El cambio de nucleótido (G→A) se observó por secuenciación directa en ésta región indicando que el análisis de PCR-SSCP es capaz de detectar alteraciones debido a un solo cambio de nucleótido.

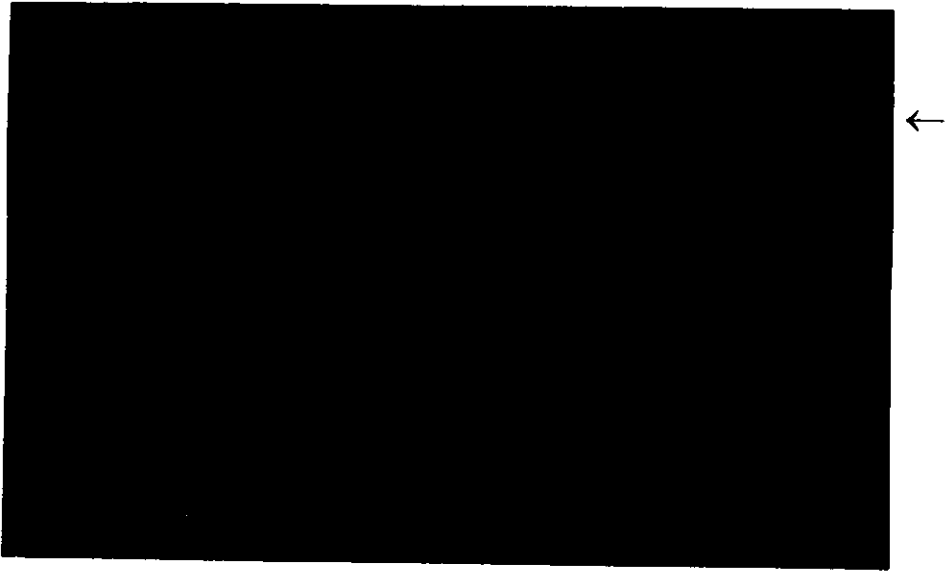


Figura No. 17. Detección de un polimorfismo en la región 3' no codificante del gen de la enzima glucocinasa en algunos de los pacientes MODY (Técnica PCR-SSCP). La flecha (←) muestra los cambios de migración en algunos alelos debido a la presencia de un polimorfismo.

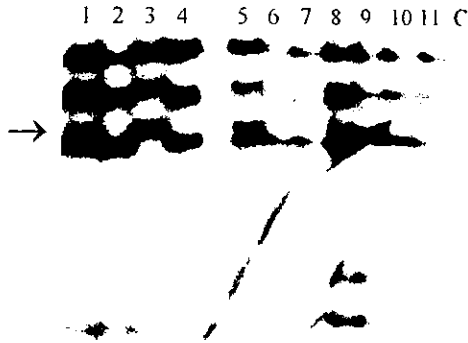


Figura 18 Análisis de controles no diabéticos en la región 3'. Se amplificaron las regiones 3' con los oligonucleotidos descritos en el capítulo de metodología en 11 individuos no diabéticos mayores de 60 años pertenecientes a las familias MODY: cambio de migración.

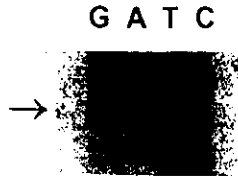


Figura 19. Secuenciación de la región 3' en donde se encontró cambio de migración por la técnica de PCR-SSCP. Se puede observar un cambio de G por A.

En la **Figura 20**, podemos observar un gel representativo de la secuenciación del exón siete de algunos de los 24 pacientes. Debido a que casi el 40% de las mutaciones reportadas en el gen de la enzima glucocinasa se encuentran en el exón 7, además de la técnica de PCR-SSCP, el exón 7 se analizó por secuenciación directa. No se detectaron deleciones, inserciones o mutaciones puntuales en ninguno de los pacientes estudiados. Tampoco se identificaron polimorfismos de secuencia previamente reportados.

SECUENCIACION DEL EXON 7

G A T C G A T C G A T C G A T C

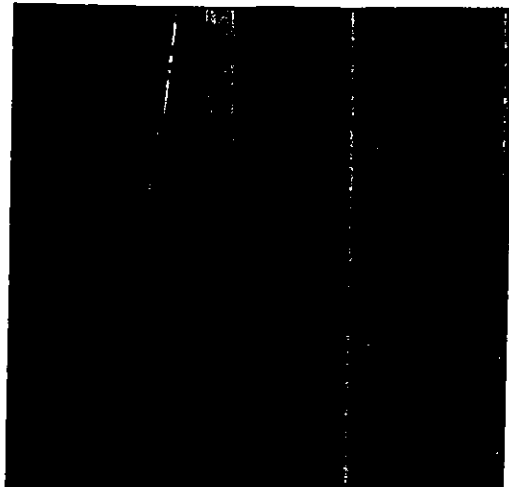


Figura 20. Gel representativo que muestra un fragmento de la secuencia del exón 7 en algunos pacientes.

CONCLUSIONES

LOS OBJETIVOS LOGRADOS SON LOS SIGUIENTES:

A. Principal.

De las familias con diabetes mellitus no dependientes de insulina de aparición temprana incluyendo tipo MODY captadas en el laboratorio durante 2 años, determinar cuales tienen mutaciones en el gene de la enzima glucocinasa, así como el tipo de mutaciones presentes.

Se captaron 24 familias con diagnostico de diabetes mellitus no dependiente de insulina de aparición temprana, de los cuales 4 son MODY "clásicos". Se buscaron mutaciones en el gene de la enzima glucocinasa en al menos un miembro de cada familia (paciente) mediante el análisis de PCR-SSCP y/o secuenciación directa a partir de productos de PCR, y no se detectaron mutaciones, solamente se detectó un polimorfismo en la región 3' que correspondía a un cambio de G→A.

B. Secundarios.

a) Establecimiento de un repositorio de líneas linfociticas inmortalizadas para el mapeo y caracterización de genes involucrados en el desarrollo de la DMNID.

Se estableció el repositorio de líneas linfociticas inmortalizadas, hasta el momento se cuentan con 150 muestras, y se siguen captando muestras de los familiares cooperadores, con las muestras que se tienen se pueden mapear genes involucrados en la diabetes en 4 familias.

b) A través de definir si el gene de la glucocinasa está involucrado en la diabetes no dependiente de insulina (DMNID) de aparición temprana y en la tipo MODY, determinar si marcadores asociados a este gene pudieran ser utilizados para el diagnóstico presintomático.

Al no encontrar mutaciones en el gene de la glucocinasa en las familias estudiadas, no es pertinente utilizar los marcadores asociados a este gene en el diagnóstico presintomático.

c) Establecimiento de una base de datos con características clínicas y genealógicas de las familias para estudios genéticos y moleculares.

Se estableció la base de datos de las familias con las características clínicas y genealógicas lo que ha sido de gran importancia para el estudio genético y molecular de los pacientes. Constantemente se siguen incluyendo datos nuevos en la base de datos.

d) Definir en cuales familias es pertinente el estudio de otros genes, ya sea asociados a MODY o a la DMNID de aparición temprana y en cuales familias pudiera mapearse genes nuevos.

Al no encontrar mutaciones en el gene de la enzima glucocinasa, el paso siguiente en la caracterización molecular de las familias es la búsqueda de los genes nuevos asociados a MODY: TCF1 y TCF14. Por otra parte contamos con 4 familias (1, 4, 5, 9) con probable herencia materna sería conveniente buscar mutaciones mitocondriales en ellas. Más del 50% de nuestras familias tienen sobrepeso o son obesas (3, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22) por lo cual los genes reportados asociados a la obesidad son buenos candidatos para buscar asociación en familias mexicanas. Contamos con cuatro familias (1, 8, 11, 14) en donde las características de sus pedigrees las hacen candidatos para mapeo de genes, lo cual sería importante realizar ya que las características clínicas de nuestros pacientes son diferentes a la de los MODY y es probable encontrar un nuevo loci asociado a MODY específico de población mexicana. El hecho que no se haya reportado asociación con gran numero de genes candidato en otras poblaciones con no excluye la posibilidad que en alguna de las familias mexicanas pudiera haber asociación con alguno de ellos.

DISCUSIÓN

No se detectaron mutaciones en la región codificadora ni en las uniones intrón-exón del gene de la enzima glucocinasa en ninguna de las 22 familias con DMNID de aparición temprana incluyendo al menos 4 familias MODY, utilizando para el análisis ensayos de PCR-SSCP. Aunque es posible todavía que existan mutaciones en la región reguladora no codificante del gene, no existe evidencia previa de la existencia de mutaciones en la región reguladora en los pacientes MODY reportados en la literatura. Todos los pacientes franceses que mostraron unión génica con marcadores polimórficos cerca del locus de la glucocinasa tienen mutaciones dentro de la región codificadora del gene ó dentro de las secuencias consenso de procesamiento de RNAm (Froguet P, 1993). El análisis de ligamiento utilizando marcadores cercanos al locus de la glucocinasa podría ser útil para saber si es posible que existan mutaciones en la región reguladora o en las regiones no codificantes, en las familias que son informativas para estudios de ligamiento.

La ausencia de cambios de migración en el análisis de PCR-SSCP del gene de la enzima glucocinasa en la población estudiada, sugiere que la glucocinasa no actúa como un locus mayor en la susceptibilidad para desarrollar diabetes en las familias con DMNID de aparición temprana y que tampoco es el responsable en las familias MODY estudiadas, este hallazgo no excluye la posibilidad de encontrar alguna mutación asociada a estas patologías estudiando un número mayor de individuos; pero debido a que la colección de las familias se hizo a través de dos Hospitales de concentración de la ciudad de México durante 2 años, no sería probable encontrar que las alteraciones en este gene fueran comunes.

ANÁLISIS DE PCR-SSCP.

Al iniciar éste estudio una limitante fue no tener acceso a muestras de DNA de pacientes con mutaciones en el gene de la glucocinasa, para el establecimiento de las condiciones de detección de mutaciones a través de SSCP. Se decidió entonces establecer el ensayo utilizando un amplificado de 120 pb proveniente de DNA genómico total de un paciente con una mutación heteróciga en el exón 1 del gen de la enzima 21-hidroxilasa. La **FIGURA 4** muestra el ensayo de PCR-SSCP para esta muestra donde se observa una diferencia en la migración del alelo mutado. Para el exón 7 donde han sido reportadas la mayoría de las mutaciones en población MODY francesa se aplicaron dos estrategias diferentes para su análisis: además de las ensayos de PCR-SSCP este exón fue secuenciado en todos los pacientes, obteniendo resultados congruentes con ambas estrategias.

Por otra parte al analizar la región 3' del gene en nuestros pacientes encontramos un cambio de migración a través de SSCP. Al secuenciar ésta región se identificó un cambio puntual heterócigo de una guanina por una adenina (G→A) en el nucleótido 361 a partir del codón de paro. Para determinar si este cambio de secuencia podía tratarse de una mutación, se analizaron por medio de PCR-SSCP a 11 personas sanas (no diabéticas) mayores de 60 años, encontrando el cambio de migración en 4 de 11 muestras, sugiriendo que se trata de un polimorfismo.

De ésta manera confirmamos que mediante el análisis de PCR-SSCP podíamos detectar cambios de secuencia, tanto mutaciones como polimorfismos.

De acuerdo como agrupamos los sujetos estudiados, A) MODY, B) Posibles MODY, C) DMNID de aparición temprana y D) DMID; se puede pensar que mientras para los grupos A y B el padecimiento es posiblemente debido a la alteración de un solo gen (monogénico) en el grupo C es probable que el padecimiento se deba a la combinación de varios genes alterados (formas poligénicas).

Al iniciar el estudio, se captaron cerca de 30 familias con diagnóstico clínico de diabetes mellitus no dependiente de insulina tipo MODY; la gran mayoría de las familias contaban solamente con el propósito y los padres, y en algunos casos el probando, los hermanos y los padres; las familias con un número tan pequeño de miembros no son útiles para el análisis genético, por ejemplo para determinar si presentaban herencia de tipo autosómico dominante (una característica fundamental de las familias MODY), esto es la madre o el padre afectados, y aproximadamente el 50% de los hermanos del propósito afectados, también aproximadamente 50% de los tíos afectados en la rama "MODY". Lo que procedimos a hacer fue a extender los árboles genealógicos de nuestras familias mediante interrogatorios a los padres de los pacientes o a algún familiar adulto; esto se hizo vía telefónica, personalmente en el consultorio médico o directamente en el domicilio de la familia afectada; además de ésta manera también se captaron muestras adicionales de sangre de los familiares (afectados y sanos). Con ésta estrategia se extendieron las familias y en algunas de ellas se demostró el patrón de herencia autosómico dominante (No. 1, 2, 3 y 4). A los padres aparentemente no afectados de los pacientes se les hizo una curva de tolerancia a la glucosa, y también a algunos miembros de las familias cooperadoras. En la mayoría de los miembros de las familias no se ha hecho aún éste estudio y se siguen realizando curvas de tolerancia a la glucosa a los familiares.

Conforme fue avanzando el estudio, algunos de los pacientes desarrollaron dependencia a la insulina (3) y en otros casos los pacientes no volvieron a la consulta médica (3) por lo que se realizó el estudio genético solamente en 24 familias.

Con los datos que obtuvimos tanto de número de familiares afectados con respecto a los sanos y con los datos de las curvas de tolerancia a la glucosa, en la mayoría de las familias no se puede demostrar hasta el momento herencia autosómico dominante. La ausencia de individuos afectados en las familias con mayor número de miembros puede deberse a la baja penetrancia del gene involucrado; como está descrito la expresión fenotípica del genotipo diabético parece estar modificada por una variedad de factores ambientales, los cuales incluyen dieta, obesidad, infección y actividad física así como sexo y paridad. Los diabéticos no dependientes de insulina obesos pueden perder todos los signos clínicos y químicos de la enfermedad si su peso retorna a lo normal. Esto dificultó en gran medida el estudio genético molecular, ya que debido al poco número de familiares afectados y al número tan pequeño de individuos estudiados por CTG, la mayoría de las familias con diabetes no dependiente de insulina de aparición temprana y no con diabetes tipo MODY.

HERENCIA MATERNA.

La frecuencia de la madres diabéticas con respecto a los padres diabéticos es mayor, lo que va de acuerdo con lo reportado, aunque la frecuencia es mucho más alta en poblaciones caucásicas (18.2% en madres y 9.1% en padres)(*Domer GA, 1975,1976*). En las familias con posible herencia materna, la enfermedad podría estar asociada a alguna mutación mitocondrial (herencia materna).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y FENOTÍPICAS QUE DISTINGUEN A LOS PACIENTES CON DMNID DE APARICIÓN TEMPRANA Y MODY MEXICANOS.

Edad de diagnóstico. La edad promedio de diagnóstico de nuestro grupo de pacientes MODY es de 14.6 +/- 2.1 años, la cual es mayor que la que presentan los pacientes MODY franceses con mutaciones en el gene de la glucocinasa, la cual es de 7 +/- 4 años, esto está de acuerdo con el no haber encontrado mutaciones en el gene de la glucocinasa en dichas familias.

Hiperglicemias. En el grupo de pacientes MODY las hiperglicemias en ayunas tienen un promedio de 113.75 +/- 48.88 mg/dl , si comparamos este valor con el promedio de hiperglicemias en ayunas de los pacientes MODY franceses ligados al cromosoma 7 (MODY2)(126 +/- 14.4 mg/dl), al cromosoma 12 (MODY3) (91 +/- 25.6 mg/dl mg/dl) (*Vaxillaire et al, 1995*), y a los MODY ligados a cromosoma 20 (MODY1), en donde los pacientes tienen hiperglicemias mucho más severas (140-366 mg/dl), y también muestran requerimiento por insulina y/o agentes

hipoglucemiantes orales y cerca del 25% presentan obesidad (*Fajans S S, 1990*), podemos observar que las glicemias en los pacientes mexicanos no son severas, y en apariencia son parecidas a la de los pacientes franceses asociados a cromosoma 12.

Tratamiento. Tres pacientes MODY no requieren insulina y tienen como tratamiento dieta y/o ejercicio. Esta característica los hace parecidos a los pacientes franceses ligados a cromosoma 12 (MODY3). Únicamente la paciente 4 requiere insulina. Aproximadamente el 30% de los pacientes reportados ligados a MODY1 tienen esta característica. Esta paciente podría tener mutaciones en TCF 14 ya que muestra además hiperglicemia en el rango de lo reportado para los pacientes ligados a este locus. De los 18 pacientes con diabetes no dependiente de aparición temprana 12 requieren o han requerido de insulina en algún momento de su enfermedad. En la mayoría de los casos en quienes se ha dado tratamiento con insulina, este se ha implementado ya que los pacientes no siguen adecuadamente la dieta prescrita. Esto puede complicar la interpretación de su curso clínico ya que en la mayoría de los casos no puede asegurarse que el paciente no hubiese respondido a otro tipo de terapia.

Curvas de Tolerancia a la Glucosa. Se han hecho CTG en algunos miembros de nuestras familias y se encontraron 20 individuos afectados. El diagnóstico de estos individuos es de suma importancia ya que comienzan seguir un tratamiento adecuado relativamente temprano y de esta manera se previenen o retardan las complicaciones características de la enfermedad. Varios estudios sugieren que entre el 15% y el 60% de las personas clasificadas como intolerantes se harán diabéticos en un rango de 5 a 10 años después de su diagnóstico (*O'Sullivan JM, 1980; Sartor G, 1980; Melton LJ, 1983*). Para estudios de ligamiento genético los individuos intolerantes se consideran como afectados.

Complicaciones. Ninguno de nuestros pacientes MODY presenta complicaciones, y solamente una de los pacientes con diabetes no dependiente de insulina de aparición temprana presenta complicaciones (No. 10), ella desarrolló cataratas a los dos años del diagnóstico; su hiperglicemia, el tipo de herencia es probablemente autosómico dominante, falta determinar CTG en familiares, y en el caso de corroborar su herencia mendeliana, el perfil de la paciente sería compatible con el de los pacientes ligados a los cromosomas 12 (MODY3) o 20 (MODY1).

Es importante dar seguimiento a las familias estudiadas para observar en un momento dado que tipo de complicaciones pudieran desarrollar, por lo que se tendrían que hacer distintos estudios longitudinales tomando en cuenta que existe una relación estrecha entre el locus asociado a la enfermedad y las características clínicas.

De acuerdo con lo reportado, una dieta con menos grasa animal y más carbohidratos complejos y el aumento de ejercicio, puede proteger a los pacientes del desarrollo de complicaciones.

Presencia de obesidad. El 61% de los pacientes con DMNID de aparición temprana presentan obesidad o sobrepeso y del grupo de pacientes MODY solamente uno de ellos (3) presenta obesidad, una característica fenotípica que no presentan los pacientes MODY franceses ligados a glucocinasa (MODY 2) y es muy poco frecuente entre los pacientes ligados a cromosoma 20 (MODY 1). En estas familias se están analizando también marcadores asociados a los cromosomas 2, 6 y 11 previamente asociados a diabetes en la población mexicano-americana, la cual tiene una alta prevalencia de obesidad.

REQUERIMIENTO VS DEPENDENCIA DE INSULINA.

El requerimiento de insulina se define como la inhabilidad para prevenir la hiperglicemia en ayunas con una terapia de dieta y dosis máximas de hipoglucemiantes orales. Este requerimiento no refleja un fenómeno autoinmune. De los 4 pacientes MODY solamente 1 ha requerido insulina (4), y de los 18 pacientes no dependientes de insulina el 66.6% requieren o han requerido insulina. Solamente 2 pacientes (23,24) son dependientes de insulina, no producen insulina por lo cual dependen de la insulina exógena para sobrevivir, en estos pacientes la función de los islotes se encuentra severamente dañada lo que hace que los niveles de insulina endógena estén seriamente reducidos o ausentes; esta destrucción de los islotes se encuentra asociada a un fenómeno autoinmune donde existe presencia de anticuerpos anti-islote pancreático (ICAs) y anti-GAD.

Los pacientes que son requerientes de insulina, necesitan de la insulina cuando tienen algún descontrol metabólico o son incapaces de normalizar su glicemia con dieta, ejercicio o hipoglucemiantes orales, pero todavía tienen capacidad de síntesis y secreción de insulina, aunque estas estén disminuidas.

No sabemos si los pacientes MODY mexicanos tienen defecto en la secreción de insulina como se ha demostrado en los pacientes MODY franceses con mutaciones en el gene de la glucocinasa (*Froguel et al., 1992; Velho et al 1992*) o como los que muestran ligamiento con marcadores en el cromosoma 20 (*Fajans et al., 1990*). Tampoco se ha evaluado en la mayoría de nuestros pacientes la reserva pancreática ni el grado de resistencia a la insulina.

DIABETES TIPO MODY CON AUTOINMUNIDAD ASOCIADA.

La DMID y la DMNID no son desordenes raros y su co-ocurrencia al azar no sería del todo extraña. Ya que MODY no se asocia con antígenos HLA (antígenos de histocompatibilidad) y tiene una historia natural de progresión diferente que la DMID, es improbable que MODY y DMID tengan un fondo patogénico común.

Ninguno de los pacientes MODY reportados (tanto 1, 2 y 3 y no-1, 2,3) se han asociado a autoinmunidad. En nuestro grupo de pacientes con DMNID de aparición temprana, solamente No. 8 (TABLA 2), la cual tiene cerca de 9 años de evolución, por aproximadamente 4 años ha requerido insulina; la paciente tiene disminuida la reserva pancreática (0.05 μ U de péptido C), lo cual puede atribuirse al tiempo de evolución tan prolongado, además la paciente presentó anticuerpos anti-GAD positivos. Esta familia es potencialmente clasificable como MODY una vez realizadas las curvas de tolerancia en familiares a la glucosa para confirmar el tipo de herencia autosómico dominante y las características clínicas de los familiares afectados, para asegurarse que se trata de una paciente "tipo MODY" y no de una paciente con diabetes no dependiente de insulina de aparición temprana asociada a un componente autoinmune.

El perfil clínico de la paciente No. 4, (TABLA 1) es muy interesante, ella presenta anticuerpos anti-islole (ICAs) positivos y no ha mostrado requerimiento de insulina desde su diagnóstico hace tres años. En ella no se tienen determinaciones de péptido C o insulina para valorar su reserva pancreática. Sin embargo sería interesante seguir su evolución y observar si desarrolla requerimiento de insulina con el tiempo.

Los perfiles de las pacientes 4 y 8 podrían ser una variante de los pacientes MODY clásicos descritos por Fajans (Fajans, 1990) en donde los miembros del pedígrée caucásico RW nunca han desarrollado autoinmunidad, medida por la presencia de anticuerpos anti-islole (ICAs).

ESTUDIO DEL GEN DE LA GLUCOCINASA EN FAMILIAS CON DMNID DE APARICIÓN TEMPRANA.

La enzima glucocinasa juega un papel clave en el proceso de secreción de insulina. Experimentos con ratones *knockout* demuestran que la ausencia homociga del gene de la enzima glucocinasa es letal (Terauchi, 1995; Grupe, 1995), mientras que las mutaciones heterocigas de este gene son capaces de producir diabetes tipo MODY. Sin embargo el tipo de alteraciones metabólicas que se ocasionan como consecuencia de mutaciones en este gen no parecen ser tan severas como las que se presentan en individuos con DMNID de etapa adulta ya que la prevalencia y el tipo de complicaciones que se desarrollan en la diabetes de los adultos son mayores a las exhibidas por los sujetos con diabetes tipo MODY, los cuales, pueden permanecer varias décadas sin desarrollar complicaciones. En algunos sujetos MODY, además, parece existir un mecanismo compensatorio que restablece la secreción normal de insulina, aún en presencia de mutaciones en el gene de la glucocinasa. Esta evidencia sugiere que

mutaciones en este gen pudieran también encontrarse en algunos pacientes con la forma más común de DMNID, particularmente en sujetos que manifiestan la sintomatología a una edad temprana, aún cuando en ellos hubiera otros genes de susceptibilidad que predispongan a la expresión de la enfermedad.

La ausencia de mutaciones en el gene de la glucocinasa en la población, sugiere que la glucocinasa no actúa como un locus mayor en la susceptibilidad para desarrollar diabetes en las familias con DMNID de aparición temprana y que tampoco es el responsable en las familias MODY mexicanas. Todos los pacientes franceses MODY que muestran ligamiento con marcadores polimórficos cerca del locus de la glucocinasa presentan mutaciones en la región que codifica para el gene o en las secuencias consenso de procesamiento del ARNm (Froguet et al, 1993) sin embargo es todavía posible que algunas de nuestras familias tuvieran mutaciones en la región reguladora del gen. El análisis de ligamiento utilizando marcadores cercanos al locus de la glucocinasa podría ser útil para descartar ésta posibilidad, en las familias que son informativas para estudios de ligamiento. El hecho de no haber encontrado mutaciones concuerda perfectamente con el perfil clínico y bioquímico que presentan nuestros pacientes comparándolo con el que exhiben los pacientes MODY2 y corrobora la heterogeneidad genética de la enfermedad.

Al no haber encontrado mutaciones en este gene en la población se corrobora la heterogeneidad genética de la enfermedad; las características clínicas de los pacientes MODY mexicanos son diferentes a la de los pacientes franceses lo que hace muy probable que se trate de un subtipo MODY diferente

FAMILIAS MODY MEXICANAS COMO UNA FUENTE DE IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE DMNID.

Debido a la naturaleza heterogénea de MODY algunas de nuestras familias MODY pudieran tener genes involucrados diferentes de los que se han identificado en la población caucásica, haciendo a estas familias una fuente valiosa en la identificación de nuevos genes implicados en el desarrollo de la enfermedad.

Los genes identificados como responsables para el subtipo MODY parecen estar también involucrados en el desarrollo de otras formas más comunes de diabetes. Mutaciones en el gen de la glucocinasa han sido reportadas en un 1-3% de pacientes con diabetes gestacional (Stoffel M, 1993). Recientemente se han reportado también mutaciones en el gene HNF-1 α (MODY3) en el 8% de los casos de diabetes no dependiente de insulina de aparición temprana y en el 0.9% de los casos de diabetes no dependiente de insulina de aparición tardía en población japonesa (Bell GI, 1997). Esto demuestra que el identificar los genes responsables de MODY es una forma de encontrar nuevos genes involucrados en

el desarrollo de la diabetes no dependiente de insulina con tipo de herencia compleja, cuya frecuencia es varios ordenes de magnitud mayor.

CARACTERIZACION GENÉTICA DE FAMILIAS CON DMNID DE APARICIÓN TEMPRANA.

Debido a la alta prevalencia de la DMNID en la población mexicana (~8%), los matrimonios entre personas diabéticas son comunes. La mayoría de los sujetos con DMNID de aparición temprana desarrollan la enfermedad antes de los 30 años posiblemente por heredar genes de susceptibilidad de ambos padres (doble carga genética). Sin embargo en algunas familias a pesar de que ambos padres del probando son diabéticos se puede reconocer claramente una rama de la familia como "tipo MODY" (**FAMILIA 1**).

La mayoría de las familias estudiadas presentan una forma de herencia no mendeliana. En estas familias es obligado la búsqueda de ligamiento usando marcadores sobre el cromosoma 2, 6 y 11, con los cuales se ha encontrado unión génica con familias con DMNID mexico-americanas (*Hanis et al, 1996; Stern et al, 1996*).

Se requiere estudios clínicos y bioquímicos más detallados para poder encontrar diferencias más sutiles entre nuestros pacientes a fin de poder hacer subgrupos que quizás posteriormente se asocien a diferentes mutaciones en diferentes genes como se ha reportado en los genes asociados a MODY en población francesa (*Byrne MM, 1994; Velho G, 1997*) e incluso a diferentes genes (*Yamagata K, 1996a,b, Vaxillaire M, 1997*).

No sabemos si los pacientes MODY mexicanos tienen defecto en la secreción de insulina como se ha demostrado en los pacientes MODY franceses con mutaciones en el gene de la glucocinasa (*Froguel et al., 1992; Velho et al 1992*) o como los que muestran ligamiento con marcadores en el cromosoma 20 (*Fajans et al., 1990*). Tampoco se ha evaluado en la mayoría de nuestros pacientes la reserva pancreática ni el grado de resistencia a la insulina.

PERSPECTIVAS

Con el reciente descubrimiento de los genes MODY1 (TNF1), MODY3 (TNF14) y MODY4 (IPF1), el siguiente paso en la caracterización genética de las familias será la búsqueda mutaciones en estos genes asociadas a la enfermedad. Para este tipo de análisis no es necesario contar con familias tan extensas como las que se requieren para análisis de ligamiento genético. La única mutación reportada asociada a MODY1 (codón 268: CAG- \rightarrow TAG) no se encuentra en ninguno de nuestros pacientes. Los análisis de ligamiento con marcadores ligados al loci MODY1 en la familia RGG sugieren que este loci esta involucrado (Lod score positivo pero menor de 3), a pesar de que la paciente no tiene la única mutación reportada en este gen. El análisis de SSCP de cada uno de los exones y/o secuenciación directa del gene en este paciente confirmará su papel en el desarrollo del padecimiento en esta familia.

Aparentemente en la mayoría de nuestras familias con DMNID de aparición temprana, en la rama afectada no se encuentran afectados el 50% de los miembros como se esperaría de una herencia autosómico dominante, aunque hay que tomar en cuenta que no se les han realizado curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) a todos los individuos. Estas determinaciones son muy importantes para establecer el posible tipo de herencia dominante en algunas familias. A través de análisis de ligamiento por simulación se determinó que solo 4 de las familias captadas hasta ahora son útiles para análisis de ligamiento genético. En estas familias podría iniciarse la búsqueda de nuevos genes a través de tamizaje completo del genoma, una vez descartada la posible participación de los genes TCF14, TCF4 y IPF1. Para que un número mayor de familias sean útiles para estudios genéticos de ligamiento es necesario incrementar el número de miembros, tanto afectados como sanos. Con las familias que son informativas para estudios de ligamiento, se están analizando ya marcadores sobre los cromosomas 2, 6 y 11, con los cuales se ha encontrado segregación en familias diabéticas de origen mexicano-americano (*Stern, 1996; Hains CL, 1996*). En estas familias también se estudiará el posible papel de genes candidato tales como el gene de la proteína reguladora de la glucocinasa (GCKR) y el gene receptor para el péptido 1 glucagon (GLP1R); (*Weigle DS, 1996; Vaxillaire M, 1994*). Debido a que la mayoría de nuestros pacientes tienen sobrepeso o son obesos uno de los genes candidato importantes a analizar son los que se asocian a la obesidad (*Weigle DS, 1996*)

La identificación del gene IPF1 como MODY4, así como la reciente identificación de HNF-1 α y HNF-4 α como genes mutados en MODY3 y MODY1 respectivamente, ha hecho que la atención de los investigadores de ésta área se enfoque en el papel de éstos factores de transcripción en la función normal de las células β -pancreáticas. El HNF-4 α es un receptor huérfano, lo que significa que no

se sabe cual es su ligando, y la identificación del ligando dará nuevas perspectivas en el conocimiento de la fisiopatología de la diabetes.

Este es el primer estudio genético molecular en pacientes con DMNID mexicanos donde se intenta identificar al gene responsable de un subtipo de diabetes específico. El hecho de contar con un repositorio permanente de linfocitos inmortalizados y de ADN de miembros de estas familias aunado al hecho de haber descartado la participación del gen de la glucocinasa en la fisiopatogenia de esta enfermedad en pacientes mexicanos sugiere que podríamos encontrar algún gene o genes no reportados en algunas de nuestras familias. La identificación de algún marcador genético asociado al padecimiento en nuestras familias podría ser de gran utilidad para el diagnóstico presintomático de los familiares aparentemente sanos, aún antes de conocer la estructura, localización y mutaciones específicas del gene afectado; con esto se podrían implementar medidas terapéuticas que busquen retrasar la aparición de complicaciones asociadas a esta patología.

Se pueden captar más familias MODY, y quizás entre las pacientes con diabetes gestacional pudieran encontrarse algunas pacientes que fueran MODY, debido a que el diagnóstico de MODY muchas veces no se hace desde que inicia la enfermedad, porque se trata de un tipo de diabetes no muy agresivo. La diabetes gestacional es una forma poligénica de diabetes en donde en un 3% de los casos se han encontrado mutaciones en el gene de la glucocinasa (*Stoffel M, 1993*). En población mexicana no se ha estudiado la prevalencia de éstas mutaciones por lo cual sería importante analizarla y si esta es alta se podrían utilizar las mutaciones en éste gene como un marcador genético que anticipe un factor de riesgo, esto es hacer diagnóstico presintomático en los familiares de éstas pacientes.

Por otra parte, los avances en el mundo para entender las enfermedades complejas como la diabetes se están haciendo a pasos agigantados. Las herramientas disponibles para los análisis de ligamiento como consecuencia del Proyecto del Genóma Humano y las estrategias desarrolladas para los estudios genéticos colocan a los investigadores de estas áreas en una posición sin precedentes para comenzar desenmarañar estos misterios.

Yet it was clear. . . . that the end was still far, far off, and that the hardest and most complicated part was only just beginning. . . . Anton Chekhov, The Lady with the Dog.

REFERENCIAS

Acaso JF, Hernandez A, Serrano S, García MC, Ferrer MD, Martinez J, Gonzalez E, Carmena R (1985): Insulin secretion and insulin receptors in NIDDM, MODY type. In Proc Int Diabetes Fed Congr, 12th Madrid Spain, pS25.

1. *Accili D, Frapier C, Mosthaf L, McKeon C, Elbein SC, Permutt MA, Ramos E, Lander E, Ullrich A, Taylor SI (1989): A mutation in the insulin receptor gene that impairs transport of the receptor to the plasma membrane and causes insulin-dependent.* EMBO J 8:2509-2513.

3. *Asmal AC, Dayal D, Jialal Y, Learly WP, Omar MAK, Pillay NL, Thandoroyen FT (1981): Non-insulin dependent diabetes mellitus with early onset in Blacks and Indians.* S Afr Med J 60:93-96.

Bali D, Svetlanov A, Lee H-W, Fusco-DeMane D, Leiser M, Li B, Barzilai N, Surana M, Hou H, Fleischer N, DeOincho R, Rossetti L, Efrat S, (1995): Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. J Biol Chem 270:21464-21467.

Ballinger S, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce Y, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC (1992): Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. Nature 1:11.

Barbosa J, King R, Goetz FC, Noreen H, Yunis EJ (1978a): HLA in maturity-onset type of hyperglycemia in the young. Arch Intern Med 138:90-93.

Barbosa J, Ramsay R, Goetz FC (1978b): Plasma glucose, insulin, glucagon and growth hormone in kindreds with maturity-onset type of hypoglycemia in young people. Ann Intern Med 141:791-92.

Barnett AH. (1981a): Diabetes in identical twins: a study of 200 sibpairs. Diabetologia 20:87-93.

Barnett AH, Spiliopoulos AJ, Pyke DA, Stubbs WA, Burrin J, Alberti KGMM (1981b): Metabolic studies in unaffected co-twins of non-insulin dependent diabetes. Br Med J 1981;ii:1656-58.

Beck-Nielsen H, Nielsen OH, Pedersen O, Bak J, Faber O, Schimitz O (1988): Insulin action and insulin secretion in identical twins with MODY: evidence for defects in both insulin action and secretion. Diabetes 37:730-35.

Bedoya FJ, Matschinsky FM, Shimizu T, O'Neil JJ, Appel M (1986): Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of rat. J Biol Chem 261:10760-64.

Bell GI, Xiang K, Newman MV, Wu S, Wright LG, Fajans S, Spielman RS, Cox N, (1991): Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. Proc Natl Acad Sci. USA 88: 1484-1488.

Bell GI, Wainscoat JS, Old JM, Chlouverakis C, Keen J, Turner RC, Weatherall DJ (1992): Maturity onset diabetes of the young is not linked to the insulin gene. Br Med J 286:590-92.

Bell GI, Froguel P, Hishi S, Pilkis SJ, Stoffel M, Takeda J, Vionnet N, Yasuda K (1993): Mutations of the human glucokinase gene and diabetes mellitus. Trends Endocrinol Metab 4:86-91.

Bennett PH, Knowler WC, Pettitt DJ, Carraher MJ, Vasquez B (1982): Longitudinal studies of the development of diabetes in the Pima Indians. In: Escheg E(ed).Adv Diabetes Epidemiol INSERM Symposium No. 22 New York:Elsevier Press, 65-74.

Bennett PH (1983): Classification of diabetes, in Ellenberg M, Rifkin H (eds): Diabetes Mellitus: Theory and Practice. New Hyde Park, NY, Medical Examination Publishing Co., p. 409-423.

Bigler R, Adler S (1981): Diabetic nephropathy in a patient with maturity-onset diabetes of the young. Arch Intern Med 141:791-92.

- Böjork E* (1994). **Anti-GAD Immunoassay**. *Diabetes* 43, 161-165.
- Bonifacio E, Lernmark A, Dawkins RL* (1988): **Serum exchange and use of dilutions have improved precision of measurement of islet antibodies**. *J Immunol Methods* 106:83-88.
- Borgadus C, Lillioja S, Stone K, Mott D* (1984): **Correlation between muscle glycogen synthase activity and in vivo insulin action in man**. *J Clin Invest* 73:1185-1192.
- Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV* (1993): **The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids**. *N Engl J Med* 328:238-242.
- Bottazzo GF, Flonin Christensen A, Doniach D* (1974): **Islet cell antibodies in diabetes mellitus with polyendocrine disease**. *Lancet* 1279-1283.
- Bottazzo GF, Gleochman H* (1986): **Immunology and Diabetes Workshops: Report of the first international workshop on standardization of cytoplasmic islet cell antibodies**. *Diabetologia* 29:125-126
- Bowden DW, Akots G, Rothschild CB, Falls KF, Sheehy MJ, Hayward C, Mackie A, Baird J, Brock D, Antonarakis SE, Fajans SS* (1992): **Linkage analysis of maturity onset diabetes of the Young (MODY): genetic heterogeneity and nonpenetrance**. *Am J. Hum Genet* 50:607-610.
- Burant CF, Sivitz WI, Fukumoto H, Kayano T, Nagamatsu S, Seino S, Pessin JE, Bell GI* (1991): **Mammalian glucose transporters: Structure and molecular regulation**. *Recent Progr Horm Res* 47:349-353.
- Cama A, Sierra ML, Ottini L, Kadowaki T, Gorden P, Imperato McGinley J, Taylor SI* (1991): **A mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor associated with insulin resistance in an obese woman**. *J Clin Endocrinol Metab* 73:894-899.

Cama A, Quon MJ, Sierra ML, Taylor SI (1992): Substitution of isoleucine for methionine at position 1153 in the beta-subunit of the human insulin receptor. A mutation that impairs receptor tyrosine kinase activity, receptor endocytosis and insulin action. J Biol Chem 267:8383-8389.

Caro JF, Ittoop O, Pories WJ, Meelheim D, Flickinger EG, Thomas F, Jenquin M, Silverman JF, Khazanie PG, Sinha MK (1986): Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes. Insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase activity. J Clin Invest 78:249-254.

Caro JF, Sinha MK, Raju SM, Ittop O, Pories WJ, Flickinger EG, Meelheim D, Dohom GL (1987): Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. J Clin Invest 79:1330-1337.

Carta G, Viviani GL, Noberasco G, Gulli G, Falzetti G, Del Nero E, Adezati L: (1985): Hepatic insulin extraction after glucose and nonglucose stimuli in non-insulin-dependent diabetes of the young people (NIDDY). In Proc Int Diabetes Fed Congr. 12th Madrid, Spain. pS88.

Chance RE, Ellis RM, Bromer WW (1968): Porcine proinsulin: characterization and amino acid sequence. Science 161:165

Ciaraldi TP, Kolterman OG, Scarlett JA, Kao M, Olefsky JM. (1982): Role of the glucose transport in the postreceptor defect of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes 31:1016-1022.

Cohen AM. (1961): Prevalence of diabetes among different ethnic Jewish groups in Israel. Metabolism, 10:50-58.

Cohen AM, Fidel J, Cohen B, Furst A, Eisenberg S. (1978): Diabetes, blood lipids, lipoproteins, and change of environment: restudy of the "new immigrant Yemenites" in Israel. Metabolism;28:716-728.

- Coleman D* (1982): **The genetics of the diabetes in rodents.** In: **Kobberling J, Tattersall R (eds). Genetics of Diabetes Mellitus.** London: Academic Press, 183-193.
- Conn JW and Fajans SS* (1965): **Prediabetes, subclinical diabetes, and latent clinical diabetes: interpretation, diagnosis and treatment: In On the Nature and Treatment of Diabetes.** Leibel DS, Wrenshall GS, De. Amsterdam, Excerpta Med. 641-56 (Int. Congr. Ser., no. 84).
- Cox N, Xiang KS, et al* (1992): **Mapping diabetes-susceptibility genes: lessons learned from search for DNA marker for maturity onset diabetes of the young.** *Diabetes* 41:401-407.
- Creutzfeldt W, Kobberling J, Neel JV* (1976): **The Genetics of Diabetes Mellitus.** Berlin: Springer-Verlag.
- Creutzfeldt W, Elbert R.* (1985): **New developments in the incretin concept.** *Diabetologia* 28:565-570.
- Damsbo P, Vaag A, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H* (1991): **Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.** *Diabetologia* 34:239-243.
- Deschamps Y, Lestrade H, Demenais F, Feingold N, Schmid M, Hors JA* (1983): **A linkage study of HLA and maturity-onset diabetes type diabetes of the young (MODY).** *Tissue Antigens* 21:391-96.
- Diabetes Epidemiology Research International Group* (1988): **Geographic patterns of childhood insulin dependent diabetes mellitus.** *Diabetes* 37:1113-1119.
- Dorner GA, Mohnike E, Steindel E* (1975): **On possible genetic and epigenetic modes of diabetes transmission.** *Endokrinologie*, 66:225-227.

Dorner GA, Mohnike A (1996): Further evidence for a predominantly maternal transmission of maturity-onset type diabetes. Endokrinologie Band, 68:121-124.

Durruty P, Munooz M, Garcia de los Rios M (1985): Clinical characteristics, inheritance of diabetic mellitus (DM) and insulin secretion in the NIDDM subgroup called maturity-onset diabetes of the young (MODY). In Proc Int Diabetes Fed Congr 12th, Madrid, Spain p.S146.

Efrat S, Leiser M, Wu Y, Fusco-DeMane D, Emran O, Surana M, Jetton T, Magnuson M, Weir G, Fleischer N (1994): Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic β -cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion. Proc Natl Acad Sci USA 91:2051-2055.

Elrick D, Stimmler L, Hlad CJ Jr., Aral I (1994): Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. J Clin Endocrinol Metab 16:1076-1080.

Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (1993) Dirección General de Epidemiología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. *Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, Secretaria de Salud. México.*

Epstein P, Boschero A, Atwater Y, Cai X, Overbeek P (1992): Expression of yeast hexokinase in pancreatic β -cells of transgenic mice reduce blood glucose, enhances insulin secretion, and decreases diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 89:12038-12042.

Eto K, Sakura H, Shimokawa K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1993): Sequence variations of glucokinase gene in Japanese subjects with NIDDM. Diabetes 42:1133-1138.

Faber OK, Thomsen M, Binder C, Platz P, Svejgaard A (1978): HLA antigens in a family with maturity-onset type diabetes mellitus. Acta Endocrinol 88:329-38.

Fajans SS, Conn JW (1960): Tolbutamide-induced improvement in carbohydrate tolerance of young people with mild diabetes mellitus. Diabetes 9:83-88.

Fajans SS, Conn JW (1962): The use of tolbutamide in the treatment of young people with mild diabetes mellitus: a progress report. Diabetes 11:123-26.

Fajans SS, Floyd JC Jr., Knopf RF, Conn FW (1967): Effect of the amino acids and proteins on insulin secretion in man. Recent Prog Horm Res 23:617-626.

Floyd JC Jr, Fajans SS, Conn JW, Thiffault C, Knopf RF, Guntsche E (1968): Secretion of insulin induced by amino acids and glucose in diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 28:266-273.

Fajans SS, Floyd JC (1972): Stimulation of islet cell secretion by nutrients and by gastrointestinal hormones released during digestion, in Steiner DF, Freinkel N (eds): Endocrine Pancreas. Washington, D.C., American Physiological Society, p.473.

Fajans SS, Cloutier MC, Crowther RL (1978) Clinical and etiologic heterogeneity of idiopathic diabetes mellitus. Diabetes 27:1112-1125.

Fajans SS (1981): Etiologic aspects of types of diabetes. Diabetes Care 4:69-75.

Fajans SS (1982): Heterogeneity between various families with non-insulin-dependent diabetes of the MODY type. In the Genetics of Diabetes Mellitus. Köbberling J, Tattersall R, Eds. London. Academic, p.251-60.

Fajans SS (1985): Heterogeneity withing type II and MODY diabetes. In Comparison of Type I and Type II Diabetes. Vranic M. Ed. New York. Plenum, p.65-87.

Fajans SS (1987): MODY: a model for understanding the pathogenesis and natural history of type II diabetes. Horm Metab Res 19:591-99.

- Fajans SS* (1990). **Scope and Heterogeneous Nature of MODY**. *Diabetes Care* 13:49-64
- Fajans SS, Bell GI, Bowden DW, Halter JB, Polansky KS* (1994): **Minireview Maturity Onset. Diabetes of the Young**. *Life Sciences* 55 No.6: 413-422
- Friedman JM, Fialkow PJ* (1980): **The genetics of diabetes mellitus**: In Steinberg AG, Bearn AG, Motulsky AG, Childs B (eds.). *Progress in Medical Genetics*. Philadelphia: WB Saunders. vol IV, 199-232
- Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N* (1991): **Molecular mapping of the mouse Ob mutation**. *Genomics* 11: 1054-1064
- Froguel P, Veino G, Conen D and Passa P* (1991) **Strategies for the collection sibling-pair data for genetic studies in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus**. *Diabetologia* 34, 685-691
- Froguel PH, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougerouse F, Tanizawa Y, Weissenbach J, Beckman JS, Lathrop GM, Passa PH, Permutt MA, Cohen D*, (1992). **Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early onset non-insulin-dependent diabetes mellitus** *Nature* 356 162-164
- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Pharm D, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt A, Beckmann J, Bell GI, Cohen D*, (1993): **Familial hyperglycemia due to mutations in the glucokinase**. *New England J. Med* 328: 697-702.
- Füesl HS, Goebel FD* (1983) **Clinical variability of autosomal dominant maturity-onset type diabetes of the young people (MODY)**. *Dtsch Med Wochenschr* 108 1868-71
- Gerich JE, Charles MA, Grodsky GM* (1976): **Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion** *Annu Rev Physiol* 38 353-360.

Ghosh S. and Schork N.J. (1996): **Genetic analysis of NIDDM. The study of quantitative traits.** Diabetes 45:1-14.

Gidh-Jain M, Takeda J, Wu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D, Patel P, Lo Y-MD, Hattersley AT, Luthman H, Wedell A, St. Charles I, Harrison RW, Weber IT, Bell GI, Pilkis SJ, (1993): **Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (Type 2) diabetes mellitus have decreases enzymatic activity: Implications for structure/function relationships.** Proc Natl Acad Sci USA 90:1932-1937.

Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, McNally JM, Dean DM, Bottazzo GF, Cudworth AG, (1981): **Evidence for a long pre-diabetic period in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus.** Lancet; ii:1363-1365.

Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D, (1986): **Islet cell antibodies identify latent type I diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis.** Diabetes, 35:237-241.

Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma I, Bauer M, Stewart T, (1995): **Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic β cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis.** Cell 83:69-78.

Hanaoka Y, Tsukasa S, Masaki T, Fujita H, Kitagawa T, Sato Y, Matsui M (1985): **Study of the prognosis of the non-insulin diabetes mellitus of the young.** In Proc Int Diabetes Fed Congr, 12th, Madrid, Spain, p.S22^o

Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellswoeth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shephard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwassaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzsch H, Schoroder -E, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Linder T, Mereu LE, Wang -Q, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI (1996): **A genome-wide search for human non-insulin dependent (typell) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2.** Nature Genet 13:161-166.

Hariharan N, Farrelly D, Hagan D, Hillyer D, Arbeeny C, Sabrah T, Treloar A, Brown K, Kalinowski S and Mookhtiar K (1997): **Expression of Human Hepatic**

Glucokinase in Transgenic Mice Liver Results in Decreased Glucose Levels and Reduced Body Weight. *Diabetes* 46, January 11-16.

Harris MI (1985): **Prevalence of non-insulin-dependent diabetes and impaired glucose tolerance.** In *Diabetes in America*. Washington, DC, U.S. Govt. Printing Office, p. 1-31 (DHEW NIH publ. no. 85-1468).

Hitman GA, Jowett NI, Williams LG, Humphries S, Winter RM, Galton DJ (1984): **Polymorphisms in the 5'-flanking region of the insulin gene and non-insulin-dependent diabetes.** *Clin Sci* 66:383-88.

Hughes SD, Quaade C, Nilburn JL, Cassidy L, Newgard CB (1991): **Expression of normal and novel glucokinase mRNAs in anterior pituitary and islet cell.** *J Biol Chem* 266:4521-30.

Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ, Duncan LJP, (1977): **Clinical and pathological significance of pancreatic islet cell antibodies in diabetics treated with oral hypoglycemic agents.** *Lancet*, i:1025-1027.

Iyengar S, Hamman RF, Marshall JA, Baxter J, Majumder PP, Ferrell RE. (1989): **Genetic studies of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: lack of association with seven genetic markers.** *Diabetologia* 32:690-693.

Iynedjian PB, Pilot P-R, Nospikel T, Milburn JL, Quaade C, Hughes S, Ucla C, Newgard CP (1989): **Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7838-42.

Ikeda Y, Tajima N, Minami N, Tanese T, Abe M (1979): **Pancreatic B-cell function in young diabetics assessed by C-peptide immunoreactivity. Proinsulin, Insulin and C-Peptide.** Baba S, Kaneko J, Yanahara N, Eds. Amsterdam, Excerpta Med, p.199-210 (Int. Congr. Ser., no.468).

Ishihara H, Tashiro F, Ikuta K, Asano T, Katagiri H, Inukai K, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Miyazaki J (1995): **Inhibition of pancreatic β -cell glucokinase by antisense RNA expression in transgenic mice: mouse strain-dependent alteration of glucose tolerance** *FEBS Lett* 371:329-332.

Iwasaki N, Oda N, Ogata M, Hara M, Hinokio Y, Oda Y, Yamagata K, Kanematsu S, Ohgawara H, Omori Y and Bell GI (1997): Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 α /MODY3 Gene in Japanese Subjects With Early- and Late-Onset NIDDM. Diabetes 16, SEPTEMBER, 1504-1508.

Jackson R (1988): Animal models of diabetes. In: Faird NR (ed). Immunogenetics of Endocrine Disorders. New York: Alan R. Liss, 89-110.

Jetton TL, Liang Y, Pettepher CC, Zimmerman EC, Cox FG, Horvath K, Matschinsky FM, Magnuson MA (1994): Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. J Biol Chem 269:3641-3654.

Jialal I, Joubert SM, Asmal AC, Jenkins N (1982a): The insulin and glucose response to an oral glucose load in non-insulin-dependent diabetes in the young. S Afr Med J 61:351-54.

Jialal I, Joubert SM, Kendall D (1982b): Fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin levels in the assessment of diabetic control in non-insulin-dependent diabetes in the young. S Afr Med J 62:889-91

Jilal I, Joubert SM (1984): Obesity does not modulate insulin secretion in Indian patients with non-insulin-dependent diabetes in the young. Diabetes Care 7:77-79.

Jilal I, Rajput MC, Asmal AC, Jobert SM (1984): Nephropathy in Indian patients with non-insulin-dependent diabetes in the young. Diabeets Care 7:587-89.

Johansen K (1973): Mild diabetes in young subjects. Acta Med Scand 193:22-33.

Johansen K, Gregerser G, (1977): A family with dominantly inherited mild juvenile diabetes. Acta Med Scandinavia, 201:567-570.

- Johnston C, Owerbach D, Leslie RDG, Pyke DA, Nerup J (1984):* **Mason-type diabetes and DNA insertion polymorphism.** *Lancet* 1:280-285.
- Kadowaki T, Bevins E, Cama A, Ojama K, Marcus-Samuels B, Kadowaki H, Beitz L, McKeon C, Taylor SI. (1988):* **Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance.** *Science* 240:784-787.
- Kadowaki T, Kadowaki H, Rechler MM, Serrano Rios M, Roth J, Gorden P, Taylor SI (1990):* **Five mutant alleles of the insulin receptor gene in patients with genetic forms of insulin resistance.** *J Clin Invest* 86:254-259.
- Kajinuma H, Kaneto A, Kuzuya T, Nakao K. (1968):* **Effects of methacholine on insulin secretion in man.** *J Clin Endocrinol Metab* 28:1384-1389.
- Kaku K, Reents C, Mueckler M, Permutt MA (1988):* **DNA polymorphisms of the human glucose transporter gene: evidence for new genetic markers for NIDDM in a population of diabetic and nondiabetic Blacks.** *Diabetes* 37:90A.
- Kawai K, Ipp E, Orci L, Perrelet A, Unger RH (1982):* **Circulating somatostatin acts on the islets of Langerhans by way of a somatostatin-poor compartment.** *Science* 218:477-480.
- Kaneto A, Kajinuma H, Kosaka K, Nakao K (1968):* **Stimulation of insulin secretion by parasympathomimetic agents.** *Endocrinology* 83:651-657.
- Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Miyazaki J, Tsukuda K, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, (1992):* **Nonsense mutations of glucokinase gene in late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Lancet* 340:1316-1320.
- Keen H (1982):* **Problems in the definition of diabetes mellitus and its subtypes.** In *The Genetics of Diabetes Mellitus*. Köbberling J, Tattersall R, Eds. London, Academic, p. 1-11.
- Kelley DE, Mandarino JL (1990):* **Hyperglycemia normalizes insulin stimulated skeletal muscle glucose oxidation and storage in noninsulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin Invest* 86:1999-2005.

Kilvert A, Fitzgerald MG, Wright AD, Natrass M (1986): **Clinical characteristics and etiological classification of insulin-dependent diabetes in the elderly.** *Q J Med* 60:865-872.

Köbberling J, Bengsch N, Bruggeboes B, Schwarck H, Tillil H, Weber M (1980): **The chlorpropamide alcohol flush: lack of specificity for familial non-insulin dependent diabetes.** *Diabetologia* 19:359-63.

Köbberling J, Tattersall R (1982): **The Genetics of Diabetes Mellitus.** London: Academic Press.

Kolterman OG, Scatlett JA, Olefsky JM (1982): **Insulin resistance in non-insulin-dependent, type II diabetes mellitus.** *Clin Endocrinol Metab* 11:363-367.

Kuzuya T, Matsuda A (1982): **Family histories of diabetics among Japanese patients with type I (insulin-dependent) and type 2 (noninsulin-dependent) diabetes.** *Diabetologia* 22:372-74.

Laakso M, Pyorala K (1985): **Age of onset and type of diabetes.** *Diabetes Care*:8:114-117

Lawson VK, Young RT, Kitabchi AE (1981): **Maturity-onset diabetes of the young: an illustrative case for control of diabetes and hormonal normalization with dietary management.** *Diabetes Care* 4:108-12.

Lee TD, Zhao T, Chi Z, Wrong H, Shen M, Rodey G (1983): **HLA-A, Band HLA-DR phenotypes in mainland Chinese patients with diabetes mellitus.** *Tissue Antigens* 22:92-95.

Leiter EH, Prochazka M, Coleman DI, Serreze DV, Schultz LD (1986): **Genetics factors predisposing to diabetes susceptibility in mice.** In: *Jaworski MA, Molnar GD, Rojofe RV, Singh B* (eds). *The Immunology of Diabetes Mellitus.* Amsterdam: Elsevier, 29-36.

Leiter EH (1989): The genetics of diabetes susceptibility in mice. FASEB 3:2231-2241.

Leiter EH, Coleman DL, Hummel KP, Hummel KP (1981a): The influence of genetic background on the expression of mutation at diabetes locus in mouse III. Effect of H-2 haplotype and sex. Diabetes 30:1029-1034.

Leiter EH, Coleman DL, Eisenstein AB, Strak I (1981b): Dietary control of pathogenesis in C57BL/KsJ db/db mice. Metabolism 30:554-562.

Leiter EH, Coleman DL, Ingram DK, Reynolds MA (1983): Influence of dietary carbohydrate on the induction of diabetes in C57BL/KsJ-db/db diabetes mice. J Nutr 113:184-195.

Lestradet H, Tanret A, Tichet J (1973): Les formes frustes du diabete de l'enfant. J Annu Diabetologie L'Hotel-Dieu 1:133-48.

Li SR, Oelbaum RS, Galton DJ, Baroni MG, Stock J (1994): Association of genetic variant of the glucosa transporter with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet ii:368-370.

Liing Y, Jetton TL, Zimmerman EC, Najafi H, Matschinsky FM, Magnuson MA (1991): Effects of alternate RNA splicing on glucokinase isoform activities in the pancreatic-islet, liver, and pituitary. J Biol Chem 266:6999-7007.

Louie LG and King MC (1991): A novel approach to establish permanent lymphoblastoid cell lines: Epstein-Barr virus transformation of cryopreserved lymphocytes. Am J Hum Genet 48: 637-638.

Magnuson MA, Andreone TL, Prinstz RL, Koch S, Granner DK (1989): Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. Proc Natl Acad Sci USA 86:4838-4844.

Matschinsky FM (1990): Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generador in pancreatic beta cells and hepatocytes. Diabetes 39:647-653.

Melton LJ, Palumbo PJ, Chu C-P (1983): Incidence of diabetes mellitus by clinical type. Diabetes Care 6:75-86.

Modan M, Karasik A, Halkin H, Fuchs Z, Lusky A, Shitrit A, Modan B (1986): Effect of past and current body mass index on prevalence of glucose intolerance and Type 2 (non-insulin dependent) diabetes and on insulin response. Diabetologia 29:82-89.

Mohan V, Ramachandran A, Snehalatha C, Rema M, Bharani G, Viswanathan M. (1985): High prevalence of maturity-onset diabetes of young (MODY) among Indians. Diabetes Care 8:371-74.

Metzer BE (1991): Organizing Committee: Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes 40:197-201.

Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench Y, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF (1985): Sequence and structure of a human glucose transporter. Science 229:941-945.

Naidoo C, Jialal Y, Hammond MG, Omar MAK, Joubert SM (1986): HLA and NIDDM in the young. Diabetes Care 9:436-438

National Diabetes Data Group (1979): Classification of diabetes mellitus and the other categories of glucose intolerance. Diabetes 28:1039-57.

Neel JV, Fajans SS, Conn JW (1965): Diabetes mellitus, in Genetics and Epidemiology of Chronic Disease. Washington, D. C., Public Health Service Publication, p 105-114.

Nelson PG, Pyke DA (1976): Genetic Diabetes not linked to the HLA locus. Br Med J 1:196-97.

O'Dea K (1984): Marked improvement in carbohydrate and lipid metabolism in diabetic Australian Aborigines after temporary reversion to traditional lifestyle. Diabetes 33:596-603.

Olefsky JM: Lilly lecture 1990 (1991): Insulin resistance and insulin action. An in vitro and in vivo perspective. Diabetes 30:148-152.

Omar MAK, Hammond MG, Motala AA, Seedat MA (1988): HLA Class I and II antigens in South African Indians with NIDDM. Diabetes 37:796-799.

Orita M, Susuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989a): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. Genomics 5:874-879.

Orita M, Iwahana H, Kanasawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989b): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci. USA 86: 2766-2770.

O'Rahilly S, Turner RC (1988): Early-onset type 2 diabetes versus maturity-onset diabetes of the youth: evidence for the existence of two discrete diabetic syndromes. Diabetic Med 224-29.

O'Rahilly S, Spivey RS, Holman RR, Nugent Z, Clark A, Turner RC (1987): Type II diabetes of early onset: a distinct clinical and genetic syndrome. Br Med J 294:923-28.

O'Rahilly S, Wainscoat JS, Turner RC (1989): Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: new genetics for old nightmares. Diabetologia 31:407-14.

Ott J (1989): Computer simulation methods in human linkage analysis. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4175-4178.

O'Sullivan JM (1980): Establishing criteria for gestational diabetes. Diabetes Care 3:437-439.

Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Brown JA, Shows TB (1981): The insulin gene is located on the short arm of chromosome 11 in humans. Diabetes 30:267-270.

Owerbach D, Thompsen B, Johansen K, Lamm LU, Nerup J (1983): DNA insertion sequences near the insulin gene are not associated with maturity-onset diabetes of the young people. Diabetologia 25:18-20.

Panzram G, Adolph W (1981): Heterogeneity of maturity onset diabetes at young age (MODY). Lancet 2:986.

Panzram G, Adolph W (1983): Ergebnisse einer Populations studie uber den nichtinsulinabhangigen Diabetes mellitus in Kindes und Jugendalter. Schweiz Med Woch-enschr 113:779-84.

Permutt MA, Chiu KC, Tanizawa I (1992): Glucokinase and NIDDM. A candidate gene that paid off. Diabetes 41:1367.

Pessin JE, Bell GI (1992): Mammalian facultative glucose transporter family: Structure and molecular regulation. Annu Rev Physiol 54:911.

Pillay TS, Langlois WJ, Olfesky JM (1995): The genetics of non-insulin diabetes mellitus. Advances in Genetics 32: 51-97.

Pettitt DJ (1986): The long-range impact of diabetes during pregnancy: the Pima Indian experience. IDF Bulletin 31:70-71.

Pinicus G, White P (1933): On the inheritance of diabetes mellitus. An analysis of 675 family histories. Am J Med Sci;186:1-14.

Pyke DA (1979): Diabetes: the genetic connections. Diabetologia 17: 333-343

Platz P, Jakobsen BK, Svejgaard A, Thomsen BS, Jensen HB, Henningsen K, Lamm LU (1982): No evidence for linkage between HLA and maturity onset diabetes type in young people. Diabetologia 23:16-18.

Polonsky KS, Licinio Paixao J, Given BD, Pugh W, Rue P, Galloway J, Karrison T, Frank B (1986): Use of the biosynthetic human C-peptide in the mesurement of insulin secretion rates in normal vounteers and type I diabetic patients. J Clin Invest 77:98-104.

- Polonsky KS, Rubenstein AH (1986): Current approaches to measurement of insulin secretion. Diabetes Metab Rev 2:315-322.*
- Porte D Jr., Pupo AA (1969): Insulin responses to glucose: Evidence for a two pool system in man. J Clin Invest 48:2309-2314.*
- Porte D Jr, Bagdade JD (1970): Human insulin secretion: An integrated approach. Annu Rev Med 21:219-224.*
- Porte D Jr., Grabe AL, Kuzuya T, Williams RH (1966): The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man. J Clin Invest 45:228-233.*
- Porte D Jr. (1967): A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man. J Clin Invest 46:86-91.*
- Porte D Jr., Williams RH (1966): Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. Science 152:1248-1253.*
- Porte D Jr. (1991): Banting lecture 1990. Beta-cells in type II diabetes mellitus. Diabetes 40:166.*
- Postic C, Niswender KD, Decaux J-F, Parsa R, Shelton KD, Gouhot CC, Petterpher DK, Graner J, Girrad J, Magnuson M (1995): Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific Dnase I hypersensitive sites Genomics 29:740-750.*
- Rimoin DL (1967): Genetics of Diabetes Mellitus. Diabetes 16:346-351.*
- Rimoin DL (1969): Ethnic variability in glucose tolerance and insulin secretion. Arch Intern Med, 124:695-700.*
- Rimoin DL, Schimke RN (1971): Genetic Disorders of the Endocrine Glands. St Luis:CV Mosby, 150-216.*

Rimon DL, Rotter JI (1982): Genetics syndromes associated with diabetes mellitus and glucose intolerance. In: Kobberling J, Tatterall R, (eds). Genetics of Diabetes Mellitus. London: Academic Press, 149 -181.

Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE (1981): Mechanism and significance of insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes 30:990-996.

Robertson RP, Porte D Jr. (1973): The glucose receptor. A defective mechanism in diabetes mellitus distinct from the beta adrenergic receptor. J Clin Invest 52:870.

Rothschild CB, Akots G, Hayworth R, Pettenati MJ, Rao PN, Wood P, Stolz FM, Hansmann I, Serino K, Keith TP, Fajans SS, Bowden DW (1993): A genetic map of chromosome 20 q12-q13.1: Multiple highly polymorphic microsatellite and RFLP markers linked to the maturity-onset diabetes of the young (MODY) locus. Am J Hum Genet 52: 110-123.

Rotter JI, Rimoin DL (1981a): Etiology genetics. In: Brownlee M, (de). Hand-book of Diabetes Mellitus. New York: Garland STPM Press:1:3-93.

Rotter JI, Rimoin DL (1981b): The genetics of the glucose intolerance disorders. Am J Med;70:116-126.

Rotter JI, Vadheim CM, Raffel LJ, Rimoin DL (1984): Genetics, diabetes mellitus heterogeneity, and coronary heart disease. In: Rao DC, Eiston RC, Kuller LH, Feinlieb M, Carter C, Havlik R (eds.). Genetic Epidemiology of Coronary Heart Disease: Past, Present and Future. New York: Alan R. Liss, 445-470.

Rotter JI, Vadheim CM, Rimoin DL (1989a): Genetics of Diabetes mellitus. In: Rifkin H, Porte D (eds.). Diabetes Mellitus, Theory and Practice.4th Edition. New York: Elsevier, 378-413.

Rotter JI, Vadheim CM, Rimoin DL (1992): Diabetes mellitus in The Genetic Basis of Common Diseases, eds King RA, Rotter JI, Motulsky AG, Oxford University Press, Inc pp 413-480.

Sakura H, Eto K, Kodowaki H, Simokawa K, Ueno H, Koda N, Fukushima Y, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1992): **Structure of the human glucokinase gene and identification of a missense mutation in a japanese patient with early onset non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin Endocrinol and Metabol* 75: 1571-1573.

Samols E, Tyler J, Marri G, Marks V (1965): **Stimulation of glucagon secretion by oral glucose.** *Lancet* 2:1257-1262.

Samols E, Harrison J (1976): **Remarkable potency of somatostatin as a glucagon suppressant.** *Metabolism* 25:1495-2000.

Sartor G, Schersten B, Carlstrom S, Melander A, Noerden A, Persson G (1980): **Ten year follow-up, of subjects with impaired glucose tolerance. Prevention of diabetes by tolbutamide and diet regulation.** *Diabetes* 29:41-49.

Schraer C, Lanier AP, Boyko E, Gohdes D, Murphy NJ (1988): **Prevalence of the diabetes mellitus in Alaskan Eskimos, Indians and Aleuts.** *Diabetes Care* 11:693-700.

Seltzer HS, Allen EW, Herron AL Jr., Brennan MT (1967): **Relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus.** *J Clin Invest* 46:323.

Serjeantson SW, Ryan DP, Zimmet P (1981): **HLA and non-insulin dependent diabetes in Fiji Indians.** *Med J Aust* 462-464.

Serjeantson SW, Zimmet P (1982): **Analysis of linkage relationships in maturity-onset diabetes of young people and independent segregation of C-6 HLA.** *Hum Genet* 62:214-216.

Sharp PS, Mohan V, Levey JC, Mather HM, Kohner EM (1987): **Insulin resistance in patients of Asian Indian and European origin with non-insulin dependent diabetes.** *Horm Metab Res*;19:84-85.

Sievers MI, Fisher JR (1985): **Diabetes in North American Indians**. In: National Diabetes Data Group. Diabetes in America; Diabetic Data compiled 1984. U.S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publication No. 85-1468. Washington, D.C., August; XI-1-XI-20.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (1995): **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Vol 1, Seventh Edition. De. Mc Graw Hill.

Steiner DF, Clark JL, Nolan C, Rubenstein AH, Margoliash E, Aten B, Oyer PE. (1969): **Proinsulin and the biosynthesis of insulin**. Recent Prog Horm Res 25:207-215.

Steiner DF, Tager HS, Chan SJ, Nanjo K, Sanke T, Rubenstein AH (1990): **Lessons learned from molecular biology of insulin-gene mutations**. Diabetes Care 13:600-613.

Stern MO, Ferrell RE, Rosenthal M, Haffner SM, Hazuda HP (1986): **Association between NIDDM, Rh blood group and haptoglobin phenotype, results from the San Antonio heart study**. Diabetes 35:387-391.

Stern MP (1992): **Type II diabetes mellitus: interface between clinical and epidemiological investigation**. Diabetes Care 11:119-126.

Stoffel M, Patel P, Lo YM, Hattersely AT, Lucassen AM, Page R, Bell GI, Bel GI, Turner RC, Wainscoat JS (1992a): **Missense glucokinase mutation in maturity-onset diabetes of the young and mutation screening in late-onset diabetes**. Nature Genetics 2:153-159.

Stoffel M, Froguel P, Takeda J, Zouali H, Vionnet N, Nishi S, Weber IT, Harrison RW, Pilkis SJ, Lesage S, Vaxillaire M, Velho G, Sun F, Iris F, Passa P, Cohen D, Bell GI (1992b): **Human glucokinase gene: isolation, characterization and identification of two missense mutations linked to early onset non-insulin dependent (type II) diabetes mellitus**. Proc Natl Acad Sci USA 89:7698-7702.

Stoffel M, Bell KL, Blackburn CL, Powell KL, Seo, TS, Tkeda J, Vionnet N, Xiang K, Gigh-Jain M, Pilkis SJ, Ober C, and Bell GI (1993): Identification of Glucokinase Mutations in Subjects With Gestacional Diabetes Mellitus. Diabetes 42, June.

Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL & Habener JF (1997): Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. Nature Genetics 17 octubre,

Sturis J, Pugh WL, Tang J, Ostrega DM, Polonsky JS, Polonsky KS (1994). Alterations in pulsatile insulin secretion in the Zucker diabetic fatty rat. Am J Physiol 267:E250-E259.

Szathmery EJE (1987): The effect of the Gc genotype on fasting insulin levels of Dogrib Indians. Hum Genet 75:368-372.

Takeda J (1993). Glucokinase mutations. J Biol Chem. 268:15200-204.

Tattersall RB (1974) Mild familial diabetes with dominant inheritance. QJ Med 43:339-57.

Tattersall RB, Fajans SS (1975): A diference between the inheritance of clasical juvenile onset and maturity onset type diabetes of the young people Diabetes 24:44-53.

Tattersal RB (1982). The present status of maturity-onset type diabetes mellitus. In Kobberling J, Tattersall RB (eds.). Genetics of Diabetes Mellitus. New York: Academic Press. 261-270.

Taylor SI (1992): Lilly Lecture 1992: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. Diabetes 41:1473-1482.

Taylor SI, Cama A, Accili D, Barbetti F, Quon MJ, Sierra ML, Suzuki Y, Koller E, Levy-Toledano R, Wertheimer E, Moncada VY, Kadowaki H, Kadowaki T (1992): Mutations in the insulin receptor gene. Endocr Rev 13:566-570.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997): Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 20, Numer 7, July.

Tulloch JA Adamson DG (1976): Dominant inheritance diabetes mellitus. J R Coll Physicians (Lond) 11:86-90.

Vaxillaire M, Vionnet N, Vigouroux C, Sun F, Espinosa R, Lebeau MM, Stoffel M, Lehto M, Beckman JS, Detheux M, Passa P, Cohen D, Schaffingen EV, Velho G, Bell GI, Froguel P (1994): Search for a third susceptibility gene for maturity-onset diabetes of the young. Diabetes 43:389-395.

Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwillinger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P (1995): A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. Nature Genetics 9:418-423.

Vaxillaire M, Rouard M, Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Boriraj VV, Chevre JC, Boccio V, Cox RD, Lathrop GM, Dussoix P, Philippe J, Timsit J, Charpentier G, Velho G, Bell GI and Froguel P (1997): Identification of nine novel mutation in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Human Molecular Genetics 6, 4, 583-586.

Velho G, Froguel P et al (1992): Primary pancreatic-beta-cell secretory defect caused by mutations in the glucokinase gene in kindreds of MODY. Lancet 340:444-448.

Velho G, Vaxillaire M, Boccio V, Charpentier G, Froguel P (1996): Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 locus on chromosome 12q. Diabetes Care 19, september, 915-918.

Velho G, Blanché H., Vaxillaire M, Pellanné-Chantelot C, Pardini VC, Timsit J, Passa P, Deschamps I, Robert JJ, Weber IT, Marotta D, Pilkis SJ, Lipkind GM, Bell GI and Froguel P (1997): Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. Diabetologia 40, (in press).

Voinnet N, Stoffel M, et al. (1992): Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 356:721-722.

Winter WE, Maclaren NK, Riley WJ, Clarke DW, Kappy MS, Spillar RP (1987): Maturity-onset diabetes of youth in black Americans. N Engl J Med 316:285-91.

Weeks DE, Ott J, Lathrop GM (1990): SLINK: a general simulation program for linkage analysis. Am J Hum Genet 47(3):A204 (supplement).

Weigle DS and Kuijper JL (1996): Obesity genes and the regulation of body fat content. BioEssays Vol.18 No. 11.

West KM (1978): Epidemiology of Diabetes and Its Vascular Lesions. New York: Elsevier North Holland, Inc

WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus (1980): Second report on diabetes mellitus. Technical Report Series 646, Geneva, Switzerland, WHO.

Williams RC, Knowler WC, Butler WJ, Pettitt DJ, Lisse JR, Bennett PH, Mann DL, Johnson AH, Terasaki PI (1981) HLA-A2 and type 2 (insulin dependent) diabetes mellitus in Pima Indians: an association of allele frequency with age. Diabetologia 21 460-463.

Wilson RM, van Der Minne P, Deverill Y, Heller SR, Gelsthorpe K, Reeves WG, Tattersall R (1985): Insulin dependence: problems with the classification of 100 consecutive patients. Diabetic Med 2:167-172.

World Health Organization (1985): Diabetes Mellitus, Geneva, World Health Organization Technical Report 727-736.

Wyman AR and White R (1980): A highly polymorphic locus in human DNA. Proc Natl Acad Sci. USA 77:6754-6758.

Xiang KS, Cox NJ, Sanz N, Huang P, Karam JH, Bell GI (1989): **Insulin receptor and apolipoprotein genes contribute to development of NIDDM in Chinese Americans.** Diabetes 38:17-23.

Yalow RS, Berson SA (1960a): **Immunoassay of plasma insulin in man.** J Clin Invest 39:1157-1165.

Yalow RS, Black H, Villazon M, Berson SA (1960b): **Comparison of plasma insulin levels following administration of tolbutamide and glucosa.** Diabetes 9:356-362.

Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire S, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Turner RC, Velho G, Chèvre JC, Froguel P & Bell GI (1996a): **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3).** Nature 384, 455-458.

Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M & Bell GI (1996b): **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3).** Nature 384, 458-460.

Yoshimasa Y, Seino S, Whittaker J, Kakehi T, Kosaki A, Kuzuya H, Imura H, Bell GI, Steiner DF (1988): **Insulin resistant diabetes due to a point mutation that prevents insulin proreceptor processing.** Science 240:784-789.

Zinecker S, Rott HD (1980): **Der autosomal dominante, leichte Diabetes des Jugendalters (MODY).** Klin Paediatr 192:229-34.

Zurlo F, Pietri AO, Harris V, Ongler RH (1981): **Evidence for the hormonal status of somatostatin in man.** Diabetes 30:883-886.

ANEXO

ESTABLECIMIENTO DE UN REPOSITORIO DE LINFOCITOS TRANSFORMADOS.

En la mayoría de las muestras de sangre de las familias MODY (150 muestras) se aislaron linfocitos para su transformación en el virus de Epstein Barr.

Los linfocitos se aislaron a partir de sangre total usando gradientes de Ficoll-Phage y se infectaron con un sobrenadante que contenía partículas del virus Epstein Barr de acuerdo con la metodología propuesta previamente por Louie L, 1991.

MATERIAL Y REACTIVOS:

10 a 20 ml. de sangre completa

Anticoagulante. EDTA 15% pH 8 100 μ l

Ficoll-Paque (Pharmacia Cat. 17-0840-02)

Sobrenadante conteniendo partículas virales del Virus Epstein-Barr (EBV) obtenidas a partir de la línea celular

Medio RPMI 1640 10 X con L-glutamine, sin bicarbonato de sodio. Cat. No. 430-1800 EB.

Penicillin/Estreptomycycin P-0781 Sigma Cell Culture

Fetal Bovine Serum Heat Inactivated F-4135 Sigma Cell Culture-

Dulbecco's phosphate, buffered saline 10X D-PBS Cat. No. 450-1300 EB GIBCO.

L-Glutamine 200 mM G-7513 Sigma Cell Culture.

Antibiotic Antimycotic Solution 100 X A-99C₁ Sigma Cell Culture.

Platos de cultivo de 24 pozos (Cell Culture Cluster 24 Well Catalog. No. 3524 Costa).

Tubos Falcon de 50 ml. estériles

Gradilla para tubos Falcon.

Pipetas de 10 ml. estériles.

Pipetas de 5 ml. estériles.

Pipetas Pasteur.

Sistema de vacío.

Marcador.

Caja de cultivo.

Pipeta Eppendorf.

Puntas Eppendorf.

Campana de Flujo Laminar.

Guantes estériles.

Frascos de cultivo T-55.

Preparación de medio de cultivo RPMI

Suplemento de aminoácidos no esenciales 1X.

Antimicótico 1X.

Penicilina estreptomicina 2X.

SEPARACIÓN DE LINFOCITOS:

La sangre una vez obtenida puede ser conservada un máximo de 72 hrs. a temperatura ambiente.

1. Se realizó una dilución (1:4) de la sangre con buffer PBS (10 ml. de sangre completa más 30 ml. de buffer PBS).
2. En un tubo Falcon de 50 ml. se agregó 10 ml. de Ficoll. Con mucho cuidado y sin romper la fase se agregó por las paredes la dilución de la sangre.
3. Se centrifugó a 1800 rpm. durante 25 min.
4. Se desechó el sobrenadante con sistema de vacío hasta un centímetro por arriba de la interfase para evitar la pérdida de linfocitos. Con una pipeta se retiró la capa de linfocitos y se depositó en otro tubo Falcon de 50 ml.
5. Se lavó la pastilla de linfocitos con PBS, se agregó hasta un volumen de 40 ml. de este buffer y se centrifugó a 1800 rpm por 10 min.
6. Se descartó el sobrenadante con sistema de vacío, con cuidado de no arrastrar el pastilla (linfocitos).
7. Se resuspendieron los linfocitos con unas gotas de PBS que quedaron en el tubo, golpeando la base del tubo.
8. Se agregaron 5 ml. de PBS y se homogeneizó la suspensión de linfocitos con la misma pipeta.
9. En el tubo Falcon de 10 ml. se agregaron 2 ml. de Ficoll y la suspensión de linfocitos. (segunda extracción ver paso 2).
10. Se centrifugó a una velocidad de 1800 rpm. durante 15 min. y se separó la capa de linfocitos (ver paso 4), y se depositó estos en un tubo Falcon de 50 ml.
11. Los linfocitos se lavaron con buffer PBS hasta 40 ml. Ver paso No. 5. Se centrifugó a 1800 rpm. por 10 min.
12. Se desechó el sobrenadante con el sistema de vacío, esta vez el tubo debió de quedar bien seco, sin restos de PBS.
13. Se repitió el lavado similar al paso 11.
14. Se desechó el sobrenadante con sistema de vacío, esta vez el tubo debió quedar bien seco, sin restos de PBS. Se agregó una gota de medio de cultivo sin suero y se resuspendieron los linfocitos golpeando la base del tubo. Una vez resuspendidos los linfocitos se agregó un mililitro de medio y se homogeneizó con la pipeta.
15. Se pasó el homogeneizado a uno de los pozos de la placa de cultivo y se agregó 0.5 ml. de la suspensión del virus de Epstein Barr.
16. Se incubó la placa a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 7% por 12 hrs. (tiempo necesario para que ocurra la infección de las células). Transcurrido ese tiempo se retiró la mitad de medio y se agregó esa misma cantidad de medio de cultivo pero con suero.
17. Después de este paso se cambió el medio cada 3 días de acuerdo al estado de las células.

NOTA: Las células transformadas tienden a agregarse formando cúmulos. Las células son esféricas ligeramente brillantes.

OBTENCIÓN DE ADN.

El ADN genómico se obtuvo a partir de células blancas sanguíneas o de líneas celulares linfocíticas usando el método de extracción que usa proteinasa K, fenol/cloroformo (Wyman A.R. and White. 1980) o el método de extracción corto.

Extracción de ADN. (no requiere fenol/cloroformo)

El ADN fue extraído a partir de sangre periférica o a partir de linfocitos transformados; inicialmente se utilizó el protocolo de extracción de ADN largo, y posteriormente un protocolo de extracción corto.

TÉCNICA CORTA

EXTRACCIÓN SIN FENOL (A PARTIR DE SANGRE TOTAL)

Esta técnica permite obtener rendimientos altos de ADN genómico a través de una muestra muy pequeña de sangre (- 1 ml)

MATERIAL Y REACTIVOS

Tubos cónicos estériles

Tubos eppendorf

puntas de plástico para micropipetas (100, 1000 μ l)

centrífuga

espectrofotómetro

EDTA 15% pH 8

NaCl 5mM

Etanol absoluto (grado biología molecular)

Amortiguador TE 10X

Amortiguador de lisis:

* tris-HCl 10 mM

* tritón X-100 al 1%

* sacarosa 300 mM

1. Se vació en tubo cónico de 15 ml. aproximadamente 3 ml. de sangre fresca con EDTA 15%, pH 8.0.
2. Se adicionó amortiguador de lisis v/v, o hasta el doble de buffer.
3. Se centrifugó 8 min. a 2,000 rpm (no necesario refrigerada).
4. Se despegó la pastilla del fondo del tubo con 500 μ l de amortiguador de lisis pasar a tubo eppendorf de 1.5 ml.
5. Se agitó el tubo eppendorf hasta desintegrar completamente la pastilla.
6. Una vez homogéneo, se centrifugó a 11,500 rpm por 2 min.

7. Se decantó el lisado y se adicionó 1 ml. de amortiguador de lisis. Se homogenizó totalmente. En el caso de que quedaran restos del botón; se resuspendían con pipeta.
8. Se repitieron los pasos 6 y 7 hasta que el lisado fue lo más trasparente posible.
9. Se adicionaron 570 μ l de NaCl 5 mM y se homogenizó muy bien.
10. Se agregaron al homogeneizado 30 μ l SDS al 10%, se resuspendieron; dejar 5 min. en reposo. Se adicionaron 200 μ l de NaCl 5M; se resuspendieron gentilmente durante 5 min. debe quedar fluido para permitir la separación (grumos:proteínas; parte acuosa:ADN).
11. Se centrifugaron a 11,500 rpm por 15 min a 4°C.
12. Se recuperó el ADN decantando en un tubo de 15 ml. y se adicionó el doble del volumen decantado de etanol frío. Se agitó y centrifugó a 3,000 rpm. por 30 min.
13. Se aspiró el etanol con pipeta Pasteur adelgazada de la punta. Se adicionaron 2 ml. de alcohol al 70%.
14. Se centrifugó a 3,000 rpm por 30 min. se aspiró con cuidado de no llevarse el ADN.
15. Se dejó secando por 10 min. en la campana de extracción.
16. Se adicionar buffer TE 10:0.1
17. Se guardó a 4°C.
18. Se cuantificó el ADN espectrofotométricamente.

TÉCNICA LARGA DE EXTRACCIÓN DE ADN. (UTILIZANDO FENOL)

MATERIAL Y REACTIVOS

Tubos cónicos
 Tubos eppendorff
 Centrifuga
 Espectrofotómetro
 Fenol (Grado biología molecular)
 Cloroformo (Grado Biología Molecular)
 Pipetas de plástico para micropipeta (200, 1000 μ l)
 Etanol absoluto
 Amortiguador TE 10/10: Tris 10 mM, EDTA 10 mM

- 1.- Se colectó 10-20 ml de sangre venosa en EDTA al 15%, pH 8 (100 μ l).
- 2.- Se congeló a -80 °C.
- 3.- Se descongeló la sangre para llevar a cabo la lisis con el amortiguador TE 10/10 frío, llegando a un volumen de 50 ml.
- 4.- Se mezcló por inversión y dejar 5 min a 4 °C
- 5 - Se centrifugo a 3000 rpm por 10 min..
- 6.- Se desechó el sobrenadante. Se volvió a repetir desde el paso 3 hasta que la pastilla quedó libre de hemoglobina.
- 7.- Se resuspendió la pastilla en 2 ml. de amortiguador TE 10/5.
- 8.- Se adicionaron 40 μ l proteinasa K (10 mg/ml).

- 9.- Además, se adicionaron 100 µl de SDS al 10%. Se mezcló.
- 10.- Se incubó a 37 °C toda la noche.
- 11.- La solución debe quedar transparente y viscosa. Este lisado se puede guardar a 4 °C por varios meses.

Extracción con fenol.

1. Se añadieron volúmenes iguales de fenol y se mezclaron en agitador a temperatura ambiente por 1-2 hr.
2. Se centrifugaron a 2000 rpm por 30 min. para separar las fases. La fase acuosa superior debe de ser clara. Si no estaba clara se centrifugaban nuevamente por cerca de 15 min.
3. Se transfirió la fase acuosa superior la cual contiene el ADN a un tubo de centrifuga nuevo de 50 ml. Usando una pipeta de plástico para transferir. Se fue muy cuidadoso, no se tomó la capa blanca a la interfase porque esta capa contiene proteínas. Puede ser necesario dejar un poco de la fase de ADN para evitar agitar la capa de proteínas.
4. Se añadió un volumen igual de Cloroformo:alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló por inversión.
5. Se Separaron las fases por centrifugación a 1500 rpm por 5-10 minutos. (3000 rpm X 30 min.)
6. Se transfirió la capa superior acuosa a un tubo nuevo de centrifuga, cuidando no agitar la capa de proteínas de la interfase.
7. Se añadió 0.5 volumen de 7.5 M de acetato de amonio y se mezcló bien.
8. Se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló. El ADN precipitó fibras blancas.

SECUENCIACION DE ADN.

Debido a que en población francesa el exón 7 del gen de la enzima glucocinasa tiene mayor prevalencia de mutaciones se procedió a secuenciar directamente este exón en todos nuestros pacientes, además de hacer la técnica de PCR-SSCP.

MÉTODO.

Método descrito por SECUENASA.
Versión 2.0. DNA Sequencing Kit.
United States Biochemical (USB)

1. Se preparó la dilución de la mezcla de marcado (1:10).
2. Se preparó la dilución de la enzima 1:7 con el amortiguador de dilución de la enzima.
3. Se marcaron los tubos Eppendorff de 1.5 ml: G, A, T y C, donde n es el número de reacciones de secuencia; se agregaron 2.5 µl del dideoxinucleotido correspondiente.
4. Se marcaron los tubos Eppendorf para cada mezcla de reacción.

5. Se prepararon los baños de incubación a 48 °C y 94 °C.

Desnaturalización por DMSO.

1. Se disolvió el ADN en 7 µl de agua (se pueden usar 7 µl de producto de la reacción en cadena de la polimerasa -PCR-)
2. Se agregó 1 µl de oligonucleotido (concentración 100 ng/µl).
3. Se agregó 1 µl de DMSO y se agitó.
4. Se incubó a 95 °C durante 3 min.
5. Se dió un pulso a la centrífuga.
6. Se sumergieron los tubos en una charola con etanol y hielo seco, de tal manera que no se borraran los números.
7. Se dió un pulso en la microfuga.
8. Se descongeló en la mano y se comenzó la reacción de marcado (Labelin Reaction)

Reacción de marcado (labeling reaction).

1. Se agregó a cada muestra 2 µl de amortiguador de secuencia.
2. Se agregó 1 µl de DTT (0.1M).
3. Se agregó 2 µl de mezcla de reacción diluida.
4. Se agregó ATP* (0.7 para la reacción standard y 1.5 para la reacción extendida).
5. Se agitó ligeramente en vortex.
6. Se agregó la enzima secuencia diluida.
7. Se agitó ligeramente en vortex.
8. Se incubó a temperatura ambiente durante 3 min para reacciones standard y 5 min para reacciones extendidas.
9. Se precalentaron los tubos con ddNTPs a 48 °C 1 minuto antes de que terminara la reacción de marcado.
10. A cada tubo se le agregaron 3 µl de reacción en la orilla de cada tubo con ddNTPs.
11. Se dió un pulso en la microfuga para parar todas las reacciones al mismo tiempo.
12. Se incubaron los tubos por 3 min a 48 °C.
13. Se agregaron 4 µl de solución de parada (*stop solution*) en la orilla de cada tubo y se dió un pulso en la microfuga para detener todas las reacciones al mismo tiempo.

•Las reacciones se pueden guardar a -20 °C por un máximo de 24 horas antes de correr el gel.

TÉCNICA DE PCR-SSCP.

La técnica de PCR-SSCP (polimerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) se basa en el principio de que una hebra sencilla de ADN ó ARN de diferentes secuencias exhiben diferentes movibilidades durante la

electroforesis en geles no-denaturalizantes de poliacrilamida. La estrategia de éste método es amplificar el segmento de interés de un gene con PCR y entonces comparar la movilidad del ADN desnaturalizado con una secuencia de referencia conocida. Las mutaciones puntuales de una secuencia siempre cambian el corrimiento de dicha secuencia en el gel. Dentro de condiciones no-denaturalizantes una hebra de ADN de doble hebra exhibe una estructura plegada. Entonces en el análisis de SSCP, la detección de una secuencia mutada se determina por el cambio de movilidad en la electroforesis del gel de poliacrilamida. La longitud y la secuencia del fragmento de PCR determinan completamente la informatividad del método. La demostración de las diferentes movilidades en diferentes fragmentos se logra de la incorporación de ^{32}P dCTP en un fragmento de PCR y por medio de una autorradiografía (Shuldiner 1992). Orita et al, (1989a,1989b) reportó que usando PCR-SSCP fue capaz de demostrar todas las mutaciones (12 de 12) en varios fragmentos de PCR del gene RAS (fragmentos de 103 y 162 pb). Además el método se ha usado para la detección de polimorfismos en las repeticiones de Alu (Orita 1990), en el gen del receptor de la dopamina humana D2 (Bolos 1990) y en el gene p53 (Murakami 1991). Sarkar y col. (1992) han demostrado en un estudio sistemático, en condiciones óptimas y dependiendo del tamaño de los fragmentos de PCR que el método de PCR detecta el 92% (fragmento de 183 pb) y 59% (fragmento de 307 pb) de todas las mutaciones.

Crítico para la reproducibilidad del método es el procedimiento de electroforesis. Se debe evitar en todas las circunstancias el calentamiento del gel durante la electroforesis, ya que esto podría alterar definitivamente el corrimiento de las muestras. La composición de la matriz del gel tiene una influencia considerable sobre la corrida de las muestras y a éste respecto es adecuada la siguiente concentración (Sarkar 1992; Rolfs, 1992): el porcentaje de $^{\prime}\text{N}^{\prime}$, ethylen bis-acrilamide de 5% del total de acrilamida, a una concentración total de acrilamida de 5% (Hayashi 1991) y la adición de 5-10% de glicerol.

La interpretación de la presencia de mutaciones en los geles de SSCP puede ser difícil, por otra parte cabe la posibilidad de la presencia de secuencias idénticas en donde una hebra de ADN se separa en dos ó más bandas en el gel (Murakami 1991). Este fenómeno se puede deber a varias causas:

- 1.- Diferencias ligeras en la temperatura entre la región cerca del vidrio y la parte media del gel.
- 2.- Las hebras están en un estado de transición de dos conformaciones (Hayashi 1991).
- 3.- Una denaturalización incompleta del fragmento de ADN de doble hebra.

Síntesis de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos que se usaron son los descritos por Stoffel M y col. 1992, estos se sintetizaron en el laboratorio y están listados en la **TABLA 5**:

Aparato. Oligo 1000, DNA Synthesizer. BECKMAN
Kit de síntesis de oligonucleotidos de BECKMAN.

Reactivos.
Columnas de síntesis (G,A,T,C)
Amiditas (G,A,T,C)

Exón	oligonucleótido 5'	oligonucleótido 3'	tamaño (pb)
1a	5'-TCCACTTCAGAAGCCTACTG	5'-TCAGATTCTGAGGCTCAAAC	195
1b	5'-AGCAGGCAGGAGCATCTCTG	5'-GCTGCTCTCCCAGTGCAAAG	149
1c	5'-CCAGACTCTCCTCTGAACTC	5'-GAAGAAGAGGTTCCATCTGA	145
2	5'-TGCAGATGCCTGGTGACAGC	5'-CACAGCTGCTTCTGGATGAG	290
3	5'-TAATATCCGGCTCAGTCACC	5'-CTGAGATCCTGCATGCCTTG	295
4	5'-TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG	5'-TGAAGGCAGAGTTCCTCTGG	272
6	5'-CCAGCACTGCAGCTTCTGTG	5'-GAGCCTCGGCAGTCTGGAAG	178
7	5'-AGTGCAGCTCTCGCTGACAG	5'-CATCTGCCGCTGCACCAGAG	285
8	5'-TGCCTGCTGATGTAATGGTC	5'-TGAGACCAAGTCTGCAGTGC	263
9	5'-ACTGTCCGGACGCACACTCAG	5'-CTTGGAGCTTGGGAACCGCA	367
10	5'-GTCGACTGCGTGCAGGGCGC	5'-TGTGGCATCCTCCCTGCGCT	263

TABLA 3. Pares de oligonucleótidos sintetizados para amplificar cada exón.

Adicionalmente se sintetizaron 2 oligonucleótidos para amplificar 237 pb de la región 3' del gen:

oligonucleótido sentido 5'-GCGGCAGGAGCAGGAACAGAG-3'

oligonucleótido antise 5'-GTCTAGGTAATGGTCAAGGTTG-3'

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando 50 ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, 0.1 mCi/ml de $\alpha^{32}\text{P}$ (Amersham 3000 Ci/mmol), 1 mM dNTPs, 1.5mM y 1 unidad de Taq polimerasa (Perkin Elmer) en un volumen de reacción de 10 μl .

Las temperaturas de alineamiento se escogieron de acuerdo con la T_m (melting temperature) de los pares de oligonucleótidos y se muestran en la **TABLA 6**. El análisis de PCR-SSCP de los productos amplificados se realizó como lo describe Orita y col., 1989a, 1989b. Se corrieron geles de poliácridamida al 5% con y sin glicerol al 10% (vol/vol) a temperatura ambiente a corriente constante de 6-12 W por 5-12 hrs. Se analizó al menos un miembro afectado de cada familia (un total de 31 sujetos afectados y 11 controles no diabéticos).

No. EXON	1a	1b	1c	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tm °C	58	64	58	63	60	65	62	60	65	62	64	68

TABLA 6. Temperaturas de alineamiento (°C) para la amplificación de cada exón.

PREPARACIÓN DE GELES.

a) GEL DE POLIACRILAMIDA-UREA (5%) PARA PCR-SSCP.

REACTIVOS:

Agua

Acrilamida al 30%. (bis-acrilamida 29:1)

285g Acrilamida (grado secuenciación)

15g N,N'-methylene bisacrylamide.

600 ml de H₂O. Se disolvió en calor a 37 °C. Se ajustó el volumen a 1 lit con H₂O destilada. Se filtró la solución a través de filtro de nitrocelulosa y almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad.

Buffer TBE 10X

TEMED

fosfato de amonio al 10%

CONDICIONES:

REACTIVOS:	CON GLICEROL	SIN GLICEROL
GLICEROL	10 ml	--
ACRILAMIDA 30%	19.95 ml	19.95 ml
AGUA	59.25 ml	69.25 ml
BUFFER TBE 10X	10 ml	10 ml
PERSULFATO DE AMONIO	250 ml	250 ml
TEMED	50 ml	50 ml

b) GEL DE POLIACRILAMIDA PARA SECUENCIACION (5%).

REACTIVOS Y MÉTODO:

Agua

Acrilamida al 30%. (bis-acrilamida 29:1)

Urea

Buffer TBE 10X

TEMED

fosfato de amonio al 10%

1.- Se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 ml: 33 ml de agua, se añadió 12 ml de acrilamida al 30%, además 34.5g de Urea, y 5 ml de buffer TBE 10X.

2.- Se agitó, y se filtró.

3.- Se añadió a la mezcla anterior 190 μ l de fosfato de amonio al 10% y 75 μ l de TEMED.

4.- Se cargó la solución rápidamente entre los vidrios para la electroforesis porque se polimeriza rápidamente.

5.- Se esperó aproximadamente 45 min. a que se polimerizara y antes de proceder a cargar las muestras.

6.- Se recorrió el gel 15 min. con buffer TBE 1X.

7.- Se cargaron las muestras.

8.- Ya que se había corrido el gel hasta donde se requería, se apagó la fuente de poder.

9.- Se procedió a fijar el gel con una mezcla de ácido acético glacial y alcohol metílico al 10% en H₂O. Ya fijado (15 min), se lavó con H₂O y se pegó en un papel filtro grueso, el gel se cubrió con papel plástico y se secó en el secador de geles por una hora.

10. Con el detector de radioactividad se estimó la cantidad de radioactividad en el gel seco, con el fin de definir el tiempo requerido de exposición al film de autoradiografía

10.- Se expuso a temperatura ambiente una noche o más dependiendo de la cantidad de radiactividad detectada.

11.- Se procedió

c) MINIGEL DE POLIACRILAMIDA-UREA (20%)(bis-acrilamida 19:1)

Se utilizó para observar los oligonucleótidos recién sintetizados.

REACTIVOS Y MÉTODOS:

acrilamida 20%

urea

buffer TBE 10X

persulfato de amonio TEMED

agua

1.- A 5 ml de acrilamida (19 ml acrilamida más 1 ml de bis-acrilamida), se añadieron 5.1 g de Urea y 1 ml de buffer TBE + 1 ml de agua.

2.- Se agitaron con poco calor y se filtró.

3.- Se añadió 25 μ l de persulfato de amonio y 10 μ l de TEMED.

- 4.- Se colocó la mezcla en una cámara de electroforesis para geles pequeña, y se esperó a que se polimerizara, se procedió a correr los oligonucleótidos y el oligonucleótido de peso molecular conocido como control.
- 5.- Se expuso el gel con pantallas intensificadoras aproximadamente 20 min. a - 80 °C ambiente.
- 6.- Se revelar.

d) GEL DE AGAROSA PARA ANALIZAR PRODUCTOS DE PCR. (1.8%)

MATERIALES Y REACTIVOS:

cámara de electroforesis para geles de agarosa
agarosa
agua
buffer TAE 1X
bromuro de *etidium*

Para 250 ml:

- 1.- Se agregó en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml: 4.5 grs de agarosa, 5 ml de buffer TAE 50X, 245 ml de agua (milli Q).
- 2.- Se disolvió con calor (microondas), después se le puso un agitador magnético y se agitó hasta que se disolvió completamente la agarosa (transparente).
- 3.- Una vez tibio se añadió 10 µl de una solución de bromuro de *Etidium* de 10 mg/ml).
- 4.- Se vertió la agarosa en una cámara para electroforesis.
- 5.- Se colocaron los peines y se esperó a que polimerizara la agarosa.
- 6.- Se cargaron las muestras en los pozos y se cargó un marcador de peso molecular adecuado al fragmento amplificado.
- 7.- Se observó en el transiluminador de luz UV.

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR EN AGAROSA. (TÉCNICA DE POLVO DE VIDRIO)

Los fragmentos amplificados de el exón 7 se corrieron en un gel de agarosa y se purificaron para posteriormente secuenciarlos.

MATERIAL Y MÉTODO:

Polvo de vidrio
NaCl 6M
Vortex
Solución de lavado (Etanol 70%, NaCl 1M)

MÉTODO:

- 1.- Se cortó la banda de interés del gel de agarosa y se depositó en un tubo Falcon de 15 ml.
- 2.- Se agregó 500 μ l de solución de NaI 6 M a cada pedazo de gel.
- 3.- Se incubó a 55 °C por 3 min. con agitación en Vortex.
- 4.- Se incubó en hielo durante 1 min.
- 5.- Se agregó 10 μ l de la suspensión de Polvo de vidrio (muy bien mezclada).
- 6.- Se incubó en hielo durante 15 min.
- 7.- Se transfirió a un tubo Eppendorf.
- 8.- Se centrifugó a velocidad máxima durante 3 min. Hay que tener cuidado con la orientación del tubo para la posición de la pastilla.
- 9.- Se lavó la pastilla 3 veces con 700 μ l de *WASH SOLUTION* fría (etanol 70%, NaCl 1M) (resuspendiendo la pastilla completamente cada vez).
- 10.- Se eluyó ADN con agua destilada (el doble de polvo de vidrio) para PCR a 55 °C, agitando en vortex.
- 11.- Se incubó a 55 °C durante 5 min.
- 12.- Se agitó en vortex.
- 13.- Se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min.
- 14.- Se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a otro tubo Eppendorf.
- 15.- Se secó en el Savant.

Analysis of the Glucokinase Gene in Mexican Families Displaying Early-Onset Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Including MODY Families

Laura del Bosque-Plata,¹ Eduardo García-García,² Salvador Ramírez-Jiménez,¹ Javier Cabello-Villegas,¹ Laura Riba,¹ Amir Gómez-León,³ Gerardo Vega-Hernández,⁴ Nelly Altamirano-Bustamante,⁵ Raul Calzada-León,⁵ Carlos Robles-Valdés,⁶ Fernando Mendoza-Morfin,⁷ Oliva Curiel-Pérez,⁷ and M. Teresa Tusié-Luna^{1*}

¹Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México y del Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

²Clinica de Diabetes del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

³Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁴Dirección General de Cómputo Académico Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁵Servicio de Endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

⁶Servicio de Especialidades Médicas del Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

⁷Departamento de Endocrinología del Hospital General del Centro Médico Nacional, "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

Non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is the most common form of diabetes, affecting 5% of the general population. Genetic factors play an important role in the development of the disease. While in other populations NIDDM is usually diagnosed after the fifth decade of life, in Mexico a large proportion of patients develop the disease at an early age (between the third and the fourth decade). In Caucasian population, mutations in the glucokinase gene, the TCF1, and TCF14 genes, have been identified in a subgroup of early-onset NIDDM patients denominated MODY (maturity-onset diabetes of the young), which show an autosomal dominant pattern of inheritance. As a first step in the molecular characterization of Mexican families displaying early-onset NIDDM we searched for mutations in the glucokinase gene through SSCP analysis and/or direct sequencing in 26 individuals from 22 independent families, where at least four can be classified as MODY. No mutations were detected in the

exons or the intron-exon boundaries of the gene in any of the screened individuals. The phenotype and clinical profile of some of the studied patients is compatible with that of patients carrying mutations in the TCF1 or TCF14 genes, while others may carry mutations in different loci. Through computer simulation analysis we identified at least four informative families which will be used for further linkage studies. *Am. J. Med. Genet.* 72:387-393, 1997. © 1997 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: glucokinase gene; Mexican population

INTRODUCTION

Non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is among the most common chronic diseases, affecting about 5% of the general population [World Health Organization, 1985]. In Mexico its prevalence reaches 8% [Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, 1994]. Although this entity has a strong genetic component as revealed by familial aggregation [Pillay et al., 1995] and studies of identical twins [Barnett, 1981; Pyke, 1979], the majority of the affected families do not exhibit a strictly mendelian pattern of inheritance [Rotter et al., 1992; Ghosh and Schork, 1996], indicating that this type of diabetes is multifactorial and most

Contract grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México; Contract grant number: IN 207493.

*Correspondence to: María Teresa Tusié-Luna M.D. Ph.D., Instituto Nacional de Pediatría, Apto. Postal 101-48, México D.F. 04530. E-mail: tusie@servidor.unam.mx

Received 23 August 1996; Accepted 7 April 1997

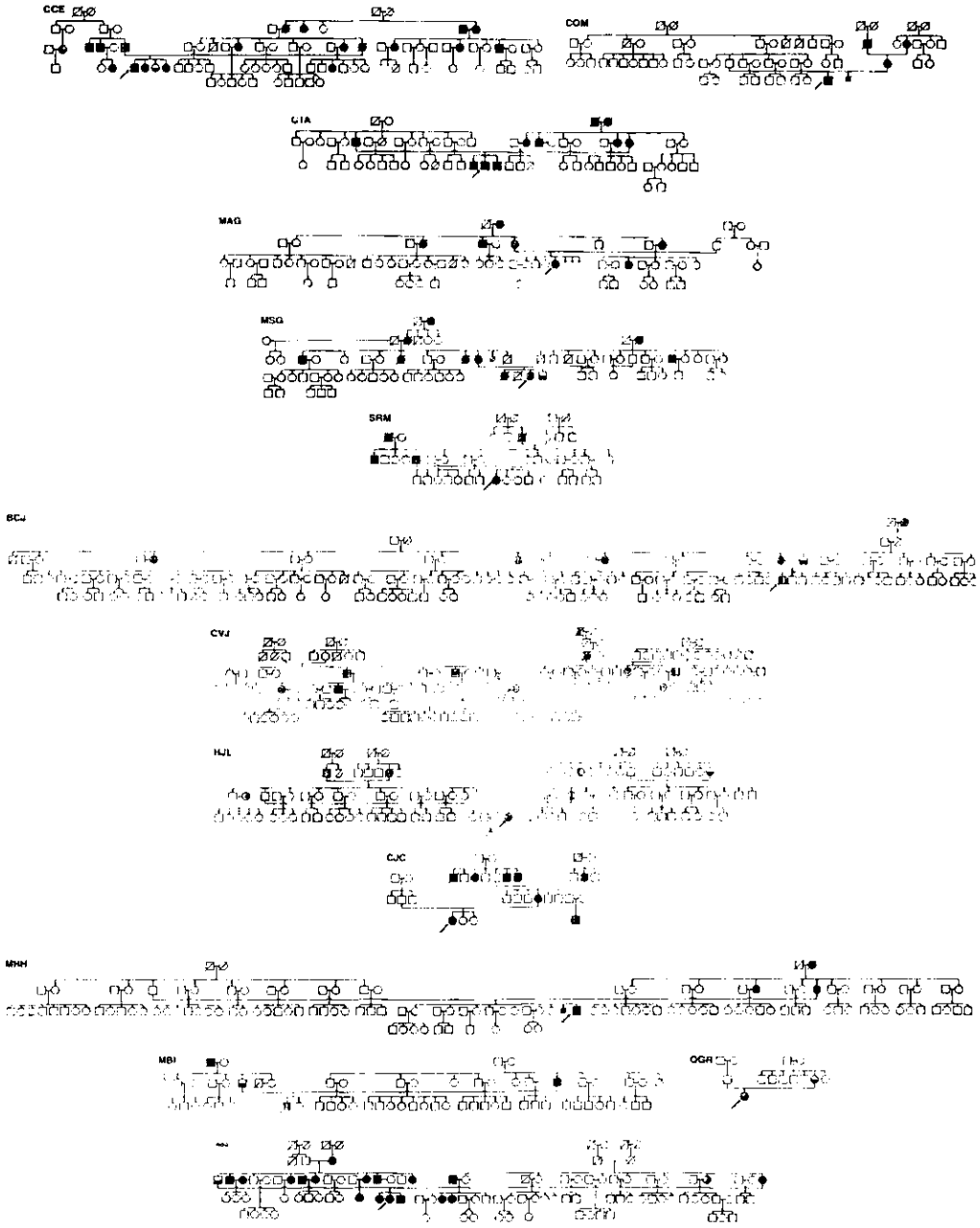


Fig. 1

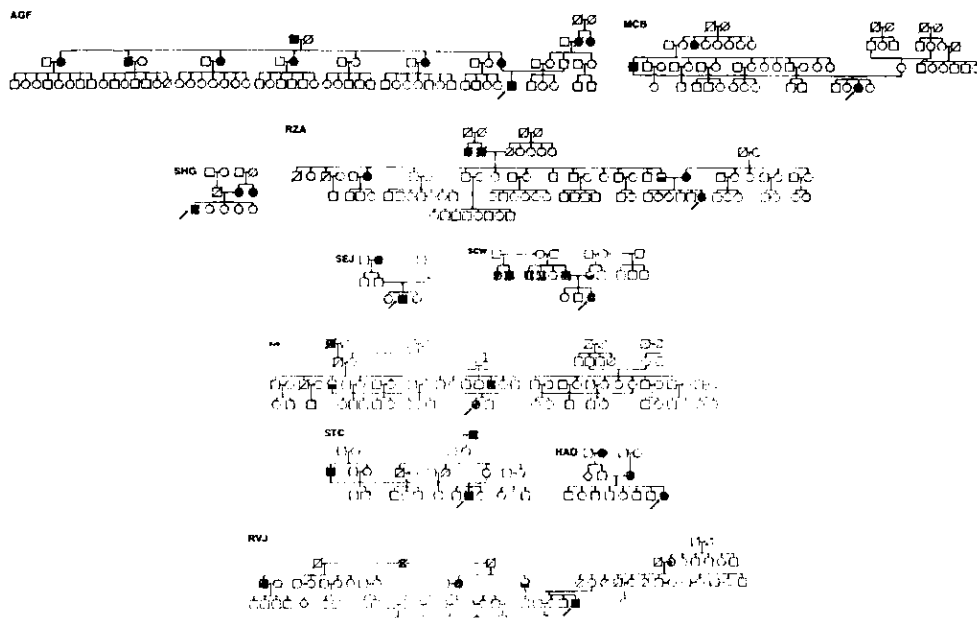


Fig. 1. Pedigrees of the families studied. The initials of the pedigrees correspond to the families listed in Table 1. Untested members for fasting hyperglycemia and glucose tolerance are indicated. ○, Early-onset NIDDM; ◐, late-onset NIDDM; ●, intolerant; ◉, unaffected by OTTC; ◌, asymptomatic, untested

likely a polygenic disease. There is a subgroup of NIDDM patients which develops the disease at an early age and shows a dominant mode of inheritance. This type of diabetes, denominated MODY (maturity-onset diabetes of the young) has been shown to be genetically heterogeneous, with different genes affected in different families [Fajans et al., 1994; Bowden et al., 1992], which makes it a good model to identify genes involved in the etiology of NIDDM. Mutations in the glucokinase gene appear in 56% of a group of French MODY families [Stoffel et al., 1992; Froguel et al., 1992, 1993]. In about 25% of these French families the affected gene (TCF1) was mapped to chromosome 12q [Vaxillaire et al., 1995; Yamagata et al., 1996a]. A third gene (TCF14) was mapped to chromosome 20 in an extended Caucasian pedigree [Bell et al., 1991; Yamagata et al., 1996b]. In a Japanese study, mutations in the glucokinase gene were sought in a large group of diabetic patients under the age of 40, including three MODY individuals [Sakura et al., 1992; Eto et al., 1993]. Only one missense mutation was identified in exon 7 in one of the three MODY patients, indicating that MODY is a genetically heterogeneous disease within and among different populations. Studies with several candidate genes involved in glucose homeostasis and insulin secretion have ruled out their participation in the expression of the MODY phenotype in the French population [Vaxillaire et al., 1994]. More recently, a genome-wide search using genetic markers spread throughout the genome allowed the identifica-

tion of a marker on chromosome 2 linked to NIDDM in Mexican-American families [Harris et al., 1996] and evidence for linkage was found for regions on chromosomes 6 and 11 in a subgroup of Mexican-American diabetic patients [Stern et al., 1996]. Therefore, with informative pedigrees the most likely approach to identify new genes involved in the development of NIDDM is to perform linkage analysis using a set of polymorphic markers spread throughout the genome [Bowden et al., 1992; Cox et al., 1992]. With this in mind, we collected genealogical information as well as clinical data on 22 Mexican families displaying early-onset NIDDM, including at least four MODY families, comprising more than 900 members and established a permanent repository (immortalized lymphocytes) of approximately 150 cell lines. As a first step in the characterization of these families, we have screened for mutations in the glucokinase gene through PCR-SSCP analysis and/or direct sequencing.

MATERIALS AND METHODS

Subjects Studied

Consent was obtained from all participants through their attending physicians. Twenty-four families were studied. Twenty-two of them have family members with early-onset NIDDM and two families have probands displaying insulin-dependent diabetes (IDDM) (families HAD, RVJ). Four of the 22 early-onset NIDDM families can be classified as MODY [Fajans,

1990) (CCE, COM, CTA, and MAG) (Fig. 1). The probands in these four families display: 1) NIDDM with an autosomal dominant mode of inheritance in at least three consecutive generations, 2) an age of onset younger than 35 years old, and 3) at least one additional affected member younger than 35 years old. In families CCE, CTA, and MAG, most of the members of the younger generations have not yet been tested with the glucose tolerance test (OGTT). All of them are under 30 years old and are presently asymptomatic. In families CCE and COM, an autosomal dominant pattern of inheritance with about 50% of affected members is sustained in at least two generations (Fig. 1). In family CCE, the father of the proband displays late-onset NIDDM; however, the maternal side exhibits a MODY type of NIDDM. Also, the transmission pattern in this pedigree is compatible with maternal inheritance (Fig. 1). Three more families could be classified as MODY if the autosomal dominant pattern of inheritance is proven once OGTT determinations are performed (pedigrees MSG, SRM, BCJ) (Fig. 1). In the remaining fifteen families (CVJ, HJL, CJC, MHH, MBI, QGR, RGG, AGF, MCB, SHG, RZA, SEJ, SCW, OJA, STC), there is no clear mendelian pattern of inheritance. Eight of these families have NIDDM members on both the paternal and maternal sides, and most of the probands are obese or overweight, suggesting a polygenic form of diabetes (CVJ, HJL, RGG, AGF, RZA, SEJ, SCW, STC) (Fig. 1).

Once OGTT determinations are performed in most members of the second and third generations we expect

to recognize a larger number of affected individuals, making likely, in some families, the possibility of an autosomal dominant pattern of inheritance. Results of OGTT determinations will also allow us to perform linkage analysis with all known phenotypes, considering the possibility of reduced penetrance in some families.

Normal controls for PCR-SSCP analysis included 11 unrelated nondiabetic individuals greater than 60 years of age selected from the non-affected side of the same diabetic families.

Diagnosis

Individuals were considered affected if they have been treated for NIDDM, or if the results of fasting glycemia or OGTT showed them to have diabetes or impaired glucose tolerance (IGT) according to the World Health Organization or the National Diabetes Data Group criteria [WHO Expert Committee, 1980; National Diabetes Data Group, 1979].

Clinical features of the studied patients are presented in Table I.

Determination of Islet Cell Antibodies (ICAs) in Patients

Due to the high proportion of patients who are treated with insulin, islet cell antibodies were measured in all probands to identify those having an autoimmune component. Undiluted sera were screened for conventional ICA-IgG through indirect immunofluo-

TABLE I. Phenotypic and Clinical Profile of the Studied Patients¹

Patient	Age Dx	Insulin Tx	Other Tx	BMI	Fasting glycemia at diagnosis (mg/dl)	Fasting glycemia under treatment (mg/dl)	Complications	ICAs	Ketacidosis
1 CCE	13	-	Diet	22.6	250	180	-	-	-
2 COM	13	-	Diet + exercise	18.3	364	85	-	-	-
3 CTA	17	-	Diet	37.2	280	70	-	-	-
4 MAG	14	+	Exercise	17.2	210	120	-	+	-
5 MSG	12	-	Diet	36.3	225	95	-	-	-
6 SRM	15	+	-	18.4	400	120	-	-	+
7 BCJ	13	+	Diet	18.5	360	80	-	-	-
8 CVJ	11	+	-	28	250	90	-	-	+
9 HJL	11	-	Diet	38.4	280	85	-	-	-
10 CJC	12	+	Hypoglycemics	23.8	500	90	Cataracts	-	-
11 MHH	13	-	Diet	25.9	342	95	-	-	-
12 MBI	15	-	Diet + exercise	21.3	380	80	-	-	-
13 QGR	10	+	-	25.6	444	180	-	-	+
14 RGG	13	+	Diet	30.4	350	250	-	-	-
15 AGF	09	+	-	19.5	398	62	-	-	-
16 MCB	12	-	Diet	27.3	400	85	-	-	-
17 SHG	15	-	Hypoglycemics	28.2	300	145	-	-	-
18 RZA	13	+	Diet	27.7	180	80	-	-	-
19 SEJ	13	+	-	27.2	220	93	-	-	-
20 SCW	14	+	-	26.1	750	80	-	-	+
21 OJA	13	+	-	24.5	280	80	-	-	-
22 STC	12	+	-	18.6	400	250	-	-	-
23 HAD	15	+	Hypoglycemics	28.5	264	130	-	+	-
24 RVJ	13	+	-	27.7	448	100	-	+	+

¹Twenty-four families were studied. Twenty-two display early onset non-insulin-dependent diabetes mellitus and two more were classified as having IDDM. Body mass index (BMI) is given in kg/m². Normal weight was considered between 19 and 24 kg/m² for females and between 20-25 for males. Values above 30 kg/m² were considered as obesity for both sexes. Dx, diagnosis; Tx, treatment; islet cell antibodies (ICAs) were assayed as described in Materials and Methods.

rescence on 4 μm crystal sections of human pancreas, as previously described [Bottazo et al., 1974]. The ICA titer in all sera was measured through a serial twofold dilution in PBS. The same pancreatic specimen was used for testing all sera in this study. Every assay included positive and negative unblinded calibrators and blind serial dilutions of the same positive and negative control sera. Sections were read blind by two members of the team. In case of discrepancy in the readings, a third reading was sought by an additional member of the team [Bottazo and Gleichman, 1986]. End point titers were converted to JDFU (Juvenile Diabetes Foundation Units) [Bonifacio et al., 1988]. The threshold of ICA detection was 4 JDFU. Only three patients were positive for ICAs: MAG, HAD, and RVJ. The corresponding titers are 32, 32, and 80 JDFU.

Insulin Treatment

In those patients treated with insulin, its administration was started after a documented failure of diet and sulfonylurea drugs. Failure is defined as sustained fasting glycemia greater than 140 mg/dl, ketosis, or abnormalities in growth rate.

Establishment of the Repository of Transformed Lymphocytes

Peripheral lymphocytes were isolated from total blood using Ficoll-Phage gradients and infected with a supernatant containing Epstein-Barr virus, as described previously [Louie and King, 1991]. After one to four weeks in culture, proliferating clones were recovered, amplified, and frozen in liquid nitrogen.

PCR-SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism) and Sequence Analysis

Genomic DNA was obtained from peripheral white blood cells or from lymphocyte cell lines using the proteinase-K, phenol/chloroform extraction method, as described previously [Wyman and White, 1980]. PCR primers were previously reported [Stoffel et al., 1992]. These primers were designed to amplify all the exons from the glucokinase gene as well as the exon/intron junctions. Two additional oligonucleotides were synthesized to amplify 237 bp from the 3' end of the gene (sense 5'-GCGGCAGGAGCAGGAACAGAG-3' and antisense 5'-GTCTAGGTCTGGTCAAGCTGTTG-3'). PCR amplifications were carried out using 50 ng of DNA, 10 pmol of each primer, 0.1 μC of ^{32}P dCTP (Amersham 3000 Ci/mmol), 1 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl_2 and 1 unit of Taq polymerase (Perkin Elmer) in a reaction volume of 10 μl .

Annealing temperatures were chosen according to the T_m for each primer pair. SSCP analysis of the amplified PCR product was performed, as described previously [Orita et al., 1989a,b]. Samples were run in 5% polyacrylamide gels both in the absence or presence of 10% glycerol (vol/vol) at room temperature at 6–12 watts for 5–15 hr. At least one affected member from each family was studied.

Computer Simulation Analysis

In order to evaluate the potential informative value of the studied families in linkage studies, we performed

a series of computer simulations using allelic frequencies determined for D20S17, a marker linked to MODY on chromosome 20 [Rothschild et al., 1993]. We analyzed 11 families where age data on every individual was available (pedigrees CVJ, CCE, HJL, MSG, MHF, MBI, RGG, AGF, MCB, OJA, MAG) assuming autosomal dominant inheritance in all of them (Fig. 1). The LINKAGE software version 5.2 was used. Maximum LOD scores were determined at 0, 0.1, and 0.5 recombination fractions [Ott, 1989; Weeks et al., 1990] under the three parameters defined for the MODY Caucasian pedigree RW [Bowden et al., 1992]: 1) autosomal dominant model, 2) age-dependent penetrance, and 3) disease allele frequency of 1%. A total of 1,000 replicates were generated and analyzed for each family. Allelic frequencies for the marker D20S17 were determined in 69 unrelated healthy Mexican individuals [Berumen-Campos et al., 1994].

RESULTS

PCR-SSCP analysis of the glucokinase gene in at least one affected individual from each family detected no mutations in any of the exons or the exon/intron boundaries screened. Only a single polymorphism was detected in the 3' non-coding region of the gene (nucleotide 361 from the stop codon) in four of the 28 patients and in three of the eleven nondiabetic controls. A nucleotide change G \rightarrow A was observed by direct sequencing at this position, confirming that the SSCP analysis was able to detect alterations in mobility due to a single nucleotide change.

Because close to 40% of the reported mutations in the glucokinase gene are present in exon 7, in addition to PCR-SSCP, exon 7 was analyzed by direct sequencing. No deletions, insertions, or point mutations were detected in any of the studied patients. Previously reported sequence polymorphisms were not detected within this region.

Allelic frequencies were determined for the marker D20S17 in 69 unrelated individuals from the Mexican population. These frequencies were significantly different from those previously reported for the Caucasian population ($P = 0.0008$) [Rothschild et al., 1993]. Assuming an autosomal dominant model and complete penetrance, four of the eleven families analyzed by computer simulation gave a maximum LOD score greater than 3 (families CVJ, CCE, HJL, MCB) (Table II) and four additional families gave maximum LOD scores greater than 2 (families MSG, MHF, AGF, OJA) (Fig. 1) at recombination fraction of zero.

When simulations were run considering age-dependent penetrance, one of the families analyzed (CVJ) gave a LOD score greater than 3 and two more displayed a LOD score greater than 2 (AGF and MSG) at recombination fraction of zero, indicating their potential informative value when determining linkage to loci that exhibit age-dependent or incomplete penetrance.

DISCUSSION

We have shown that mutations in the glucokinase gene are not found in any of the 22 early-onset NIDDM

TABLE II. Results of the Computer Simulation Analysis in Some of the Studied Families*

Family	Non-complete penetrance	Complete penetrance	Complete penetrance	Complete penetrance
0	0.0	0.0	0.1	0.5
1 CCE	—	6.58	6.58	2.45
4 MAG	1.07	1.11	1.11	2.45
5 MSG	2.19	2.99	2.99	1.87
8 CVJ	3.36	4.22	4.22	2.25
9 HJL	1.79	3.60	3.60	1.50
11 MHH	1.55	2.39	2.39	2.39
12 MBI	1.41	1.80	1.80	1.80
14 RGG	0.97	1.80	1.80	1.80
15 AGF	2.27	2.41	2.41	2.40
16 MCB	—	4.19	4.19	2.16
21 OJA	—	2.23	2.23	2.22

*Maximum LOD scores are shown considering complete and non-complete penetrances at zero, 0.1, and 0.5 recombination fractions (θ).

Mexican families, including four MODY families, nor in the IDDM families studied. The PCR-SSCP analysis included the entire coding region as well as the intron/exon junctions.

According to the phenotypic and clinical profile displayed by the four MODY patients it is likely that they represent a genetically heterogeneous group. Despite the fact that three of these patients are well controlled with diet or exercise (COM, CTA, and MAG), as MODY patients linked to glucokinase, their age of onset is higher than that displayed by the MODY French patients (14.6 ± 2.1 vs. 7 ± 4), and one of them (CTA) presents obesity, a phenotypic feature not found among French patients. In this particular patient, whose grandfather displays late-onset NIDDM, obesity seems to be transmitted from the maternal side. The profile of patients COM, CTA and MAG is certainly different from that of patients showing linkage with chromosome 12 markers who are usually treated with insulin or hypoglycemic agents and have more severe fasting glycemias (142.2 ± 55.8 vs. 91.6 ± 25.6) [Vaxillaire et al., 1995]. Patients linked to MODY 1 locus (chromosome 20) also require insulin and/or oral hypoglycemic agents and about 25% present obesity [Fajans, 1990]. Only patient CCE displays moderate hyperglycemia with diet as the only treatment. His clinical profile may be compatible to that of MODY patients linked to markers on chromosomes 12 or 20. According to our simulation data, it should be possible to assess linkage to these loci in this pedigree.

It is unknown whether Mexican patients carry a defect in insulin secretion, as has been shown for MODY patients carrying glucokinase mutations [Froguel et al., 1992; Velho et al., 1992] or those showing linkage to chromosome 20 [Fajans, 1990]. Studies to evaluate pancreatic reserve, insulin resistance, or defects in insulin secretion have not yet been performed on our group of patients.

The clinical profile of patient MAG is rather interesting in the sense that even though she has positive islet cell antibodies, the patient has not developed a requirement for insulin since diagnosis three years ago. It will be of interest, however, to follow her evolution and see if insulin requirement develops with time.

This particular phenotype may represent a variant of the classic MODY patients described by Fajans [1990], in which members from the RW pedigree showing linkage to chromosome 20 markers do not develop autoimmunity, as determined by the presence of islet cell antibodies.

The absence of glucokinase mutations among our Mexican patients suggests that the glucokinase gene is unlikely to act as a major locus in the susceptibility to develop diabetes in our early-onset NIDDM families, nor as the single responsible gene in the MODY Mexican families studied. It is still possible that mutations exist within the promoter region or at the introns far from the intron/exon junction. However, so far there is no reported evidence for the presence of regulatory mutations in the glucokinase gene since all French MODY patients showing genetic linkage with polymorphic markers near the glucokinase locus carry mutations within the coding region of the gene or at the consensus donor/acceptor splicing sequences [Froguel et al., 1993]. Linkage analysis using markers near the glucokinase locus will be useful in determining this possibility in the informative families.

Due to the high prevalence of NIDDM in the Mexican population, marriage between diabetic subjects is not uncommon. Most of the early-onset NIDDM subjects may develop the disease at an early age as a consequence of having both maternal and paternal inheritance. However, in some families an autosomal dominant pattern of inheritance can be recognized. Due to the heterogenous nature of MODY, some of these families may carry defective genes different from those identified in the Caucasian population, making them a valuable resource in the identification of new genes implicated in the development of the disease.

For the majority of our families where a non-mendelian form of diabetes is recognized, the most likely approach of having informative pedigrees is the testing for linkage using markers on chromosomes 2, 6, and 11, found to segregate in diabetic Mexican-American families [Hanis et al., 1996; Stern et al., 1996]. At least four of the eleven families analyzed by computer simulation have proved to be informative for further linkage studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jaime Berumen for providing the DNA samples used to determine the allelic frequencies of markers on chromosome 20, Dr. Alejandro Zentella for critical reading of the manuscript, and Biol. Salvador Gamboa for helping us prepare the figures.

REFERENCES

- Barnett AH (1981): Diabetes in identical twins: A study of 200 sibpairs. *Diabetologia* 20:87-93.
- Bell GI, Xiang K, Newman MV, Wu S, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, Cox N (1991): Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1484-1488.
- Berumen-Campos J, Casas-Avila L, Mendoza-Hernández A, Salinas-Segura E, Medina-León R, Larriva-Sahad J (1994): Diversidad genética

- de tres sondas de DNA en la huella digital de DNA de una población mexicana. *Rev Invest Clin* 46:467-464.
- Bonifacio E, Lemmark A, Dawkins RL (1988): Serum exchange and use of dilutions have improved precision of measurement of islet cell antibodies. *J Immunol Methods* 106:83-88.
- Bottazzo GF, Flonin Christensen A, Doniach D (1974): Islet cell antibodies in diabetes mellitus with polyendocrine disease. *Lancet* Vol II (No. 7894):1279-1283.
- Bottazzo GF, Gleichman H (1986): Immunology and diabetes workshops: Report of the first international workshop on standardization of cytoplasmic islet cell antibodies. *Diabetologia* 29:125-126.
- Bowden DW, Akota G, Rothschild CB, Falls KP, Sheehy MJ, Hayward C, Mackie A, Baird J, Brock D, Antonarakis SE, Fajans SS (1992): Linkage analysis of maturity onset diabetes of the young (MODY): Genetic heterogeneity and nonpenetrance. *Am J Hum Genet* 50:607-610.
- Cox N, Xiang KS, Fajans SS, Bell GI (1992): Mapping diabetes-susceptibility genes: Lessons learned from search for DNA marker for maturity onset diabetes of the young. *Diabetes* 41:401-407.
- Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (1994): Publicación de la Secretaría de Salud. Mexico.
- Eto K, Sakura H, Shimokawa K, Kodowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Kodowaki T (1993): Sequence variations of the glucokinase gene in Japanese subjects with NIDDM. *Diabetes* 42:1133-1137.
- Fajans SS (1990): Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care* 13:49-64.
- Fajans SS, Bell GI, Bowden DW, Halter JB, Polansky KS (1994): Minireview: Maturity onset diabetes of the young. *Life Sci* 55:413-422.
- Froguel PH, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougerouse F, Tanizawa Y, Weissenbach J, Beckmann JS, Lathrop GM, Passa PH, Permutt MA, Cohen D (1992): Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356:162-164.
- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Pharm D, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt A, Beckmann J, Bell GI, Cohen D (1993): Familial hyperglycemia due to mutations in the glucokinase gene. *N Engl J Med* 328:697-702.
- Ghosh S, Schork NJ (1996): Genetic analysis of NIDDM. The study of quantitative traits. *Diabetes* 45:1-14.
- Hanis LC, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin/Ewens KJ, Shephard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzsch H, Schoroder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Linder T, Mereu LE, Wang YQ, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI (1996): A genome-wide search for human non-insulin dependent (type II) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet* 13:161-166.
- Louie LG, King MC (1991): A novel approach to establish permanent lymphoblastoid cell lines: Epstein-Barr virus transformation of cryopreserved lymphocytes. *Am J Hum Genet* 48:637-638.
- Menzel S, Yamagata K, Jeffrey B, Nerup J, Permutt A, Fajans SS, Menzel R, Iwasaki N, Omori Y, Cox N, Bell GI (1995): Localization of the MODY3 to a 5-cM region of human chromosome 12. *Diabetes* 44:1408-1413.
- National Diabetes Data Group International Workshop (1979): Classification of diabetes and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039-1057.
- Orita M, Susuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989a): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.
- Orita M, Iwahana H, Kanasawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989b): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770.
- Ott J (1989): Computer simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4175-4178.
- Pillay TS, Langlois WJ, Olfsky JM (1995): The genetics of non-insulin diabetes mellitus. *Adv Genet* 32:51-97.
- Pyke DA (1979): Diabetes: The genetic connections. *Diabetologia* 17:333-343.
- Rothschild CB, Akota G, Hayworth R, Pettenati MJ, Rao PN, Wood P, Stolz FM, Hansmann I, Serino K, Keith TP, Fajans SS, Rowden DW (1993): A genetic map of chromosome 20 q12-q13.1: Multiple highly polymorphic microsatellite and RFLP markers linked to the maturity onset diabetes of the young (MODY) locus. *Am J Hum Genet* 52:110-123.
- Rotter JI, Vadheim CM, Rimoin DL (1992): Diabetes mellitus. In King RR, Rotter JI, Motulsky AG (eds): "The Genetic Basis of Common Diseases." Oxford: Oxford University Press, pp 413-480.
- Sakura H, Eto K, Kodowaki H, Shimokawa K, Ueno H, Koda N, Fukushima Y, Akanuma Y, Yazaki Y, Kodowaki T (1992): Structure of the human glucokinase gene and identification of a missense mutation in a Japanese patient with early onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metabol* 75:1571-1573.
- Stern M, Duggirala R, Mitchell B, Reinhart L, Shivakumar S, Shipman P, Uresandi O, Benavides E, Blangero J, O'Connell P (1996): Evidence for linkage of regions of chromosomes 6 and 11 to plasma glucose concentrations in Mexican Americans. *Genome Res* 6:724-734.
- Stoffel M, Froguel P, Takeda J, Zouali H, Vionnet N, Nishi S, Weber IT, Harrison RW, Pitkin SJ, Lesage S, Vaxillaire M, Velho G, Sun F, Iris F, Passa P, Cohen D, Bell GI (1992): Human glucokinase gene: Isolation, characterization and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin dependent (type II) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci* 89:7698-7702.
- Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P (1995): A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet* 9:418-423.
- Vaxillaire M, Vionnet N, Vigouroux C, Sun F, Espinosa R, Lebeau MM, Stoffel M, Lehto M, Beckmann JS, Dethoux M, Passa P, Cohen D, Schaffinger EV, Velho G, Bell GI, Froguel P (1994): Search for a third susceptibility gene for maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes* 43:389-395.
- Velho G, Froguel P, Clement K, Pueyo ME, Rakotoambinina B, Zouali H, Passa P, Cohen D, Robert JJ (1992): Primary pancreatic beta-cell secretory defect caused by mutations in glucokinase genes in kindreds of maturity onset diabetes of the young. *Lancet* 340:444-448.
- Weeks DE, Ott J, Lathrop GM (1990): SLINK: A general simulation program for linkage analysis. *Am J Hum Genet* 47:A204.
- WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus (1980): Second report on diabetes mellitus. Technical Report Series 646. Geneva, Switzerland, WHO.
- World Health Organization (1985): Diabetes mellitus. Geneva World Health Organization Technical Report 727-736.
- Wyman AR, White R (1980): A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6754-6758.
- Yamagata K, Furata H, Oda Y, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI (1996b): Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384:458-460.
- Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furata H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop M, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda Y, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Turner RC, Velho G, Chevre JC, Froguel P, Bell GI (1996a): Mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384:455-458.