

Diabetes Mellitus Neonatal Transitoria Tipo 1

Natalia Pardo Lorente

Programa de Regulación Génica, Células Madre y Cáncer, Centro de Regulación Genómica, Barcelona

Correo electrónico: natalia.pardo@crg.eu

RESUMEN

La diabetes mellitus neonatal transitoria tipo 1 (DMNT₁) es una enfermedad de impronta caracterizada por la aparición de diabetes mellitus durante el primer año de vida, con resolución espontánea de la misma en los primeros 18 meses. Además de la diabetes, los pacientes pueden presentar otras manifestaciones clínicas de diferente tipo y severidad. La causa genética de la DMNT₁ es la alteración del locus improntado 6q24, que incluye los genes *PLAGL1* e *HYMAI*, cuya expresión es exclusivamente paterna. Actualmente, existen tres etiologías descritas: la disomía uniparental paterna del cromosoma 6, duplicaciones del cromosoma 6 paterno, o la pérdida de metilación en el alelo materno. Dichas alteraciones genéticas dan lugar a un mismo fenotipo: la sobreexpresión de la copia paterna de los genes improntados *PLAGL1* e *HYMAI*, siendo *PLAGL1* el principal candidato como gen causante de la DMNT₁. Por otro lado, algunos pacientes presentan alteraciones de impronta multi-loci, y por tanto, una presentación clínica más heterogénea. La mitad de dichos pacientes presenta variantes patogénicas en el factor de transcripción *ZFP57*, que parece estar implicado en el mantenimiento de la metilación del ADN. Además, estudios en modelos animales y pacientes han revelado la implicación del locus 6q24 en el desarrollo del páncreas y en la funcionalidad de las células beta pancreáticas, demostrando que es la vía de secreción de insulina en respuesta a glucosa la que está afectada en la DMNT₁. Finalmente, aunque la mayoría de pacientes con DMNT₁ manifiestan una presentación de diabetes similar, independientemente del mecanismo molecular, es crucial conocer la etiología genética de la DMNT₁ con el fin de determinar el riesgo de recurrencia en futuras generaciones. En un futuro cercano, una investigación más exhaustiva de la DMNT₁ contribuirá a expandir nuestro conocimiento sobre las enfermedades de impronta genómica y a un mejor manejo clínico de estos pacientes.

Palabras clave: Diabetes mellitus neonatal, enfermedad de impronta genómica, epigenética

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus neonatal transitoria (DMNT) es una enfermedad rara que se caracteriza por la aparición de diabetes mellitus durante el primer año de vida, con una resolución espontánea de la misma en los primeros 18 meses. Sin embargo, la diabetes puede reaparecer durante la infancia, adolescencia o edad adulta. Su incidencia se estima en 1:300.000 (Wiedemann *et al.*, 2010).

Existen tres formas de DMNT con una etiología genética diferente. La DMNT tipo 1 (DMNT₁) o diabetes mellitus relacionada con el locus 6q24 [OMIM: 601410] es una enfermedad causada por alteraciones en los genes improntados localizados en el locus 6q24, mientras que la DMNT tipo 2 [OMIM: 610374] y tipo 3 [OMIM: 610582] resultan de alteraciones germinales en los genes *ABCC8* y *KCNJ11*, respectiva-

mente, que codifican para subunidades de un canal de potasio sensible a ATP y que se encuentran ambos en el locus 11p15.1 (Smith, 1996). También se han identificado alteraciones en los genes *INS* (Garin *et al.*, 2010), *HNF1B* (Yorifuji *et al.*, 2004; Edghill *et al.*, 2006) y *NEUROG3* (Rubio-Cabezas *et al.*, 2014) asociadas a diabetes neonatal transitoria.

En este ensayo se describe la patogénesis de la DMNT₁, una enfermedad producida por alteraciones en la impronta genómica. La impronta genómica es un proceso biológico que se caracteriza por el establecimiento de marcas epigenéticas, principalmente en regiones CpG, en las que se produce una metilación diferencial en ciertos loci durante la gametogénesis (e incluso a nivel postzigótico), lo que resulta en una expresión génica específica del origen parental. Los loci improntados contienen genes con funciones clave en el desarrollo, crecimiento y metabo-

mo. Por ello, alteraciones en estas regiones improntadas pueden dar lugar a enfermedades de impronta (Monk *et al.*, 2019).

DESCRIPCIÓN CLÍNICA

Los pacientes con DMNT1 desarrollan hiperglicemia durante su primera semana de vida, aunque la diabetes se resuelve de manera espontánea en los primeros 18 meses. Es importante recalcar que no se detectan autoanticuerpos frente a las células de los islotes pancreáticos en estos pacientes, lo que permite descartar un proceso autoinmune. Además, normalmente, no es necesaria la administración de insulina (Valerio *et al.*, 2004; Boonen *et al.*, 2013).

La presentación clínica de la diabetes va acompañada de deshidratación y ausencia de cetoacidosis. Otras manifestaciones clínicas frecuentes son un retraso de crecimiento intrauterino durante el embarazo, y un peso (pero no talla) al nacer inferior a la media, debido a los niveles insuficientes de insulina en el útero. Con el tiempo, una vez la diabetes ha remitido, los parámetros de crecimiento vuelven a la normalidad. Se han reportado también algunas anomalías congénitas en infantes con DMNT1, como macroglosia y hernia umbilical (Temple y Mackay, 2005; Shield, 2000; Temple *et al.*, 2000; Rica *et al.*, 2007; Yorifuji *et al.*, 2018). Asimismo, los pacientes con alteraciones de impronta multi-loci pueden presentar retraso en el desarrollo, afectación neurológica, sordera, hipotonía, enfermedades cardíacas congénitas y malformaciones renales (Temple y Mackay, 2005).

Frecuentemente, los episodios de hiperglicemia vuelven a aparecer durante la infancia o la adolescencia, especialmente durante el transcurso de una enfermedad (Shield *et al.*, 1997). Además, se han reportado casos donde los pacientes desarrollan hipoglicemia hiperinsulínica tras la remisión de la diabetes, que podría deberse a un exceso en la secreción de insulina (Flanagan *et al.*, 2013). Desafortunadamente, una considerable proporción de pacientes con DMNT1 adquiere una diabetes permanente durante la adolescencia o edad adulta joven, que podría ser consecuencia de una disfunción pancreática residual.

Esta diabetes se caracteriza por una disminución de la secreción de insulina, ausencia de anticuerpos de islotes pancreáticos y un peso corporal normal, con similitud a la diabetes MODY (diabetes de la edad madura que se presenta en el joven) (Temple y Mackay, 2005; Shield, 2000; Temple *et al.*, 2000; Yorifuji *et al.*, 2018). En dicho caso, la diabetes se puede tratar con insulina, sulfonilureas o controlando la dieta. Ante una falta de respuesta al tratamiento, otras alternativas para disminuir los niveles de glucosa en sangre son el uso de inhibidores de la β -glucosidasa, gliptinas o glinidas (Yorifuji *et al.*, 2018).

ETIOLOGÍA CLÍNICA

La primera persona que sugirió que la DMNT1 podría ser una enfermedad de impronta fue David Haig en 1994 (Haig, 1994), quien además postuló anteriormente que los genes de la insulina estaban improntados. En 1995, Temple y sus colaboradores corroboraban esta hipótesis al descubrir que los pacientes con DMNT1 presentaban con frecuencia una disomía uniparental paterna del cromosoma 6. Este descubrimiento sugería la presencia de un gen improntado que estaría implicado en la función de las células beta pancreáticas durante el desarrollo fetal y neonatal (Temple *et al.*, 1995).

Un año después, el grupo de investigación de Temple describía otros casos de DMNT1 debidos a duplicaciones del cromosoma 6, cuyo patrón de herencia apoyaba la hipótesis de una enfermedad de impronta, ya que la enfermedad solo se manifestaba en pacientes con duplicaciones paternas mientras que, si portaban duplicaciones maternas, eran asintomáticos. Sus experimentos sugerían que el gen causante de la DMNT1 se encontraba en la región cromosómica 6q22.33—q23.3 y que presentaba impronta materna. De esta manera, si solo se expresa la copia paterna del gen improntado, la disomía uniparental paterna y la duplicación paterna del cromosoma 6 resultarían ambos en la sobreexpresión de dicho gen y, por tanto, en el mismo fenotipo (Temple *et al.*, 1996).

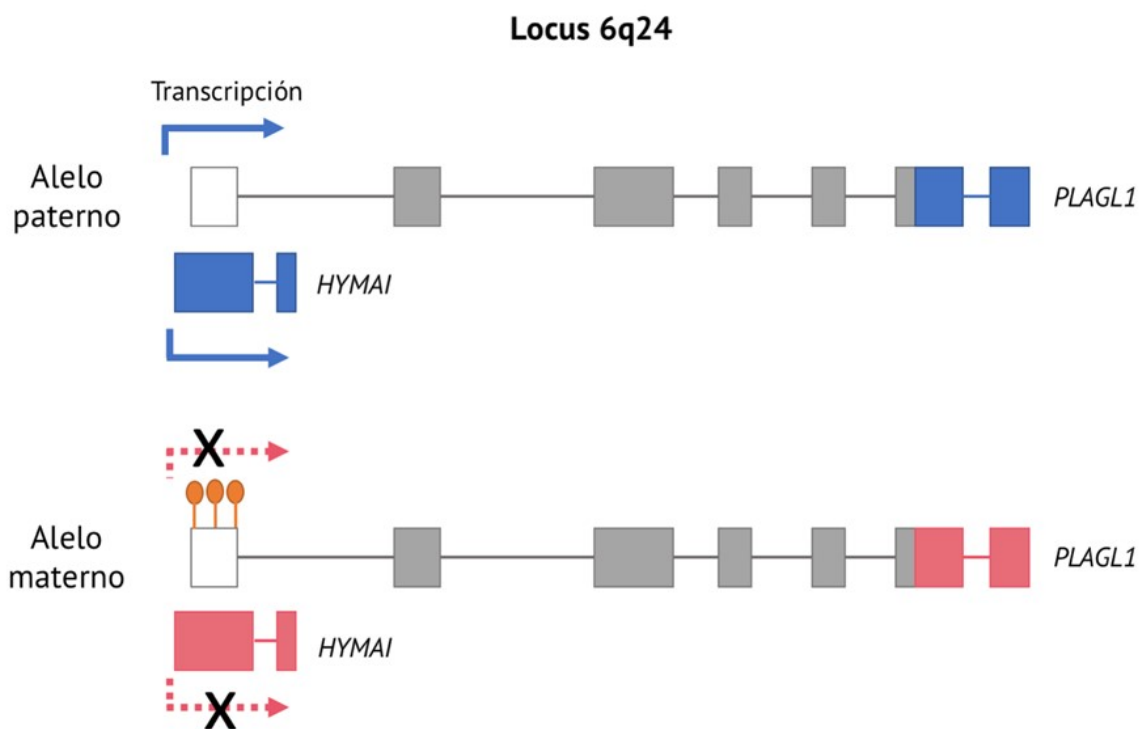
En el año 2000, el mismo grupo refinaba la región improntada a un área de 300-400 kilobases situada

en la región cromosómica 6q24 que incluía seis islas CpG. De hecho, descubrieron que, en una de estas islas, los pacientes con disomía uniparental paterna y los controles presentaban un patrón de metilación diferente: en los pacientes se encontraba hipometilada, con dos copias paternas no metiladas, mientras que los controles tenían un alelo materno metilado y un alelo paterno no metilado. Además, estos investigadores describieron un tercer mecanismo molecular implicado en el desarrollo de la DMNT1, que consistía en la pérdida de la metilación en el alelo materno, lo que también conducía a una sobreexpresión del gen improntado. Estos descubrimientos confirmaban la presencia de un locus improntado en la región 6q24 involucrado en la DMNT1 (Gardner *et al.*, 2000).

El locus improntado 6q24 contiene un promotor compartido por dos genes, *PLAGL1* (*pleiomorphic adenoma gene-like 1*), también conocido como *ZAC1* (*zinc finger protein associated with apoptosis and cell-cycle arrest*), e *HYMAI* (*hydatidiform mole associated and imprinted*). En el año 2000, se descubrió que ambos genes estaban improntados en humanos, ya que existía una isla CpG adyacente a dichos genes que

estaba diferencialmente metilada y únicamente se expresaba la copia paterna de ambos genes (Arima *et al.*, 2000; Kamiya *et al.*, 2000). Respaldo esta hipótesis, se observó que, en un paciente con DMNT1 con pérdida de metilación en el alelo materno, la expresión de *PLAGL1* e *HYMAI* ya no era exclusivamente paterna, sino que ambos alelos se expresaban (Mackay *et al.*, 2002).

En resumen, la DMNT1 está causada por alteraciones en el locus improntado 6q24 que conducen a la sobreexpresión de los genes improntados *PLAGL1* e *HYMAI*. Este locus incluye una región diferencialmente metilada, estando metilada en el alelo materno y no metilada en el paterno, lo que resulta en una expresión específica del alelo paterno de los genes *PLAGL1* e *HYMAI* (Figura 1). Actualmente, se conocen tres causas genéticas para la DMNT1: la disomía uniparental paterna del cromosoma 6 (41% de los casos), que puede afectar a un segmento o al cromosoma entero; la duplicación paterna de la región 6q24 (33%), que puede ser *de novo*, heredada o causada por alteraciones cromosómicas, y la pérdida de metilación materna de la región diferencialmente



Locus 6q24 improntado. La región diferencialmente metilada (en blanco) no está metilada en el alelo paterno, lo que resulta en una expresión paterna de los genes *PLAGL1* e *HYMAI*; mientras que sí está metilada en el alelo materno, con la consecuente ausencia de expresión de la copia materna de estos genes. Figura adaptada de Yorifuji *et al.* (2018).

metilada del locus 6q24 (~26%). Este último mecanismo molecular se conoce como epimutación, que puede ser primaria, debido a errores reproductivos o factores ambientales, o secundaria, causada por alteraciones genéticas en elementos *cis* o factores *trans* (Mackay y Temple, 2010; Mackay *et al.*, 2014). Sin embargo, todavía no se conoce si uno o los dos genes *PLAGL1* e *HYMA1* son los genes causantes de la *DMNT1*.

Cabe mencionar que la manifestación clínica de la diabetes no suele variar en función de la etiología genética del paciente. Sin embargo, algunos pacientes con *DMNT1* no desarrollan diabetes neonatal, lo que implica una penetrancia incompleta (Valerio *et al.*, 2004; Blik *et al.*, 2009; Boonen *et al.*, 2013). Otras características fenotípicas sí pueden variar en función del mecanismo molecular. No obstante, pacientes que presentan la misma causa genética pueden desarrollar diferentes alteraciones fenotípicas, por lo que la correlación entre el genotipo y fenotipo no es inmediata (Marquis *et al.*, 2000). Por ejemplo, es más probable que individuos con disomía uniparental paterna desarrollen problemas relacionados con enfermedades recesivas del cromosoma 6. Por otro lado, los pacientes con duplicaciones normalmente no presentan otras complicaciones. Sin embargo, duplicaciones que afecten a varios loci pueden producir otras alteraciones, como retraso mental o disformismo. En cuanto a los pacientes con epimutaciones, aquellos en los que únicamente existe una hipometilación del locus de *DMNT1* tienen una presentación clínica similar a otros casos de *DMNT1*, mientras que los individuos con alteraciones de impronta multi-loci presentan un mayor número de complicaciones (Mackay y Temple, 2010; Yorifuji *et al.*, 2018).

DNMT1 CON ALTERACIÓN DE LA IMPRONTA MULTI-LOCI

Algunos pacientes con *DMNT1* presentan alteraciones en otras regiones genómicas improntadas además del locus 6q24. En este contexto, en el año 2005, Arima y su grupo observaron que algunos individuos con *DMNT1* presentaban una hipometilación de la

región improntada *KCNQ1OT1:TSS-DMR* en 11p15, asociada con el síndrome de Beckwith-Wiedemann (Arima *et al.*, 2005). Otro estudio posterior corroboraba la existencia de una hipometilación materna en mosaico en múltiples loci improntados (*GRB10:alt-TSS-DMR* en 7p21, *MEST:alt-TSS-DMR* en 7q32, *KCNQ1OT1:TSS-DMR* en 11p15 y *PEG3:TSS-DMR* en 19q13) en pacientes con *DMNT1*, que resultaban en manifestaciones clínicas mucho más diversas. Estos descubrimientos sugerían que este síndrome podría estar causado por un fallo en el mantenimiento de la metilación durante una etapa muy temprana del cigoto (Mackay *et al.*, 2006).

Tras estas observaciones, se llevó a cabo un estudio que evaluaba una cohorte de 13 pacientes con hipometilación materna de múltiples loci improntados. Dicho estudio reveló la existencia de variantes patogénicas en homocigosis en el gen *ZFP57* en seis familias consanguíneas y un caso de heterocigosis compuesta. Aparentemente, todos los individuos con hipometilación en el locus 6q24 también presentaban una hipometilación materna en los loci *PEG3:TSS-DMR* y *GRB10:alt-TSS-DMR*, mientras que no se detectaron alteraciones en *ZFP57* en aquellos individuos que únicamente presentaban pérdida de la metilación en el locus 6q24 (Mackay *et al.*, 2008). Posteriormente, la investigación clínica y molecular de 10 familias con *DMNT1* y variantes patogénicas en *ZFP57* corroboraba dichas observaciones. Estos estudios revelaban una pérdida de metilación completa en el locus 6q24, mientras que el grado de hipometilación era variable en los otros loci con impronta materna (Boonen *et al.*, 2013).

El gen *ZFP57* codifica para una proteína de dedos de zinc que se expresa muy pronto durante la embriogénesis. Las variantes patogénicas identificadas eran o bien truncantes o bien con cambio de sentido afectando a dominios funcionales importantes. Debido a la asociación de estas alteraciones con la hipometilación materna en mosaico de regiones improntadas, se cree que *ZFP57* tiene un papel en el mantenimiento de la metilación del ADN durante el desarrollo temprano (Mackay *et al.*, 2008).

No obstante, solo un 50% de los casos de *DMNT1* con alteraciones de la impronta multi-loci están cau-

sados por variantes recesivas bialélicas en *ZFP57*, mientras que la causa del 50% restante se desconoce. Alteraciones en otros factores *trans* involucrados en el establecimiento, mantenimiento y/o eliminación de marcas epigenéticas, o alteraciones de elementos *cis* podrían también resultar en epimutaciones secundarias. Por otra parte, también podrían ocurrir epimutaciones primarias (no relacionadas con alteraciones genéticas) o bien al azar o causadas por factores ambientales. Como ejemplo de ello, un tema de debate actual es la posibilidad de que las técnicas de reproducción asistida causen alteraciones epigenéticas o bien en el gameto o en el embrión, debido a la elevada frecuencia de enfermedades de impronta en niños nacidos por medio de estas técnicas (Pinborg *et al.*, 2016; Uk *et al.*, 2018). Otros factores ambientales que podrían causar alteraciones epigenéticas son deficiencias nutricionales, alteraciones metabólicas o exposición a disruptores endocrinos durante el embarazo (Monk *et al.*, 2019).

CAUSAS DE LA DIABETES

El estudio de la funcionalidad de las células beta pancreáticas en modelos de enfermedad y pacientes ha sido clave para conseguir un mejor entendimiento de cómo un fallo en la impronta genómica conduce a una disfunción pancreática y a hiperglicemia. Ma y colaboradores desarrollaron un modelo de ratón transgénico de *DMNT1* con sobreexpresión del locus 6q24, a partir de múltiples copias de un clon BAC (cromosoma artificial bacteriano) conteniendo los genes *PLAGL1* e *HYMAI*, con el fin de evaluar los efectos de la *DMNT1* en la función pancreática. Este modelo reproducía los fenotipos característicos de la *DMNT1* ya que, únicamente cuando el transgén se heredaba del padre, las crías de ratón presentaban hiperglicemia. Esta hiperglicemia desaparecía en el ratón joven y volvía a aparecer más tarde en la etapa adulta. Observaron que la hiperglicemia neonatal en los ratones era resultado de una síntesis y secreción deficiente de insulina, aunque la masa celular de células beta pancreáticas era normal. Sin embargo, en los ratones jóvenes con un contenido de insulina normal, detectaron un aumento en el número de células

beta pancreáticas. Además, el estudio de dicho modelo de ratón de *DMNT1* a nivel embrionario revelaba una alteración en el desarrollo del páncreas, consistente con la disminución de la expresión de factores de transcripción claves en el desarrollo pancreático (Ma *et al.*, 2004). Estas observaciones demostraban que el locus 6q24 está implicado en el desarrollo del páncreas y en la función de las células beta pancreáticas.

Por otro lado, un estudio *post mortem* de un neonato con *DMNT1* que falleció a los 16 días reveló una ausencia total de células beta productoras de insulina, lo que sugería una implicación del gen causante de la *DMNT1* en el desarrollo de estas células (Blum *et al.*, 1993). Otros investigadores exploraron la funcionalidad de las células beta en pacientes con recaída y observaron que dichas células no respondían a la estimulación con glucosa, pero sí secretaban insulina tras la estimulación con glucagón. La producción y secreción de insulina tras el estímulo de glucosa o glucagón está mediada por dos vías distintas, lo que indicaría que solo la vía de secreción de insulina en respuesta a glucosa está afectada en estos pacientes (Valerio *et al.*, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, la alteración de la impronta en el locus 6q24 de la *DMNT1* da lugar a la sobreexpresión de los genes improntados *PLAGL1* e *HYMAI*. El gen *PLAGL1* codifica para un factor de transcripción de dedos de zinc que participa en el arresto del ciclo celular y apoptosis actuando como un coactivador de p53. Se ha especulado que la sobreexpresión de *PLAGL1* durante el desarrollo del páncreas podría causar la apoptosis de las células beta pancreáticas (Mackay *et al.*, 2002). Por otro lado, *HYMAI* es un transcrito de ARN no codificante, expresado de manera ubicua, con una función desconocida.

Ambos genes *PLAGL1* e *HYMAI* comparten el mismo promotor improntado. Sin embargo, *PLAGL1* presenta otro promotor no improntado. La expresión génica bialélica de *PLAGL1* a partir de este último promotor se ha detectado en el páncreas y en otros tejidos (Valleley, Cordery y Bonthron, 2007). Por tanto, se ha sugerido que la *DMNT1* podría deberse a la sobreexpresión de *PLAGL1* en el feto en un tejido y en una

etapa del desarrollo embrionario específicos, que puede después remitir debido al cambio al promotor no improntado. En dicho contexto, la reaparición de la diabetes podría explicarse por una sobreexpresión residual crónica del gen *PLAGL1* a partir del promotor improntado o por una masa reducida de células beta pancreáticas. Como consecuencia, *PLAGL1* es el principal candidato como gen causante de la *DMNT1*, aunque no se puede excluir la implicación del gen *HYMAI*, ya que se han descubierto otros transcritos no codificantes con un papel importante en enfermedades de impronta (Mackay y Temple, 2010).

En consecuencia, se han llevado a cabo varios estudios para tratar de determinar el rol del gen *PLAGL1* en la presentación de la diabetes. De acuerdo con descubrimientos previos, estudios llevados a cabo en una línea celular de células beta pancreáticas de ratón revelaban que la sobreexpresión de *PLAGL1* afecta negativamente a la producción y secreción de insulina tras la estimulación con glucosa (Du *et al.*, 2012). El primer gen diana de *PLAGL1* que se identificó fue el receptor del polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP). *PLAGL1* reduce la expresión de dicho receptor, cuya función es promover la secreción de insulina estimulada por glucosa por los islotes pancreáticos (Hoffman *et al.*, 1998). Además, la sobreexpresión de *PLAGL1* en células beta murinas permitió la identificación de otro gen diana, *RASGRF1*, cuya expresión está también regulada negativamente por *PLAGL1*, conduciendo a una disminución de la secreción de insulina (Hoffmann y Spengler, 2012). Otros ensayos de expresión génica posteriores han revelado un mayor número de genes diana de *PLAGL1* involucrados en la funcionalidad de las células beta. Hoy en día se conoce que la sobreexpresión de *PLAGL1* conduce a una disminución de la secreción de insulina y a una reducida proliferación de las células beta por medio del aumento de la expresión de *PPAR γ* , *TCF4* y *SOCS3*, y la disminución de la expresión del receptor de PACAP y *RASGRF1* (Hoffmann y Spengler, 2015).

Estos descubrimientos parecen explicar cómo la sobreexpresión de *PLAGL1* produce una diabetes neonatal. No obstante, se requieren más estudios para esclarecer la causa de la remisión espontánea de la

diabetes así como los mecanismos que desencadenan la recaída posterior durante la adolescencia o edad adulta.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA ALTERACIÓN DE LA IMPRONTA

El conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en las enfermedades de impronta ha avanzado considerablemente gracias al estudio de modelos animales. En el contexto de la *DMNT1*, Arima *et al.* descubrieron que la región 6q24 era sintética a la región cromosómica 10A en ratón, donde un análisis de expresión en embriones de ratón revelaba una expresión exclusivamente paterna del gen *Plagl1* en todos los tejidos analizados, sugiriendo que este gen también estaba improntado en ratones (Arima *et al.*, 2000). Asimismo, el mismo grupo descubría posteriormente una posible región reguladora de esta región improntada en el locus sintético de ratón (Arima *et al.*, 2001).

Además, estudios de la línea germinal de ratón revelaban que la metilación del ADN de la región improntada se adquiría en la línea germinal femenina durante un estadio temprano, coincidiendo con la pérdida de expresión de *Plagl1* en los ovocitos. En consonancia, estudios en ovocitos humanos confirmaban también que la impronta en 6q24 es un evento temprano, ya que la metilación en el ADN se puede detectar en ovocitos de folículos primordiales y primarios (Arima y Wake, 2006).

Por otro lado, Li y colaboradores emplearon un modelo de ratón con el fin de elucidar la función del factor *Zfp57* en el establecimiento y mantenimiento de la metilación en regiones improntadas. Mientras que la pérdida de la función de *Zfp57* en el cigoto resultaba en una pérdida parcial de la metilación diferencial del ADN y letalidad parcial, la pérdida de las funciones de *Zfp57* en el gameto femenino y en el cigoto daba lugar a una pérdida total de la metilación diferencial, y por consiguiente, a una mortalidad embrionaria elevada. El mismo estudio revelaba, además, que *Zfp57* es importante para el establecimiento de la impronta en ciertos loci en la línea germinal feme-

nina y para el mantenimiento de la metilación del ADN en loci improntados paternos (*MEG3/DLK1:IG-DMR*) y maternos (*MEST:alt-TSS-DMR*, *PEG3:TSS-DMR* y *NNAT:TSS-DMR*) durante el desarrollo embrionario (Li *et al.*, 2008). Estas observaciones corroboraban el hecho de que variantes patogénicas en *ZFP57* resulten en hipometilación de varios loci improntados.

Asimismo, Quenneville y colaboradores estudiaron el rol de *Zfp57* y su cofactor *Kap1* en células troncales embrionarias de ratón, y observaron que ambos se unen a alelos metilados de regiones del control de la impronta y mantienen la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y la heterocromatina (Quenneville *et al.*, 2011). Por tanto, estas observaciones indicarían que *Zfp57* protege a los loci improntados de la inestabilidad epigenética que existe en la embriogénesis temprana.

Curiosamente, los estudios en modelo de ratón han revelado que *Zfp57* es importante para mantener la impronta materna y paterna en varios genes, pero solo la hipometilación materna se ha observado en humanos. Esto podría explicarse por el hecho de que

la cohorte de pacientes evaluada únicamente incluye pacientes con *DMNT1*. Sin embargo, se requieren más estudios enfocados a caracterizar la función de *ZFP57* en modelos humanos (Mackay y Temple, 2010).

DIAGNÓSTICO Y RIESGO DE RECURRENCIA

Todos los pacientes con sospecha de *DMNT1* deberían someterse a un consejo genético y test genético para determinar el mecanismo molecular responsable de la enfermedad (Tabla 1). Aunque la manifestación de la diabetes es independiente del mecanismo molecular, es importante que se defina la etiología genética de la enfermedad, ya que ésta es clave para determinar el riesgo de recurrencia y proporcionar al paciente y sus familiares un adecuado consejo genético.

Las diferentes alteraciones en la región 6q24 tienen como consecuencia la hipometilación de este locus. Dicha hipometilación se puede detectar por medio de estudios de metilación del ADN mediante la técnica

Tests genéticos moleculares para determinar la etiología genética de pacientes con *DMNT1*.

Alteración	Tecnología	Objetivo	Casos
Hipometilación en el locus 6q24	Secuenciación por bisulfito Southern Blot específico de metilación MS-MLPA PCR específica de metilación	Establecer diagnóstico	100%
UPD	Análisis de marcadores microsatélites polimórficos Microarrays basados en SNP	Determinar mecanismo molecular	~41%
Duplicaciones	PCR cuantitativa PCR de largo alcance MS-MLPA Microarrays basados en oligonucleótidos Microarrays basados en SNP	Determinar mecanismo molecular	~29%
Alteraciones del gen <i>ZFP57</i>	Secuenciación PCR cuantitativa PCR de largo alcance MLPA	Determinar mecanismo molecular	~9%

Adaptado de Temple y Mackay (2005).

MS-MLPA, amplificación múltiple, específica de metilación, de sondas ligadas. PCR, reacción en cadena de la polimerasa. SNP, polimorfismo de nucleótido único. UPD, disomía uniparental.

ca de secuenciación por bisulfito o la técnica de MS-MLPA (amplificación múltiple, específica de metilación, de sondas ligadas), entre otros métodos. Estas técnicas permiten confirmar el diagnóstico de la DMNT1. Sin embargo, puede ser necesario emplear otras pruebas que permiten discernir la etiología genética, y por tanto, determinar el correspondiente riesgo de recurrencia.

Las duplicaciones del locus 6q24 pueden analizarse mediante microarrays cromosómicos, bien microarrays de oligonucleótidos o microarrays de SNP (polimorfismo de nucleótido único), o con métodos alternativos, como el uso de la PCR cuantitativa o mediante la técnica de MS-MLPA, entre otros. Para los estudios de disomía uniparental paterna, ya sea parcial o completa, puede emplearse el análisis de segregación de marcadores microsatélites polimórficos distribuidos a lo largo del cromosoma implicado o los microarrays de SNP (Temple y Mackay, 2005).

En el caso de que no se identifiquen ni duplicaciones ni disomía, se concluye que el mecanismo molecular causante de la DMNT1 es la presencia de epimutaciones. Si estas epimutaciones afectan a otros loci, es importante intentar discernir si tienen una causa genética, por lo que se procede a realizar un test genético para analizar la secuencia del gen *ZFP57* así como posibles duplicaciones o deleciones, con el fin de detectar posibles variantes patogénicas en dicho gen (Temple y Mackay, 2005).

Por otro lado, la recurrencia de la DMNT1 en futuras generaciones depende del mecanismo molecular. Los descendientes de individuos con disomía uniparental paterna no presentan riesgo de recurrencia, ya que la disomía uniparental suele deberse a un error al azar durante la meiosis, a menos que los progenitores presenten otras alteraciones cromosómicas (Mackay y Temple, 2010).

En aquellos pacientes con duplicaciones, es crucial conocer si la duplicación es heredada o *de novo*. Si es heredada del padre, la duplicación se transmitirá de manera dominante. De esta manera, los descendientes de padres portadores tendrían 50% de riesgo de heredar la enfermedad, mientras que las madres portadoras no transmiten la enfermedad (Mackay y Temple, 2010).

Respecto a los pacientes que presentan variantes patogénicas bialélicas del factor *ZFP57*, todos los descendientes serán, como mínimo, portadores. Si la pareja del individuo afectado es asimismo portadora de una alteración en *ZFP57*, cada uno de sus descendientes tiene un 50% de probabilidades de heredar ambos alelos alterados y, por tanto, desarrollarían alteraciones de la impronta multi-loci, y un 50% de probabilidades de ser portador asintomático.

Finalmente, en aquellos pacientes con pérdida de metilación únicamente en el locus de DMNT1 o con hipometilación materna multi-loci sin alteraciones en *ZFP57*, el riesgo de recurrencia no se conoce (Temple y Mackay, 2005; Mackay y Temple, 2010).

CONCLUSIONES

La DMNT1 es una enfermedad de impronta cuyos mecanismos genéticos y epigenéticos se han descrito por medio de la investigación genética de pacientes y familiares. Asimismo, modelos de ratón y estudios humanos han sido cruciales a la hora de comprender cómo este fallo en la impronta genómica conduce a una disfunción de las células beta pancreáticas y para entender los mecanismos moleculares de la impronta. Sin embargo, se requiere una mayor investigación para clarificar porqué la mayoría de los pacientes recaen y para descifrar las causas de las epimutaciones. Todo este conocimiento contribuirá a un mejor manejo clínico de los pacientes y a expandir nuestro conocimiento de las enfermedades de impronta. En resumen, la DMNT1 es un gran ejemplo de la interacción entre genética, epigenética y ambiente en la diabetes mellitus.

BIBLIOGRAFÍA

- Arima, T. et al. A Novel Imprinted Gene, HYMAI, Is Located within an Imprinted Domain on Human Chromosome 6 Containing ZAC. *Genomics*. 2000; 67 (3): 248–255. doi: 10.1006/geno.2000.6266
- Arima, T. et al. A conserved imprinting control region at the HYMAI / ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Human Molecular Genet-*

- ics. 2001; 10(14): 1475–1483. doi: 10.1093/hmg/10.14.1475
- Arima, T. et al. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic acids research*. 2005; 33(8): 2650–2660. doi: 10.1093/nar/gki555
- Arima, T. and Wake, N. Establishment of the primary imprint of the HYMAI/PLAGL1 imprint control region during oogenesis. *Cytogenetic and Genome Research*. 2006; 113(1–4): 247–252. doi: 10.1159/000090839
- Bliek, J. et al. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2009; 17(5): 611–619. doi: 10.1038/ejhg.2008.233
- Blum, D. et al. Congenital absence of insulin cells in a neonate with diabetes mellitus and mutase-deficient methylmalonic acidemia. *Diabetologia*. 1993; 36(4): 352–7. doi: 10.1007/bf00400240
- Boonen, S. E. et al. Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci. *Diabetes Care*. 2013; 36(3): 505–512. doi: 10.2337/dc12-0700
- Du, X. et al. Overexpression of ZAC Impairs Glucose Stimulated Insulin Translation and Secretion in Clonal Pancreatic Beta-Cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28(8): 645–653. doi: 10.1002/dmrr.2325
- Edghill, E. et al. Hepatocyte Nuclear factor-1 Beta Mutations Cause Neonatal Diabetes and Intrauterine Growth Retardation: Support for a Critical Role of HNF-1beta in Human Pancreatic Development. *Diabet Med*. 2006; 23(12): 1301–6. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01999.x
- Flanagan, S. E. et al. Hypoglycaemia following diabetes remission in patients with 6q24 methylation defects – expanding the clinical phenotype. *Diabetologia*. 2013; 56(1): 218–221. doi: 10.1007/s00125-012-2766-z
- Gardner, R. et al. An imprinted locus associated with transient neonatal diabetes mellitus', *Human Molecular Genetics*. 2000; 9(4): 589–596. doi: hmg/9.4.589
- Garin, I. et al. Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(7): 3105–3110. doi: 10.1073/pnas.0910533107
- Haig, D. Is human insulin imprinted? *Nature Genetics*. 1994; 7(1): 10. doi: 10.1038/ng0594-10a
- Hoffman, A. et al. Induction of Type I PACAP Receptor Expression by the New Zinc Finger. *Annals New York Academy Of Sciences*. 1998; 865: 49–58. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11162.x
- Hoffmann, A. y Spengler, D. Transient Neonatal Diabetes Mellitus Gene ZAC1 Impairs Insulin Secretion in Mice through Rasgrf1. *Molecular and Cellular Biology*. 2012; 32(13): 2549–2560. doi: 10.1128/mcb.06637-11
- Hoffmann, A. y Spengler, D. Role of ZAC1 in transient neonatal diabetes mellitus and glucose metabolism. *World Journal of Biological Chemistry*. 2015; 6(3): 95–109. doi: 10.4331/wjbc.v6.i3.95
- Kamiya, M. et al. The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(3): 453–60. doi: 10.1093/hmg/9.3.453
- Li, X. et al. A Maternal-Zygotic Effect Gene, Zfp57, Maintains Both Maternal and Paternal Imprints. *Developmental Cell*. Elsevier Inc. 2008; 15(4): 547–557. doi: 10.1016/j.devcel.2008.08.014
- Ma, D. et al. Impaired glucose homeostasis in transgenic mice expressing the human transient neonatal diabetes mellitus locus, TNDM. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114(3): 339–348. doi: 10.1172/JCI19876
- Mackay, D. et al. Clinical utility gene card for: Transient Neonatal Diabetes Mellitus, 6q24-related. *European Journal of Human Genetics*. 2014; 22(9). doi: 10.1038/ejhg.2014.27
- Mackay, D. J. G. et al. Relaxation of imprinted expression of ZAC and HYMAI in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. *Human Genetics*. 2002; 110(2): 139–144. doi: 10.1007/s00439-001-0671-5

- Mackay, D. J. G. et al. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Human Genetics*. 2006; 120(2): 262–269. doi: 10.1007/s00439-006-0205-2
- Mackay, D. J. G. et al. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nature Genetics*. 2008; 40(8): 949–951. doi: 10.1038/ng.187
- Mackay, D. J. G. y Temple, I. K. Transient neonatal diabetes mellitus type 1. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2010; 154C(3): 335–342. doi: 10.1002/ajmg.c.30272
- Marquis, E. et al. Variable features of transient neonatal diabetes mellitus with paternal isodisomy of chromosome 6. *European Journal of Human Genetics*. 2000; 8(2): 137–140. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200401
- Monk, D. et al. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nature Reviews Genetics*. 2019; 20(4): 235–248. doi: 10.1038/s41576-018-0092-0
- Pinborg, A. et al. Epigenetics and assisted reproductive technologies. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2016; 95(1): 10–15. doi: 10.1111/aogs.12799
- Rica, I. et al. The Majority of Cases of Neonatal Diabetes in Spain Can Be Explained by Known Genetic Abnormalities. *Diabet Med*. 2007; 24(7): 707–13. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02140.x
- Rubio-Cabezas, O. et al. Neurogenin 3 is important but not essential for pancreatic islet development in humans. *Diabetologia*. 2014; 57(11): 2421–2424. doi: 10.1007/s00125-014-3349-y
- Quenneville, S. et al. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Molecular Cell*. Elsevier Inc. 2011; 44(3): 361–372. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.032
- Shield, J. P. H. et al. Aetiopathology and genetic basis of neonatal diabetes. *Archives of Disease in Childhood*. 1997; 76: F39–F42. doi: 10.1136/fn.76.1.f39
- Shield, J. P. H. Neonatal Diabetes: New Insights into Aetiology and Implications. *Hormone Research*. 2000; 53(suppl 1): 7–11. doi: 10.1159/000053198
- Smith, M. Diabetes Mellitus, Transient Neonatal, 1; TNDM1 [#601410]. OMIM. 1996. URL: <https://www.omim.org/entry/601410?search=601410&highlight=601410> [26-05-2020]
- Temple, I. et al. Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22-q23. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5(8): 1117–1121. doi: 10.1093/hmg/5.8.1117
- Temple, I. K. et al. An imprinted gene(s) for diabetes? *Nature Genetics*. 1995; 9(2): 110–112. doi: 10.1038/ng0295-110
- Temple, I. K. et al. Transient neonatal diabetes: Widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. *Diabetes*. 2000; 49(8): 1359–1366. doi: 10.2337/diabetes.49.8.1359
- Temple, I. K. y Mackay, D. J. Diabetes Mellitus, 6q24-Related Transient Neonatal. *GeneReviews*. 2005. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1534/> [20-05-2020]
- Uk, A. et al. Assisted Reproductive Technologies and imprinting disorders: Results of a study from a French congenital malformations registry. *European Journal of Medical Genetics*. 2018; 61(9): 518–523. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.05.017
- Valerio, G. et al. B-Cell Dysfunction in Classic Transient Neonatal Diabetes Is Characterized By Impaired Insulin Response To Glucose But Normal Response To Glucagon. *Diabetes Care*. 2004; 27(10): 2405–2408. doi: 10.2337/diacare.27.10.2405
- Valleley, E. M., Cordery, S. F. and Bonthron, D. T. Tissue-specific imprinting of the ZAC / PLAGL1 tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Human Molecular Genetics*. 2007; 16(8): 972–981. doi: 10.1093/hmg/ddm041
- Wiedemann, B. et al. Incidence of neonatal diabetes in Austria-calculation based on the Austrian Diabetes Register. *Pediatric Diabetes*. 2010; 11(1): 18–23. doi: 10.1111/j.1399-5448.2009.00530.x
- Yorifuji, T. et al. Neonatal Diabetes Mellitus and Neo-

natal Polycystic, Dysplastic Kidneys: Phenotypically Discordant Recurrence of a Mutation in the Hepatocyte Nuclear factor-1beta Gene Due to Germline Mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 2905–8. doi: 10.1210/jc.2003-031828

Yorifuji, T. et al. Chromosome 6q24-related diabetes mellitus. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2018; 27(2): 59–65. doi: 10.1297/cpe.27.59

Recibido: 2 enero 2020

Aprobado: 16 junio 2020

Publicado: 30 junio 2020

ABSTRACT

Transient neonatal diabetes mellitus type 1 (TNDM₁) is an imprinting disorder characterized by the development of diabetes mellitus during the first year of life, which resolves spontaneously by the age of 18 months. These patients also present other clinical manifestations, although the type and the severity vary. The genetic cause of this disease is the alteration of the imprinted locus 6q24, comprising genes *PLAGL1* and *HYMAI*, which are exclusively paternally-expressed. Currently, there are three known etiologies: paternal uniparental disomy of chromosome 6, duplications of paternal chromosome 6 and loss of methylation in the maternal allele. All of them result in the same phenotype: an overexpression of the paternal copies of imprinted genes *PLAGL1* and *HYMAI*, being *PLAGL1* the main TNDM₁ candidate gene. On another note, some of the affected individuals present a multi-loci imprinting disturbance, and thus, are clinically more heterogeneous. Half of these patients harbor pathogenic variants in transcription factor *ZFP57*, with a suspected role in the maintenance of DNA methylation. Besides, studies in animal models and patients have proved the involvement of the 6q24 locus in pancreas development and in the functionality of pancreatic beta cells, indicating also that the pathway of insulin secretion in response to glucose is the one that is impaired in these patients. Finally, although the diabetic presentation of most TNDM₁ patients is similar regardless of the molecular mechanism, it is crucial to investigate the genetic etiology, since it has important implications in the risk of recurrence in future generations. In the near future, a more comprehensive research in TNDM₁ will contribute to an expanded knowledge of imprinting disorders as well as to an improved clinical management of these patients.

Keywords: Neonatal diabetes mellitus, imprinting disorders, epigenetics