



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio del componente genético para el desarrollo de
Obesidad y Diabetes tipo 2 en población mexicana”**

TESIS

Que presenta

MAESTRA EN CIENCIAS MARÍA AURORA MEJÍA BENÍTEZ

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
Genética y Biología Molecular

Directores de la Tesis:

Dr. Jaime García Mena

Dr. Miguel Cruz López

México, D.F.

OCTUBRE 2015

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco; en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS y en la unidad perteneciente al CNRS UMR 8199 (Universidad Lille 2/Instituto Pasteur de Lille, Francia)

Este trabajo fue financiado con apoyo de *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) UMR 8199; FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT SALUD-2013-C01-201471 y FIS/IMSS/PROT/PRI0/14/034 para Miguel Cruz López. Convocatoria SSA/IMMS/ISSSTE-CONACYT 2010-2, clave 150352 para Adán Valladares Salgado. y Cinvestav-IPN; FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361 para Jaime García Mena.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca Doctoral y Beca Mixta con el número de registro 320982, que me otorgó para la realización de mis estudios y este proyecto.

Agradezco al Cinvestav-IPN por el apoyo otorgado para el congreso “74th Scientific Sessions. American Diabetes Association” USA 2014.

Agradezco a la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS por el apoyo otorgado con folio 2011-001.

Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con material de laboratorio y a la Sra. Antonia López Salazar por su apoyo administrativo.

Se agradece la participación de los adultos de las Unidades de Medicina Familiar 10, 23, 28, HGZ No. 1 y de los Bancos de Sangre Centrales del CMN siglo XXI.

DEDICATORIA

A mis padres Leandro Mejía e Inés Benítez, mi hermana Angélica, mis Padrinos Carol y Charles y mi hermanito Gabriel Modesto. Con todo mi amor.

Quiero agradecer a mis Directores de tesis el Dr. Jaime García Mena y el Dr. Miguel Cruz López por la confianza depositada en mi persona para la realización de este trabajo.

A mis asesores los Doctores Esther López Bayghen, Bulmaro Cisneros, Adán Valladares y Carlos Hoyo por sus correcciones y consejos profesionales.

Je tiens à adresser tous mes remerciements à l'ensemble de l'équipe du laboratoire CNRS UMR8199, et tout particulièrement le Dr Philippe Frogel et le Dr Amélie Bonnefond, qui m'ont permis de terminer mes travaux en leur compagnie et sous leur supervision, à Loïc Yengo, pour son aide précieuse sur les analyses statistiques, à Stephan Lobbens, pour sa bienveillance dans ses formations sur les manipulations, Melanie H. pour le soutien administratif. Enfin je souhaite bien sûr remercier Landry, Beny, Loïc S, Ghislain, Mickael, Ana, Marlène, Dorothe et tous les autres pour m'avoir accompagné dans cette expérience humaine et professionnelle.

Al personal administrativo; Gabriela Mora y Carmen Núñez Reynoso por su paciencia, cariño y apoyo.

A mis amigos que a pesar de la distancia siempre están a mi lado; René Miller, Jaime Gómez, Alejandra Trejo, Laura Fritsche, Martha Velázquez, Mario García, Olga Linden.

À mes amis Jairo, Natacha, Bérange, Vincent D., Sadia pour l'enthousiasme et les conseils précieux m'ont toujours été d'un grand réconfort.

À Lionel Simeon pour me motiver lorsque j'en ai besoin. Merci pour ton écoute, ta confiance en moi. Je t'aime tjrs!

A todos las personas que a lo largo de este camino he conocido y que ahora forman parte de mí.

Gracias Universo.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCION	
1. Conceptos de Genética	10
1.1. Variabilidad en el genoma	
1.2. Polimorfismos de un solo nucleótido	
2. Enfermedades de Herencia Multifactorial	15
2.1. Caracteres cuantitativos	
2.2. Origen de las Enfermedades Multifactoriales	
3. Estudios de Enfermedades Multifactoriales	18
3.1. Aspectos Generales	
3.2. Estudio de Genes Candidatos	
3.3. Diseños para estudiar Genes Candidatos	
3.4. Barrido genómico inespecífico	
3.5. Ventajas de los estudios GWAS	
3.6. Desventajas de los estudios GWAS	
3.7. Microarreglos de ADN	
4. Epidemiología de Diabetes tipo 2 y Obesidad	23
5. Generalidades sobre Obesidad	27
5.1. Definición	
5.2. Clasificación	
5.3. Diagnóstico de Obesidad	
5.4. Fisiopatología de la Obesidad	
5.5. Factores Ambientales asociados a Obesidad	
5.6. Factores Genéticos asociados a Obesidad	
6. Generalidades sobre Diabetes	
6.1. Definición	
6.2. Clasificación	
6.3. Diagnóstico de Diabetes tipo 2	
6.4. Fisiopatología de la Diabetes	
6.4.1. Resistencia a la Insulina	
6.4.2. Otros factores de daño a la célula beta	
6.5. Estudios Genéticos en Diabetes tipo 2	

JUSTIFICACIÓN	42
HIPOTESIS	42
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
DESARROLLO	44
1. Diagrama de Flujo	
2. Material y Métodos	
3. Diseño Experimental	
3.1. Fase 1: Obesidad Infantil	
3.2. Fase 2: Diabetes tipo 2	
RESULTADOS	69
DISCUSIÓN	89
CONCLUSIONES	95
PERSPECTIVAS	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma Humano	11
Figura 2. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)	13
Figura 3. Estudios de asociación del genoma completo	19
Figura 4 Microarreglo de ADN	22
Figura 5. Prevalencia Diabetes México, INEGI 2012	24
Figura 6. Porcentaje de casos hospitalizados con DT2 por entidad federativa. (Secretaria de Salud, 2013)	25
Figura 7. Prevalencia de sobrepeso y Obesidad en población Adulta. México ENSANUT; 2012	26
Figura 8. Prevalencia de sobrepeso y Obesidad en población infantil (5 a 11 años de edad). México; ENSANUT 2012	26
Figura 9. Contribución de distintos tipos celular a la inflamación del tejido adiposo	29
Figura 10. Mapa de los loci asociados al IMC en estudios de GWAS. (El-Sayed Moustafa & Froguel 2013)	32
Figura 11. Vías intracelulares de respuesta a la Insulina	38
Figura 12. Lista de loci asociados a Diabetes tipo 2 (Bonfond & Froguel 2015)	41
Figura 13. Diagrama de Flujo utilizada en Fase 1, Obesidad Infantil	44
Figura 14. Diagrama de Flujo utilizada en Fase 2, Diabetes	45
Figura 15. Extracción de DNA por método de columna	54
Figura 16. Integridad del ADN de las muestras utilizadas en geles de agarosa al 0.8%	54
Figura 17. Mapa de discriminación alélica para un polimorfismo determinado	55
Figura 18. Amplification Plot del polimorfismo determinado donde observamos en azul la fluorescencia obtenida únicamente por el producto de amplificación	56
Figura 19. Frecuencias alélicas de las variantes en <i>ENPP1</i> , <i>MC4R</i> y <i>GNPDA2</i> en la población estudiada	71
Figura 20. Call rate mayor a 98% para las muestras analizadas	76
Figura 21. Cluster de la variante en <i>GLIS3</i>	77
Figura 22. Cluster de la variante en <i>JAZF1</i>	77
Figura 23. Cluster de la variante en <i>ARPP21</i>	78
Figura 24. Cluster de la variante en <i>CYBRD1</i>	78
Figura 25. Cluster de la variante en <i>FGD6</i>	79
Figura 26. Análisis de los componentes Principales	80
Figura 27. Plot de Manhattan $-\log_{10}$ FvR Model para cada cromosoma	81
Figura 28. Regional Plot de <i>JAZF1</i> mediante locus zoom	83
Figura 29. Regional Plot de <i>GLIS3</i> mediante locus zoom	83
Figura 30. Regional Plot de <i>FGD6</i> mediante locus zoom	84

Figura 31. Regional Plot de <i>ARPP21</i> mediante locus zoom	84
Figura 32. Regional Plot de <i>CYBRD1</i> mediante Locus Zoom	85
Figura 33. SNPs asociados a Obesidad Infantil en población Mexicana	95
Figura 34. SNPs asociados a Diabetes tipo 2 en población Mexicana	96
Figura 35. Diversidad genética en la población estudiada	96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los SNPs en función de la clase funcional del genoma	14
Tabla 2. Frecuencia de Diabetes y riesgos de recurrencia entre parientes. (Florez et al. 2003)	35
Tabla 3. Criterios diagnósticos de Diabetes en Adultos, ADA 2014	36
Tabla 4. Características Antropométricas y Metabólicas de casos y controles	69
Tabla 5. Asociación entre los SNPs <i>MC4R</i> rs17782313, <i>NEGR1</i> rs2815752, <i>ENPP1</i> rs7754561, <i>NPC1</i> rs1805081, <i>GNPDA2</i> rs10938397, <i>FTO</i> rs1421085 y Obesidad en niños mexicanos	72
Tabla 6. Asociación entre los SNPs <i>MC4R</i> rs17782313, <i>NEGR1</i> rs2815752, <i>ENPP1</i> rs7754561, <i>NPC1</i> rs1805081, <i>GNPDA2</i> rs10938397, <i>FTO</i> rs1421085 y parámetros bioquímicos en niños no Obesos Mexicanos	74
Tabla 7. Características clínicas de la población estudiada	75
Tabla 8. Asociación de diversos SNPs y Diabetes de tipo 2 en Población Mexicana	82
Tabla 9. SNPs asociados a los niveles de triglicéridos en población Mexicana	86
Tabla 10. Score de riesgo genético basado en 69 SNPs asociados a DT2	86
Tabla 11. Comparación de Heterogeneidad genética entre población Francesa y Mexicana	87

RESUMEN

La búsqueda de genes que participan en el desarrollo de enfermedades ha tomado gran relevancia debido a que modulan los aspectos de la fisiología humana y su interacción con el medio ambiente está ligada al desarrollo de ciertos padecimientos. La obesidad y la diabetes tipo 2 son resultado de las interacciones entre la nutrición y el acervo genético.

Se han identificado varias mutaciones que son responsables de formas muy raras monogénicas de obesidad (como los portadores de mutaciones en el gen de la leptina) y diabetes (las diversas formas de MODY, del inglés “Maturity Onset Diabetes of the Young”); reafirmando el componente genético.

En últimos años gracias al desarrollo de los estudios de asociación del genoma completo (en inglés GWAS) se ha comenzado a identificar las bases genéticas de las formas comunes de ambas patologías, que están influenciadas por decenas, si no cientos, de genes. En especial, la realización de meta-análisis a gran escala de los resultados de diferentes GWAS se considera en este momento la mejor herramienta a la hora de identificar las variantes genéticas más estrechamente implicadas en el desarrollo de estas enfermedades.

Durante los últimos 7 años, este tipo de estudios han proporcionado variantes genéticas de riesgo para Obesidad, Diabetes tipo 2 y fenotipos intermedios, estableciendo aproximadamente 300 loci asociados a estos fenotipos en su mayor parte en Población Europea.

Realizar este tipo de Estudios en población mexicana podría identificar nuevas variantes de riesgo común para esta población y rara en otras, dando como resultado nuevas vías de señalización involucradas en el desarrollo de estas patologías. En este trabajo realizamos estudios de asociación genómica para tratar de identificar biomarcadores moleculares que puedan ser utilizadas como predictores tempranos de riesgo metabólico, y/o desarrollar tratamientos farmacológicos que sean capaces de retrasar dichos padecimientos en nuestra población.

ABSTRACT

The search for genes involved in disease development has taken great importance because they modulate aspects of human physiology and its interaction with the environment has been linked to the development of certain conditions. Obesity and type 2 diabetes are the result of interactions between nutrition and the genetic background.

In the recent years researchers have identified several mutations responsible for monogenic rare forms of obesity (as carriers of mutations in the leptin gene) and diabetes (various forms of MODY, "Maturity Onset of Diabetes the Young ") establishing a genetic component.

In recent years thanks to the development of genome-wide association studies (GWAS) we have begun to identify the genetic basis of the common forms of both diseases, which are influenced by dozens, if not hundreds, of genes. In particular, large-scale analysis of different GWAS is currently the best tool to identify genetic variants involved in the development of these diseases.

Over the past seven years, these studies have provided genetic risk variants for obesity, type 2 diabetes and intermediate phenotypes, establishing around 300 loci associated with these conditions mostly in European Population.

Perform such studies in the Mexican population could identify new variants of common risk for this population and rare in others, resulting in new signaling pathways involved in the development of these diseases. In this work we did genome association studies trying to identify molecular biomarkers that can be used as early predictors of metabolic risk and/or development of drug treatments capable of delay such conditions in our population.

INTRODUCCIÓN

1. Conceptos de Genética

El concepto de *gen* tiene sus antecedentes históricos en Mendel, en sus definiciones de las unidades informativas responsable de una característica transmisible. Posteriormente, en 1950 se definía como la secuencia de ADN, con la información necesaria para la síntesis de una proteína en particular.

En la actualidad hablamos de un *gen molecular*, una secuencia completa de ácidos nucleicos necesaria para la síntesis de un producto génico funcional (polipéptido o ARN). Se conoce la estructura de esos genes, con identificación de las diferentes zonas, que definen su estructura, y su funcionalidad: los *exones*, porciones de los genes que formarán el RNA mensajero; los *intrones*, regiones espaciadoras que desaparecerán del RNA precursor; los *locus o loci*, parte del gen donde se encuentran las regiones esenciales que controlan su expresión (regiones reguladoras).

El tamaño de los genes es muy variable, se miden en unidades de 1000 pares de bases (bp) o kilobase (Kb) o 1 millón de bp o Megabase (Mb). El ADN humano tiene 3.000 Mb y los genes constituyen sólo el 10-15 % del ADN, es decir, entre 300-450 Mb. Existen alrededor de 30.000-40.000 genes con una longitud media de 10 Kb, y un rango muy amplio. La transcripción génica, en la que la polimerasa del RNA sintetizará RNA a partir de la hebra molde de ADN, será la conclusión final del proceso que constituye la herencia génica, tal y como se entiende hoy (Rockman & Kruglyak, 2006; Jamenson JL, Kopp P, 2008). Los ácidos nucleicos forman *el genoma*, un sistema que tiene la propiedad de portar, transmitir y acumular información codificada. Esta información codificada en los genes hace posible la funcionalidad de los sistemas vivos, y este es el mecanismo de la evolución biológica.

El estudio del genoma fue un proyecto que comenzó a mediados de 1980 y culminó con la publicación de los resultados el 15 de Febrero del 2001 en la revista *Nature*. Los *mapas genéticos* describen el orden que adoptan los genes y definen la posición que ocupa cada gen respecto a los demás loci del mismo cromosoma (Lander et al. 2001).

En la actualidad conocemos que el ADN codificante constituye sólo un 30% de la totalidad y se encarga de expresar genes, cuyo producto final son proteínas. El ADN no codificante supone un 70% del total, es inactivo, desde el punto de vista transcripcional, es altamente polimórfico, tiene un gran interés de cara a la identificación de individuos y, no obstante, tiene funciones diversas, como la promoción de genes, regulación de la transcripción, y otras funciones desconocidas o sin función aparente.

Una distribución casi completa del genoma se conoce desde hace menos de una década y se simplifica en el siguiente esquema.

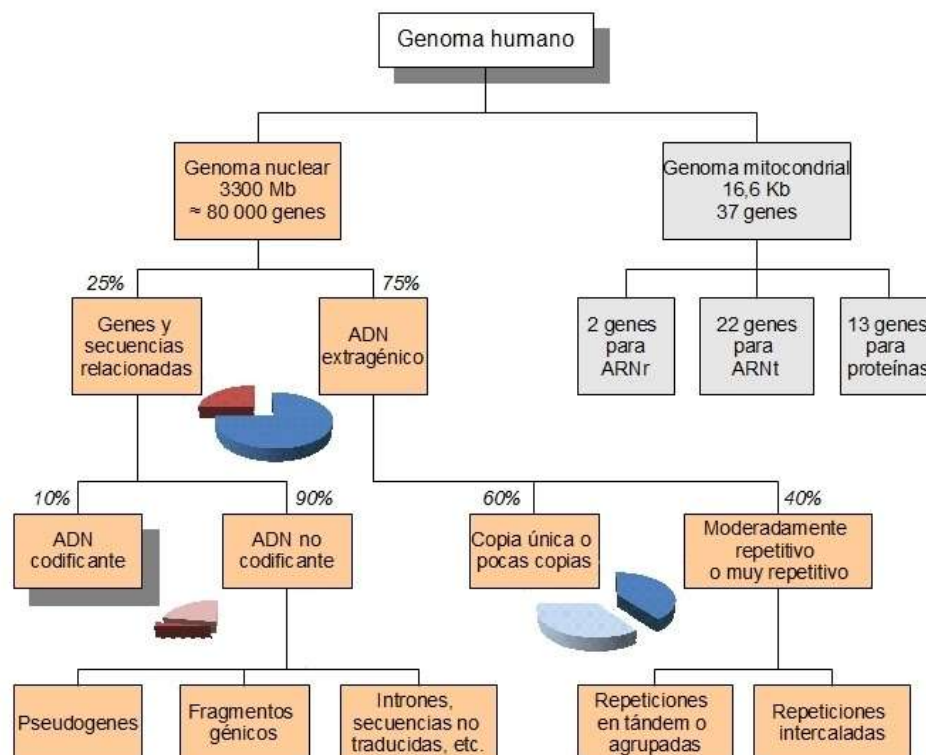


Figura 1. Genoma Humano

1.1 Variabilidad en el genoma

Si bien dos personas del mismo sexo comparten un porcentaje elevado (alrededor del 99,9%) de su secuencia de ADN, el 0.1% restante contiene las variaciones genéticas que influyen en el fenotipo de los individuos.

Las variaciones en el genoma se clasifican principalmente en variantes comunes y variantes raras para indicar la frecuencia del alelo menor presente en la población. Las comunes son polimorfismos definidos como aquella variante genética cuya frecuencia del alelo menor (MAF) es de por lo menos un 1% en la población, mientras que las variantes raras son aquellas que tienen una MAF menor del 1%. De igual forma, las variantes en el genoma se pueden clasificar de acuerdo con su composición de nucleótidos en variantes de un solo nucleótido y variantes estructurales. La gran mayoría de las variantes son neutras, es decir que no contribuyen a la variación fenotípica.

El análisis de la variabilidad ha permitido identificar millones de cambios puntuales denominados SNP (Single Nucleotide Polymorphism) con una frecuencia de aproximadamente un cambio cada 1000 p. La base molecular de las diferencias fenotípicas entre poblaciones de orígenes geográficos distintos está fundamentada en pocos genes que controlan la expresión de ciertos caracteres fácilmente distinguibles a simple vista.

1.2 Polimorfismos de un solo nucleótido

Los polimorfismos en un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en inglés SNP) son las más frecuentes en los individuos; y se define como el cambio en una sola base (Figura 1) se ha estimado que el genoma contiene alrededor de 11 millones, de los cuales 7 millones aproximadamente tienen un MAF del 5% y los restantes un MAF entre 1 y 5%.

Por su parte, las variantes estructurales se refieren a secuencias de pares de bases que difieren entre los individuos, como son las inserciones deleciones (Andes).

Existen además dos tipos de polimorfismos que corresponden a sustituciones en bloque, en las cuales un segmento de nucleótidos adyacentes varía entre dos genomas. También se encuentran las inversiones de secuencias de ADN, donde pares de bases son invertidas en una sección de un cromosoma, y por último, las variaciones en el número de copias (CNV), que son secuencias idénticas o casi idénticas que se repiten en algunos cromosomas pero no en otros (Frazer KA *et al.*, 2009).

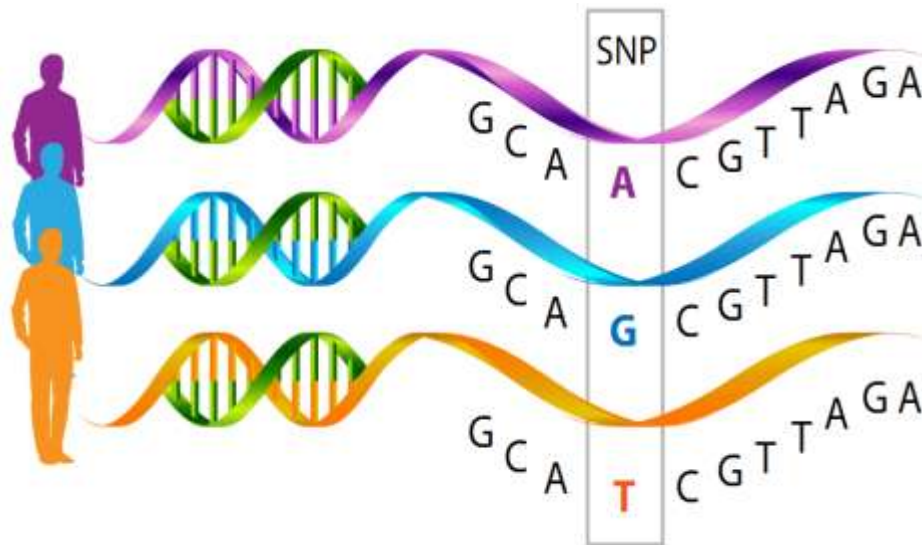


Figura 2. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

Cabe mencionar que la distribución de SNPs a lo largo del genoma no es homogénea sino que existen zonas calientes que presentan mayor variabilidad, así como se observa una tendencia a acumular SNPs en regiones de poca importancia funcional (Tabla 1)

<i>Región genómica</i>	<i>Talla de la región (Mb)</i>	<i>Densidad (SNP, Mb)</i>
<i>Intergénica</i>	<i>2185</i>	<i>707</i>
<i>Intrones</i>	<i>615</i>	<i>921</i>
<i>Primer Intron</i>	<i>164</i>	<i>808</i>
<i>Exones</i>	<i>31</i>	<i>529</i>
<i>Primer Exon</i>	<i>10</i>	<i>592</i>

Tabla 1. Distribución de los SNPs en función de la clase funcional del genoma

En concreto en el primer intrón existe una menor frecuencia de SNPs comparado con otros intrones del mismo gen, ello es debido a que en algunos casos el primer intrón puede contener secuencias reguladoras en cis de la transcripción así como en muchos genes existen dos promotores alternativos, estando el segundo de ello situado dentro del primer intrón. Con respecto a las secuencias intergénicas se observa que el 75% de los SNPs se localizan dentro de estas regiones, pero la densidad de SNPs es menor que en los intrones. Esto podría explicarse por un fenómeno de incremento de la mutagénesis debida a los fenómenos de transcripción génica.

Con respecto a los exones, destacar que el primer exón puede acumular mayor variabilidad genética, debido a que suele contener regiones no traducidas importantes para la unión del ribosoma durante las etapas preliminares de la traducción, por ello está menos limitado que el resto de exones a la hora de acumular cambios. Con respecto a los exones codificantes, los SNPs son muy raros (0,17% del total), siendo la mayoría cambios conservativos por tambaleo de la tercera base del codón o cambios por un aminoácido muy similar funcionalmente al original. Cambios no conservativos constituyen sólo el 0,07% del total descrito.

Sin embargo pueden tener un papel importante en explicar las diferencias fenotípicas entre los seres humanos.

Por ejemplo multitud de SNPs en los genes de los citocromos P450 están asociados a una mayor frecuencia de desarrollo de cáncer o enfermedades cardiovasculares, otros SNPs en genes implicados en la respuesta inmunitaria están asociados a enfermedades autoinmunes como la psoriasis o la enfermedad de Crohn.

El catálogo completo de SNPs del genoma humano y su asociación con diferentes enfermedades es una tarea importante para el presente y futuro. También van a representar un papel determinante como marcadores evolutivos que permiten trazar el origen y dispersión de las poblaciones humanas. (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001)

2. Enfermedades de Herencia Multifactorial

2.1 Caracteres cuantitativos

Los caracteres cuantitativos o métricos que son heredables, son el resultado de la acción de varios genes. Estos genes que actúan sobre un mismo rasgo lo pueden hacer en forma igualitaria y aditiva, es decir, mediante aportes pequeños e iguales de cada uno, que se suman para dar el rasgo completo (estatura, presión arterial) o, alternativamente, los aportes de cada gen pueden ser desiguales, sobresaliendo un gen sobre los demás. En general, la herencia cuantitativa o multifactorial se refiere al primer caso (efecto igualitario y aditivo, sin dominancia)

En cambio, si el aporte de los genes no es igualitario y sobresale alguno, la curva no será normal y podrá presentar picos secundarios o desviaciones. De este modo, las curvas de distribución de intensidad de un rasgo métrico pueden dar una indicación inmediata del tipo de factor genético implicado en este rasgo.

La hipótesis de un umbral determinante de la aparición de una enfermedad discreta permite explicar un número de enfermedades con componente genético no mendeliano y con factores ambientales superpuestos (Holt et al., 1961)

Últimamente se ha considerado que algunas enfermedades están determinadas por múltiples genes y además por factores ambientales, de tal modo que pueden tratarse

como un carácter métrico que, pasado un cierto umbral, provoca una discontinuidad: la enfermedad. Los factores predisponentes a la enfermedad (genéticos y ambientales) han sido reunidos bajo el nombre de intensidad de compromiso (liability); es esta intensidad de compromiso la que en toda la población se distribuye como una curva normal, en cuyo extremo, luego de un umbral de compromiso, se encuentran los afectados por la enfermedad. Un ejemplo demostrativo de enfermedad multifactorial es el paladar hendido, cuya heredabilidad del paladar hendido completo (labio y paladar) se estima en alrededor del 70%, pero la incidencia en hermanos de un afectado no pasa del 5%, lo cual muestra un tipo de herencia no mendeliano. (Farrel et al., 1992; Fraser FC, 1980)

2.2 Origen de las Enfermedades Multifactoriales

Los antecedentes familiares son un elemento esencial para identificar un componente hereditario y deben actualizarse de forma periódica. Los padres, hermanos e hijos comparten la mitad de los genes con el paciente objeto de estudio. Prácticamente, todas las enfermedades poseen un componente genético y se precisa un laboratorio de referencia que realice los estudios moleculares, siempre con el consentimiento informado pertinente. Las moléculas que forman parte del material hereditario, almacenan la información biológica de una forma estable, se replican y la transmiten de una célula a otra y de una generación a la siguiente. Llevan la información para otro tipo de moléculas y estructuras y poseen capacidad de mutación y recombinación.

En las enfermedades multifactoriales intervienen tanto los factores hereditarios como los ambientales y de su interacción se expresa el proceso patológico. Esto hace, que en ocasiones, el protagonismo del impacto ambiental, haga difícil identificar una influencia hereditaria, aunque este haya contribuido de forma mayor a la enfermedad. Esta realidad fue bien definida como modelo autorregresivo umbral o Threshold Auto Regressive Model.

Los procesos autoregresivos se activaban cuando determinada variable sobrepasaba un valor umbral. Estos modelos y otros cuantitativos o semi-cuantitativos han ayudado al entendimiento de muchas enfermedades, apareciendo conceptos más novedosos de “predisposición”, “latencia”, “umbral de enfermedad”, “factores favorecedores”, etc., que emplean un razonamiento matemático para explicar la aparición de una enfermedad. (Chan & Tong 1986)

La variabilidad genética tiene como fuente primaria a la mutación, alteraciones o cambios en la molécula que contiene la información. Si no existiera la mutación, no habría sido posible observar la enorme variabilidad existente de especies diferentes ni la variabilidad dentro de cada especie. Sin la mutación no se podría haber producido el proceso evolutivo. Sin embargo, muchas de las mutaciones moleculares identificadas son responsables de multitud de enfermedades.

En la actualidad se identifican distintos tipos, dependiendo del mecanismo que las ha provocado. Las más frecuentes son: las mutaciones puntuales (42 %); deleciones, tanto parciales como totales, (32 %); las inserciones (9%); rearreglos (7%) y duplicaciones (5 %). Una mutación patológica será la que provoca una alteración en la secuencia del ADN de un gen asociado con una función alterada o con una falta de función. Esto lo distingue de los alelos normales y de las variantes alélicas. En los primeros, la secuencia de ADN de un gen está asociada a una función normal y se observa en la población con la frecuencia más alta; las segundas, son alteraciones en la secuencia de un gen cuyo efecto no está claro hasta realizar un estudio adicional del genotipo y del correspondiente fenotipo, en una población suficientemente amplia, finalmente podría tratarse de una mutación genética o de un polimorfismo, alteración en la secuencia salvaje de un gen, asociada con una función normal. (Cohn Vicki, 2010)

3. Estudios de Enfermedades Multifactoriales.

3.1 Aspectos Generales

En los estudios genéticos es importante la selección de los sujetos de estudio, de ahí que la definición de caso tiene un criterio de selección bien definido respecto a las características clínicas de la enfermedad estudiada. Los sujetos de estudio deben tener un origen étnico similar para evitar la heterogeneidad genética y con esto falsos positivos. Las bases genéticas de la Enfermedad pueden ser investigadas aplicando varias estrategias como son el estudio de “asociación” mediante genes candidatos o barrido genómico inespecífico. (Suárez et al. 2007)

3.2 Estudio de Genes Candidatos

Se denomina gen candidato a aquellos genes identificados cuya alteración causa en modelos animales la enfermedad en cuestión, o bien de aquellos que se sospecha su relación con un proceso fisiológico del que dependa en este caso la Obesidad o Diabetes tipo 2, como son los genes implicados en el metabolismo lipídico, en la secreción y acción de la insulina, homeostasis de la glucosa etc.

Para seleccionar las variantes genéticas es importante tomar en cuenta ciertos aspectos como son: 1- La localización de la variante genética (promotor, intrón, exón). 2- Modelos bioinformáticos de predicción. 3- Posibilidad de realizar estudios funcionales y 4- La distinción entre variantes funcionales e indicadoras. (Schork et al. 2007)

3.3 Diseños para estudiar genes candidatos

El objetivo de los estudios es establecer el grado de asociación entre alelos de un gen candidato y la ocurrencia de una enfermedad en una población definida. En años recientes se ha producido un cambio de enfoque en las enfermedades comunes de tipo multifactorial o de origen complejo.

La aparición de nuevas tecnologías así como la secuenciación completa del genoma humano en el 2003, permitieron la aparición de los así llamados “estudios de asociación del genoma completo” (Genome Wide Association Studies o GWAS en inglés).

Este tipo de estudios genómicos, en vez, de comenzar con la hipótesis de un gen candidato para la enfermedad, estudian la totalidad de las variantes polimórficas que existen en el genoma de dos grupos: el grupo caso con la enfermedad y el grupo control sin la enfermedad (Figura 3)

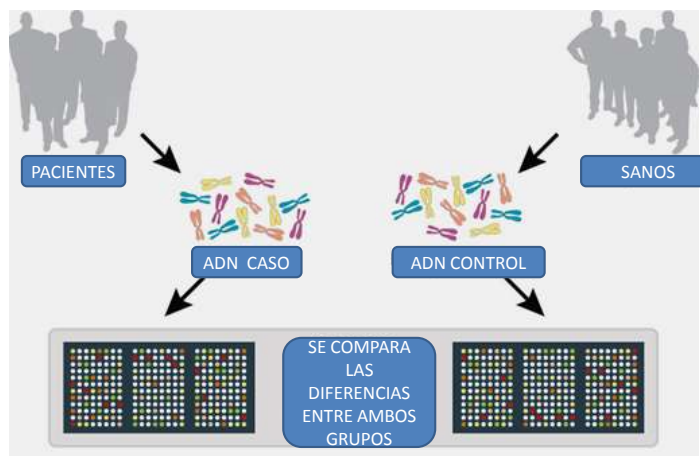


Figura 3. Estudios de asociación del genoma completo.

A grandes rasgos analizan la frecuencias de ciertos SNP en los grupos y cuando encuentran que la frecuencia de algunos SNP en el grupo de enfermos excede el de los presentes en el grupo control, se considera a dichos SNP sospechosos de ser un factor de riesgo para la enfermedad, o bien que están cerca de un locus de riesgo para la enfermedad. Todos los SNPs utilizados como marcadores en estos estudios han sido registrados en las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), incluyendo sus frecuencias alélicas y otro tipo de información genómica (Sayers et al., 2009)

3.4 Barrido genómico inespecífico

Uno de los principales aportes al desarrollo de esta herramienta son: primero, los resultados obtenidos a partir del proyecto HapMap, los cuales muestran los patrones de variación y de desequilibrio de ligamiento de tres poblaciones ancestrales como son la caucásica, asiática y africana (International Hap Map Consortium, 2005) y segundo, la disponibilidad de micro chips de genotipificación que agrupan cientos de miles SNPs, los cuales abarcan gran parte del genoma total y favorecen la realización de un rastreo global.

Aquí se investiga la asociación genotípica de un número elevado de SNPs situados a intervalos más o menos regulares en el genoma, sin tener sospechas previas de su relación a la enfermedad de estudio; siendo el GWAS el prototipo. Desde sus inicios, los GWAs han utilizado marcadores moleculares del tipo STRs o SNPs. Con respecto a los STRs, el genoma humano está constituido por aproximadamente 30,000 microsatélites, los cuales fueron descritos inicialmente por Weber y cols. (Weber JL et al., 1989) como secuencias pequeñas de ADN repetidas en tándem (STRs), constituidas por unidades de 2 a 7 pb que se repiten en un número variable de veces y dan lugar a alelos de tamaño aproximado entre 80 y 400 pb. Su gran utilidad se puso rápidamente de manifiesto como marcadores moleculares para rastrear genes comprometidos en enfermedades, debido a su abundancia, distribución muy regular en el genoma, naturaleza polimórfica y su pequeño tamaño. Los SNPs pueden estar presentes en regiones codificadoras o no codificadoras, así como en regiones intergénicas del genoma. Inicialmente, estos polimorfismos se observaron en regiones que codifican genes indispensables para la expresión de proteínas. Los SNPs que se encuentran al inicio de regiones que codifican proteínas pueden ejercer efectos sobre varios eventos epigenéticos, splicing genético, sitios de unión de los factores de transcripción, regulación de promotores y RNAs no codificantes (Rao, 2008). El aspecto más importante con respecto al uso de estos marcadores en los estudios de rastreo genómico es que ellos se pueden heredar juntos en un mismo haplotipo o bloque de LD.

Por consiguiente, para la genotipificación se puede emplear uno o un grupo de estos marcadores presentes en una región del genoma, ya que todos los SNPs que se encuentran en ese bloque están relacionados. Sin embargo, en una región del genoma que tenga poco LD o donde no existan segmentos de haplotipos se necesitaría un número mayor de SNPs. En cuanto al estudio de variantes raras, éstas no pueden ser detectadas a través de GWAs que se basan en el uso de marcadores polimórficos que están ligados, debido a que son variantes de baja frecuencia y pequeña contribución en la susceptibilidad a enfermedades. Por lo tanto, para establecer asociaciones con variantes raras es necesario realizar un mapeo directo e identificar dichas variables dentro de la población de estudio. La identificación se realiza mediante la secuenciación de genes candidatos en el grupo de individuos con la enfermedad en cuestión. Posteriormente se evalúa su frecuencia en una población control apropiada y las posibles consecuencias en la función del producto de dicho gen (Cirulli et al.,2008. Bodmer et al.,2008).

3.5 Ventajas de los estudios GWAS

Las ventajas del método de GWAS son: No requieren una hipótesis previa; los datos pueden ser utilizados para otras búsquedas futuras; permite descartar asociaciones espurias; provee datos de origen ancestral de los individuos; aporta detalles de secuencias y de variación en el número de copias (CNV), y facilita la verificación de vías bioquímicas responsables de la enfermedad.

3.6 Desventajas de los estudios GWAS

Sus desventajas y precauciones a tener en cuenta son: Solo descubren alelos relativamente comunes ($AF > 5\%$); tienen poco valor predictivo; requieren gran número de muestras del orden de decenas de miles; utilizan chips de 100.000 o más SNP; lo que se ubica son loci y no genes; y se requiere siempre de una réplica en otros grupos poblacionales, para verificar la validez de los datos. (Hardy J, Singleton A, 2009)

3.7 Microarreglos de ADN

En los últimos años de la década de 1990, en laboratorios de la Universidad de Stanford en Estados Unidos desarrollo un ingenioso método que permite observar el grado de funcionamiento (transcripción) ya no de un solo gen, sino de un conjunto de miles de genes, e incluso de todo un genoma. (Ferea, Brown., 1999) El método de los microarreglos, también llamados pastillas de ADN consiste en depositar minúsculas microgotas en las microcuadriculas de un casillero virtual sobre el vidrio de un portaobjetos preparado. La base de la técnica consiste en la hibridación específica, de segmentos de ácidos nucleicos desconocidos, con los segmentos “diana o blanco” pegados al vidrio. La especificidad de esta hibridación está dada por la complementariedad de las secuencias. Las condiciones de hibridación (pH, temperatura y otras) son importantes para la eficiencia. Una vez ocurrida la hibridación, la presencia o ausencia se detecta iluminando con luz laser el microarreglo: puesto que los segmentos desconocidos estaban teñidos con un fluoróforo, el nivel de fluorescencia en cada punto es proporcional al nivel de hibridación. (Figura 4)

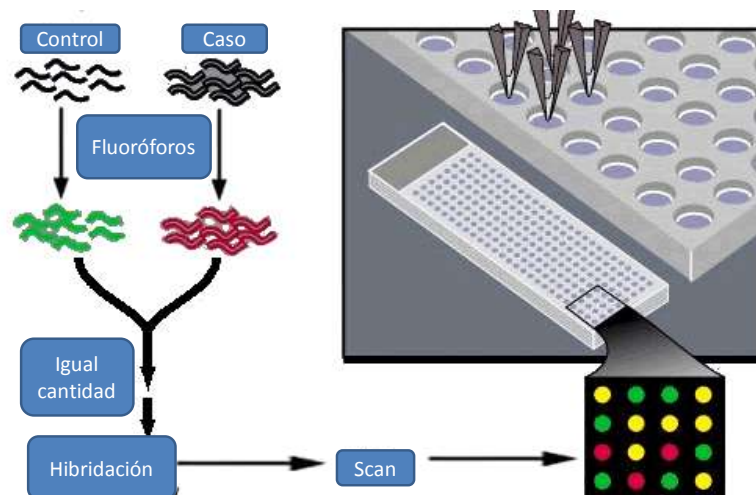


Figura 4 Microarreglo de ADN

Lo fundamental de esta técnica es que se realizan todas las hibridaciones simultáneamente y se analizan como un sistema: es decir que se puede visualizar todo el genoma funcionando. (Gerhold et al., 1999)

4. Epidemiología de Diabetes tipo 2 y Obesidad

De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes estima que más de 387 millones de personas en el mundo padecen Diabetes tipo 2 de los cuales el 77% vive en países clasificados por el Banco Mundial como de ingresos medios y bajos. (IDF, 2014).

Respecto al comportamiento de esta enfermedad en México, de 1998 al 2012 se ha observado una tendencia hacia el incremento en un 4.7%. Específicamente en el año 2012, la prevalencia nacional es de 14.4%, lo que equivale a 8 millones de personas con Diabetes (Figura 5)(ENSANUT, 2012)

El mayor aumento del número de personas con diabetes a lo largo de los próximos 20 años tendrá lugar en países de ingresos medios y bajos llegando a ser hasta de 521 millones de personas con este padecimiento. Esto viene impulsado por el aumento en la esperanza de vida y por los cambios de comportamiento asociados a la urbanización, de crecimiento rápido, y al desarrollo.

Entre los cambios clave de comportamiento se encuentran la disminución de la actividad física, el cambio a dietas con un contenido más alto en calorías y el aumento asociado de la obesidad.



Figura 5. Prevalencia Diabetes México, INEGI 2012

De acuerdo a las cifras preliminares emitidas por el INEGI para el año 2012, esta enfermedad constituyó la segunda causa de muerte en la población mexicana, con una tasa de mortalidad de 75 defunciones por cada 100 mil habitantes, además de ser la primera causa de hospitalización mostrando un aumento ordenado. (Figura 6) (Secretaría de Salud, 2013)

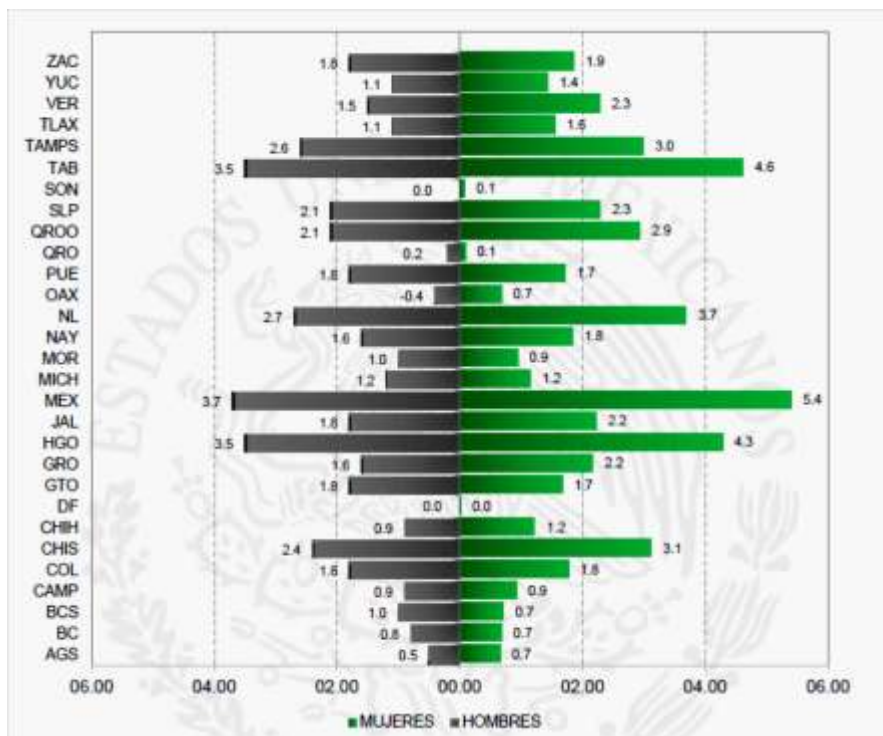


Figura 6. Porcentaje de casos hospitalizados con DT2 por entidad federativa.
(Secretaria de Salud, 2013)

La obesidad se considera como importante factor de riesgo para el desarrollo de Diabetes, en México 90% de los casos de Diabetes son atribuibles al sobrepeso y Obesidad; la prevalencia nacional para el 2012 fue de 73% para las mujeres y 69.4% para los hombres. (Figura 7)

A nivel mundial la obesidad infantil afecta a más de 43 millones de niños de los cuales 35 millones están en países en desarrollo. (World Health Organization, 2012). En las últimas dos décadas ha habido un incremento de 65% de este problema en preescolares del mundo en desarrollo y 48% en el mundo desarrollado. En México la prevalencia combinada de sobrepeso/obesidad en niños de 5 a 11 años es de 34.4% de acuerdo a la ENSA de 2012. (Figura 7). De donde la prevalencia de sobrepeso es del 19.8% y de obesidad es del 14.6%.

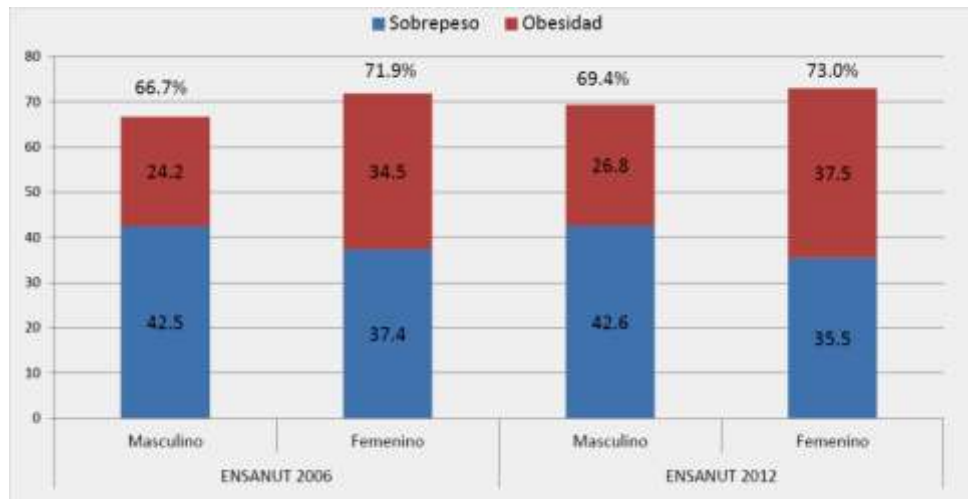


Figura 7. Prevalencia de sobrepeso y Obesidad en población Adulta. México ENSANUT; 2012.



Figura 8. Prevalencia de sobrepeso y Obesidad en población infantil (5 a 11 años de edad). México; ENSANUT 2012

5. Generalidades sobre Obesidad

5.1 Definición

La Obesidad se define como una enfermedad crónica, compleja y multifactorial la cual se produce por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético dando como resultado una progresiva acumulación de tejido adiposo. (Goossens, 2008)

5.2 Clasificación

La obesidad se clasifica de acuerdo con su etiología genética en: 1- monogénica en donde la causa es un gen único disfuncional siendo la mutación del gen MC4R (receptor 4 de melanocortina) la causa más frecuente de este tipo de Obesidad (Ichihara et al., 2008) 2- Sindromática donde existe un patrón de herencia Mendeliano, cursan con retraso mental, dismorfias y obesidad. Como es el caso del Síndrome de Prader Willi (Burman et al., 2001) y 3- Poligénica o común en donde la influencia genética se va a asociar a condiciones externas como los hábitos dietéticos y estilos de vida sedentarios, relacionado esto con la disponibilidad de alimentos, la estructura sociológica y cultural que intervienen en el mecanismo de regulación del gasto y almacenamiento de la energía dando lugar a un depósito excesivo de grasa corporal. (Bouchard,1997; Ebbeling et al., 2002)

5.3 Diagnóstico de Obesidad

El índice más aceptado actualmente para evaluar la obesidad infantil y en adultos es el Índice de Masa Corporal. El IMC o índice de Quetelet es una expresión del peso referido a la talla y se calcula dividiendo el peso corporal expresado en kilogramos por la talla elevada al cuadrado expresada en metros. Siendo el mayor utilizado por su facilidad de cálculo. En los adultos se considera sobrepeso cuando el índice de masa corporal ($IMC = \text{peso en kg} / \text{talla en m}^2$) es >25 , y obesidad si es ≥ 30 .

En los niños y adolescentes la OMS recomienda las tablas de referencia internacionales del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) (ANEXO I-II), diagnosticándose como sobrepeso a partir del centil 85 en las curvas de IMC y obesidad a partir del centil 95. (INSP, 2006) Los puntos de corte se establecieron de manera convencional en niños con relación a la morbimortalidad en adultos demostrada por estudios epidemiológicos. (NCHS, 2000)

5.4 Fisiopatología de la Obesidad

De acuerdo con la primera ley de la termodinámica, la obesidad es el resultado del desequilibrio entre el gasto y el aporte de energía. Esta energía procede, en el caso de nuestro organismo, de los principios inmediatos: carbohidratos, proteínas y grasas (Badman, 2005). Los carbohidratos son el primer escalón en el suministro de energía. Cuando el consumo de carbohidratos excede los requerimientos, estos se convierten en grasas. En ausencia, o con niveles muy bajos de glúcidos, las grasas son movilizadas siendo utilizadas para la producción de energía. A este proceso se le conoce como lipólisis, y en él, las grasas son convertidas en ácidos grasos y glicerol. De este modo, el cuerpo humano cumple las leyes físicas representadas por este primer principio de la termodinámica, según el cual la energía ni se crea ni se destruye, solo se transforma. Todo exceso de energía introducida cambia la energía interna del organismo y se transforma en energía química, y como principal almacén esta el tejido graso (Lowell, 2000). Un ingreso energético (IE) mayor que el gasto o consumo energético total (CET), inevitablemente causara un aumento del tejido adiposo, que siempre se acompaña del incremento de la masa magra, así como también del peso corporal, en cuyo control el CET desempeña una función importante. A medida en que se acumulan lípidos en el adipocito, este se hipertrofia y cuando la célula ha alcanzado su tamaño máximo, se forman nuevos adipocitos y se establece la hiperplasia.

Esta acumulación de grasa visceral juega un papel muy importante en el desarrollo de resistencia a la Insulina. (Nishina, 2003)

Una explicación está dada por la teoría del sobreflujo que dice que la grasa visceral es metabólicamente más activa y una vez que llega al límite de capacidad para acumular triglicéridos, se presenta un sobreflujo de grasa a través del sistema porta-hepático hacia el hígado, donde los ácidos grasos y el glicerol son liberados interfiriendo con el mecanismo de transporte y señalización de la insulina. Una segunda teoría dice que el incremento en la liberación de ácidos grasos libres a la circulación portal disminuye la depuración hepática produciendo una hiperinsulinemia sistémica. (McGarry, 1999)

Actualmente se sabe que la obesidad es un proceso inflamatorio crónico de bajo nivel, ya que existe un aumento de los niveles circulantes no sólo de citocinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), también de proteínas de la fase aguda. La obesidad visceral y en general el adipocito hipertrófico desarrolla resistencia a la insulina a través de activación de vías de señalización en la mitocondria y el retículo endoplásmico. Entre estas vías encontramos la vía del factor nuclear kappa-beta (NFK β) y la vía de la c-jun N terminal cinasa (JNK) que al ser sobre reguladas libera citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de apoptosis llevando a un círculo vicioso de inflamación crónica. (Figura 9)(Hotamisligil, 2006)

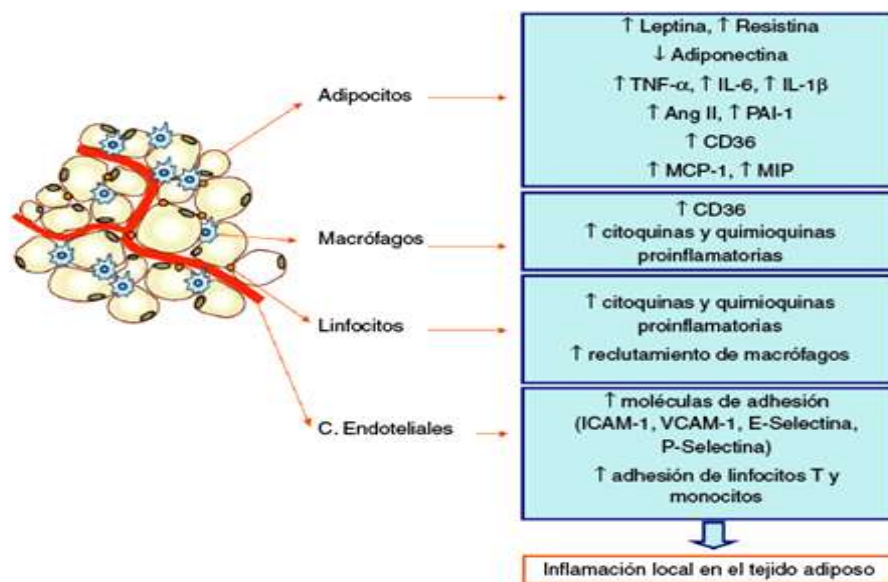


Figura 9 Contribución de distintos tipos celular a la inflamación del tejido adiposo.

5.5 Factores Ambientales asociados a Obesidad

En efecto, ya desde el surgimiento de la agricultura hace unos 10 000 años, pero en forma muy acelerada en el siglo XX, han ocurrido cambios en ambos componentes del balance energético. Los efectos de la agricultura han sido graduales, pero han impactado tanto a la actividad física -estimando una reducción en un tercio o más, teniendo un menor gasto energético- como a la alimentación.

La domesticación y mejoramiento, mediante cruces, de plantas permitió una creciente disponibilidad de semillas maduras de gramíneas y leguminosas que tienen una densidad energética media (cuatro Kcal/gr) y que seguramente desplazaron en forma parcial a los tejidos vegetales frescos (verduras y frutas) cuya densidad es mucho menor (menos de 1 kcal/gr). Así la dieta relativamente diluida del Paleolítico se reemplazó por una dieta más concentrada en energía y es probable que el consumo en pequeñas porciones haya cambiado por un consumo en cargas, como en la actualidad con desayuno, comida principal y cena; originando respuestas insulínicas en forma de picos a las que el organismo humano no estaba acostumbrado y que favorece el depósito de grasa y retención de sodio. Es claro, que nuestros antepasados sobrevivieron a este cambio, pero no necesariamente lo hicieron todos con la misma eficacia.

Los cambios mencionados se fueron acentuando durante milenios. Gradualmente, se logró aumentar la cantidad de almidones en la dieta, aislar aceites y grasas que permitieron una mayor ingestión de triglicéridos y consecuentemente una mayor densidad energética, se descubrió la fermentación –que introdujo el etanol en la dieta- y la forma de obtener sal y sacarosa en forma aislada y, más recientemente, el proceso de refinación que redujo el aporte de fibras. Estas nuevas condiciones alimentarias cobraron mayor importancia en el siglo XX y, en países como el nuestro durante la segunda mitad del mismo. (Salud & Yucatán 1999)

La elevación del contenido del triglicéridos (aportan 9Kcal/gr) aumenta la densidad energética de la dieta, lo que se acentúa con la presencia de etanol (7kcal/gr) y sacarosa y con la reducción de las fibras. Dando lugar a dietas que inducen menor saciedad.

El retraso en la saciedad combinado con la alta densidad energética de la dieta favorece la ingestión excesiva y más aún si la dieta es atractiva o hay factores que alientan su consumo (costo económico).

Entre los factores ambientales figuran los *epigenéticos* propuestos por Baker, donde la mala alimentación de la madre durante el embarazo produce en el feto una respuesta adaptativa que establece un estado metabólico “ahorrativo” y protege el desarrollo del sistema nervioso. Se reduce el crecimiento en estatura, masa muscular y peso, lo que reduce los requerimientos y eleva las oportunidades de sobrevivir. Aumenta la concentración de cortisol en la sangre que a la larga favorece la resistencia a la insulina. (Barker, 1998)

5.6 Factores Genéticos asociados a Obesidad

Estudios recientes sugieren que el desarrollo de la obesidad podría tener su origen en las etapas más precoces de la vida, esto es, durante el periodo fetal. Según esto, en el periodo fetal tendrá lugar un mecanismo de programación, el cual activara numerosos procesos nutricionales, hormonales, físicos y psicológicos, los cuales van a actuar en periodos críticos de la vida configurando ciertas funciones fisiológicas (Tounian P, 2011)

La existencia de uno o varios miembros en una misma familia con obesidad severa ha planteado la probable implicación de factores genéticos en la aparición de este cuadro a edades tempranas, implicación que ya ha sido verificada por diferentes estudios. Así, se ha podido determinar como el riesgo de padecer obesidad extrema a lo largo de la vida (IMC > 45), se multiplica por 7 cuando uno de los progenitores la padece (Hernández Cordero, 2011; Junnila et al., 2012; Serene et al., 2011) Es más, estudios sobre familias han puesto de manifiesto índices de heredabilidad para el total de grasa corporal que varían desde el 20 al 80% (Murrin et al., 2011)

De acuerdo a la doceava revisión del mapa de la obesidad humana, con datos recogidos hasta el año 2005, han sido publicados 47 casos de obesidad monogenica, 24 casos de alteraciones mendelianas y 253 loci diferentes y susceptibles de encontrarse implicados en obesidad poligénica (Figura 10)(El-Sayed Moustafa & Froguel 2013).

En este sentido, el mapa de la obesidad indica que, excepto en el cromosoma Y, en todos los cromosomas hay genes con una potencial implicación en la aparición y desarrollo de la Obesidad (Rankinen et al., 2006) (Rao et al. 2014). Actualmente, y en base a los resultados de los 222 estudios realizados sobre genes y obesidad, existe evidencia científica suficiente como para establecer en 71 el número de genes identificados como posibles inductores en la aparición de la obesidad (Doo M, Kim Y, 2011)

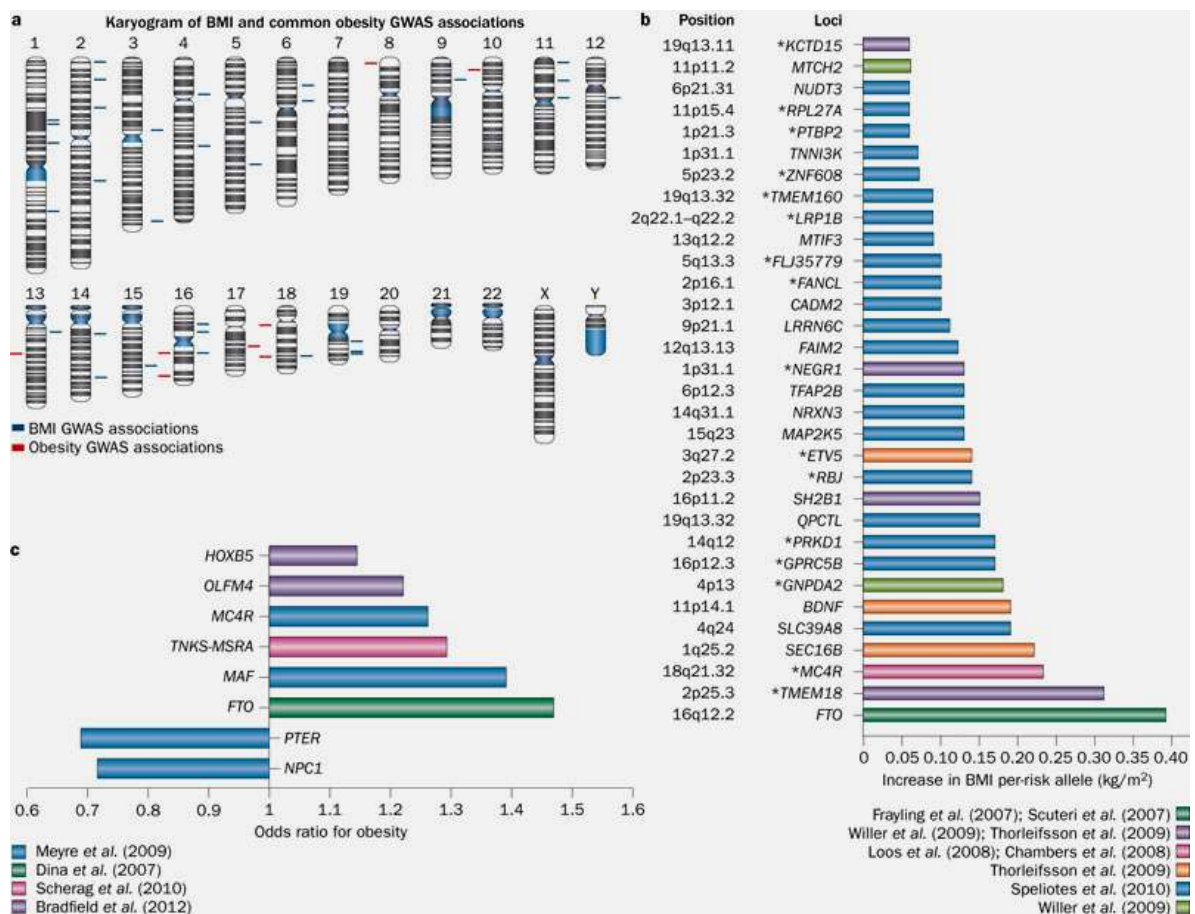


Figura 10 Mapa de los loci asociados al IMC en estudios de GWAS.(El-Sayed Moustafa & Froguel 2013)

Si además tenemos en cuenta las regiones cromosómicas, el número ascendería a más de 300. De ellos, 15 genes se asocian de manera íntima con el volumen de grasa corporal. Uno de los genes descubiertos por su potencial implicación en el desarrollo de obesidad a edades tempranas es el gen *FTO* (Baturin et al., 2011).

Se considera inductor de la ganancia progresiva de peso en aquellos sujetos en los que se encuentra sobre expresado (Peng et al.,2011; Dina et al.,2007). Por lo general, su expresión es mayor en las áreas hipotalámicas implicadas en el proceso de alimentación (McTaggart et al.,2011). Se ha podido comprobar su posible interrelación a nivel de las sensaciones de apetito y saciedad (Wardle, 2008)

Pero no fue hasta hace poco que se dilucido el mecanismo por el cual *FTO* se asocia a un desbalance energético, mediante la activación de otros dos genes denominados *IRX3* y *IRX5* llevando a un almacenamiento de los lípidos y una disminución en la termogénesis mitocondrial. (Claussnitzer et al. 2015)

Dentro de los genes mayormente asociados a Obesidad encontramos al gen *MC4R*, se encuentra en el cromosoma 18, localización18q22, codifica al receptor de melanocortina 4, este receptor se expresa en el hipotálamo, y está implicado en el control del apetito, provocando la inhibición de la ingesta. Se ha demostrado que mutaciones en este gen pueden producir hiperfagia, hiperinsulinemia, hiperglucemia, un gasto energético inferior a la media y obesidad.(Yeo et al. 1998) Se considera la causa más común de obesidad monogénica, con herencia autosómica dominante (HAD); el gen *ADAMTS2* o gen *NPY* (ADAM metalopeptidasa con el tipo de trombospondina 1), se localiza en el cromosoma 5, localización 5 qter, codifica al neuropéptido Y, un neurotransmisor localizado en el hipotálamo, que juega un papel importante en la regulación hipotalámica del balance energético, estimulando la ingesta y aumentando la actividad lipoproteín-lipasa del tejido adiposo.

El polimorfismo en el gen *NPY* (I128T-C) produce un cambio del aminoácido Leucina a Prolina y la presencia de este polimorfismo se asocia a obesidad con niveles altos de triglicéridos desencadenada por hiperfagia, hiperinsulinemia y disminución del consumo energético; el gen *LEPR*: receptor de la leptina, situado en el cromosoma 1, localización 1p31, codifica la leptina, hormona secretada por los adipocitos, que

actúa regulando el peso corporal mediante la unión y activación a su receptor en el hipotálamo. Las mutaciones en este gen juegan un papel trascendental en la fisiopatología de la obesidad; los genes *ADRB2* y *ADRB3*, de los receptores adrenérgicos beta 2 de superficie, con localizaciones 5q31-q32 y 8p12, respectivamente.

Estos genes codifican a los receptores adrenérgicos beta 2 y beta 3, localizados principalmente en el tejido adiposo, ambos participan en la regulación del metabolismo lipídico, intervienen en el control de la lipólisis y termogénesis. Los portadores de polimorfismos en estos genes, tienen mayor riesgo de desarrollar obesidad, asma nocturna y diabetes mellitus tipo 2; el polimorfismo -866 G/A del gen *UCP2* de la proteína desacoplante 2, portadora de protones (mitocondrial), localizado en el cromosoma 11, posición 11q13, lleva a una mayor expresión de la proteína en el tejido adiposo blanco y en el músculo esquelético. Se asocia a mayor riesgo de desarrollar obesidad en la edad adulta. La *UCP2* es un transportador mitocondrial que impide la formación de ATP, y libera energía en forma de calor (termogénesis adaptativa o facultativa), permitiendo así regular el peso y temperatura corporal (Cheung et al., 2012) (Tomaszewski et al., 2009)

Por último, El *PPARG* (receptor activado del proliferador de peroxisomas gamma, nuclear), regula la diferenciación de los adipocitos y la sensibilidad a la insulina, además de participar en la homeostasis energética. Interviene en la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. La presencia del polimorfismos Pro12Ala (alelo Ala12) del gen *PPARG*, localizado en el cromosoma 3, 3p25, se asocia a niveles bajos de insulina, menor índice de masa corporal, y desempeña un papel protector frente a la resistencia a la insulina y niveles de colesterol HDL altos. Este es un ejemplo de marcador genético de carácter protector en riesgo vascular. (Razquin et al. 2011)

La oportunidad más grande en estos momentos es estudiar al mismo tiempo mecanismos epigenéticos que puedan contribuir al desarrollo de este padecimiento. Por el momento variaciones cromosómicas, llamados variantes del número de copias, por sus siglas en inglés CNVs han sido asociadas a la presencia de Obesidad. (Falchi et al. 2014)

6. Generalidades sobre Diabetes

6.1 Definición

La definición de Diabetes es toda aquella alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de modificaciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. El origen y la etiología de la enfermedad pueden ser muy diversos, pero conllevan inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, en la sensibilidad a la acción de la hormona o bien en ambas en algún momento de su historia natural.

6.2 Clasificación

Habitualmente se distinguen dos tipos fenotípicamente diferentes: La Diabetes Tipo 1, de sigla DT1 (insulinodependiente) y la del tipo 2, de sigla DT2 (No insulinodependiente). La frecuencia poblacional y los riesgos de recurrencia entre hermanos se expresan en la tabla 2.(Florez et al. 2003)

	Incidencia en Población	Riesgo de recurrencia en hermano	Riesgo de recurrencia en gemelo
DM1	0.4%	6%	20-70%
DM2	7%	30-40%	63%

Tabla 2. Frecuencia de Diabetes y riesgos de recurrencia entre parientes. (Florez et al. 2003)

La Diabetes tipo 1 es de mediación inmunitaria, que consiste en un trastorno catabólico en el cual no hay prácticamente insulina circulante, aumenta el glucagon plasmático y la célula Beta pancreática falla en respuesta a todos los estímulos insulinógenos. Por tanto se requiere de insulina exógena para revertir el estado catabólico.

Sin embargo existen otros tipos específicos de Diabetes como Diabetes Gestacional; Diabetes con defectos genéticos en la función de la célula beta del páncreas

denominados MODY (Diabetes de tipo Adulto de comienzo en la juventud; del inglés: *maturity onset diabetes of the young*) o bien defectos en la acción de la Insulina (Lepreuchanismo etc). (American Diabetes Association 2014)

Recientemente un nuevo tipo denominado LADA (Diabetes autoinmune del adulto; del inglés: *latent autoinmune diabetes in adults*), en el cual existe la presencia de anticuerpos antiglutamato decarboxilasa (GAD), edad de diagnóstico de 30 a 45 años y el requerimiento inminente de Insulina. (Cernea et al. 2009) Su clasificación puede depender, entre otros factores, de las circunstancias en que se produzca el diagnóstico, de la precocidad del mismo, de la intensidad inicial de la hiperglucemia y de la presencia de enfermedades o tratamientos concomitantes. Del mismo modo, debemos tener siempre presente que la DM no es un proceso inerte sino que constituye una entidad en continua evolución. Así, su severidad puede mantenerse, mejorar o empeorar, y el grado de control metabólico estar íntimamente ligado a la propia historia natural de la enfermedad o al tratamiento considerado como idóneo en cada momento.

En el presente trabajo nos enfocaremos a la Diabetes tipo 2 siendo esta la forma más común encontrada hasta en el 90% de Diabéticos.

6.3 Diagnóstico de Diabetes tipo 2

Los criterios diagnósticos en la tabla 3 son los marcados por la Asociación Americana de Diabetes y actualmente son los más utilizados a nivel mundial.

Criterio diagnóstico	Valor
Hemoglobina glucosilada (HbA1c)	= 6,5 %
Glucemia plasmática en ayunas (GPA)	= 126 mg/d
Glucemia plasmática a las dos horas después de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (con 75 g de glucosa) (PTOG)	= 200 mg/dl
Glucemia plasmática	= 200 mg/dl en pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis de hiperglucemia

Tabla 3. Criterios diagnósticos de Diabetes en Adultos, ADA 2014

6.4 Fisiopatología de la Diabetes

La diabetes tipo 2 está relacionada casi que necesariamente a la condición de obesidad y, por lo tanto, con la resistencia a la insulina (RI) en músculo e hígado, pero se requiere adicionalmente de un deterioro de la función de la célula Beta pancreática. Estas características forman la parte central de la fisiopatología en este padecimiento. Para vencer la RI, la célula Beta inicia un proceso que termina en el aumento de la masa celular, produciendo mayor cantidad de insulina (hiperinsulinismo), que logra compensar la RI, y mantener los niveles de glucemia normales; sin embargo, con el tiempo, la célula Beta pierde su capacidad para mantener la hiperinsulinemia compensatoria, produciéndose un déficit relativo de insulina con respecto a la RI. Aparece finalmente la hiperglucemia, inicialmente en los estados post-prandiales y luego en ayunas, a partir de lo cual se establece el diagnóstico de DM2. (Maggio & Pi-Sunyer 2003)

6.4.1 Resistencia a la Insulina

La resistencia a la insulina es una condición que es heredada y está presente desde la gestación, que es cuando los niveles de insulina se encuentran en rangos normales pero que con el paso del tiempo se incrementa para mantener los niveles de glucosa, sin embargo, llega a un punto donde las células beta del páncreas se ven rebasadas y ya no producen suficiente cantidad de la hormona para compensar dicha condición, lo que trae como consecuencia que se presente la hiperglucemia (Aguirre, 2011).

El adipocito parece orquestar todo el proceso; ésta es una célula que básicamente acumula ácidos grasos (AG) en forma de triglicéridos (TG) pero que además, a través de adipocinas, puede influenciar otros órganos. Su capacidad de almacenamiento se ve limitada por su tamaño; al alcanzar ocho veces el mismo, no puede seguir almacenando AG, generando migración de éstos a órganos que en condiciones normales no lo hacen, como son el músculo esquelético (ME) y el hígado.

El ME es el principal órgano blanco de la insulina, ya que allí se deposita por efecto de la insulina el 80% de la glucosa circulante; la llegada de los AG bloquea las señales de la insulina, lo que lleva a RI en el tejido muscular esquelético. Como se observa en la figura 2, la unión de la insulina a su receptor fosforila el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS 1) en los aminoácidos tirosina, activando la vía de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3-K), la cual a su vez activa la translocación de los transportadores de la glucosa, Glut-4, desde el citoplasma hasta la membrana celular, generando poros que permiten la entrada de la glucosa a la célula. Con la llegada de los AG libres (AGL) se activa el diacilglicerol (DAG) y posteriormente la proteína cinasa C; ésta a su vez fosforila el IRS pero ya no en los aminoácidos tirosina sino en los aminoácidos serina como consecuencia de esto el IRS ya no queda disponible para la insulina, ocasionando una resistencia a la insulina.(Shulman 2000)

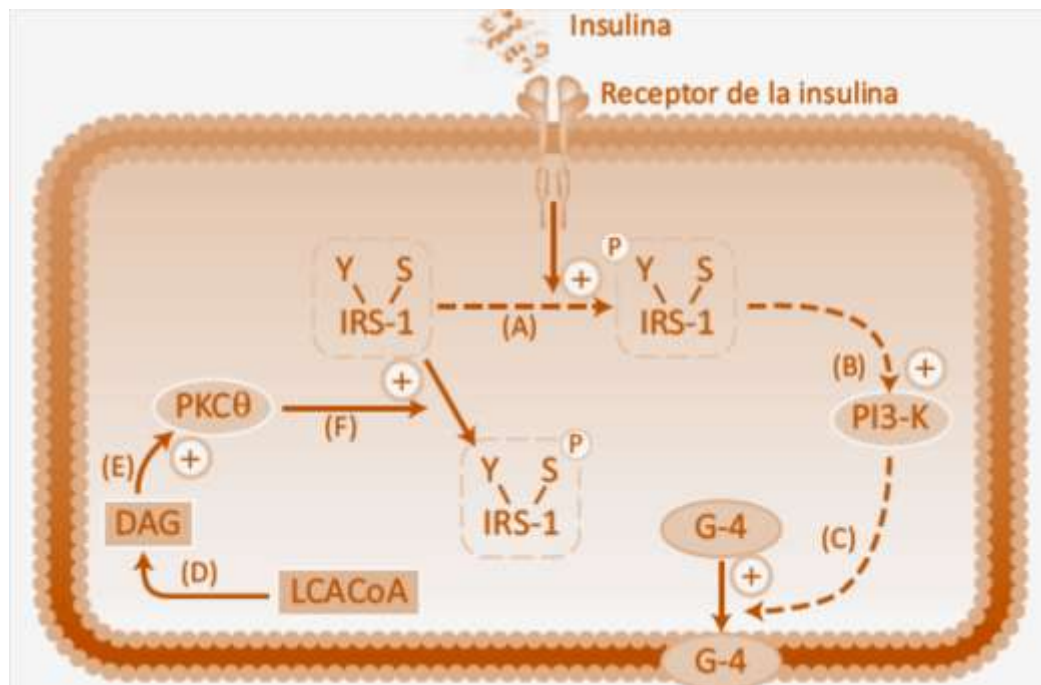


Figura 11. Vías intracelulares de respuesta a la Insulina.

6.4.2 Otros factores de daño a la célula beta

Actualmente se sabe que la falla en la célula Beta ocurre mucho antes de lo pensado, los sujetos en el tercil superior con intolerancia a la glucosa han perdido cerca del 80% de la función de la célula Beta.

Además del músculo, hígado y célula beta; el tejido graso (Lipólisis acelerada), Intestino delgado (Deficiencia/ resistencia a Incretina), célula alfa (Hiper glucagonemia), riñón (reabsorción de glucosa incrementada) y cerebro (resistencia a la Insulina) juegan un papel importante en la patogénesis de la Diabetes. Motivo por el cual ha sido denominado por De Fronzo el octeto fatal. (DeFronzo 2009)

Una de las aportaciones recientes a la fisiopatología de este padecimiento es la relación con la microbiota. En un estudio reciente combinando análisis metagenómico y clínico (Metagenome-Wide Association Study MGWAS), Karlsson y colaboradores, caracterizaron el metagenoma bacteriano fecal de 145 mujeres europeas sanas, pre-diabéticas o diabéticas. Encontrando que una menor abundancia de clostridia productoras de butirato (*Roseburia intestinalis* y *Faecalibacterium prausnitzii*) era altamente discriminante de DT2. (Karlsson et al. 2013)

Actualmente, la microbiota es considerada como un actor importante en la regulación del metabolismo energético del organismo, en particular a través del rescate colónico de energía a partir de la fibra dietética y de la regulación del almacenamiento de grasa por los adipocitos. La MI de los obesos y de los pacientes con DM2 está alterada, comparada con aquella de los individuos sanos, y sería más eficiente en la extracción de energía a partir de los alimentos. El aporte de grasa dietaría también altera la composición de la MI, aumentando poblaciones bacterianas gram-negativas y alterando la función intestinal de barrera. Estos eventos conllevan al aumento de las concentraciones plasmáticas de LPS y el con siguiente desarrollo de un estado inflamatorio de bajo grado que facilita la aparición de resistencia insulínica y DM2. (Han & Lin 2014)

6.5 Estudios Genéticos en Diabetes tipo 2

Este padecimiento ha sido uno de lo más estudiados, debido a su frecuencia a nivel mundial y complicaciones graves. Luego de haberse hallado un gen en el año 2000 (*PPARG*, del inglés peroxisome proliferative activated receptor- receptor gamma de activadores de proliferación de peroxisomas) uno más en 2003 (*KCNJ11* un canal de potasio, elemento 11 de la familia J), y justo hasta el descubrimiento de *TCF7L2*; se evidenció su papel como gen de susceptibilidad para la DT2 en diversas poblaciones humanas aunque con un riesgo variable. Siendo uno de los candidatos replicado en distintas poblaciones con un riesgo atribuible de entre el 2 y el 28%. (Grant et al., 2006; Groves et al., 2006)

Fue justamente a partir del 2007 cuando se inició el bombardeo de genes descubiertos. (Hiroshi et al., 2007) En concreto podemos dividir en dos periodos el descubrimiento de las variantes asociadas a Diabetes, una primera ola de GWAS por el 2007 identifico una docena de variantes: *ADAMTS9*, *CDC123*, *CDKAL1*, *JAZF1*, *NOTCH2*, *THADA* entre otros. (Saxena et al. 2007)(Scott et al. 2007)(Zeggini et al. 2007) Y la segunda ola dada en 2009 identificando a *MTNR1B*, *DGKB*, *PROX1*, *ADCY5* y *GCKR*; todos estos estudios realizados en población Europea. (Dupuis et al. 2010) (Prokopenko et al. 2009)

Actualmente existen cerca de 90 variantes asociadas a Diabetes, involucradas en la secreción de insulina, función de la célula Beta, resistencia a la Insulina o bien sin función conocida; de las cuales solo dos variantes son exclusivas de la población Mexicana, *SLC16A11* y una mutación rara en el gen *HNF4*(Figura 12) (Bonfond & Froguel 2015)(Williams et al. 2014)(Estrada et al. 2014) El efecto individual de cada SNP en el riesgo para padecer DT2 es modesto, incrementando menos del 15% de riesgo (OR <1.15). Como consecuencia todos los SNPs han capturado menos del 15% de agregación familiar. (Morris et al. 2012).

En otras palabras los SNPs no son útiles para predecir el futuro de la enfermedad; sin embargo el uso de los datos genéticos puede beneficiar a los pacientes de recién diagnóstico o bien proponer nuevos medicamentos. Y más aún hemos aprendido que cada etnia tiene variantes exclusivas de su trasfondo genético.

Insulin secretion / beta cell or islet function				Unknown				Insulin resistance			
<i>HNF4A</i>	CE	<i>KCNQ1</i>	EA	<i>ADAMTS9</i>	CE	<i>RND / RBM43</i>	AA	<i>ANK1</i>	CE	<i>IRS1</i>	CE
<i>TCF7L2</i>	CE	<i>MAEA</i>	EA	<i>AP3S2</i>	SA	<i>SGCG</i>	SA	<i>BCAR1</i>	CE	<i>PPARG</i>	CE
<i>GCK</i>	CE	<i>PAX4</i>	EA	<i>CHCHD2P9</i>	CE	<i>SPRY2</i>	EA	<i>CCND2</i>	CE	<i>FTO</i>	CE
<i>HNF1B</i>	CE	<i>SLC30A8</i>	CE	<i>DNER</i>	SA	<i>SRR</i>	EA	<i>CILP2</i>	CE	<i>GRB14</i>	SA
<i>KCNJ11</i>	CE	<i>THADA</i>	CE	<i>FITM2 / R3HDML</i>	EA	<i>ST6GAL1</i>	SA	<i>KLHDC5</i>	CE	<i>HMG2</i>	CE
<i>WFS1</i>	CE	<i>UBE2E2</i>	EA	<i>GCC1</i>	EA	<i>TLE4</i>	CE	<i>TLE1</i>	CE	<i>KLF14</i>	CE
<i>ARAP1</i>	CE	<i>VPS26A</i>	SA	<i>GRK5</i>	EA	<i>TMEM163</i>	SA	<i>ZMIZ1</i>	CE	<i>PEPD</i>	EA
<i>BCL11A</i>	CE	<i>ZBED3</i>	CE	<i>HMG20A</i>	SA	<i>TP53NP1</i>	CE	<i>COBLL1</i>	CE	<i>RBMS1</i>	CE
<i>C2CD4A / C2CD4B</i>	EA	<i>ZFAND3</i>	EA	<i>JAZF1</i>	CE	<i>TSPAN8 / LGR5</i>	CE	<i>MACF1</i>	CE	<i>ARL15</i>	TA
<i>CDC123 / CAMK1D</i>	CE	<i>GPSM1</i>	EA	<i>KCNK16</i>	EA	<i>ZFAND6</i>	CE			<i>LEP</i>	EA
<i>CDKAL1</i>	CE	<i>LPP</i>	TA	<i>LAMA1</i>	CE	<i>FAF1</i>	TA			<i>SLC16A11</i>	M
<i>CDKN2A/B</i>	CE	<i>SSR1 / RREB1</i>	TA	<i>MOB2</i>	CE	<i>HLA-B</i>	AA			<i>GCKR</i>	CE
<i>DUSP9</i>	CE	<i>ADCY5</i>	CE	<i>NOTCH2</i>	CE	<i>IGF2</i>	AA			<i>ANKRD55</i>	CE
<i>GLIS3</i>	EA	<i>DGKB</i>	CE	<i>PRC1</i>	CE	<i>MPHOSPH9</i>	TA			<i>MC4R</i>	CE
<i>HHEX / IDE</i>	CE	<i>MTNR1B</i>	CE	<i>PSMD6</i>	EA	<i>POU5F1 / TCF19</i>	TA			<i>TBC1D4</i>	G
<i>HNF1A</i>	CE	<i>PROX1</i>	CE	<i>PTPRD</i>	EA	<i>SLC16A13</i>	EA				
<i>IGF2BP2</i>	CE	<i>GIPR</i>	CE	<i>RASGRP1</i>	EA	<i>TMEM154</i>	TA				

T2D susceptibility genes primarily found through:

- Linkage studies
- Candidate genes studies
- GWAS and GWAS meta-analyses
- GWAS and GWAS meta-analyses of both imputed and genotyped SNPs
- GWAS and GWAS meta-analyses for T2D-related quantitative traits
- GWAS based on Metabochip custom beadchips
- WES

Figura 12. Lista de loci asociados a Diabetes tipo 2. AA. Africanos-Americanos; CE Caucasicos de Europa; EA Asiaticos del Este; G Groenlandia; GWAS estudios completo del genoma; M Mexicanos; SA Asiaticos del Sur; T2D Diabetes tipo 2; TA Trans-ancestría; WES secuenciación completa de exones. (Bonnetfond & Froguel 2015)

JUSTIFICACIÓN

México se encuentra en un proceso de transición epidemiológica, caracterizado por un aumento en la morbi-mortalidad de enfermedades crónico degenerativas, como la Obesidad y Diabetes tipo 2. (Salud & Yucatán 1999).

Ambos padecimientos están asociados a una menor esperanza de vida y a sus complicaciones micro y macro vasculares. El aumento en la demanda de servicios de salud y los costos elevados, directos e indirectos de sus comorbilidades imponen la necesidad urgente de actuar con la mejor evidencia científica disponible para su control y prevención.

En la población mexicana es necesaria la identificación de marcadores genéticos exclusivos que puedan ser utilizadas como predictores tempranos de riesgo metabólico con el fin proponer modelos de prevención que puedan aplicarse desde la niñez.

HIPOTESIS

En la población Mexicana existe un perfil genético exclusivo para el desarrollo de obesidad en niños y Diabetes tipo 2 en adultos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar variantes genéticas de riesgo asociadas a Obesidad infantil y Diabetes tipo 2 en población Mexicana

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes de estudio para Obesidad Infantil y Diabetes tipo 2 en una muestra de población de la Ciudad de México.
2. Medir las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen *FTO*, *NPC1*, *GNPDA2*, *NEGR1*, *ENPP1* y *MC4R* para obesidad Infantil.
3. Para Diabetes tipo 2 realizar un escrutinio completo del genoma mediante el uso de Metabochip con 200 mil polimorfismos.
4. Determinar la asociación del polimorfismo en los genes candidatos con el índice de masa corporal y perfil bioquímico para el caso de obesidad infantil y con un perfil metabólico para el caso de diabetes tipo 2.
5. Determinar la asociación entre los polimorfismos con el perfil metabólico de los casos y controles para ambos padecimientos.
6. Realizar un score de riesgo genético para la población Mexicana de todas las variantes asociadas a DT2.
7. Analizar si las variantes de los genes estudiados pueden utilizarse como marcadores predictivos

DESARROLLO

1. Diagrama de Flujo

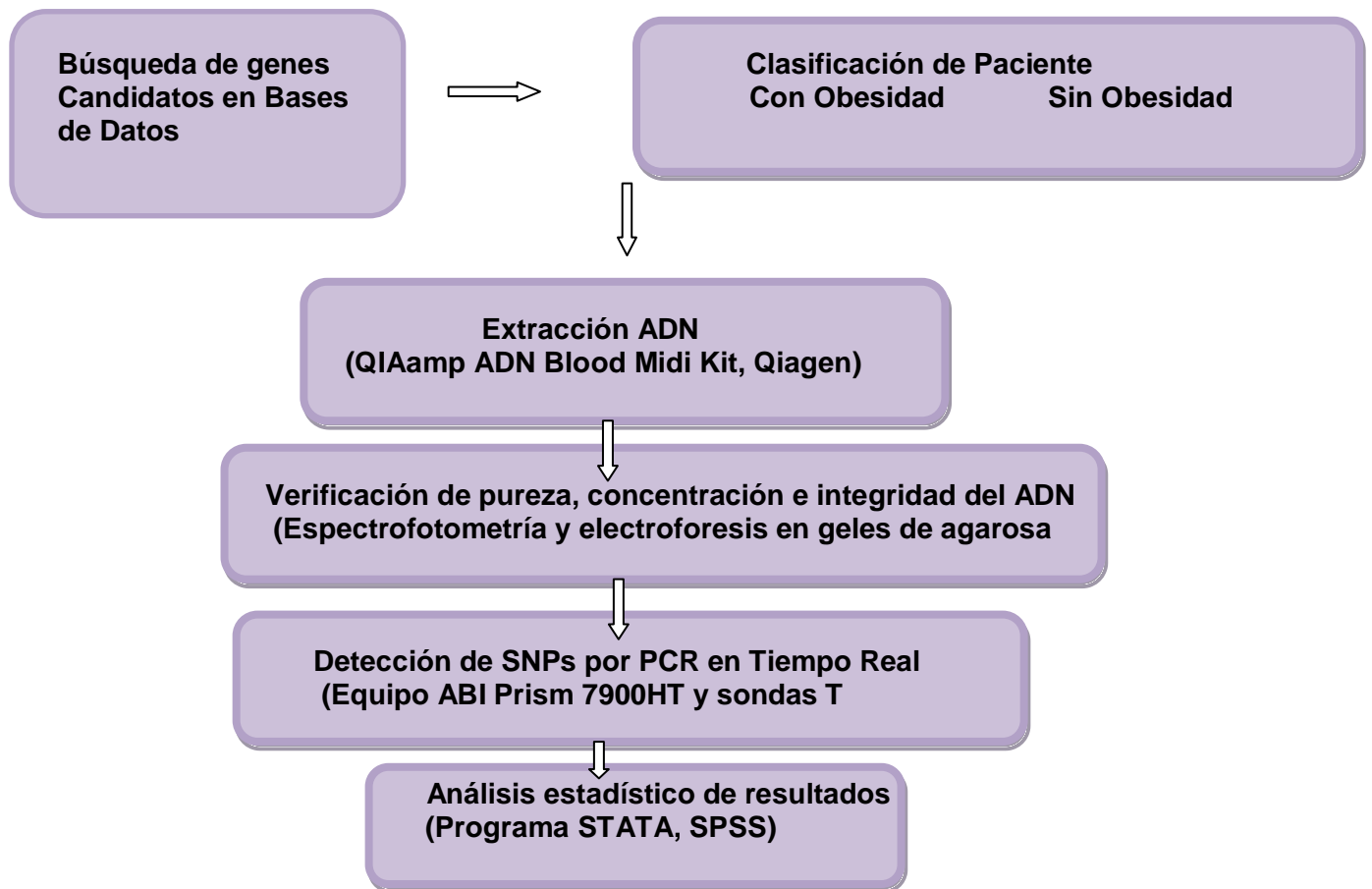


Figura 13. Diagrama de Flujo utilizada en Fase 1, Obesidad Infantil.

Diabetes tipo 2

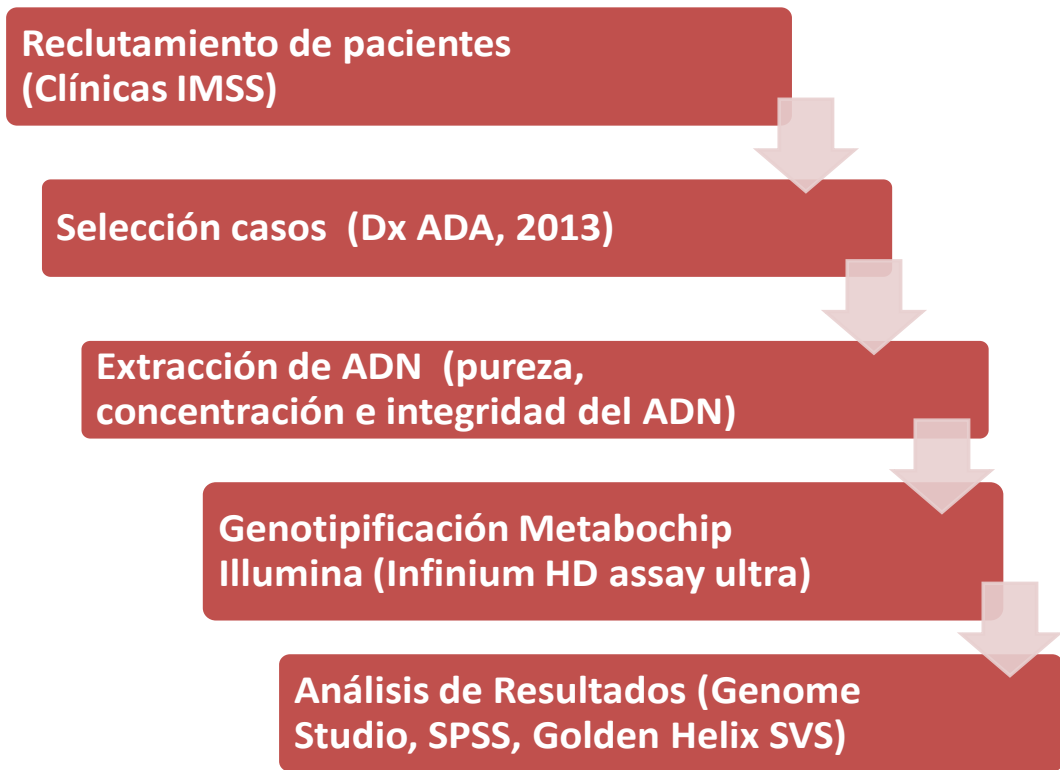


Figura 14. Diagrama de flujo utilizada en Fase 2, Diabetes

2. Material y Métodos.

2.1. Fase 1: Obesidad infantil

Diseño del estudio: casos y controles.

Se procederá a tomar las muestras de sangre procedentes de niños casos y controles entre 6 y 12 años de edad procedentes de cinco estados de la República Mexicana (San Luis Potosí, Queretaro, Guanajuto, Tijuana y Ciudad de México, que fueron reclutados aleatoriamente del 2007 al 2011; todos ellos fueron caracterizados en los siguientes parámetros: valoración clínica (medidas antropométricas, antecedentes heredo-familiares de diabetes, hipertensión, obesidad, etc.), parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos e insulina. El diagnóstico se realizó acorde a los criterios del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) ($IMC \geq Pc95$). Los controles fueron niños con $IMC \leq Pc75$. Las tablas se muestran en los Anexos I y II de la presente tesis.

Los **casos** son niños cuyo IMC es \geq del percentil 95 para edad y sexo.

Los **controles** son niños cuyo IMC es $<$ del percentil 75 para edad y sexo.

Tamaño de la muestra. Para el polimorfismo de los genes se han descrito prevalencias desde 10% hasta 37% y se ha informado una razón de momios desde 1.4 hasta 2.37 veces. Aplicando los parámetros mencionados se obtuvo un tamaño de muestra de 800 niños para cada grupo de estudio, casos y controles.

Criterios de inclusión. Niños aparentemente sanos, de ambos sexos, con edades de 6 a 12 años, cuyo IMC sea $<$ del percentil 75 o \geq percentil 95, quienes previa información hayan otorgado su consentimiento por escrito.

Criterios de exclusión. Niños que al momento del estudio se encuentren con:

- 1) Alguna enfermedad infecciosa aguda que modificaría el patrón de citocinas.
- 2) Que sufran alguna enfermedad crónica como alergias y enfermedades autoinmunes
- y 3) Que estén participando en un programa de reducción de peso, con o sin tratamiento farmacológico.

Definición de variables:

Variables dependientes: Condición nutricional (normalidad u obesidad general y central) y distribución de grasa corporal. Concentraciones de glucosa, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos y presión arterial sistólica y diastólica

Variables Independientes: polimorfismo de los genes candidatos *ENPP1*, *MDR2*, *NEGR1*, *FTO* y *MC4R*; estilo de vida (dieta habitual y ejercicio).

2.2. Fase 2 Diabetes tipo 2

Diseño del estudio: casos y controles.

Se reclutaron 2900 pacientes adultos derechohabientes del IMSS en el Hospital de especialidades Centro Médico siglo XXI procedentes de 4 unidades de Medicina Familiar de la ciudad de México durante el periodo de 2011 a 2012; a los que previo consentimiento informado se evaluaron los siguientes parámetros: valoración clínica (toma de presión arterial y Exploración física para datos de neuropatía diabética; medidas antropométricas, antecedentes heredo-familiares de enfermedades cardiovasculares, renales, diabetes y obesidad, antecedentes de tabaquismo, alcoholismo y actividad física), Recordatorio de alimentación de 24 horas, parámetros bioquímicos (glucosa, Hemoglobina glucosilada, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, urea, creatinina), y albumina en orina. Se les realizara un pronóstico de riesgo cardiovascular y se estimó su tasa de filtración glomerular mediante la fórmula de Cockcroft –Gault.

Los **casos** son adultos que cursan con Diabetes tipo 2, según los criterios del *American Diabetes Association* (ADA) y que fueron diagnosticados entre 30 a 55 años de edad con o sin complicaciones macro y microvasculares. No consanguíneos.

Los **controles** son adultos sin diagnóstico de Diabetes al momento del estudio. No consanguíneos.

Tamaño de la muestra: 1200 casos y 1000 controles, a todos los pacientes se les entrego una hoja de resultados bioquímicos, Riesgo Cardiovascular, tasa de filtración glomerular y medidas antropométricas. (Anexo III)

Criterios de Inclusión: Casos; Pacientes Diabéticos diagnosticados de acuerdo a los criterios del ADA de los 30 a 55 años de edad con y sin complicaciones. No consanguíneos.

Controles; Pacientes de 30 a 75 años edad sin Diagnostico de Diabetes.

Criterios de No inclusión: Pacientes con otras enfermedades que puedan reducir la sobrevida o que puedan confundir la ocurrencia de eventos (SIDA- Cirrosis Hepática, cualquier neoplasia maligna, etc.). Sujetos que no sean capaces de proveer información confiable durante la entrevista (demencia, dependencia al alcohol u otros fármacos).

Definición de variables:

VARIABLES DEPENDIENTES: Diabetes tipo 2, concentraciones de glucosa, hemoglobina glucosilada, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos, urea, creatinina, albumina en orina y presión arterial sistólica y diastólica

VARIABLES INDEPENDIENTES: polimorfismos de los genes candidatos, estilo de vida (dieta habitual y ejercicio) y tratamiento.

Tamaño de muestra: El poder estadístico de un estudio depende de diferentes factores, como:

- El tamaño del efecto a detectar, es decir, la magnitud mínima de la diferencia o asociación entre los grupos que se considera clínicamente relevante. Cuanto mayor sea el tamaño del efecto que se desea detectar, mayor será la probabilidad de obtener hallazgos significativos y, por lo tanto, mayor será el poder estadístico.
- La variabilidad de la respuesta estudiada. Así, cuanto mayor sea la variabilidad en la respuesta, más difícil será detectar diferencias entre los grupos que se comparan y menor será el poder estadístico de la investigación. De ahí que sea recomendable estudiar grupos lo más homogéneos posibles.
- El tamaño de la muestra a estudiar. Cuanto mayor sea el tamaño muestral, mayor será la potencia estadística de un estudio. Es por ello que en los estudios con muestras muy grandes se detectan como significativas diferencias poco relevantes, y en los estudios con muestras menores es más fácil obtener resultados falsamente negativos.

- El nivel de significación estadística. Si se disminuye el valor de alfa también se disminuye el poder de la prueba. Es decir, si disminuimos la probabilidad de cometer un error de tipo I aumentamos simultáneamente la probabilidad de un error de tipo II, por lo que se trata de encontrar un punto de “equilibrio” entre ambas.

Habitualmente se trabaja con un nivel de significación del 95% ($\alpha=0.05$), por lo que el equilibrio hay que encontrarlo finalmente entre el tamaño de la muestra que es posible estudiar y el poder que se quiere para el estudio. (LenThomas & J.Krebs 2012)

Mediante el software *Quanto* La selección del tamaño de muestra se basó en estos importantes factores. En una fase preliminar, se evaluó la potencia estadística para identificar loci con diferentes efectos relativos utilizando diversos tamaños de muestra. A partir de estos análisis preliminares, se seleccionó un tamaño de muestra que supone un balance razonable entre costo y potencia estadística (1000 casos y 1000 controles).

3. Diseño Experimental

3.1. Fase 1: Obesidad Infantil

- Extracción de ADN se obtuvo a partir de células mononucleares de sangre periférica. Se utilizará un método de columna (QIAamp ADN Blood Midi Kit, No. Cat 51185, Qiagen) el cual se basa en la unión específica del ADN a una membrana de silica gel con la posterior eliminación de contaminantes por medio de lavados y centrifugación. El ADN puro es eluído en un volumen final de 300 a 400µg.
- Determinación de integridad y pureza del ADN. Se realizaron lecturas espectrofotométricas a 260/280 en el equipo de nanodrop. La integridad se analizó mediante geles de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio para observar la presencia del ADN genómico.
- Detección de SNP's. Todas las muestras fueron genotipificadas para las siguientes variantes *MC4R* rs17782313, *NEGR1* rs2815752, *ENPP1* rs7754561, *NPC1* rs1805081, *GNPDA2* rs10938397 y *FTO* rs1421085 utilizando tecnología de Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com), haciendo uso del equipo ABI Prism 7900HT y sondas TaqMan que detectan el alelo 1 o del alelo 2. El rango de genotipificación fue de al menos 98%, y sin desviación del equilibrio Hardy-Weinberg ($P \geq 0.01$)
Los datos se analizaron por medio del software del equipo para obtener frecuencia de homocigotos para alelo 1 ó 2 o heterocigotos 1,2.

Análisis Estadístico

Análisis descriptivo: Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas, desagregadas por género y edad, de acuerdo con el IMC en las 2 categorías normal y obesidad respectivamente. Las frecuencias genotípicas, se calculan estimando la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calcula la proporción

de cada alelo. Para los datos obtenidos de SNP's se evaluará si existe equilibrio de Hardy–Weinberg con el programa Popgene v1.32 (University of Alberta, Canada).

Comparación divariada. Se estimó el grado de asociación del SNP comparando proporciones en sujetos con IMC normal y anormal, estimado la razón de momios y su correspondiente intervalo de confianza al 95%. Se estimó la correlación entre el IMC con los datos de laboratorio (perfil bioquímico), por el coeficiente de correlación de Pearson.

Análisis multivariado: Se calculó el odds ratio (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación. Se ajustó para evitar variables de confusión, por lo cual utilizamos modelos de regresión logística.

Los resultados del perfil bioquímico e IMC los cuales se analizaron mediante regresión logística. Todos estos análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS (SPSS Inc, Chicago Ill.) y STATA (SE/8, Stata Corp, TX). Considerando significativos los valores de $p < 0.05$.

Extracción de ADN

1. Extracción de ADN se realizó a partir de 4ml de muestras sangre periférica utilizando un método de columna (QIAamp ADN Blood Midi Kit, No. Cat 51185, Qiagen) el cual se basa en la unión específica del ADN a una membrana de silica gel con la posterior eliminación de contaminantes por medio de lavados y centrifugación.

El ADN puro es eluído en un volumen final de 300 a 400 μ l, con un rendimiento promedio de 50 μ g

A continuación se describe la metodología que se realizó para el aislamiento del ADN con columnas Qiagen. (Figura 15)

1. En un tubo de 15 ml se agrega 200 μ l de proteasa
2. Posteriormente se añade 2ml de sangre
3. Añadir 2.5 mL de buffer AL, al mismo tubo mezclando 15 veces por inversión y luego se mezcla con vortex por un minuto.
4. Incubar a 70° C durante 10 minutos.

5. Añadir 2 ml de etanol al 100%.
6. Mezclar 10 veces por inversión y posteriormente en el vortex.
7. Transferir cuidadosamente la mitad de la mezcla anterior y cerrar el tubo.
8. Centrifugar a 3000 rpm durante 3 min.
9. Transferir cuidadosamente la mitad restante de la mezcla.
10. Centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos nuevamente.
11. Remover la columna del tubo y desechar el filtrado, regresar la columna al tubo.
12. Cuidadosamente agregar 2 ml de buffer $\Delta W1$ a la columna, cerrar el tubo y centrifugar a 4000 rpm por 6 minutos.
13. Agregar cuidadosamente 2 mL de buffer $\Delta W2$, cerrar el tubo y centrifugar con su tapa.
14. Centrifugar a 4000 rpm por 20 min.
15. Colocar la columna en un tubo limpio de 15 ml, cuidando que no queden residuos de los buffers en la punta de la columna (de ser así limpie con una toalla o gasa limpiando el buffer excedente) y descartar el tubo que tenía el filtrado.
16. Incubar la columna por 10 min a 70° C.
17. Sacar la columna del horno y enfriar por 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Añadir 300 μ l de buffer ΔE a TA directamente sobre la membrana de la columna cierre el tubo e incubar de 5 a 10 min a TA.
19. Centrifugar a 4000 rpm por 6 min, repetir el paso anterior.
20. Transferir el filtrado a tubos de 1.5 ml nuevos.

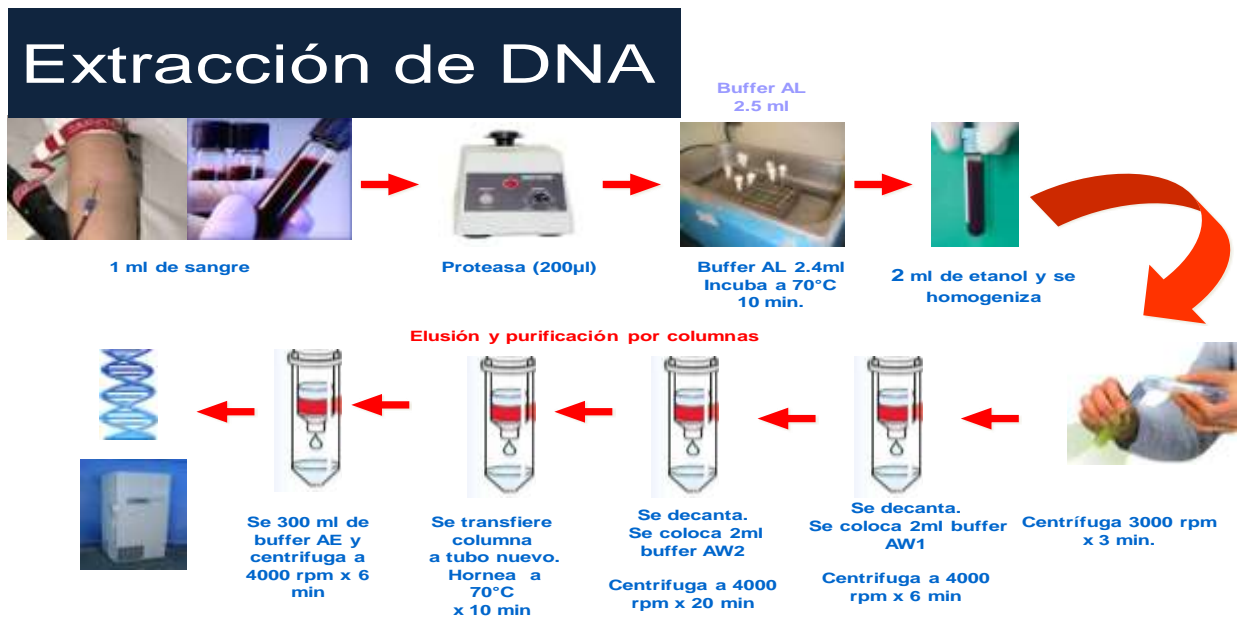


Figura 15. Extracción de DNA por método de columna

Determinación de integridad y pureza del ADN.

Se realizaron lecturas espectrofotométricas a 260/280 en el equipo de nanodrop. El índice de pureza se obtuvo por el coeficiente de lecturas a 260 y 280nm ($I_{260/280}$) con un rango de 1.7 a 1.9.

La integridad se analizó mediante geles de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio observándose una banda correspondiente al ADN genómico extraído. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas obteniendo una concentración final de 20ng/µl para la realización de PCR en tiempo real.

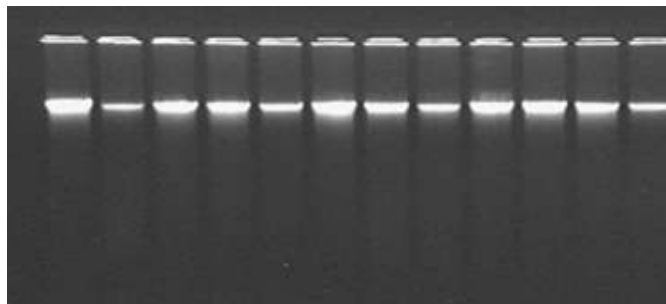


Figura 16. Integridad del ADN de las muestras utilizadas en geles de agarosa al 0.8%.

Determinación de SNP's.

La amplificación y detección de los productos se realizó por medio de PCR en tiempo real en el equipo 7900HT Fast real time PCR system (Applied Biosystems). Se utilizaron sondas y primers proporcionados por el fabricante (Assay on Demand, Applied Biosystems). Se obtuvieron los genotipos de cada muestra en el software del equipo mediante un mapa de discriminación alélica (Figura 17) y un Amplification Plot donde se gráfica la señal de fluorescencia contra el número de ciclos (Figura 18). Los datos se analizaron por medio del software del equipo obteniendo frecuencias de homocigotos para alelo 1 ó 2 o heterocigotos^{1,2}. Se siguió el mismo procedimiento para cada polimorfismo.

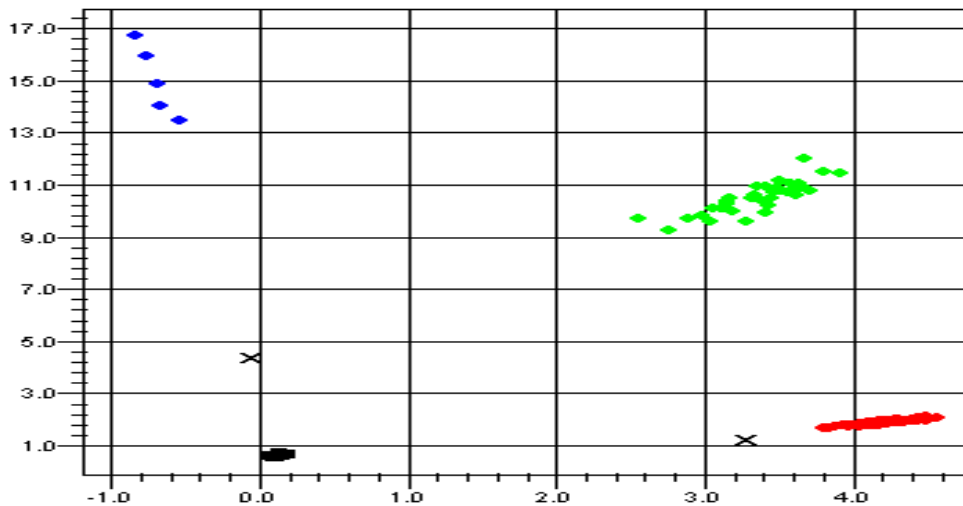


Figura 17. Mapa de discriminación alélica para un polimorfismo determinado. El color azul representa el genotipo homocigoto para el alelo T, el color verde el genotipo heterocigoto y por último el color rojo a los individuos homocigotos para el alelo A. Los cuadros negros son los controles negativos (NTC).

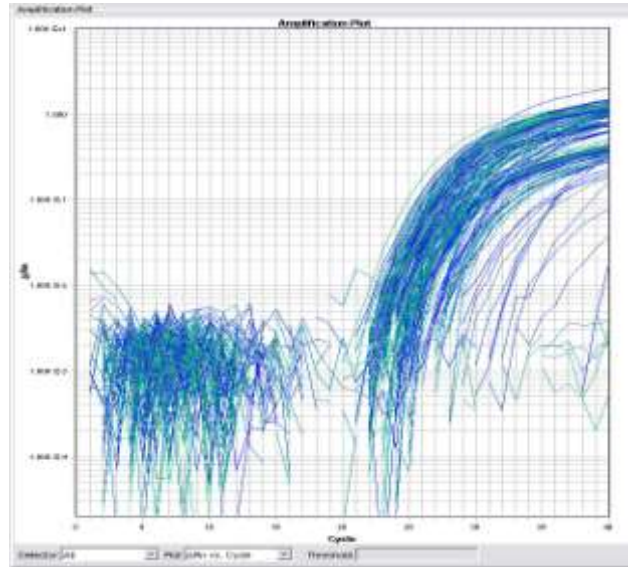


Figura 18. Amplification Plot del polimorfismo determinado donde observamos en azul la fluorescencia obtenida únicamente por el producto de amplificación.

Análisis para marcadores predictivos

1. Análisis Estadístico mediante análisis multivariado se calculó el odds ratios (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación. Los 4 modelos principales de herencia utilizados, fueron:

Modelo dominante. Supone que una única copia de C es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos TC y homocigotos CC tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos TT:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta D_o + \gamma Z$$

Modelo recesivo. Supone que son necesarias 2 copias de C para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos TC y homocigotos del alelo más frecuente TT tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante CC:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta R_e + \gamma Z$$

***Modelo aditivo.** Supone que cada copia de C modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala logit); por tanto, los homocigotos CC tienen el doble de riesgo que los heterocigotos TC. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos TC y peso 2 a los homocigotos CC:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta_{Ad} + \gamma Z$$

Modelo codominante. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (He) y homocigotos variantes (Va) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Este modelo emplea 2 coeficientes (grados de libertad).

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta_1 He + \beta_2 Va + \gamma Z$$

* Este tipo de modelo es el más comúnmente utilizado en todo tipo de estudios caso-control

Se comparó el ajuste del modelo codominante (2 parámetros), con los demás modelos (1 parámetro). Estas comparaciones se realizaron mediante el test de la razón de verosimilitudes. En estos modelos se integraron los resultados del perfil bioquímico e IMC los cuales se analizaron mediante regresión logística. Todos estos análisis se llevaron a cabo con el programa STATA (SE/8, Stata Corp, TX). Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

3.2. Fase 2: Diabetes tipo 2

Generalidades: A todos los pacientes se les aplicó un cuestionario a través del cual se obtuvieron datos socioeconómicos, demográficos, patológicos personales y heredofamiliares. El cuestionario fue aplicado por personal de salud a quien se le capacitó y estandarizó previamente en la aplicación del cuestionario, toma de mediciones y muestras. La toma de muestra de sangre se realizó en instalaciones del Centro Médico siglo XXI, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, en ayuno de 12hrs se obtuvo una muestra sanguínea por venopunción en 2 tubos al vacío y estériles (Vacutainer), uno sin EDTA con capacidad de 7mL para la realización de determinaciones serológicas y otro con EDTA con capacidad de 5mL para la determinación de A1c y la extracción de DNA.

.-Determinaciones antropométricas. Las mediciones que se les realizaron a los pacientes son: Peso (Kg) y Talla (cm), para el cálculo de IMC (Kg/m^2) y el perímetro de cintura y cadera, a partir de estos se calculó el índice cintura/cadera (ICC). La presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) se midió con un esfigomanómetro de columna de mercurio (America Diagnostic Corp., NY).

.-Determinaciones clínicas. El perfil bioquímico comprendió: glucosa (mg/dL, mmol/L), urea (mg/dL), creatinina, colesterol LDL (C-LDL, mg/dL), colesterol HDL (C-HDL, mg/dL) y triglicéridos (mg/dL). Estos parámetros se determinaron por fotometría en el instrumento ILab 30 Clinical Chemistry System (Instrumentation Laboratory, Barcelona España). El control de calidad interno se realizó con los controles SYNCHRON niveles 1, 2 y 3. Las determinaciones bioquímicas fueron realizadas por químicos titulados y capacitados en el uso de estas metodologías, así mismo desconocían la hipótesis del estudio.

- Extracción de ADN. La Extracción de ADN se realizó a partir de muestras de sangre periférica, de la cual se realizó la extracción de ADN genómico mediante un método semi automatizado con el equipo ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid

PrepStation. Para determinar la pureza del DNA se realizaron lecturas espectrofotométricas a 260/280 en el equipo de nanodrop.

La integridad se analizó mediante geles de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio para observar la presencia del DNA genómico. Obteniendo por cada muestra concentraciones de al menos 250ng/ μ l.

- Genotipificación: Se realizó una selección previa de muestras a utilizar en los microarreglos, para esto se procedió a verificar la concentración de ADN por medio de Nanodrop, aquellas con una concentración menor a 100ng/ μ l se excluyeron.

Posteriormente se excluyeron aquellos pacientes en un rango de edad menor a 35. La genotipificación se realizó a 2000 muestras mediante microarreglos Cardiometabochip Illumina tecnología "bead array", siguiendo el protocolo Infinium HD Assay, descrito con detalle más adelante.

La ventaja de utilizar este microarreglo es en primera el costo a comparación de uno de escaneo completo del genoma, en segunda fue diseñado específicamente para analizar SNPs previamente asociados a rasgos metabólicos. Divido en dos paneles:

- 1- SNPs asociados a once rasgos: Diabetes tipo 2, glucosa en ayuno, enfermedad coronaria, Lipoproteína de baja densidad (colesterol-LDL), Lipoproteína de alta densidad (colesterol-HDL), Triglicéridos, Índice de Masa corporal, presión sistólica y diastólica, intervalo QT e índice cintura-cadera ajustado a IMC.
- 2- SNPs asociados a rasgos de menor interés : insulina en ayuno, glucosa 2 hr postprandio, hemoglobina glicada, edad de Dx DT2, dx menor a los 45 años, circunferencia de cintura, talla, porcentaje de grasa total, colesterol total, cuenta plaquetaria, volumen plaquetario y cuenta de leucocitos.

Este microarreglo fue diseñado por representantes de varios consorcios como DIAGRAM (Diabetes tipo 2), GIANT (rasgos antropométricos), MAGIC (glucosa e insulina) y GWAS meta-análisis y cuenta con 196.725 polimorfismos de un solo nucleótido los cuales se analizan al mismo tiempo por cada individuo.

Protocolo Infinium HD Assay Ultra (Cardiometabochip)

Día 1

- Cuantificación del DNA
- Preparar placa MSA3 (4µl DNA en cada pozo a una concentración de 50ng/µl)

Reactivos: 0.1N NaOH; MA1; MA2; MSM

En este punto se procede a desnaturalizar y neutralizar las muestras para proceder a la amplificación.

Preparación: se precalienta el horno de hibridación Illumina a 37°C, se procede a dispensar 20µl MA1 a la placa MSA3

Dispensar 4µl 0.1N NaOH a cada pozo ya con el DNA y el MA1

Sellar la placa MSA3 (96 pozos)

Vortex a 1600rpm por un minuto

Centrifugar a 280xg por un minuto

Incubar 10 minutos a temperatura ambiente

Agregar 34µl MA2 en cada pozo

Agregar 38µl MSM a cada pozo

Resellar nuevamente la placa

Vortex a 1600rpm por un minuto

Centrifugar 280xg por un minuto

Incubar en el horno de hibridación durante 20 a 24hrs a 37°C

Día 2

- Fragmentación MSA3
(No olvidar Precalentar el bloque MIDI a 37°C y descongelar el FSM a temperatura ambiente, cuidadosamente invertir para mezclar el contenido y dar un pulso en la centrifuga 280xg)
Retirar la placa MSA3 del horno de hibridación Illumina
Centrifugar la placa a 50xg por un minuto
Agregar 25µl FSM a cada pozo

Resellar nuevamente

Vortex 1600rpm por un minuto

Centrifugar 50xg por un minuto a 22°C

Colocar la placa sellada en el bloque caliente a 37°C y dejarlo ahí durante una hora

- Precipitar MSA3

(No olvidar precalentar el bloque a 37°C y descongelar el reactivo PM1)

Agregar 50µl PM1 a cada pozo, resellar la placa

Vortex 1600rpm por un minuto

Incubar a 37°C durante 5 minutos

Centrifugar 50xg a 22°C por un minuto

(Nota: preparar la centrifuga a 4°C para el siguiente paso)

Agregar 155µl 100% 2-Propanolol a cada pozo

Cuidadosamente sellar con una capa NUEVA

Invertir 10 veces para mezclar el contenido

Incubar a 4°C durante 30 minutos

Centrifugar a 3000 xg a 4°C durante 20 minutos

Retirar el sello y tirarlo; decantar el sobrenadante

Pegar firmemente sobre pañuelos con la placa invertida varias veces durante un minuto

Dejar secando la placa invertida al menos durante una hora



- Resuspender MSA3
(Precalentar el horno de hibridación Illumina a 48°C y descongelar reactivo RA1)

Agregar 23µl RA1 a cada pozo con el pellet de DNA

Sellar la placa con “foil seal” con ayuda del bloque, empujando hacia abajo firmemente 5 segundos

Colocar la placa en la incubadora durante una hora a 48°C

Vortex a 1800rpm por un minuto

Dar un pulso en la centrifuga a 280xg

- Hibridar Multi BC2
(Precalentar el bloque a 95°C; asimismo el horno de hibridación a 48°C)

Pasos: Preparar las cámaras de Hibridación “Hyb chambers”

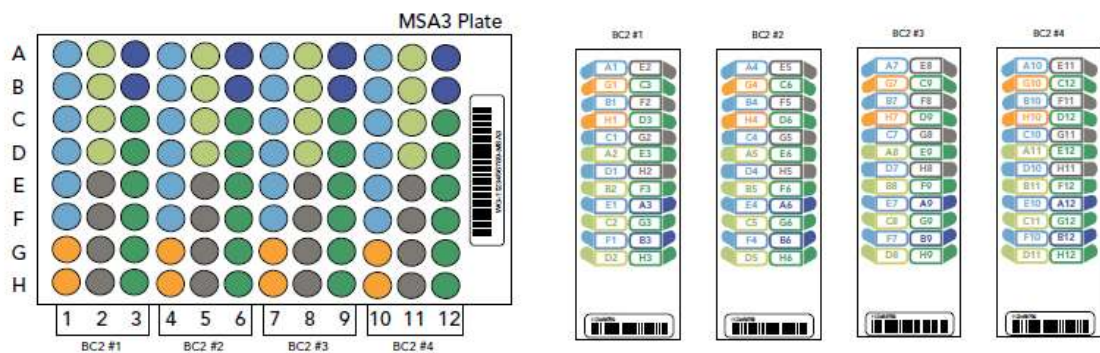
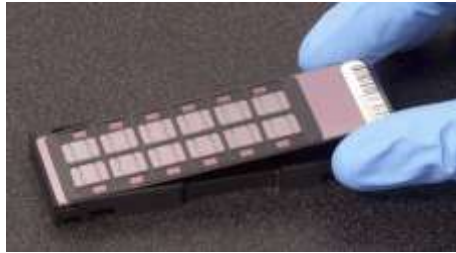
Agregar 400µl de PB2 a cada reserva, asegurar cada cámara y dejarlas en temperatura ambiente

Colocar la placa MSA3 en el bloque para su desnaturalización a 95°C durante 20 minutos, después de la incubación dejarlo a temp. ambiente durante 30min

Dar un pulso en la centrifuga a 280xg

Cargar el microarreglo (chip)

Nota: Por cada microarreglo se cargan 12 muestras



Cargar el chip con 15µl de DNA de la placa MSA3 como se muestra arriba.

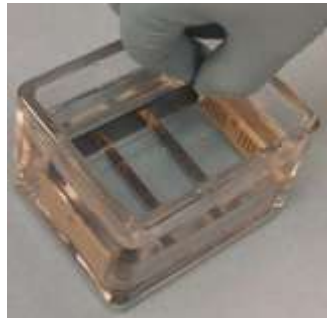
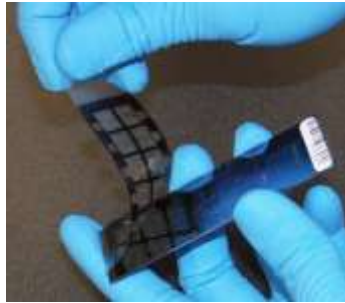
Por cada chip se debe escanear el código de barras



Una vez cargada las láminas se procede a colocar en el horno de hibridación ilumina a 48°C durante al menos 16 horas y no más de 24 horas.

Lavar "beadchip"

Se retiran las cámaras del horno y se dejan a temperatura ambiente 20min para enfriar. Se llena un rack con 200ml de PB1 De cada microarreglo se retira la parte de plástico de este y se coloca en el rack con el PB1 para lavarlo durante al menos 10 minutos cambiando de rack



Una vez lavados se empieza a colocar cada microarreglo en la cámara para prepararlos para la extensión



- Elongacion y tincion del microarreglo

Seguido de la hibridacion el reactivo RA1 retiro las partes no hibridadas del DNA, los reactivos XC1 y XC2 se agregan para dar una superficie a la reaccion de elongacion. Los reactivos TEM se agregan a las camaras para realizar la elongacion de la cadena incorporando nucleotidos marcados.

- Escaneo de la imagen por medio del Bed array reader
- Preparacion del Genome Studio para su analisis

- Control de Calidad para las muestras genotipificadas

Una vez obtenido los primeros resultados se procedió a realizar los controles de calidad mediante el software Genome Studio y SVS Golden Helix.

Estrategias de control de calidad para evitar problemas potenciales asociados con el genotipado:

1. Eliminación de muestras con bajo éxito en el genotipado. (< 98% call rating)
2. Eliminación de muestras duplicadas y de individuos consanguíneos
3. Eliminación de SNPs que evidencien problemas de genotipado, basándose en las desviaciones con respecto a las proporciones Hardy-Weinberg.
4. Inclusión de duplicados “blancos o NTC” para evaluar la concordancia de los datos.
5. Inspecciones visuales de los clusters correspondientes a los SNPs significativos

- Métodos estadísticos utilizados en el estudio de escaneo mediante el microarreglo de MetaboChip

Para este estudio se empleó regresión logística incluyendo proporciones de mezcla genética como covariables. Esta estrategia es la más utilizada en estudios previos de GWAs en los cuales la estratificación representa un problema. Se basa en las proporciones de mezcla genética estimadas usando métodos multivariados, tales como análisis de componentes principales (PCA).

En este trabajo ajustamos por ancestría en las muestras utilizando datos del Hap Map 1000 genomas para después incorporarlos como covariables en los modelos de regresión logística (para ensayos dicotómicos) o lineal (para ensayos cuantitativos).

En nuestro estudio, los análisis de regresión se realizaron con el software SVS Golden Helix y PLINK, que ofrece pruebas que incorporan la incertidumbre asociada con los genotipos imputados.

Análisis por variables fenotípicas: Es conocido que algunas variables fenotípicas, como edad y sexo actúan como confusor. Para ello se realizó un análisis estratificado por dichas variables, y análisis multivariado.

RESULTADOS

Fase 1 Obesidad Infantil

Se analizaron 1685 niños de 6 a 12 años. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. La prueba estadística realizada fue *t* de Student y se consideran significativos valores de $p < 0.05$. En el caso de los parámetros Antropométricos podemos ver que la edad promedio de los pacientes es de 9 años (Tabla 4).

Características	Índice de Masa Corporal				Dif	P*
	<85pc n=949		\geq 85pc n=514			
	media	\pm DE	media	\pm DE		
Femenino (%)	48.1		46.4		-	0.492
Edad (años)	9.5	\pm 1.9	9.6	\pm 1.8	0.1	0.109
Antropométrico						
Peso (kg)	29.7	\pm 7.8	46.5	\pm 13.1	16.9	<0.001
Altura(cm)	133.2	\pm 11.8	139.2	\pm 11.5	6.0	<0.001
IMC(kg/m ²)	16.5	\pm 1.8	23.7	\pm 3.6	7.3	<0.001
IMC(percentil)	46.1	\pm 24.5	95.4	\pm 3.7	49.4	<0.001
Presión Arterial(mmHg)						
Sistólica BP	95.4	\pm 12.6	102.9	\pm 14.3	7.5	<0.001
Sistólica BP (percentil)	37.1	\pm 31.8	48.1	\pm 32.3	10.9	<0.001
Diastólica BP	61.5	\pm 9.6	66.6	\pm 10.4	5.1	<0.001
Diastólica BP (percentil)	54.6	\pm 25.3	64.5	\pm 23.3	9.9	<0.001
Bioquímicos (mg/dL)						
Insulina (μ U/mL)	7.8	\pm 5.6	13.9	\pm 9.2	6.1	<0.001
HOMA-IR**	1.7	\pm 1.3	2.9	\pm 2.0	1.2	<0.001
Glucosa	85.6	\pm 10.1	87.7	\pm 11.1	2.0	0.001
Colesterol Total	152.1	\pm 30.1	160.9	\pm 35.0	8.8	<0.001
Trigliceridos	83.8	\pm 34.6	124.4	\pm 67.5	40.5	<0.001
HDL-C	49.8	\pm 11.8	45.2	\pm 13.0	-4.7	<0.001
LDL-C	92.1	\pm 23.4	101.8	\pm 27.7	9.7	<0.001

Tabla 4. Características Antropométricas y Metabólicas de casos y controles

Observamos en los niños con Obesidad un grande porcentaje de Resistencia a la Insulina (45% en los casos) calculada mediante el «HOMA» (*Homeostasis Model Assessment*, modelo homeostático con datos basales), según la siguiente fórmula: $HOMA = (glucosa \text{ mmol/l} \times insulina \text{ } \mu\text{U/ml} / 22.5)$. Se definió resistencia a la insulina cuando el valor de HOMA era superior a 2,4. (Stumvoll et al., 2004).

Al comparar ambos grupos los niveles de glucosa no mostraron cambios significativos, siendo la media de 85mg/dl; los niveles de triglicéridos son mayores en los casos y para colesterol total, HDL, LDL siguieron el mismo patrón para ambos grupos. Cabe mencionar que en los niños Obesos encontramos una Insulinemia marcada de 12mU/ml como media, además de presentar resistencia a la Insulina, como ya he mencionado anteriormente. Lo cual nos muestra que en pacientes a edad escolar ya existe una alteración metabólica.

Frecuencias Alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas encontradas en esta población se verificaron con aquellas ya reportadas, sin embargo no existen datos para muestras en población Mexicana. En la Figura 19 se muestran las frecuencias alélicas de los tres SNPs estadísticamente significativos.

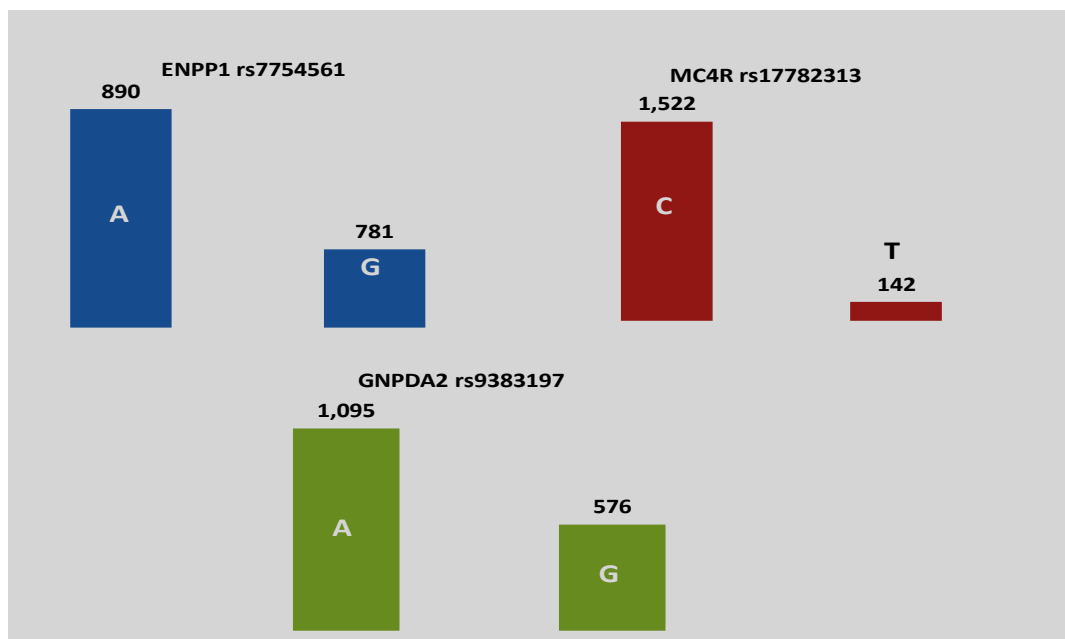


Figura 19. Frecuencias alélicas de las variantes en *ENPP1*, *MC4R* y *GNPDA2* en la población estudiada

Asociación de los SNPs estudiados con el riesgo de Obesidad. (Tabla 5)

Para esto se realizó una regresión logística lineal, utilizando el modelo Aditivo.

Después de aplicar una corrección de Bonferroni consideramos un valor significativo de p por debajo de 1.4×10^{-3} ($0.05/36$) y con un valor de p entre 0.05 y 1.4×10^{-3} se consideró significativa nominalmente.

Identificamos una contribución significativa asociada al riesgo de Obesidad para la variante *GNPAD2* rs10938397 (alelo de riesgo G en población Europa; OR=1.30; P = 1.34×10^{-3}).

Además de una asociación nominal entre el riesgo de Obesidad y la variante *MC4R* rs17782313 (alelo de riesgo C; OR = 1.40; P = 0.016 y *ENPP1* rs7754561 (alelo de riesgo G; OR =0.84; P = 0.020. (Tabla 5). Siendo la variante en *MCR4* que muestra un efecto nominal en el IMC (alelo de riesgo C; β [error estándar]= 0.41[0.16] kg/m²; P = 0.012 (Tabla 6)

Locus	SNP	AR*	Casos/ Controles	N	RAF (%)	OR [95% CI]	P
<i>NEGR1</i>	rs2815752	A	Control	949	74.4	-	-
			Caso	514	77.6	1.18 [0.99;1.41]	0.068
<i>NPC1</i>	rs1805081	A	Control	949	74.6	-	-
			Caso	514	74.2	1.02 [0.85;1.21]	0.845
<i>ENPP1</i>	rs7754561	G	Control	949	48.6	-	-
			Caso	514	44.2	0.84 [0.72;0.97]	0.020
<i>MCR4</i>	rs17782313	C	Control	949	7.3	-	-
			Caso	514	9.8	1.40 [1.06;1.83]	0.016
<i>GNPDA2</i>	rs10938397	G	Control	949	32.2	-	-
			Caso	514	38.0	1.30 [1.11;1.53]	1.34×10⁻³
<i>FTO</i>	rs1421085	C	Control	949	19.1	-	-
			Caso	514	21.1	1.13 [0.93;1.38]	0.228

Tabla 5 Asociación entre los SNPs *MC4R* rs17782313, *NEGR1* rs2815752, *ENPP1* rs7754561, *NPC1* rs1805081, *GNPDA2* rs10938397, *FTO* rs1421085 y Obesidad en niños mexicanos

* Alelos de riesgo reportados en Población Europea. **AR**, Alelo de riesgo; **RAF**, Frecuencia del AR; **OR**, Odds ratio; **CI**, Intervalo de confianza; **P**, valor de P.

Es importante mencionar que no encontramos una asociación significativa entre el riesgo de obesidad y las variantes en NPC1 rs2815752 y FTO rs1421085 como se había esperado.

En cuanto a los rasgos metabólicos, encontramos una asociación nominal entre el IMC y la variante en *NEGR1* (alelo de riesgo A, $\beta=0.24[0.10]$ kg/m²; P = 0.019) (Tabla 6).

Para la variante de NPC1 rs2815752 encontramos una asociación significativa con los niveles de insulina mostrando que el alelo de riesgo A confiere un error beta de -0.10 μ U/mL, P = 1.21×10^{-3} . Tabla 6.

Además identificamos un efecto del alelo de riesgo de MC4R rs17782313 y el incremento en la glucosa plasmática en ayuno (alelo de riesgo C; $\beta = 0.36[0.11]$ mmol/L; P = 1.47×10^{-3}).

Para FTO a pesar de no mostrar una asociación a Obesidad, encontramos una ligera asociación con el colesterol total ($\beta = 3.70[1.72]$ mg/dL; P = 0.032) y los niveles de Insulina ($\beta = -0.06[0.04]$ μ U/mL; P = 0.064)

Locus SNP AR*	N	IMC (kg/m ²)		Insulina ayuno (μU/mL)		Glucosa ayuno (mmol/L)		Colesterol Total (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)	
		β (ES)	P	β (ES)	P	β (ES)	P	β (ES)	P	β (ES)	P
NEGR1 rs2815752 A	1,171	0.24 (0.10)	0.01 9	0.01 (0.03)	0.611	0.07 (0.07)	0.353	2.14 (1.44)	0.139	0.01 (0.02)	0.425
NPC1 rs1805081 A	1,171	-0.16 (0.11)	0.12 6	-0.10 (0.03)	1.21×10⁻³	-0.08 (0.07)	0.278	2.22 (1.52)	0.144	-0.003 (0.02)	0.884
ENPP1 rs7754561 G	1,171	-0.11 (0.09)	0.20 9	0.004 (0.03)	0.873	0.01 (0.06)	0.905	2.20 (1.29)	0.087	0.004 (0.02)	0.827
MCR4 rs17782313 C	1,171	0.41 (0.16)	0.01 2	0.04 (0.05)	0.362	0.36 (0.11)	1.47×10⁻³	2.71 (2.34)	0.247	0.02 (0.03)	0.410
GNPDA2 rs10938397 G	1,171	0.10 (0.10)	0.28 8	0.04 (0.03)	0.126	0.10 (0.07)	0.132	1.90 (1.40)	0.176	0.03 (0.02)	0.076
FTO rs1421085 C	1,171	-0.17 (0.12)	0.17 1	-0.06 (0.04)	0.064	-0.14 (0.09)	0.111	3.70 (1.72)	0.032	0.006 (0.02)	0.778

Tabla 6. Asociación entre los SNPs *MC4R* rs17782313, *NEGR1* rs2815752, *ENPP1* rs7754561, *NPC1* rs1805081, *GNPDA2* rs10938397, *FTO* rs1421085 y parámetros bioquímicos en niños no Obesos Mexicanos.

Los niveles de Insulina y triglicéridos fueron logarítmicamente transformados antes de los análisis estadísticos

* Alelos de riesgo reportados en Población Europea.

AR, Alelo de riesgo; ES, error estándar; β, efecto del tamaño-; P, valor de P; IMC, Índice de masa corporal

RESULTADOS

Fase 2: Diabetes tipo 2

Se analizaron 2000 muestras todas procedentes de la Ciudad de México, el rango de edad fue de 35 a 60 años para ambos grupos de estudio, la media de Índice de Masa Corporal (IMC) fue de 29.7 para casos y 26.5 para controles. Las características clínicas se muestran en la tabla 7. Como era de esperar los casos tuvieron un índice de masa corporal mayor respecto a los controles (29.7 kg/m² versus 26.5 kg/m²) respectivamente y el 86% de los casos estaban diagnosticados con Hipertensión.

Características	Casos n=999	Controles n=1001	Ambos n=2000
Edad (años)	57.9 ± 0.3	48.2 ± 6.9	53.1 ± 0.2
Edad de diagnostico	46.3 ± 0.2	NA	46.3 ± 0.2
Sexo Masculino (1)	403 (40.3)	593 (59.2)	996 (49.8)
Femenino (2)	596 (59.7)	408 (40.8)	1004 (50.2)
IMC, kg/m ²	29.7 ± 0.2	27.5 ± 3.9	28.6 ± 0.1
PCC	0.9 ± 0	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0
Presión sistólica, mmHg	122.9 ± 0.5	118.6 ± 13	120.7 ± 0.3
Presión Diastólica, mmHg	82.1 ± 0.3	72.2 ± 8.3	77.1 ± 0.2
Glucosa, mg/dL	152.1 ± 2.1	85.3 ± 9.1	118.7 ± 1.3
Urea, mg/dL	33.9 ± 0.5	28.1 ± 8.4	31 ± 0.3
BUN, mg/dL	15.8 ± 0.2	12.7 ± 3.8	14.3 ± 0.1
Creatinina, mg/dL	0.86 ± 0.01	0.81 ± 0.25	0.84 ± 0.01
Colesterol Total, mg/dL	190.8 ± 1.5	191.8 ± 42.7	191.3 ± 1
HDL, mg/dL	44 ± 0.4	46.8 ± 14	45.4 ± 0.3
LDL, mg/dL	127.6 ± 1.1	134.3 ± 34.9	131 ± 0.8
Trigliceridos, mg/dL	196.9 ± 4.3	160 ± 110.2	178.4 ± 2.8
HbA1c, %	7.57 ± 0.09	5.0 ± 0.02	6.57 ± 0.09
TFG	99.7 ± 1.2	NA	99.7 ± 1.2
Riesgo Cardiovascular, (%)	15.02 ± 0.29	NA	15.02 ± 0.29

Los datos se muestran como ±(DE), o numero (porcentaje), NA sin datos.

Tabla 7. Características clínicas de la población estudiada

Análisis de asociación para estudios de GWAS

El análisis de los polimorfismos genéticos permite identificar genes que confieren susceptibilidad a presentar una enfermedad o un rasgo asociado a esta.

Desde el punto de vista estadístico un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente.

Utilizando el programa *Genome Studio* se llevan a cabo los filtros de control de calidad (MAF >1%, *call rate* >98%) como se observa en la figura 20; dentro del control de calidad se incluye el análisis de diversidad genética (heterocigocidad y análisis de los componentes principales).

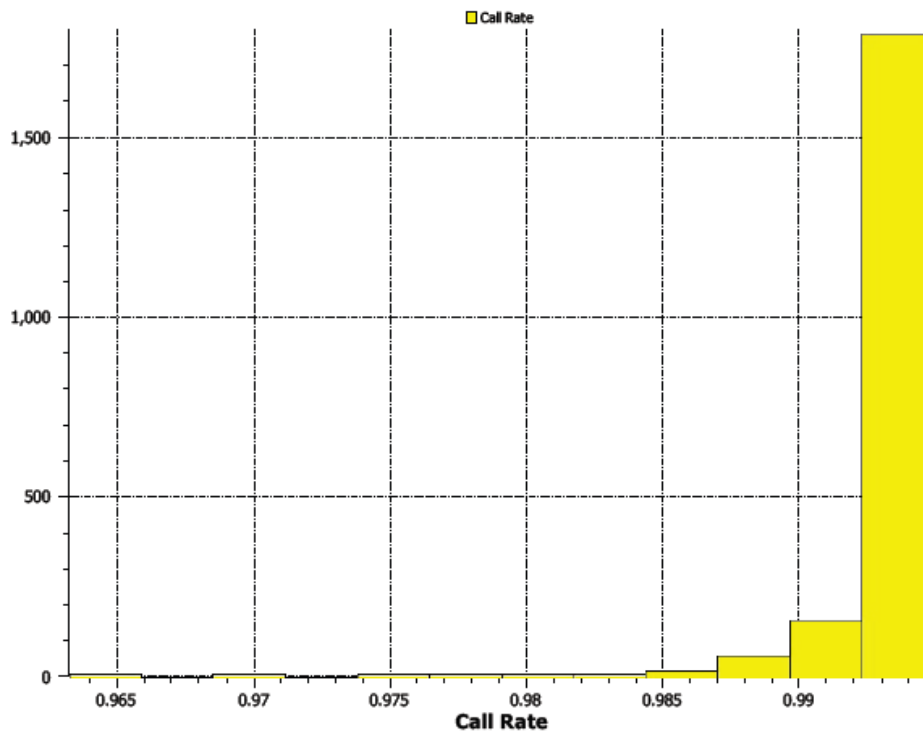


Figura 20. *Call rate* mayor a 98% para las muestras analizadas

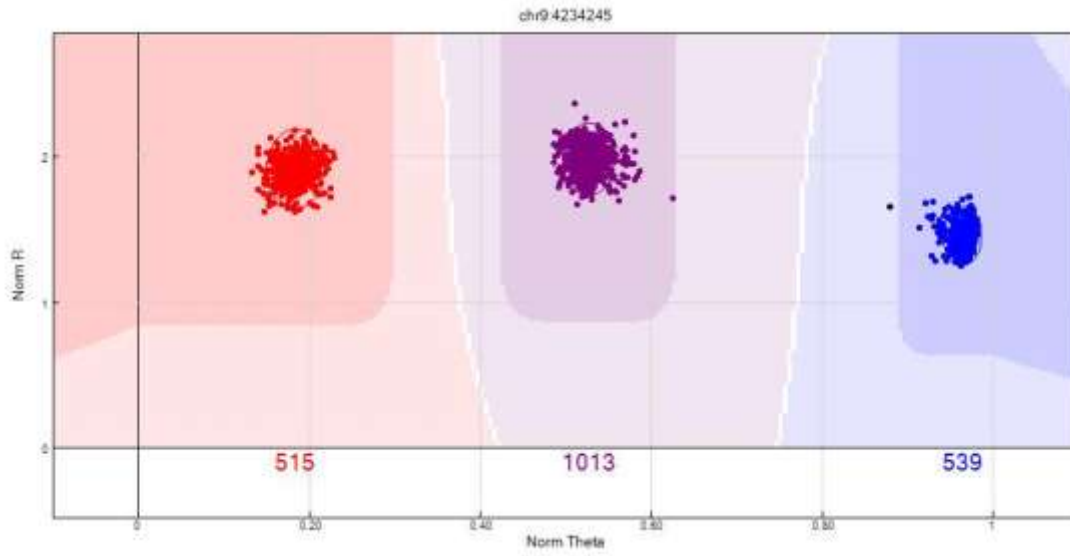


Figura 21. Cluster de la variante en *GLIS3*

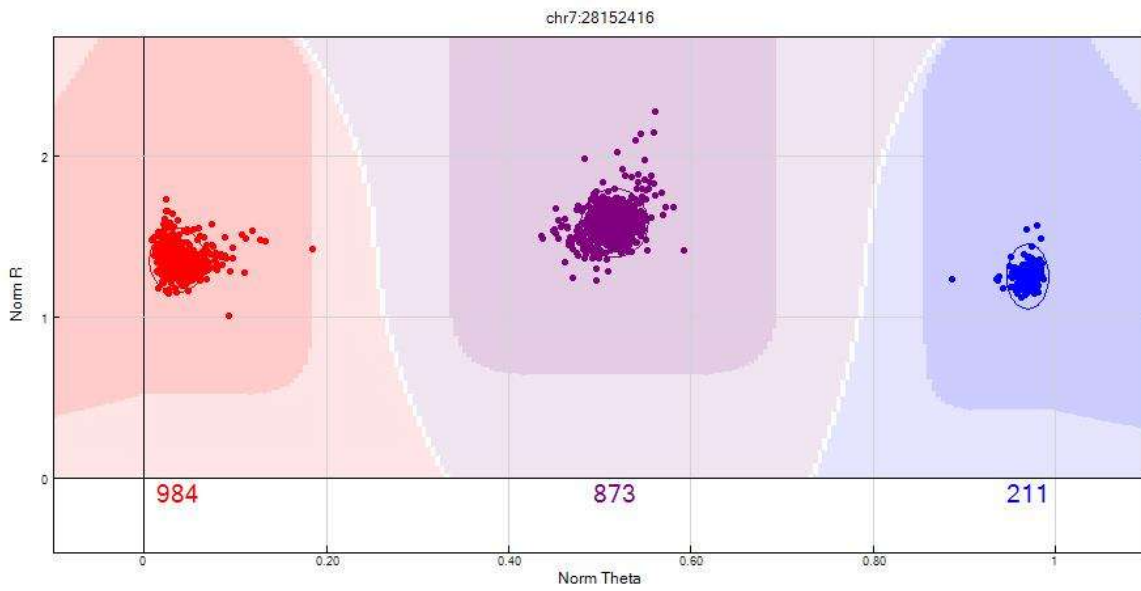


Figura 22. Cluster de la variante en *JAZF1*

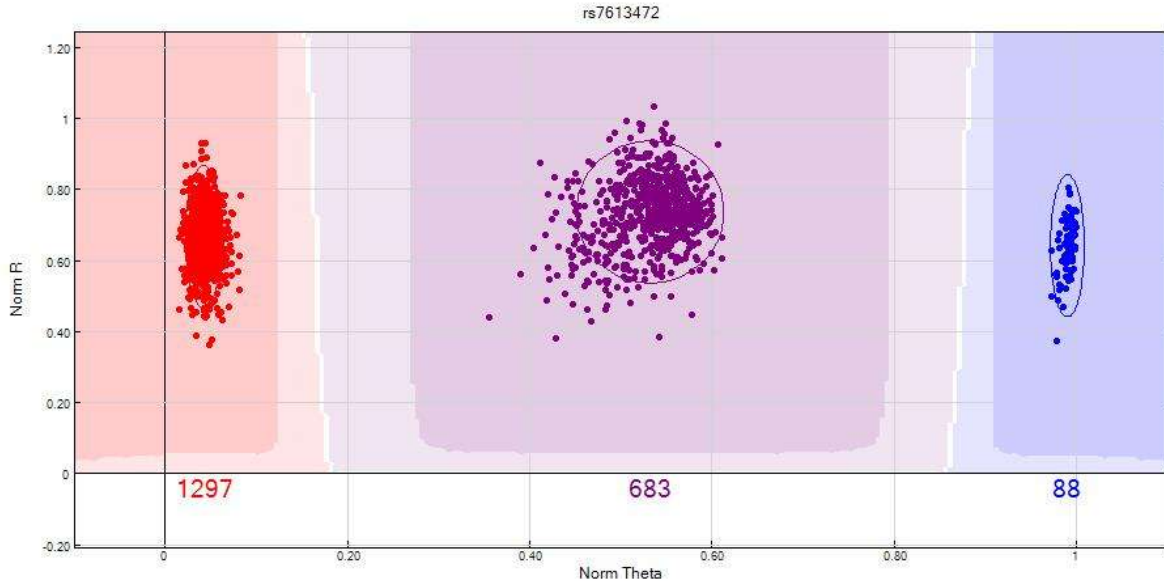


Figura 23. Cluster de la variante en ARPP21

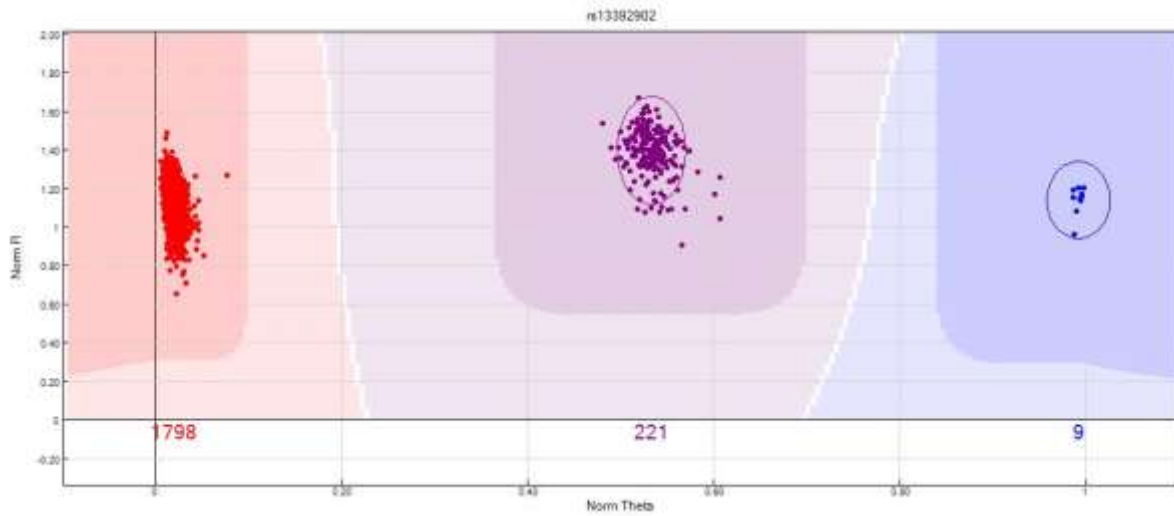


Figura 24. Cluster de la variante en CYBRD1

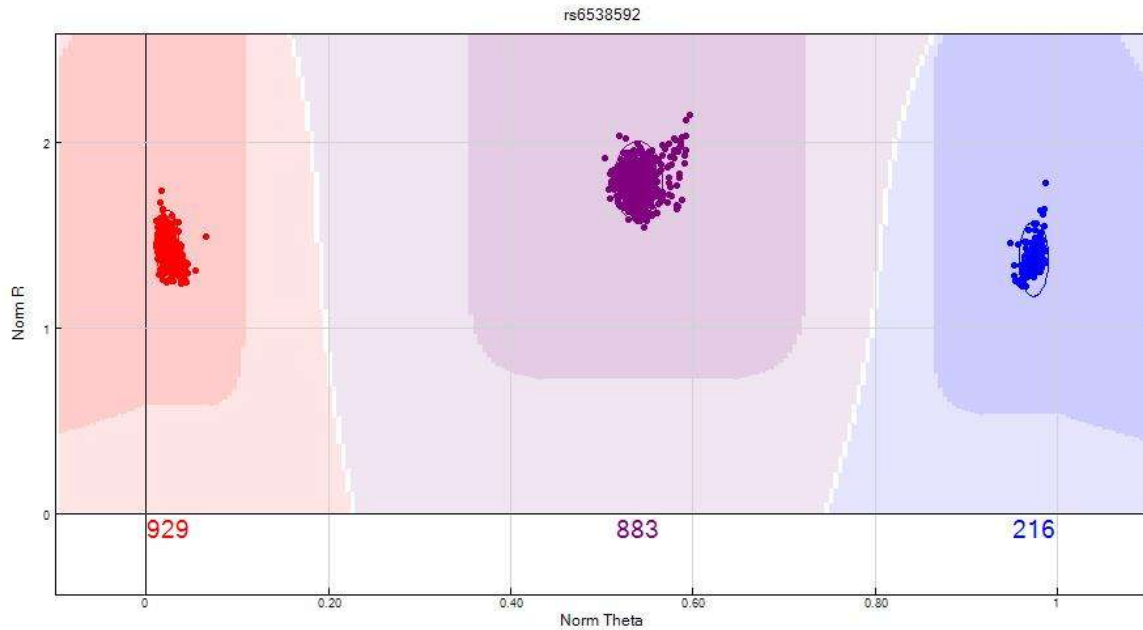


Figura 25. *Cluster* de la variante en *FGD6*

Análisis de los componentes Principales

Un problema central en el análisis de datos multivariantes es la reducción de la dimensionalidad: si es posible describir con precisión los valores de p variables por un pequeño subconjunto $r < p$ de ellas, se habrá reducido la dimensión del problema a costa de una pequeña pérdida de información, en este caso se realiza un *prunning* previo de todo el pool de SNPs.

El análisis de componentes principales tiene este objetivo: dadas “ n ” observaciones de p variables, se analiza si es posible representar adecuadamente esta información con un número menor de variables construidas como combinaciones lineales de las originales.

Se analizaron datos de 1520 sujetos no relacionados de la Ciudad de México; para fines de comparación se incluyeron datos obtenidos de las poblaciones Internacionales del Hap-Map 3: (ASW) Africanos del sudeste de USA, (CEU) Europeos del Norte, (YRI, LWK, MKK) Africanos, (CHB, CHD) Chinos, (JPT) Japoneses, (GIH) Indios Gujarati, (MEX) Mexicanos de California, USA.

Estos resultados apoyan la presencia de una heterogeneidad genética entre la población de la Ciudad de México principalmente con un componente Africano y sugiere que las diferencias observadas entre las poblaciones mexicanas proveniente de California USA es distinta a la que reside en la Ciudad de México. (Figura 26)

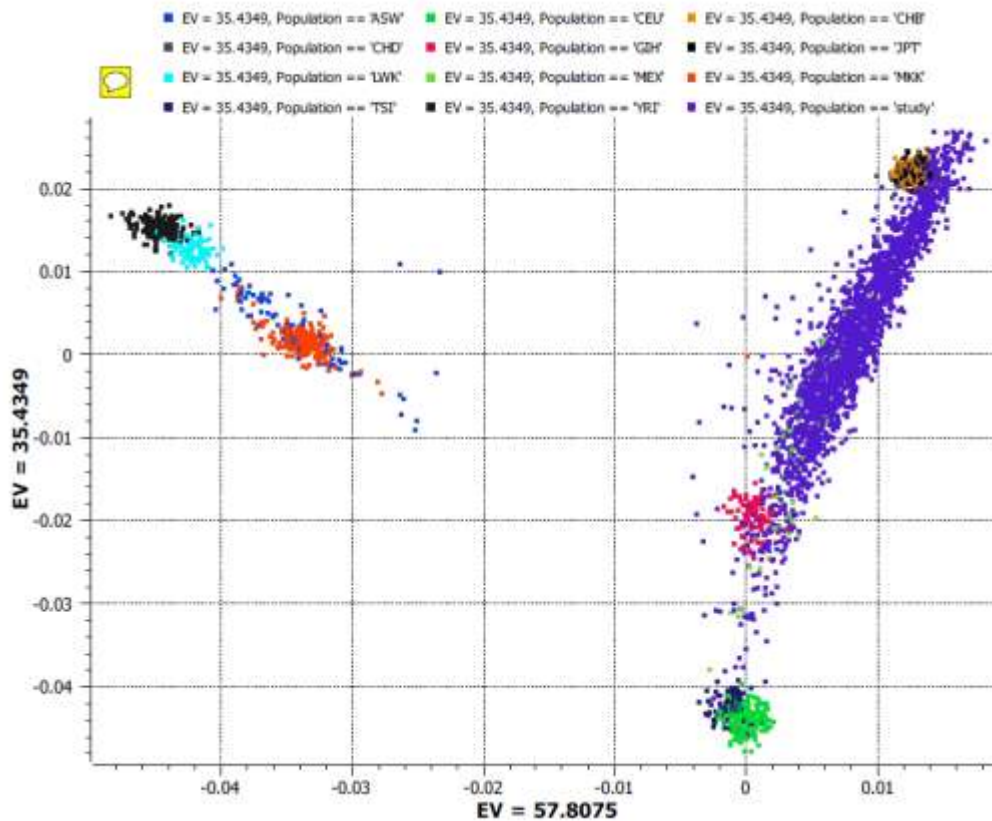


Figura 26. Análisis de los componentes Principales. En morado se muestra la población de estudio. La distribución de la población en el Eigen vector 2 reflejan una contribución ancestral europea (verde) a nuestra población.

Mediante análisis estadísticos pudimos determinar la diversidad del componente genético para las muestras de estudio, encontrando un componente Amerindio de 68%, Europeo de 27%, Africano 4% y Asiático 1% correspondiendo a lo anteriormente publicado por nuestro grupo de estudio. (Martinez-Marignac et al. 2007) Sin embargo la presencia del componente Asiático es novedosa.

Una vez realizados todos los filtros posteriores al control del calidad y partiendo de la base de datos ajustada a ancestría, realizamos un *prunning* de SNPs obteniendo al final 56,700 variantes por analizar mediante regresión logística partiendo de un modelo Aditivo, ajustado por edad, sexo e Índice de Masa Corporal (BMI). Al final se obtuvo un Plot de Manhattan que muestra en el cromosoma 9 un grupo de variantes con una fuerte asociación.

Los SNPs estadísticamente significativos fueron aquellos con valores de p alrededor de 1×10^{-7} (Figura 27).

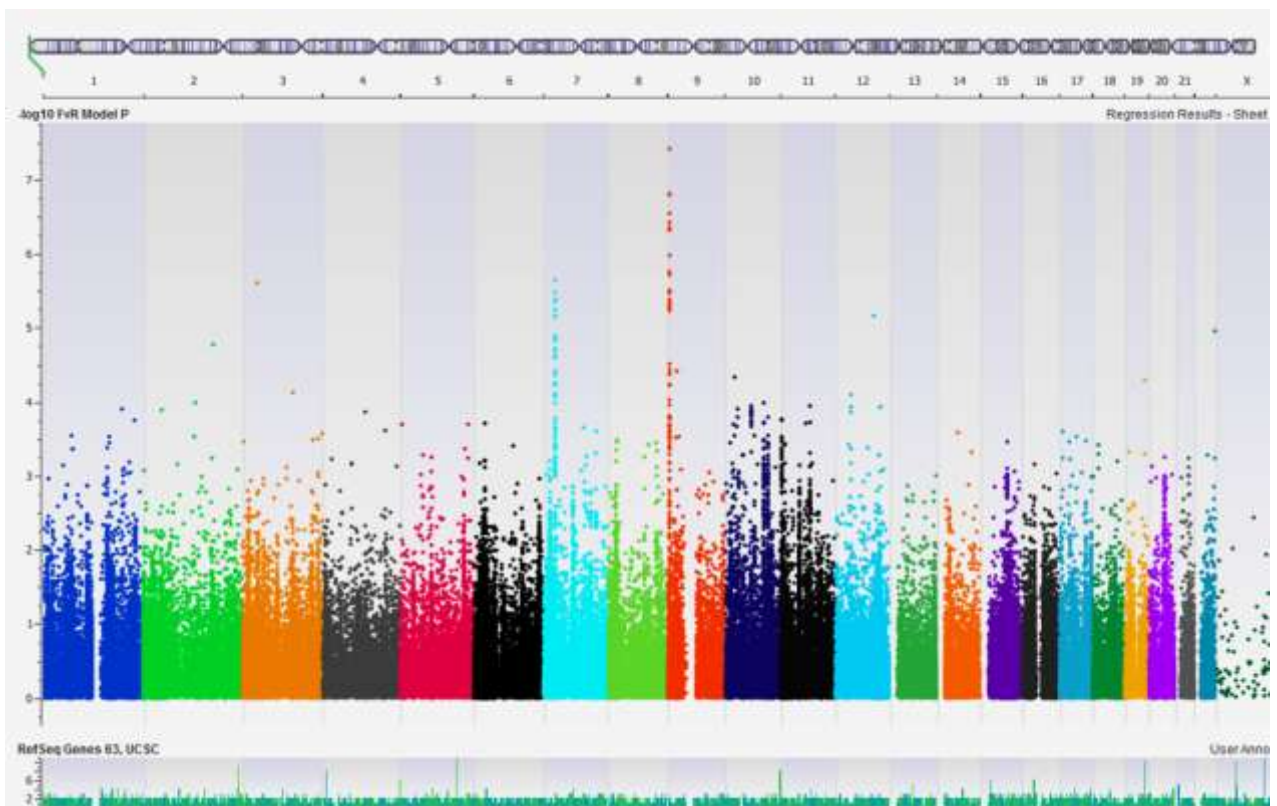


Figura 27. *Plot* de Manhattan $-\log_{10}$ FvR Model para cada cromosoma, observando una fuerte asociación el cromosoma 9 (color Naranja)

Encontramos una asociación nominal entre DT2 y varias señales independientes en, o cerca de los genes *GLIS3*, *JAZF1*, *FGD6*, *ARRP21* y *CYBRD1* (Tabla 8).

Es importante mencionar que *GLIS3* y *JAZF1* son genes previamente asociados a DT2. En este trabajo detectamos siete locus localizados en intrones de *GLIS3*, este

gen se ha visto involucrado en el desarrollo de la célula-Beta pancreática y en la expresión del gen de la Insulina. (Kang et al., 2009).

Adicionalmente encontramos que una de estas variantes (rs17717221) está localizada en un *enhancer* activo útil para la transcripción de genes en la célula Beta (ANEXO IV).

En el caso de *JAZF1* identificamos cinco variantes también localizadas en regiones intrónicas (rs849142, rs12531540, rs849138,rs702814 and rs864745) varias de ellas en desequilibrio de ligamiento.

Para los genes *FGD6* rs6538592, *ARPP1* rs7613472 y *CYRBD1* rs13392902 los SNPs igualmente se encontraron en regiones intrónicas.

Gen	SNP	AA***	Población	N	AAF*** (%)	AAF (%) Europeos	Odds Ratio	Valor de P
<i>GLIS3</i> *	rs12335418	A	Control	987	40.1	71.4	—	—
			Diabético	988	38.2		0.67	3.16×10 ⁻⁷
<i>GLIS3</i> *	rs12350696	A	Control	987	56.1	69.0	—	—
			Diabético	988	52.0		0.68	1.15×10 ⁻⁶
<i>GLIS3</i> *	rs12000159	T	Control	987	48.2	69.2	—	—
			Diabético	988	42.1		0.70	3.39×10 ⁻⁶
<i>GLIS3</i> *	rs7849638	A	Control	987	51.3	65.5	—	—
			Diabético	988	50.1		0.69	1.95×10 ⁻⁶
<i>GLIS3</i> *	rs17717221	G	Control	987	58.4	96.7	—	—
			Diabético	988	58.6		1.49	6.45×10 ⁻⁶
<i>GLIS3</i> *	rs73382379	A	Control	987	7.3	2.5	—	—
			Diabético	988	7.5		1.48	9.75×10 ⁻⁶
<i>FGD6</i> *	rs6538592	G	Control	988	64.1	50.0	—	—
			Diabético	987	62.6		0.67	4.13×10 ⁻⁶
<i>ARRP21</i> *	rs7613472	G	Control	988	77.3	29.6	—	—
			Diabético	987	70.2		0.62	1.84×10 ⁻⁶
<i>JAZF1</i> *	rs849142	G	Control	988	41.1	48.3	—	—
			Diabético	987	40.2		0.68	5.74×10 ⁻⁶
<i>JAZF1</i> *	rs12531540	A	Control	988	6.2	49.2	—	—
			Diabético	987	6.0		0.68	5.81×10 ⁻⁶
<i>JAZF1</i> *	rs849138	A	Control	988	6.2	50.8	—	—
			Diabético	987	6.3		0.68	8.39×10 ⁻⁶
<i>JAZF1</i> *	rs702814	A	Control	988	32.1	49.2	—	—
			Diabético	987	30.0		0.60	8.97×10 ⁻⁶
<i>CYBRD1</i> **	rs13392902	G	Control	988	8.8	9.3	—	—
			Diabético	987	8.1		0.47	9.50×10 ⁻⁶

*Ajustado por edad, sexo e BMI , **Ajustado por edad y sexo , ***AA: Alelo Ancestral / AAF AA frecuencia

Tabla 8. Asociación de diversos SNPs y Diabetes de tipo 2 en Población Mexicana

Mediante el programa de *Locus Zoom* verificamos estas asociaciones por cada SNP, utilizando como referencia el ensamblaje del mapa genético hg18 en la base de UCSC Genome browser. Cada variante se muestra en las siguientes figuras.

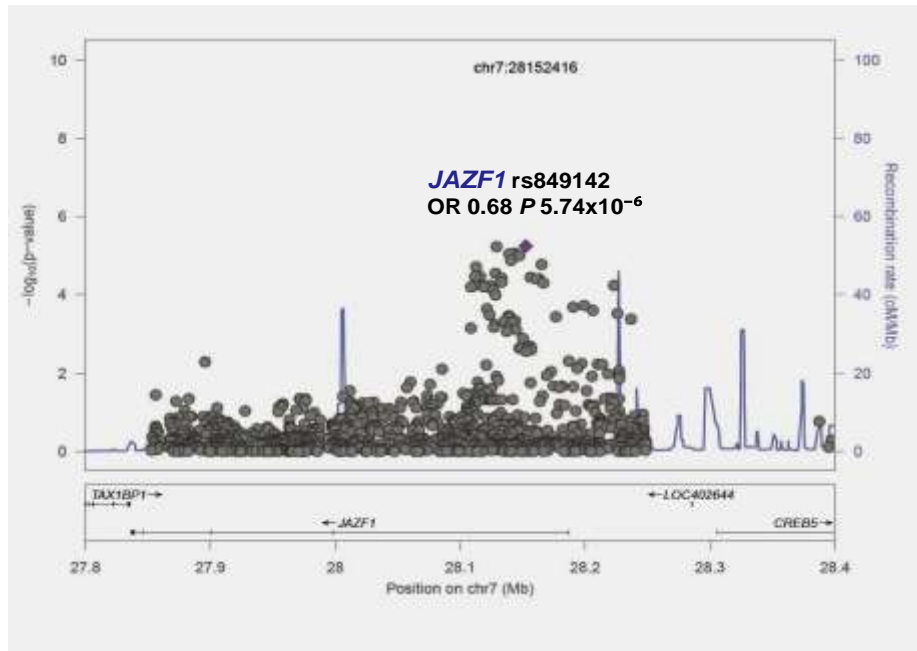


Figura 28. Regional *Plot* de *JAZF1* mediante locus zoom

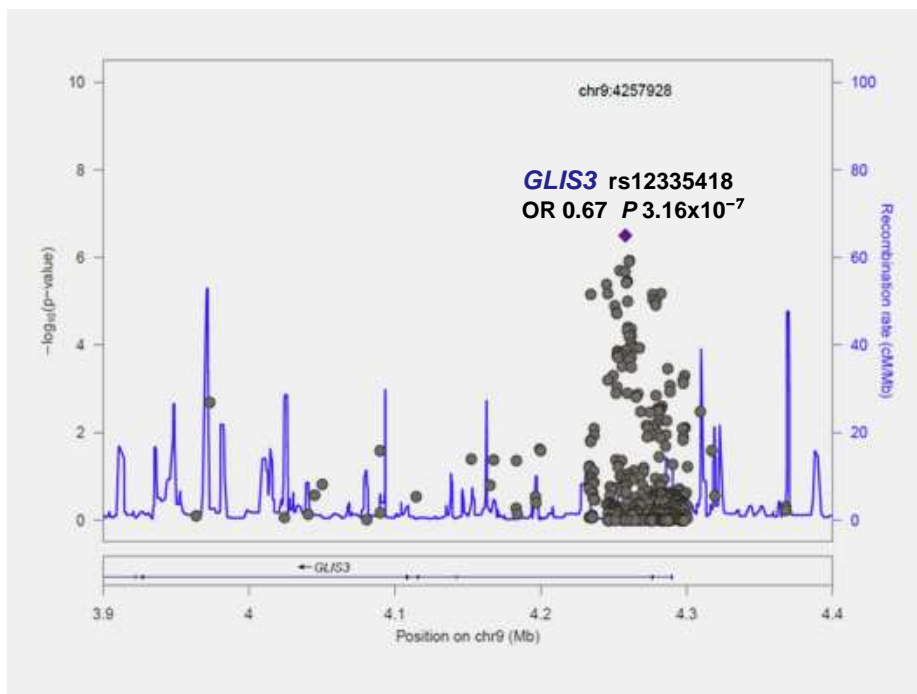


Figura 29. Regional *Plot* de *GLIS3* mediante locus zoom

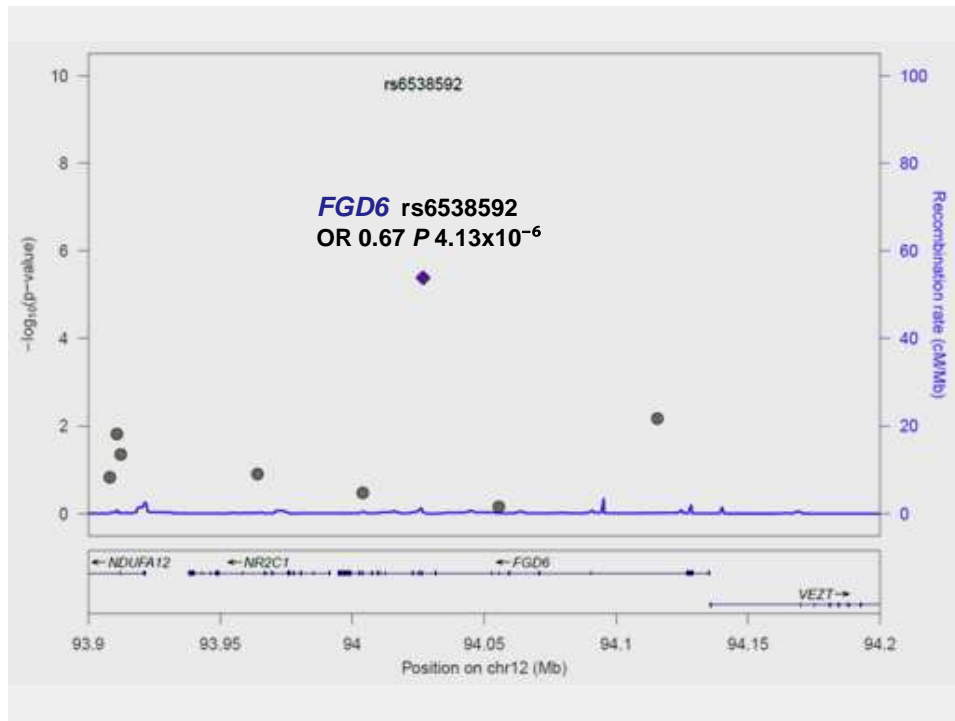


Figura 30. Regional *Plot* de *FGD6* mediante locus zoom

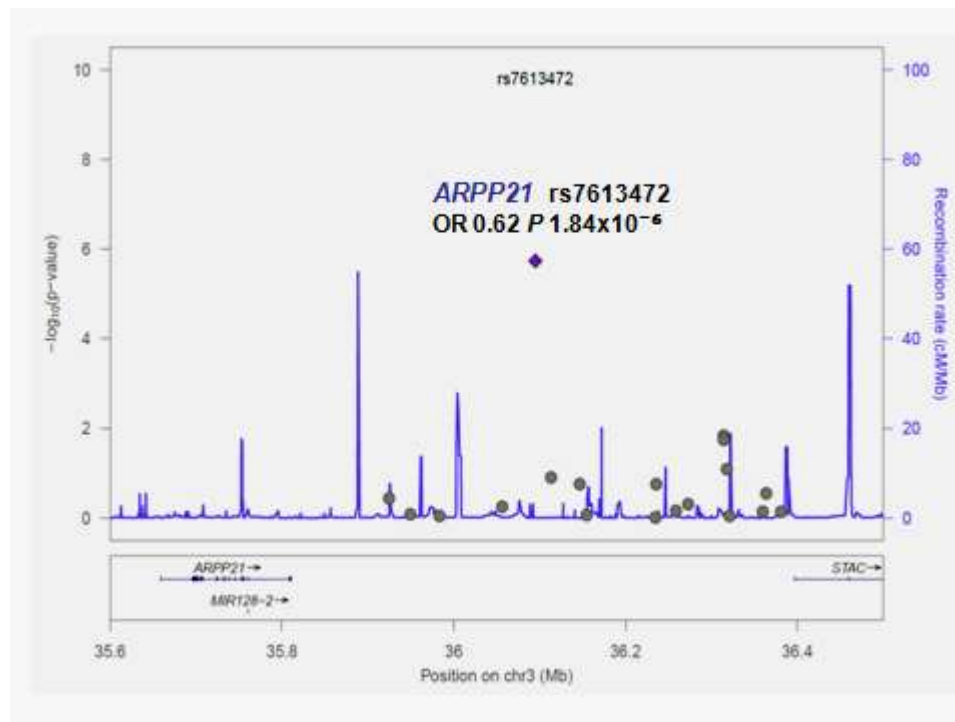


Figura 31. Regional *Plot* de *ARPP21* mediante locus zoom

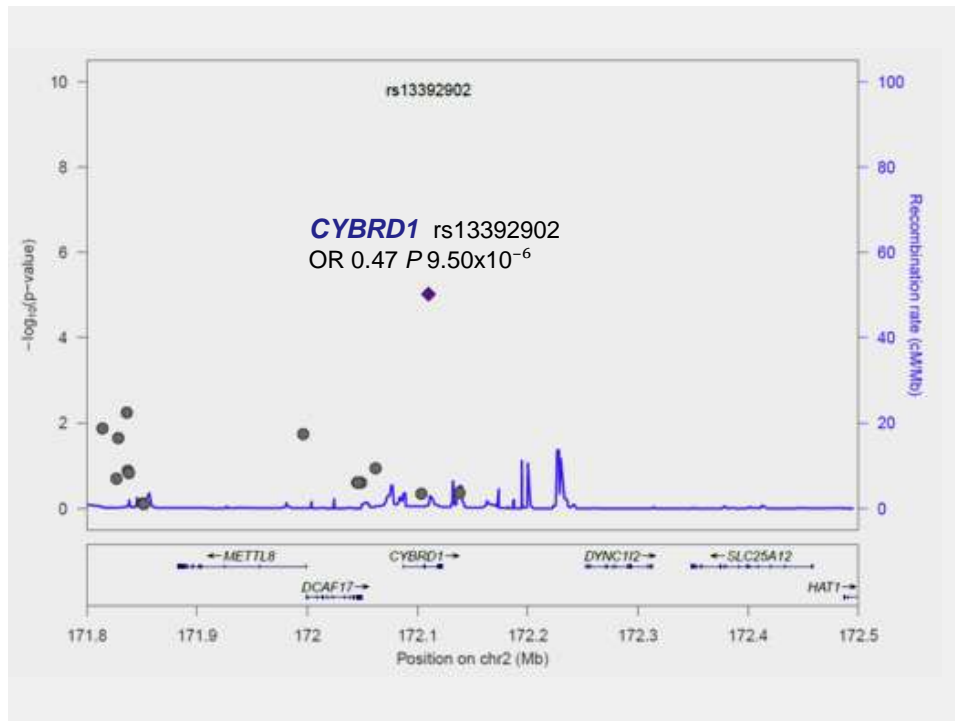


Figura 32. Regional Plot de *CYBRD1* mediante Locus Zoom

Una vez obtenidos los resultados de la genotipificación, se realizan los análisis de asociación entre los SNPs (Polimorfismos de un solo nucleótido) y diferentes rasgos metabólicos.

Analizamos la asociación de distintos SNPs y niveles de colesterol total, Glucosa en ayuno, HDL, LDL y triglicéridos mediante regresión logística en un modelo aditivo ajustado por edad, sexo e Índice de Masa corporal.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa para los siguientes polimorfismos y los niveles de triglicéridos.

Para el resto de los rasgos metabólicos se realizó el mismo procedimiento, los resultados se presentan en el ANEXO V de esta tesis.

SNP	CHR	Alelo Riesgo	BETA	P	GEN
chr11:116156325	11	A	-0,149	5,56E-12	<i>ZNF259</i>
chr11:116150485	11	A	-0,130	2,83E-09	<i>BUD13</i>
chr11:10133558	11	G	2,556	1,96E-07	<i>SBF2, KIAA1766</i>
chr11:2890200	11	A	2,556	1,96E-07	<i>SLC22A18</i>
chr2:203967925	2	G	2,556	1,96E-07	<i>ABI2, argBPIB</i>
rs6589567	11	A	0,133	2,71E-07	<i>APOA5</i>

Tabla 9. SNPs asociados a los niveles de triglicéridos en población Mexicana.

Se realizó un score genético de riesgo mediante la suma de cada alelo de riesgo por individuo para los 69 SNPs asociados a Diabetes tipo 2 en población Europea. Obteniendo un riesgo por alelo de 0.065 con un OR 1.052; P-7.73E-06. Los resultados se muestran en la tabla 10.

SCORE DE RIESGO GENÉTICO BASADO
EN 69 SNPs/DT2

	TAMAÑO DE EFECTO POR ALELO	OR	P-VALOR
SIN AJUSTAR	0.049	1.050	2.32E-07
AJUSTADO POR EDAD Y SEXO	0.051	1.052	7.73E-06
AJUSTADO POR EDAD, SEXO E IMC	0.065	1.068	3.92E-08

Tabla 10. Score de riesgo genético basado en 69 SNPs asociados a DT2.

Observando los resultados, ciertos SNPs ya bien establecidos como de riesgo para DT2 no se replicaron en nuestra población de estudio, por ello realizamos estudios de heterogeneidad. Tomando únicamente los resultados del Score genético de riesgo, realizamos una comparación entre riesgos genéticos basados en cuatro modelos: SNPs asociados a DT2, asociados a la función de la célula beta, asociados a la resistencia a insulina y aquellos asociados a glucemia en ayuno. Tomamos los resultados de la cohorte Francesa *DESIR* genotipificada también por MetaboChip. Encontramos un valor de Heterogeneidad de Het P-value: 9,89E-06; OR 1,093. (Tabla 11).

	Beta T2D	OR T2D	Pval T2D	Beta T2D	OR T2D	Pval T2D	Het. P-val	OR	FE Pval
GRST2DFr*	0,122	1,129	1,47E-54	0,074	1,077	3,14E-10	7,72E-04	1,113	0,00E+00
GRSBeta*	0,187	1,206	1,34E-43	0,144	1,155	1,32E-12	7,86E-02	1,190	0,00E+00
GRSIR*	0,078	1,081	1,27E-05	0,060	1,062	4,66E-02	6,26E-01	1,076	1,82E-06
GRSFG*	0,124	1,132	7,47E-34	0,056	1,058	3,23E-04	2,65E-04	1,109	0,00E+00

Tabla 11. Comparación de Heterogeneidad genética entre población Francesa y Mexicana (marcada en verde).

DISCUSION

México se encuentra en un proceso de transición en salud caracterizado por el aumento de enfermedades crónico-degenerativas como son la Obesidad y Diabetes. A pesar de que muchas variantes genéticas han sido asociadas a estos fenotipos, muy pocas han sido replicadas en otras poblaciones.

En este estudio tratamos de establecer la asociación entre las variantes *FTO*, *NPC1*, *GNPDA2*, *NEGR1*, *ENPP1* y *MC4R* y la ocurrencia de Obesidad en una población Infantil de cinco estados de la República Mexicana.

El panorama general del estado metabólico en los niños con Obesidad muestra una tendencia a presentar resistencia a la Insulina a edades más tempranas (Salud & Yucatán 1999)

Aquí encontramos un 45% de niños ya con este fenotipo con una media de edad de 8 años. En la literatura la presencia de resistencia a la Insulina se asocia a hipertlipidemia (Ascaso et al.,2001) pero no en este estudio.

Todos los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas y genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg pensando que se han mantenido constantes a través de generaciones.

Encontramos una asociación significativa del alelo menor de *GNPDA2* SNP rs10938397 con un incremento en el riesgo para padecer Obesidad. Esta asociación ya había sido identificada en un meta análisis de GWAS en población Europea realizada por el consorcio GIANT (Willer CJ et al., 2009), siendo este el primer estudio en población mexicana.

Así mismo encontramos asociaciones nominales entre el riesgo de padecer Obesidad o bien el Índice de masa corporal con los siguientes SNPs: *ENPP1* rs7754561, *MC4R* rs17782313 y *NEGR1* rs2815752.

Cabe mencionar que estos polimorfismos fueron igualmente asociados en población Europea con excepción del alelo de riesgo *ENPP1* SNP rs7754561 que muestra un efecto protector en la población mexicana.

En este trabajo identificamos un efecto significativo del alelo de riesgo en *NPC1* rs1805081 con la disminución de los niveles séricos de Insulina.

El gen *NPC1* codifica para la proteína de membrana tipo C1 que tras la traducción es insertada en la membrana de los lisosomas y los endosomas tardíos; mutaciones en este gen se relacionan con la enfermedad de Niemann-Pick.

Recientemente Jelinek y colaboradores reportaron que la haploinsuficiencia de *NPC1* en modelos animales da lugar a hiperinsulinemia y un aumento en la susceptibilidad a ganar peso. (Jelinek D., et al., 2011).

Por otra parte identificamos el alelo de riesgo de *MC4R* y su asociación con el incremento de glucosa en ayuno, a nuestro conocimiento no existe un estudio previo que muestre esta asociación.

En resumen replicamos cuatro variantes previamente asociadas en población Europea (*GNPDA2*, y nominalmente *NEGR1*, *MC4R*, *ENPP1*) con el mismo efecto a excepción de *ENPP1*.

A pesar de que actualmente se conocen varios SNPs asociados a Obesidad explican menos de 5% del riesgo para Obesidad infantil, sugiriendo la existencia de loci adicionales, o bien loci raros que contribuyan en una mayor proporción.

La Diabetes tipo 2 se debe considerar una de las manifestaciones más graves de la Obesidad. Cerca de 70% de los individuos con DT2 tienen obesidad en el momento del diagnóstico. (Maggio & Pi-Sunyer, 2003). El riesgo de desarrollar este padecimiento aumenta junto con el grado y la duración de la Obesidad, es decir aquellos niños con Obesidad Infantil serán más susceptibles a padecer Diabetes tipo 2 en edad adulta.

Es por eso que cree que ciertas mutaciones en diferentes *loci* del mismo gen causan la misma enfermedad, teniendo un mismo gen como en el caso del receptor de Melanocortina 4 (*MC4R*) que contribuye a un cambio en el IMC y como en este estudio un incremento de la glucosa en ayuno; pudiendo pensar en que se comparten vías metabólicas.

Así bien los estudios del escrutinio completo del Genoma Humano han identificado 70 loci asociados a la condición de DT2 (Hivert, Vassy, & Meigs, 2014). El mecanismo por el cual estos genes candidatos predisponen al padecimiento permanece desconocido.

El panorama metabólico para la población adulta estudiada no muestra diferencias significativas entre ambos grupos, en el caso de los triglicéridos existe un ligero aumento para los pacientes con DT2 a diferencia de los controles; en el resto de parámetros bioquímicos no existe cambio alguno. Es importante mencionar que el 78% de los pacientes diabéticos estaban diagnosticados con al menos otra comorbilidad en este caso Hipertensión lo que muestra una posible presencia de disfunción endotelial.

El riesgo de padecer DT2 depende del efecto unificado de las variantes de susceptibilidad que interactúan en diferentes vías de señalización y alteran la función o expresión de otras moléculas, aunado a esto el estímulo de los factores ambientales pueden alterar la respuesta de la célula beta para mantener la normoglicemia. Las variantes localizadas en *GLIS3* que se encuentran asociadas a DT2 se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento (coeficiente de relación r^2 of .95 a 1.0 con nuestros SNPs) lo que fortalece la hipótesis de que una única variante en este gen puede ser la responsable de todas las asociaciones reportadas.

Este gen codifica para un factor de transcripción en dedo de zinc similar a Krüppel involucrado en el desarrollo pancreático (Lichti-Kaiser et al., 2012) estudios recientes muestran su interacción con Pdx1, NeuroD1 y MafA/MafB para la activación transcripcional del promotor *Ins2* llevando al mantenimiento de las funciones en la célula Beta. (Zeruth, Takeda, & Jetten, 2013) .Además el SNP rs17717221 encontrado en nuestro estudio está localizado en un sitio de unión para el factor de transcripción MAFB, el cual es expresado en la célula Beta durante la embriogénesis (Artnér et al., 2010). La variación alélica en los enhancers de los islotes pancreáticos debe jugar un rol importante en el mantenimiento de las funciones en la célula Beta como la expresión de la Insulina.

Un estudio realizado por Dayeh y cols., muestra que la variante intergénica de *JAZF1* tiene perfiles diferentes de metilación en el ADN de islotes pancreáticos humanos en pacientes no Diabéticos comparados con donadores DT2 con una diferencia de -5.02% ($p=6.0 \times 10^{-4}$) (Dayeh et al., 2014).

Como ya se ha mencionado variantes en *JAZF1* habían sido asociadas en Población Europea y Africana tal es el caso de la variante rs864745 Zeggini et Langberg confirmándose su asociación en Población Mexicana.

El gen *ARPP-21* codifica para una fosfoproteína reguladora de AMP c enriquecida en regiones del cerebro que reciben estímulos dopaminérgicos como el núcleo caudado y la corteza cerebelar. (Rakhilin et al., 2004) Ha sido reportado que el ratón *knockout* muestra un comportamiento de ansiedad y deficit emocional con niveles disminuidos de dopamina (Davis, Olausson, Greengard, Taylor, & Nairn, 2012)

Por su parte *CYBRD1* codifica para un citocromo Beta duodenal con actividad de ferredoxina (Cells, Latunde-dada, Simpson, & Mckie, 2008) que aparentemente no guarda relación alguna con el desarrollo de este padecimiento. Sin embargo se sabe que una sobrecarga de Hierro se asocia a DT2 (Gao, Li, Gao, & Li, 2014) (Blasco et al., 2014) mediante un aumento en el estrés oxidativo y una disfunción mitocondrial en la célula Beta (Huang et al., 2011)

Constantine y cols, demostraron la asociación entre el SNP rs884409 y un aumento en los niveles de Hierro en una cohorte de Europa del Norte (Beckman et al., 2009) Este SNP está en desequilibrio de ligamiento con el SNP rs13392902 reportado en nuestro estudio, sin embargo no podemos confirmar esta asociación debido a la falta de datos en nuestra cohorte. Este gen puede ser importante para el depósito de Hierro en el hígado llevando así a una resistencia a la Insulina. En este año se publicó un estudio que asocia niveles de ferritina y transferrina asociados a la presencia de diabetes tipo 2 (ferritina OR=1.98 [1.22-3.22], transferrina OR=2.42 [1.54-3.81])(Huth et al., 2015). Con esto se abre la pauta a la posible interacción de esta variante con la fisiopatología de Diabetes. El siguiente paso es realizar estudios funcionales inactivando o sobre-expresando este gen.

En el caso de los rasgos metabólicos el que llama más la atención por su asociación estadísticamente significativa, es niveles de Triglicéridos. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud 2012, 31.5% de la población adulta mexicana padece Hipertrigliceridemia estos valores excesivamente altos son propios de cinco de los seis clásicos fenotipos de las llamadas hiperlipoproteinemias de Frederickson (tipos 1, 2B, 3, 4 y 5), siendo la tipo 2 (hipercolesterolemia familiar) la única hiperlipoproteinemia que no presenta hipertrigliceridemia de forma característica. El ejemplo más clásico de influencia genética sobre los niveles de TG se observa en la hiperlipoproteinemia tipo 1, que se produce por una alteración en la actividad de la Lipoproteína Lipasa (LPL). Esta enzima juega un papel fundamental en la regulación de lípidos plasmáticos, ya que es la encargada de la hidrólisis de los TG empaquetados en los quilomicrones y en las partículas VLDL para producir ácidos grasos que serán captados por el músculo y el tejido adiposo.

La mayor parte de los SNPs asociados a algún tipo de dislipidemia en distintas poblaciones se localizan en el cromosoma 11, como los SNPs encontrados en este estudio que codifican a los genes *ZNF259*, *BUD13*, *SBF2* y *SLC22A18*.

Nuestros resultados confirman que la mayor parte de la variabilidad observada entre poblaciones se debe a la heterogeneidad en los efectos alélicos en Europeos, Africanos y Nativos Americanos.

El riesgo Genético es debido a múltiples interacciones de varios genes, cada uno de los cuales puede proteger o dañar a la célula Beta. La plasticidad de la célula asegura una capacidad secretora de Insulina y normoglicemia bajo condiciones extremas pero ¿hasta qué punto esta plasticidad deja de funcionar? No lo sabemos con exactitud. En un modelo de ratón con resistencia a la Insulina debido a una falla en la secreción, la respuesta fue altamente influenciada por el trasfondo genético (Andrikopoulos et al.,2005).

Así bien considerando las diferencias genéticas en las frecuencias alélicas y los haplotipos dentro de diferentes poblaciones. Los estudios en Poblaciones de diferentes ancestrías incrementan la oportunidad de detectar variantes nuevas implicadas en vías de señalización comunes.

CONCLUSIONES

- La distribución de genotipos entre ambos sexos fue la misma tanto en población infantil como adulta.
- De acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg ambas poblaciones de estudio se encuentran en equilibrio génico.
- 45% de los niños con Obesidad infantil presentan resistencia a la Insulina junto con niveles altos de Insulina.
- Clínicamente el 30% de los niños con Obesidad presentan Acantosis Nigricans.
- Portadores del alelo G en la variante de *GNPAD2* rs10938397 presenta un riesgo OR=1.30 para la presencia de Obesidad.
- Portadores del alelo C en la variante de *MCR4* tienen un efecto nominal asociado al IMC (β [error estándar]= 0.41 kg/m²).
- Portadores del alelo G en la variante de *ENPP1* rs7754561 presentan un efecto protector a la presencia de Obesidad con un OR =0.84, a diferencia de lo mostrado en poblaciones Europeas.
- En la población Adulta 30% de los controles presenta Sobrepeso u Obesidad.
- El 60% de los Pacientes Diabéticos muestran al menos dos complicaciones de Diabetes.
- El 30% de los Pacientes Diabéticos tiene una tasa glomerular de filtración por debajo de 60ml/min/m².
- No existen diferencias significativas en el perfil bioquímico (colesterol total, HDL, LDL, Triglicéridos) de pacientes con Diabetes tipo 2 o control.
- Se replicaron las variantes en *GLIS3* y *JAZF1* anteriormente asociadas a Diabetes tipo 2 en población Mexicana.
- Se encontraron tres nuevos *loci* en los genes *FGD6*, *ARPP21* y *CYBRD* asociados a Diabetes tipo 2 en Población Mexicana.
- La diversidad del componente genético para las muestras de estudio en población Adulta, está dada por un componente Amerindio de 68%, Europeo de 27%, Africano 4% y Asiático 1%.

- La población mexicana muestra un score genético de riesgo de 0.065 por alelo portado para la presencia de Diabetes tipo 2
- Existe un alta heterogeneidad genética entre la población Francesa y Mexicana (Het P-value: 9,89E-06; OR 1,093) siendo de mayor importancia en los SNPs asociados a la función de la célula Beta.
- Los SNPs encontrados en este estudio asociados a niveles de triglicéridos codifican a los genes *ZNF259*, *BUD13*, *SBF2* y *SLC22A18* localizados en el cromosoma 11.
- Los polimorfismos asociados a Obesidad infantil y Diabetes tipo 2 en nuestra muestra de estudio permiten estimar el peso aproximado del componente genético en población mexicana.

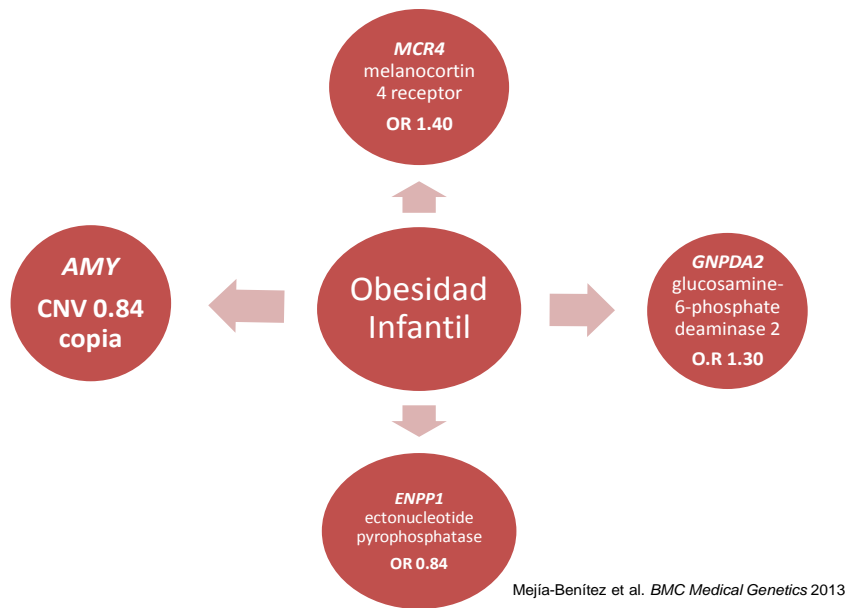


Figura 33. SNPs asociados a Obesidad Infantil en población Mexicana

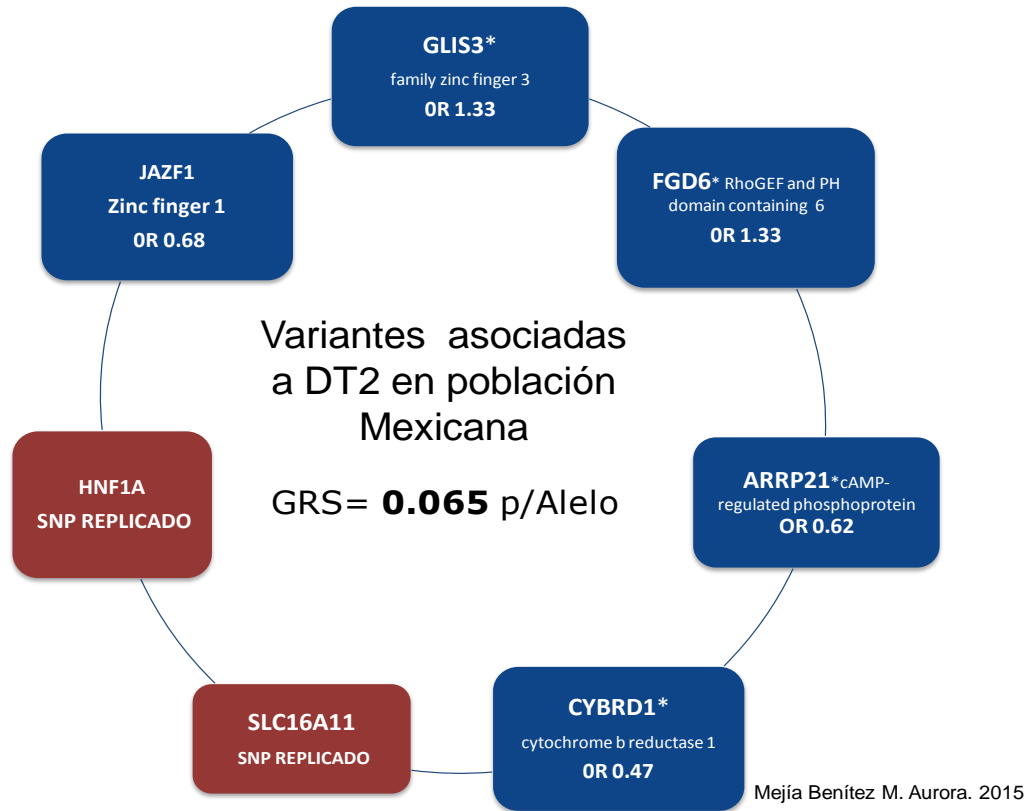


Figura 34. SNPs asociados a Diabetes tipo 2 en población Mexicana.

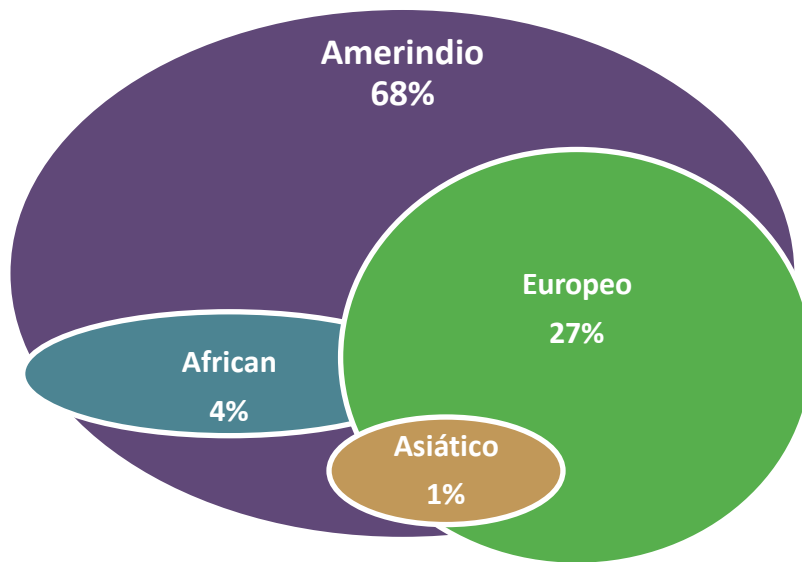


Figura 35. Diversidad genética en la población estudiada.

PERSPECTIVAS

El mapa génico de la obesidad y Diabetes tipo 2 continúa expandiéndose de forma acelerada. Y actualmente se cuenta con variantes exclusivas a la población Mexicana como es el caso de *SLC16A11* y una mutación rara en *HNF1A* asociada a Diabetes tipo 2 por el grupo SIGMA. Reafirmando la diferencias entre poblaciones de distinto origen étnico.

Diferentes estudios con distintas metodologías han confirmado hallazgos comunes, aunque la asociación de riesgo con algunos rasgos de la obesidad y Diabetes no están completamente definidos. Esto significa que al día de hoy, el mapa genómico continúa en construcción.

Los mecanismos genéticos que explican tanto la acumulación excesiva de grasa corporal y la resistencia a la insulina tienen gran potencial futuro para derivar intervenciones dirigidas a modificar el perfil epidemiológico actual de nuestro país. Sin embargo, la traducción de los conocimientos a posibles intervenciones poblacionales depende estrictamente de la comprensión de la arquitectura genómica completa. La propia complejidad del problema, aunado al enorme costo del análisis genómico, nos permite proponer que una de las direcciones que debemos seguir es formar colaboraciones con los grandes consorcios dedicados al tema. Este tipo de alianzas permite como lo hemos visto en el presente trabajo identificar aquellos genes particulares a nuestra población.

Es importante mencionar que una vez identificadas las variantes genéticas es de extrema importancia replicar las mismas en otras poblaciones, para así dar el paso al nivel funcional; lo cual nos permitirá dilucidar nuevos mecanismos fisiopatológicos.

REFERENCIAS

- Aguilar C., Rojas R, Gómez J., Franco A., Olaiz G., Rull J., Sepúlveda J., 2004. El síndrome metabólico: un concepto en evolución *Gac Méd Méx*;140: 2.
- Aguirre LM, Valadez L., 2011. Diabetes mellitus. En: Vázquez EM, Romero E, Larrosa.
- American Diabetes Association, 2014. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 38, pp.S8–S16.
- Artner, I., Hang, Y., Mazur, M., Yamamoto, T., Guo, M., Lindner, J., Stein, R. 2010. MafA and MafB regulate genes critical to β -cells in a unique temporal manner. *Diabetes*,59, 2530–2539.
- Badman MK, Flier JS.,2005 The gut and energy balance: Visceral allies in the obesity wars. *Science*;307:1909-14.
- Barker, D.J. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Londres)* 1998; 95:115-128
- Baturin AK, Pogozheva AV, Iu Sorokina E, Makurina ON, Tutel'ian VA. ,2011. The study of polymorphism rs9939609 FTO gene in patients with overweight and obesity. *Vopr Pitan*;80:13-7.
- Beckman, K. B., Chen, V., Matak, P., McKie, A. T., Delatycki, M. B., Olynyk, J. K., Bertalli, N. A., 2009. A novel association between a SNP in CYBRD1 and serum ferritin levels in a cohort study of HFE hereditary haemochromatosis. *British Journal of Haematology*, 147, 140–149.
- Bell CG, Walley AJ, Froguel P., 2005. The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*;6 221-34.
- Blasco, G., Puig, J., Daunis-I-Estadella, J., Molina, X., Xifra, G., Fernández-Aranda, F., Fernández-Real, J. M., 2014. Brain Iron Overload, Insulin Resistance and Cognitive Performance in Obese Subjects: A Preliminary MRI Case-Control Study. *Diabetes Care*, 37(November), 1–8.
- Bodmer W, Bonilla C. 2008. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet*; 40(6): 695-701.
- Bonnefond, A. & Froguel, P., 2015. Rare and Common Genetic Events in Type 2 Diabetes: What Should Biologists Know? *Cell Metabolism*, 21(3), pp.357–68.

- Bouchard C. 1997. Genetics of human obesity: recent results from linkage studies. *J Nutr*; 127: 188S-189S.
- Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*. 1992;71:1195-204.
- Burman Pia., Ritze'n Martin and Lindgren Ann Christin. Endocrine Dysfunction in Prader-Willi Syndrome: A Review with Special Reference to GH. *Endocrine Reviews* 2001, 22(6):787–799
- Cauchi, S., Meyre, D., Dina, C., Choquet, H., Samson, Ch., et al. (2006) *Diabetes* 55, 2903-2908
- Cells, E., Latunde-dada, G. O., Simpson, R. J., & Mckie, A. T. (2008). Duodenal Cytochrome B Expression Stimulates Iron Uptake by Human Intestinal, (October 2007), 1–5.
- Cernea, S., Buzzetti, R. & Pozzilli, P., 2009. Beta-cell protection and therapy for latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes care*, 32 Suppl 2(suppl_2), pp.S246–52.
- Chan, K.S. & Tong, H., 1986. On estimating thresholds in autoregressive Models. *Journal of Time Series Analysis*, 7(3), pp.179–190.
- Chen Q, Phillip H, Pekala J. Tumor necrosis factor - γ - induced insulin resistance in adipocytes. *PSEBM*. 2000;223:128-35.
- Cheung CY, Tso AW, Cheung BM. Genetic variants associates with persistent central obesity and the metabolic syndrome in a 12-year longitudinal study. *Eur J Endocrinol*. 2011 Mar; 164 (3): 381-8
- Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*; 11(6): 415-25.
- Claussnitzer, M. et al., 2015. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *New England Journal of Medicine*, 373(10), p.150819140043007.
- Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998;392:398-401.
- Comuzzie AG, Willimas JT, Blangero MJ. Searching for genes underlying normal variation in human adiposity. *J Mol Med* 2001; 79:57-70

- Corbaton A., Cuervo R., Pérez N., Y Serrano M. Síndrome metabólico: una situación multifactorial (genes y ambiente). De los criterios diagnósticos a la prevención y tratamiento. *Enfermedades Metabólicas Realigraf*, Madrid 2006. 57-89.
- Cruz M., García J., López E., Valladares A., Sánchez R., Wachter N., Aguilar R., y Kumate J. Genes candidates como posibles marcadores de susceptibilidad a Diabetes tipo 2. *REB* 2005 ; 24(3,4):81-86.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360:1509-17.
- D. C. Rao. *C.C.G. Genetic Dissection of Complex Traits* 2008; 60:3–34
- D’Adamo E, Caprio S (2011). Type 2 Diabetes in Youth: Epidemiology and Pathophysiology. *Diabetes care*. 31 (2), 161-165.
- Davis, M. M., Olausson, P., Greengard, P., Taylor, J. R., & Nairn, A. C. (2012). Regulator of calmodulin signaling knockout mice display anxiety-like behavior and motivational deficits. *European Journal of Neuroscience*, 35, 300–308.
- Dayeh, T., Volkov, P., Salö, S., Hall, E., Nilsson, E., Olsson, A. H., ... Ling, C. (2014). Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Human Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Donors Identifies Candidate Genes That Influence Insulin Secretion. *PLoS Genet*, 10(3), e1004160.
- DeFronzo, R.A., 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4), pp.773–95.
- Delrue MA, Michaud JL. Fat chance: genetic syndromes with obesity. *Clin Genet*. 2004;66(2):83-93.
- Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoœur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougneres P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chevre JC, Froguel P: Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39:724-726, 2007
- Dina C., Meyre D., Samson C., Tichet J., Marre M., Jouret B., Charles MA., Balkau B., Froguel P. Comment on “A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity”. *Science* 2007; 315: 187b.

- Doo M, Kim Y. Association between ESR1 rs1884051 polymorphism and dietary total energy and plant protein intake on obesity in Korean men. *Nutr Res Pract.* 2011;5:527-32.
- Dupuis, J. et al., 2010. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nature genetics*, 42, pp.105–116.
- Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *The Lancet*, 2002; 360:(473).
- El-Sayed Moustafa, J.S. & Froguel, P., 2013. From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nature reviews. Endocrinology*, 9(7), pp.402–13. Available at:
- Estrada, K. et al., 2014. Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. *JAMA*, 311(22), pp.2305–14. Available at:
- Falchi, M. et al., 2014. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nature genetics*, 46(5), pp.492–7.
- Feinleib M, Garrison RJ, Fabsitz R, Christian JC, Hrubec Z, Borhani NO, et al. The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. *Am J Epidemiol.* 1977;106 284-95.
- Ferea TL, Brown PO. Observing the living genome *Curr Op Genet Dev* 1999; 9:715-722
- Fernandez, M. The Metabolic Syndrome. *Nutrition Reviews* 2007(II) 65(6): S30–S34.
- Florez, J.C., Hirschhorn, J. & Altshuler, D., 2003. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annual review of genomics and human genetics*, 4, pp.257–91.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI: A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316:889-894, 2007
- Frazer KA et al. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009; 10(4): 241-51

- Gao, W., Li, X., Gao, Z., & Li, H. (2014). Iron increases diabetes-induced kidney injury and oxidative stress in rats. *Biological Trace Element Research*, 160(3), 368–75
- Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *TIBS* 1999; 24:168-173
- González E., Pascual I., Laclaustra M., y Casanovas J. Síndrome metabólico y diabetes mellitus *Rev Esp Cardiol Supl.* 2005;5:30D-7D
- Gonzalez Jimenez E. Genes and obesity: a cause and effect relationship. *Endocrinol Nutr.* 2011;58:492-6
- Goran MI, Ball GDC, Cruz ML. Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1417-27.
- Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benedicsson, R., Manolescu, A., Sainz, J. et al. (2006 *Nat.Genet.* 38, 320-323
- Groves, C. J., Zeggini, E., Minton, J., Frayling, T. M., Weedon, M. N., et al. (2006) *Diabetes* 55, 2640-2644
- Han, J.-L. & Lin, H.-L., 2014. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective. *World journal of gastroenterology : WJG*, 20(47), pp.17737–45.
- Hardy J, Singleton A. Genome wide association studies and human disease. *NEJM* 2009; 360:1759-1768
- Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:51-9.
- Hernandez Cordero S. Prevention of infant obesity. *Gac Med Mex.* 2011;147:46---50.
- Hiroshi, M., Hara, K., Ito, C., Hagai, R., Froguel, P. et al. (2007) *Diabetologia* 50, 747-751
- Hivert, M.-F., Vassy, J. L., & Meigs, J. B. (2014). Susceptibility to type 2 diabetes mellitus--from genes to prevention. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(4), 198–205.
- Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond).* 2008; 32 (7): S52–S54

- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1595-9.
- Huang, J., Jones, D., Luo, B., Sanderson, M., Soto, J., Abel, E. D., ... McClain, D. A. (2011). Iron overload and diabetes risk: A shift from glucose to fatty acid oxidation and increased hepatic glucose production in a mouse model of hereditary hemochromatosis. *Diabetes*, 60, 80–87.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Qing Fang, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 1997;88:131-41.
- Ichihara S, Yamada Y. Genetic factors for human obesity. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(7-8):1086-98.
- International Diabetes Federation. *The Metabolic syndrome 2013*
- International Hap Map Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437(7063): 1299-320.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921. (2001).
- Jackson RS, Creemers JWM, Ohagi S, Raffin-Sanson M-L, Sanders L, Montague CT, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nature Genetics.* 1997;16:303 - 6.
- Jelinek D, Millward V, Birdi A, Trouard TP, Heidenreich RA, Garver WS: Npc1 haploinsufficiency promotes weight gain and metabolic features associated with insulin resistance. *Hum Mol Genet* 2011, 20(2):312-321.
- Jiang YH, Tsai TF, Bressler J, Beaudet AL. Imprinting in Angelman and Prader-Willi syndromes. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8(3):334-42.
- Junnila R, Aromaa M, Heinonen OJ, Lagstrom H, Liuksila PR, Vahlberg T, et al. The weighty matter intervention: a familycentered way to tackle an overweight childhood. *J Community Health Nurs.* 2012;29:39---52.
- Kang, H. S., Kim, Y.-S., ZeRuth, G., Beak, J. Y., Gerrish, K., Kilic, G., ... Jetten, A. M. (2009). Transcription factor Glis3, a novel critical player in the regulation of pancreatic beta-cell development and insulin gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 6366–6379.

- Karlsson, F.H. et al., 2013. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498(7452), pp.99–103.
- Kent JW, Commuzzie AG, MC M, Almasy L, Rainwater DL, VandeBerg JL, et al. Intracellular adhesion molecule-1 concentration is genetically correlated with insuline resistance, obesity and HDL concentrations in Mexican American. *Diabetes*. 2004;53:2691-5.
- Kohen-Avramoglu R, Theriault A, Adeli K. Emergence of the metabolic syndrome in childhood: an epidemiological overview and mechanistic link to dyslipemia. *Clin Biochem*. 2003;36:413-20.
- Krook A. Sending the signal: Molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Medicine and Science in sports and exercise* 2004; 1212-1217.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics*. 1998;19:155-7.
- Kumar S., Elbein S. The Genetic Basis of Type 2 Diabetes. *Cell science*. 2006; 2(4): 100–131.
- Lander, E.S. et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp.860–921.
- Lango H, Weedon MN: What will whole genome searches for susceptibility genes for common complex disease offer to clinical practice? *J Intern Med* 263:16-27, 2008
- Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL. Biology of vascular malformations of the brain. *Stroke*. 2009 Dec; 40 (12):694-702
- Lehman, D. M., Hunt, K. J., Leach, R. J., Hamlington, J., Arya, R., Abboud, H. E., Duggirala, R., et al. (2007) *Diabetes* 56, 389-593
- LenThomas & J.Krebs, C., 2012. A Review of Statistical Power Analysis Software.
- Li C, Huang T-K, Cruz ML, Goran MI. Birth weight, puberty, and systolic blood pressure in children and adolescents: a longitudinal analysis. *J Hum Hypert*. 2006;20:444-50.
- Lichti-Kaiser, K., ZeRuth, G., Kang, H. S., Vasanth, S., & Jetten, A. M. (2012). Gli-Similar Proteins. Their Mechanisms of Action, Physiological Functions, and Roles in Disease. *Vitamins and Hormones*, 88, 141–171.

- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*. 2002;360:57-8.
- Liu G, Zhu H, Dong Y, Podolsky RH, Treiber FA, Snieder H. Influence of common variants in FTO and near INSIG2 and MC4R on growth curves for adiposity in African- and European-American youth. *Eur J Epidemiol*. 2011;26:463-73.
- Lowell BB, Spiegelmen BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000;404:661-71.
- Maggio, C.A. & Pi-Sunyer, F.X., 2003. Obesity and type 2 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 32(4), pp.805–22.
- Martínez JA. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc* 2000;59:337-45.
- Martinez-Marignac, V.L. et al., 2007. Admixture in Mexico City: Implications for admixture mapping of Type 2 diabetes genetic risk factors. *Human Genetics*, 120(6), pp.807–819.
- Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Decreased plasma adiponectin concentrations in woman with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2764-9.
- McGarry JD, Dobbins RL. Fatty acid, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetology*, 1999; 42:128-138.
- McTaggart JS, Lee S, Iberl M, Church C, Cox RD, Ashcroft FM. FTO is expressed in neurones throughout the brain and its expression is unaltered by fasting. *PLoS One*. 2011;6:27968.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387:903-8.
- Morris, A., Voight, B. & Teslovich, T., 2012. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nature genetics*, 44, pp.981–990.
- Murrin CM, Kelly GE, Tremblay RE, Kelleher CC. Body mass index and height over three generations: evidence from the Lifeways cross-generational cohort study. *BMC Public Health*. 2012;12:81.

- Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, et al. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genetics*. 1995;10:135-42.
- National Center for Health Statistics. Prevalence of overweight among children and adolescents: United States, 2000. En línea: http://www.cdc.gov/growthcharts/cdc_charts.htm
- Nishina M, Kikuchi T, Yamazaki H, Kameda K, Htura M et al. (2003). Relationship among systolic blood pressure, serum insulin and leptin and visceral fat accumulation in obese children. *Hypertens Res*: 26:281-288.
- Nutrición clínica en pediatría. 1a ed. México: Editorial Intersistemas, p. 189-192.
- Olaiz F. Rivera J. Shamah L. Rojas R., Villalpando S., Hernández M., Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
- Olaiz F.G., Rojas R., Aguilar S.C., Rauda J y Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *SPM* 2007;49: S331-S337.
- Palmer LJ, Cardon LR: Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet* 366:1223-1234, 2005
- Peng S, Zhu Y, Xu F, Ren X, Li X, Lai M. FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. *BMC Med*. 2011;9:71.
- Perusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, et al. The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res*. 2005;13:381-490.
- Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci*. 2000;67:91-300.
- Pilz S, Horejsi R, Möller R, Almer G, Scharnagl H, Stojakovic T, et al. Early atherosclerosis in obese juveniles is associated with low serum levels of adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4792-6.
- Prokopenko, I. et al., 2009. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nature genetics*, 41(1), pp.77-81.

- Rakhilin, S. V, Olson, P. a, Nishi, a, Starkova, N. N., Fienberg, a a, Nairn, a C. Greengard, P. (2004). A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5696), 698–701.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*. 2006;14:529-644.
- Rao, K.R., Lal, N. & Giridharan, N. V, 2014. Genetic & epigenetic approach to human obesity. *The Indian journal of medical research*, 140(5), pp.589–603.
- Razquin, C., Marti, A. & Martinez, J.A., 2011. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPAR γ . *Approaches for personalized nutrition. Molecular nutrition & food research*, 55(1), pp.136–49.
- Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med*. 2004;82(8):510-29.
- Rockman, M. V & Kruglyak, L., 2006. Genetics of global gene expression. *Nature reviews. Genetics*, 7(11), pp.862–72.
- Rodríguez-Morán M, Salazar-Vázquez B, Violante R, Guerrero-Romero F. Metabolic syndrome among children and adolescents aged 10-18 years. *Diabetes Care*. 2004;27(10):2516-7.
- Salud, M.F.M. para la & Yucatán, U.A. de, 1999. *Obesidad en México*.
- Saxena, R. et al., 2007. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5829), pp.1331–6.
- Sayers EW et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2009; 37
- Schork, N.J., Greenwood, T.A. & Braff, D.L., 2007. Statistical genetics concepts and approaches in schizophrenia and related neuropsychiatric research. *Schizophrenia bulletin*, 33(1), pp.95–104.
- Scott, L.J. et al., 2007. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science*, 316(5829), pp.1341–1345.
- Scott, L.J., Bonnycastle C., Willer C. J., Sprau, A. G., Jacjson, A. U., Narisu, N., et al. (2006) *Diabetes* 55, 2649-2653

- Serene TE, Shamarina S, Mohd NM. Familial and socioenvironmental predictors of overweight and obesity among primary school children in Selangor and Kuala Lumpur. *Malays J Nutr.* 2011;17:151---62.
- Shulman, G.I., 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 106(2), pp.171–6.
- Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N Engl J Med.* 2002;346:802-10.
- Sorof J, Daniels S. Obesity hypertension in children: A problem of epidemic proportions. *Hypertension.* 2002;40 441-7.
- Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. *Annu Rev Med.* 2004;55:27-39.
- Srinivasan SR, Frontini MG, Berenson GS, Bogalusa Heart Study. Longitudinal changes in risk variables of insulin resistance syndrome from childhood to young adulthood in offspring of parents with type 2 diabetes: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism.* 2003;52:443-50.
- Staiger H, Tschritter O, Machann J, Thamer C, Fritsche A, Maerker E, et al. Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans. *Obesity research.* 2003;11:368-72.
- Stumvoll T, MacLaren N. Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2526-2539.
- Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med.* 1990;322:1483-7.
- Suárez, E. et al., 2007. A tutorial in genetic epidemiology and some considerations in statistical modeling. *Puerto Rico health sciences journal*, 26(4), pp.401–21.
- SVEHDM/DGAE/Secretaría de Salud/México, enero-marzo 2013
- Tomaszewski M, Charchar FJ, Barnes T, et al., A common variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 6 gene (LRP6) is associated with LDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Sep;29(9):1316-21
- Tounian P. Programming towards Childhood Obesity. *Ann Nutr Metab.* 2011;58:30-41.

- Venter C. et al. The sequence of the human genome. *Science* 291 1304-1351. (2001)
- Wardle J, Carnell S, Haworth C, Farooqi S, O'rahilly S, Plomin R. Obesity associated variation in FTO is associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3640-3.
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44(3): 388-96
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, Berndt SI, Elliott AL, Jackson AU, Lamina C et al: Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 2009, 41(1):25-34.
- Williams, A.L. et al., 2014. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*, 506(7486), pp.97–101.
- World Health Organization: Obesity and overweight [online] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (2012).
- Yang W-S, Jeng C-Y, Wu T-J, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzahua Y, et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone increases plasma levels of adiponectine in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2002;25:376-80.
- Yeo, G.S. et al., 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature genetics*, 20(2), pp.111–2.
- Zeggini, E. et al., 2007. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5829), pp.1336–41.
- Zeruth, G. T., Takeda, Y., & Jetten, A. M. (2013). The Kruppel-like protein Gli-similar 3 (Glis3) functions as a key regulator of insulin transcription. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 3.

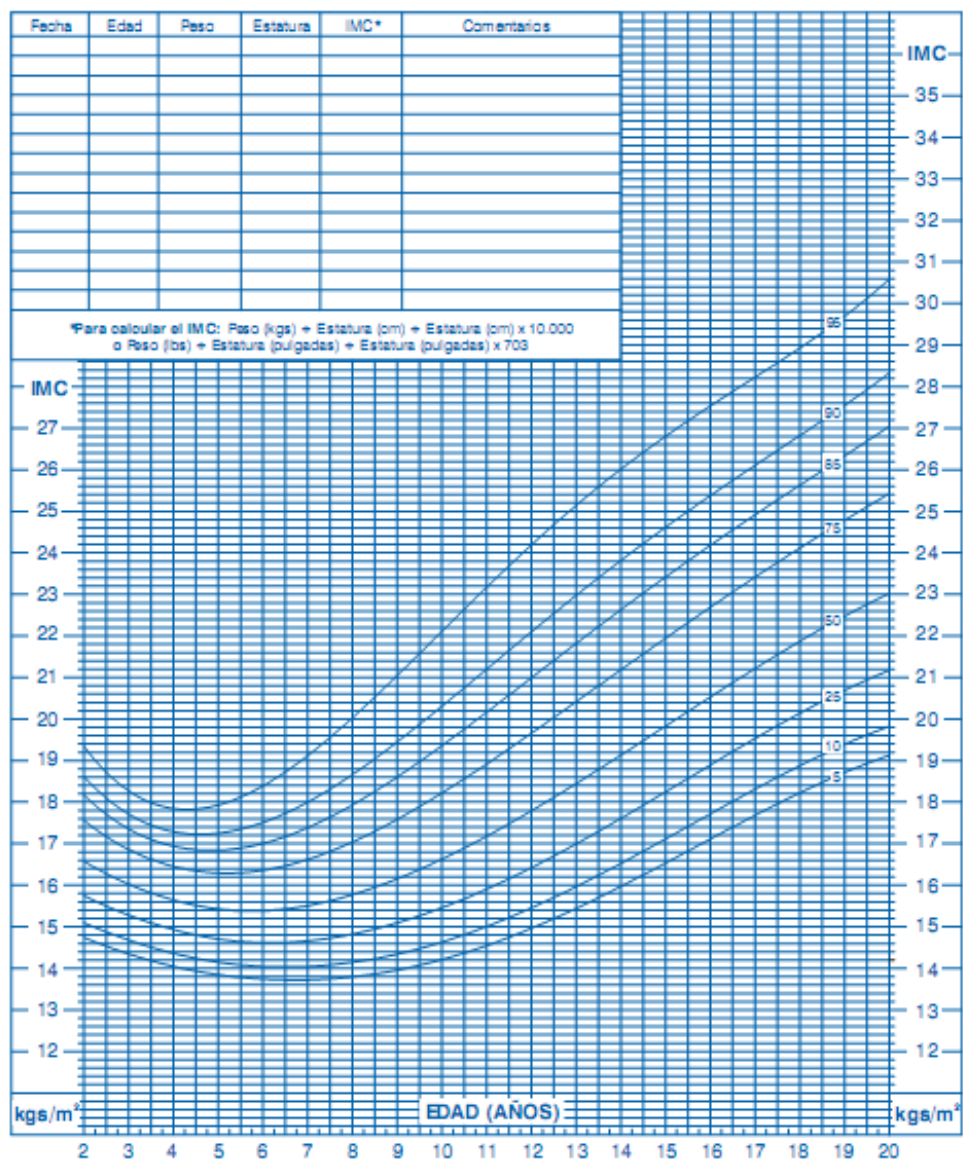
ARTICULOS PUBLICADOS

Mejía-Benítez A, Klünder-Klünder M, Yengo L, Meyre D, Aradillas C, Cruz E, Pérez-Luque E, Malacara JM, Garay ME, Peralta-Romero J, Flores-Huerta S, García-Mena J, Froguel P, Cruz M, Bonnefond A. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Med Genet.* 2013 Feb1;14:2

María A. Mejía-Benítez, Amélie Bonnefond, Loïc Yengo, Marlène Huyvaert, Aurélie Dechaume, Jesús Peralta-Romero, Miguel Klünder-Klünder, Jaime García Mena, Julia S. El-Sayed Moustafa, Mario Falchi, Miguel Cruz, Philippe Froguel. Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia* November 2014. DOI 10.1007/s00125-014-3441-3

ANEXO I Tabla de IMC para niños de 2 a 20 años de edad

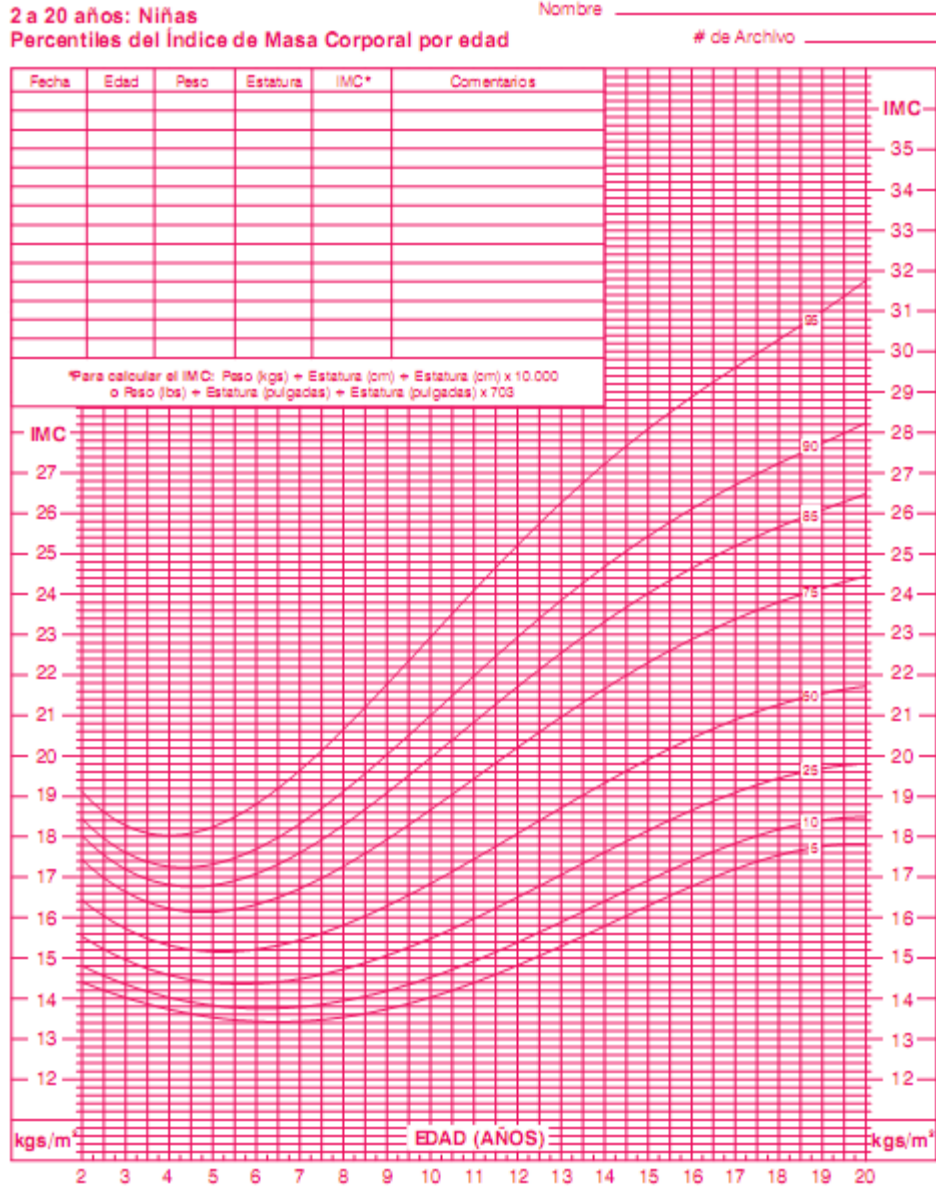
2 a 20 años: Niños Nombre _____
 Percentiles del Índice de Masa Corporal por edad # de Archivo _____



Publicado el 30 de mayo del 2000 (modificado el 18 de octubre del 2000).
 FUENTE: Desarrollado por el Centro Nacional de Estadísticas de Salud en colaboración con el
 Centro Nacional para la Prevención de Enfermedades Crónicas y Promoción de Salud (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>



ANEXO II Tabla de IMC para niñas de 2 a 20 años



Publicado el 30 de mayo del 2000 (modificado el 16 de octubre del 2000).
 FUENTE: Desarrollado por el Centro Nacional de Estadísticas de Salud en colaboración con el
 Centro Nacional para la Prevención de Enfermedades Crónicas y Promoción de Salud (2000).

ANEXO III

Hoja de resultados Bioquímicos entregados a los pacientes incluidos en el proyecto Diabetes.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

IMSS

Paciente: [] A **No Folio :** 28000020
Sexo: F **Fecha cita:** 31/01/12
Edad: 49 años **Expediente:**
Servicio: UMF 28
Diagnostico: DIABETES MELLITUS

ANTROPOMETRIA: Copia de Laboratorio
 De acuerdo a su IMC usted se encuentra: **OBESO**

		No	No	Sí	No	
Estatura: 159 m		Normal	Sobrepeso	Obeso	Obesidad Severa	K.Cal Consumidas: 1513
Peso: 79.7 kg		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	K.Cal Requeridas: 1500
Cintura: 103 cm						
Cadera: 102 cm						
Presión Arterial: 110/80 mmHg						
IMC: 31.62						

RESULTADOS DE LABORATORIO

Estudio	Resultado	Unidades	Referencia
Glucosa	126	mg/dL	70 - 100 **
Urea	30	mg/dL	15 - 40
Creatinina	0.61	mg/dL	0.6 - 1.3
Colesterol Total	234	mg/dL	< 200
Colesterol HDL	42	mg/dL	Mujeres >50 Hombres >40
Colesterol LDL	189	mg/dL	< 100
Triglicéridos	284	mg/dL	< 150
HbA1c	7.58	%	< 7.0
Albumina en Orina	0.10	mg/dL	Normal < 30 mg/dL Microalbuminuria 30 a 299 mg/dL Macroalbuminuria > 300 mg/dL

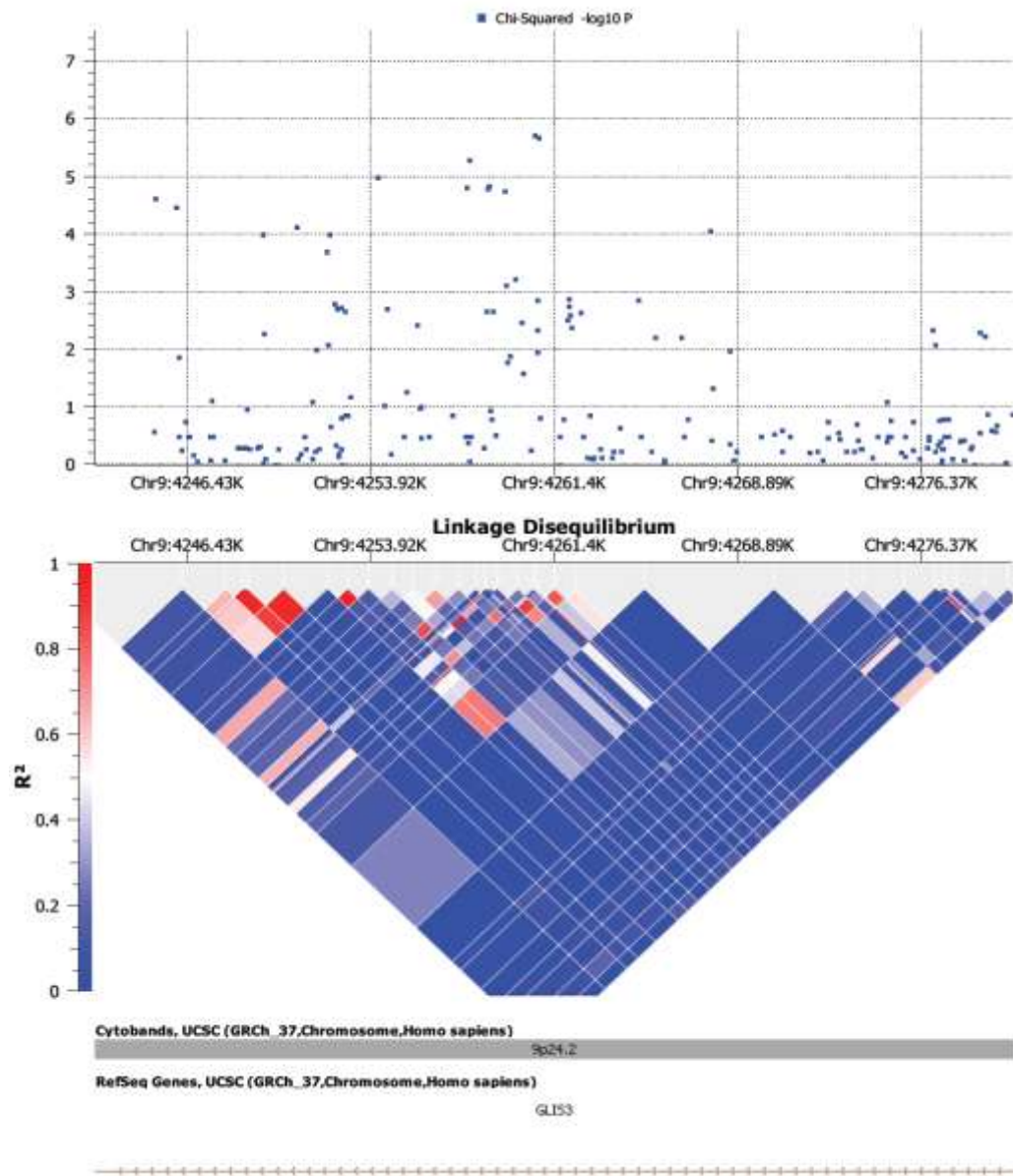
TFG **140** ml/min/1.73m²

Estadio	Daño renal	TFGe (ml/min/1.73m ²)
1	Normal o alta	> 190
2	Disminución leve	60 - 89
3	Disminución moderada	30 - 59
4	Disminución grave	15 - 29
5	Falla renal	< 15 (diálisis)

***Clasificación de la ERC (KDOQI)**

RIESGO CARDIOVASCULAR 6%

ANEXO IV Mapa que muestra las variantes en desequilibrio de ligamiento en la región del gen *GLIS* analizado por Genome Studio. En rojo se muestran las variantes con un r^2 mayor a 0.9



ANEXO V SNPs asociados a rasgos metabólicos en la Población Mexicana

SNP	CHR	BP	A1	TM	BETA	P	GEN
chr16:11589534	16	11589534	G	980	1.036	4.60E-06	LITAF
chr6:25997316	6	25997316	A	980	1.036	4.60E-06	SLC17A3
chr6:26141106	6	26141106	A	980	1.036	4.60E-06	HIST1H3B, HIST1H2AB
rs2731759	16	56850578	A	980	0.079	3.76E-06	CCDC113

Tabla SNPs asociados a niveles de colesterol; ESI.

SNP	CHR	BP	A1	TM	BETA	P	GEN
chr2:204113523	2	204113523	G	980	0.35	6.01E-06	RAPH1

Tabla SNP asociado a niveles de LDL; ES y ESI.

SNP	CHR	BP	A1	TM	BETA	P	GENES
chr11:116150485	11	116150485	A	980	0.077	1.52E-09	BUD13
chr11:116146238	11	116146238	A	980	0.071	2.22E-07	BUD13
chr17:78314097	17	78314097	A	980	-0.858	2.41E-07	TBCD
chr17:78324826	17	78324826	A	980	-0.858	2.41E-07	TBCD
rs1864163	16	55554734	A	980	-0.070	1.48E-06	CETP

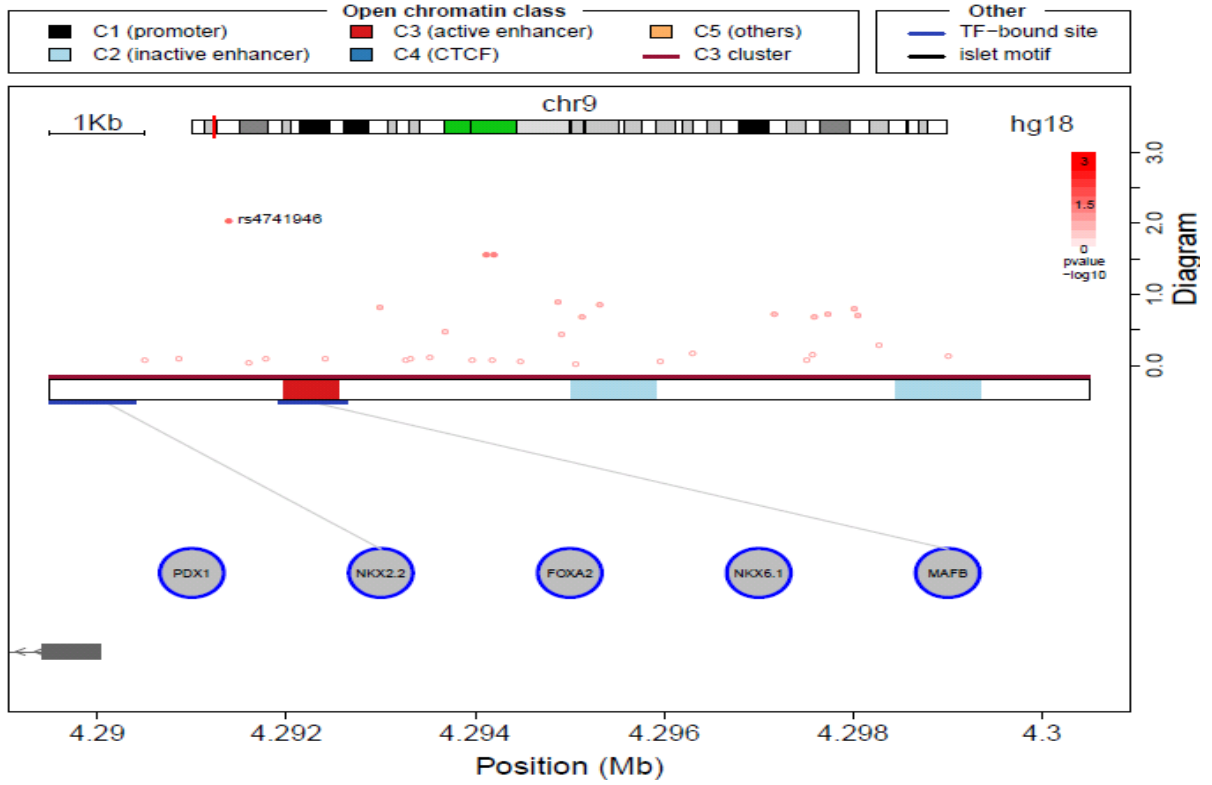
Tabla de SNPs asociados a niveles de HDL; ESI

SNP	CHR	BP	A1	TM	BETA	P	GEN
chr11:10133558	11	10133558	G	980	2.604	1.38E-07	SBF2, KIAA1766
chr11:2890200	11	2890200	A	980	2.604	1.38E-07	SLC22A18
chr11:9927908	11	9927908	G	980	2.604	1.38E-07	SBF2
chr11:9999855	11	9999855	C	980	2.604	1.38E-07	SBF2, KIAA1766
chr2:203967925	2	203967925	G	980	2.604	1.38E-07	ABI2, argBPIB
chr11:116130572	11	116130572	A	980	0.1389	2.74E-06	BUD13

Tabla SNPs asociados a niveles de triglicéridos; ES.

SNPS asociados con una $p > 0.05$. **ES** Ajustado a Edad y Sexo; **ESI** Ajustado a Edad, sexo e IMC; **CHR** cromosoma; **BP** posición ; **TM** tamaño de la muestra; **A1** alelo de estudio; **BETA** Tamaño del efecto (log Odds Ratio para DT2); **P** valor de p

ANEXO VI. Enhancer activo en la región de *GLIS3* unido a MAFB



ANEXO VII

Proyecto Adicional: Número de copias en el gen de *AMY1* y su relación con Obesidad en población infantil mexicana.

Introducción

A lo largo de esta tesis, hemos mencionado que la Obesidad es un problema grave de Salud que afecta a uno de cada tres niños de 5 a 11 años de edad. Los estudios de GWAS han identificado diferentes variantes asociadas a este padecimiento, pero todavía existe una gran parte de la heredabilidad sin comprender. El grupo de estudio del Dr. Froguel recientemente ha identificado una fuerte asociación entre el número de copias del gen que codifica a la amilasa salival (*AMY1*) y la presencia de Obesidad en población adulta europea y asiática.

Es importante conocer un poco de la función de la saliva humana, la cual contiene dos tipos principales de secreción proteica: 1) una secreción serosa rica en ptialina (α -amilasa) siendo una enzima para digerir almidones y 2) una secreción mucosa que contiene mucina y cumple funciones de lubricación y protección de la superficie. Las glándulas parótidas secretan exclusivamente saliva serosa, mientras que las submandibulares y sublinguales secretan ambos tipos. El pH de la saliva oscila de 6.0 a 7.0, límites favorables para la acción digestiva de la α -amilasa. (Dawes et al.)

El gen de la amilasa humana es un cluster altamente repetitivo, siendo una región con un número de copias variable el cual ha ido expandiéndose, principalmente en el humano. El genoma de referencia humano (hg19) muestra tres repetidos del gen *AMY1*, que corresponden a las copias *AMY1A*, *AMY1B* y *AMY1C* en el ensamble original en donde *AMY1B* muestra una orientación invertida (Figura 1 de este Anexo). A pesar de unos pocos indels, estas tres copias de *AMY1* son idénticas en un 99.9% teniendo una secuencia idéntica de 26.5kb cada copia. La secuencia de *AMY1* es idéntica en un 93.2% a *AMY2A* y 93.6% a *AMY2B*. (Carpenter et al.)

La caracterización del número de copias en el gen de la amilasa data de unos 30 años atrás realizada para análisis de pedigree mediante Southern Blot. Mostrando que el número de copias de *AMY1* era proporcional a la concentración de saliva.

Siendo este el punto de partida para el inicio de estudios relacionados a la importancia funcional y la presencia de un determinado número de copias. Por tal motivo en este trabajo medimos el número de copias en niños mexicanos con Obesidad para dilucidar el vínculo entre el IMC y el número de copias, además de ser una población con un alto consumo de almidón

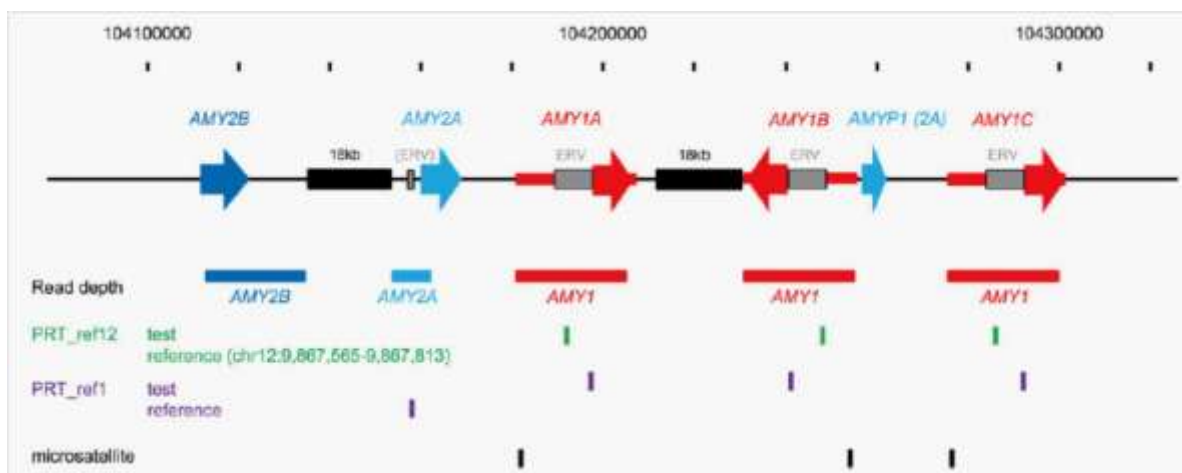


Figura 1. Anexo VII. Región del gen de la amilasa humana. Genoma de referencia (hg19) mostrando tres copias de *AMY1* (*AMY1A/1B/1C*) y una copia de *AMY2A* y *AMY2B* respectivamente. Los exones 4-10 de *AMY2A* están repetidos en un pseudogen *AMYP1*. El rectángulo negro “18kb” indica dos regiones idénticas cercanas con múltiples secuencias similares a otras regiones del locus. (Carpenter et al.)

Objetivo: Establecer la relación entre el número de copias de *AMY1* y el riesgo de Obesidad en 597 niños Mexicanos

Metodología

Participantes del estudio

Se tomaron 597 muestras (293 Obesos y 304 eutróficos) de la cohorte de estudio descrita anteriormente en la Fase 1 de Obesidad Infantil

Estos niños fueron apareados por edad y sexo, para evitar variables de confusión estadística. (Características clínicas en Tabla 1 de este Anexo VI)

El IMC fue calculado de acuerdo a las tablas del Centro de Control y prevención de Enfermedades 2000 (CDC, 2000) (Anexo I, II). Donde se define como peso normal por debajo del percentil 85th percentil, mientras que Obesidad valores por encima del percentil 95th (Kuczmarski et al.).

El estudio fue aprobado por el Comité de ética del Centro Médico siglo XXI, IMSS (*'Instituto Mexicano del Seguro Social'*, número de referencia: 2011-000-079).

PCR Digital

PCR digital (dPCR), una variación de la vieja PCR en la que es posible generar una única copia de un segmento de ácido nucleico (AN), esto se realiza partiendo la muestra en muchas porciones pequeñas (en un PCR array) y se realiza la amplificación en todas ellas, en estas separaciones que vienen a ser como diluciones hay tan poco ADN que se puede llegar a tener solamente una o ninguna molécula de AN en cada porción, luego de la reacción, se marcan los amplicones con un marcador fluorescente y se recogen los resultados como binario 1 y 0 para positivo y negativo o sea con o sin AN presente, de esta manera se puede cuantificar mejor la cantidad de AN presente de forma mucho más exacta que en una PCR convencional. (Whale et al.)

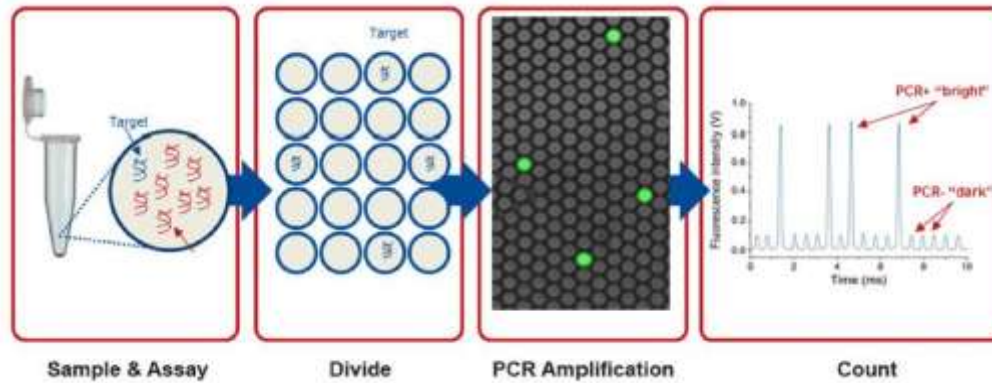


Figura 2. Anexo VII. PCR Digital se realiza dividiendo la muestras de ADN (junto con la qPCR sonda y primers) en distintas camaras separadas, así cada reacción tendra 0 o 1 molecula diana. Al final se cuentan las reacciones fluorescentes que corresponden a una molecula diana. (Bustin et al.)

Si bien es cierto el término PCR digital viene acuñado desde el año 1999 y empezó a utilizarse con más intensidad desde hace unos años, donde su aplicación principal ha sido en el campo de la investigación del cáncer. Una variación de esta técnica es que se utiliza una cantidad menor de porciones reactivas, llegando a usarse nanolitros (nL) una cantidad mucho menor que la utilizada generalmente y que ha sido llamada PCR digital de microfluído, asegurando 1000 veces más reacciones con la misma cantidad de muestra y de reactivos.

Para este proyecto la PCR digital fue realizada en el equipo BioMark System (Fluidigm), qdPCR 37K Digital Array (Fluidigm), siguiendo el protocolo establecido.

La reacción final para un panel digital comprendió 1.2µL DNA (a 5ng/µL; concentración medida en el Qubit dsDNA HS Assay kit [Life Technologies]), 2µL TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 0.4µL 20x GE Agente de carga (Fluidigm), 0.2µL *AMY1* sonda TaqMan (Hs07226362_cn; Life Technologies) y 0.2µL RNase P TaqMan humana como referencia del Número de copias (Life Technologies).

Se colocó un total de 10µL de 1× GE del Agente de carga (Fluidigm) junto con 4µL de la mezcla final en cada pozo del array digital, las cuales se distribuyeron a través de mini pozo dentro de cada panel utilizando el IFC controller-MX (Fluidigm).

En las muestras que encontramos un número de copias mayor a 10 para *AMY1*, se disminuyó la concentración de ADN a 4ng/µL; estas muestras se corrieron nuevamente por octuplicado

Los blancos o NTC fueron cargados solo con muestra que contenía Master Mix. En ninguno se encontró la presencia de copias.

Como se muestra en la Figura 3, los datos se recogen en archivo Excel y se verifican las siguientes características: a) Una diferencia estimada del número de copias de *AMY*>2 entre cada panel. b) > 600 cámaras positivas para *AMY1* (VIC-MGM) y c) <50 cámaras positivas para RNAsa P (FAM-MGM). Con esto se aseguró un mayor control de calidad en las mediciones. Las muestras que tienen alguna de las características anteriores se repitieron nuevamente.

La PCR digital ha demostrado ser una técnica altamente sensitiva para medir CNVs polimórficos.(Falchi et al.; Whale et al.).

plate	Sample Info Name	VIC-MGB Est. Targets	FAM-MGB Est. Targets	nb copies/ch	nb copies/genome		nb copies/genome	
							moyenne	sd
mexicain1	1	71	243	3.4	6.8	1	7.2	0.5
mexicain1	1	387	1384 saturé					
mexicain1	1	229	816	3.6	7.1			
mexicain1	1	99	384	3.9	7.8			
mexicain1	24	146	451	3.1	6.2	24	6.1	0.6
mexicain1	24	75	248	3.3	6.6			
mexicain1	24	99	269	2.7	5.4			
mexicain1	24	133	322	2.4				
mexicain1	200	138	218	1.6	3.2	200	3.7	0.5
mexicain1	200	321	621	1.9	3.9			
mexicain1	200	72	192	2.7				
mexicain1	200	295	601	2.0	4.1			
mexicain1	245	199	601	3.0		245	6.6	0.0
mexicain1	245	243	802	3.3	6.6			
mexicain1	245	241	802	3.3	6.7			
mexicain1	245	271	905	3.3	6.7			
mexicain1	249	71	387	5.5	10.9	249	10.6	0.6
mexicain1	249	273	1467 saturé					
mexicain1	249	176	870	4.9	9.9			
mexicain1	249	191	1051	5.5	11.0			
mexicain1	258	149	271	1.8	3.6	258	3.9	0.2
mexicain1	258	164	330	2.0	4.0			
mexicain1	258	131	255	1.9	3.9			
mexicain1	258	113	239	2.1				
mexicain1	286	216	623	2.9	5.8	286	5.6	0.1
mexicain1	286	196	473	2.4				
mexicain1	286	179	495	2.8	5.5			
mexicain1	286	230	639	2.8	5.6			
mexicain1	506	213	612	2.9	5.7	506	5.8	0.1
mexicain1	506	176	586	3.3				
mexicain1	506	208	595	2.9	5.7			
mexicain1	506	233	694	3.0	6.0			
mexicain1	524	185	952	5.1		524	11.6	0.8
mexicain1	524	209	1134	5.4	10.9			
mexicain1	524	126	783	6.2	12.4			
mexicain1	524	151	867	5.7	11.5			
mexicain1	537	226	404	1.8		537	3.8	0.1
mexicain1	537	232	465	2.0	4.0			
mexicain1	537	108	201	1.9	3.7			
mexicain1	537	116	221	1.9	3.8			
mexicain1	553	135	423	3.1	6.3	553	6.1	0.2
mexicain1	553	150	454	3.0	6.1			
mexicain1	553	141	416	3.0	5.9			
mexicain1	553	179	599	3.3				
mexicain1	585	141	348	2.5		585	5.3	0.2
mexicain1	585	173	471	2.7	5.4			
mexicain1	585	132	331	2.5	5.0			
mexicain1	585	115	305	2.7	5.3			

Figura 3. Resultados en crudo que muestra los filtros de control de calidad.

Análisis estadísticos

El efecto que tuvo el número de copias en la presencia de Obesidad fue analizado mediante Regresión logística ajustada por edad y sexo, bajo un modelo aditivo.

Los análisis se llevaron a cabo mediante el SPSS (version 14.0) y R (version 3.0).

Resultados

El número de copias de *AMY1* estimado en los 597 niños fue de 1 a 16 (Figura 4). Mediante regresión logística ajustado para edad y sexo, encontramos una fuerte asociación entre el número de copias de *AMY1* y un riesgo menor para presentar Obesidad (odds ratio [OR] [95% intervalo de confianza] por copia = 0.84 [0.78 - 0.91]; $P = 4.25 \times 10^{-6}$; Figura 4 y Tabla 2). La media del número de copias de *AMY1* fue de 6.1 ± 1.9 en los casos y en controles 7.0 ± 2.7 (Tabla 2).

Posteriormente, quisimos saber si este efecto de *AMY1* era homogéneo en el grupo de estudio a través de la distribución del número de copias. En el cuartil 1 que abarca a aquellos individuos con un número de copias menor a 5 la media del número de copias para ambos grupos fue similar (4.2 ± 0.9 versus 4.2 ± 0.8 , respectivamente; Tabla 2).

Sin embargo, en el último cuartil que abarca a aquellos individuos con un número de copias mayor a 8, los niños con Obesidad en promedio mostraron un menor número de copias con respecto a los niños eutróficos (9.2 ± 0.4 versus 10.5 ± 1.8 , respectivamente; Tabla 2).

Mediante un modelo de regresión logística ajustado a edad y sexo, encontramos un efecto significativo en el número de copias en este cuartil (OR estimado por copia = 0.40 [0.25 - 0.64]; $P = 3.12 \times 10^{-4}$; Tabla 2), a pesar del bajo poder estadístico. Todos los individuos con un número de copias mayor a 10 de *AMY1* ($N = 29$) tienen un IMC por debajo del percentil 75 (eutróficos). Este resultado sugiere que la asociación global entre el número de copias de *AMY1* y el riesgo disminuido para presentar Obesidad puede estar dada por la contribución de una presencia alta en el número de copias de *AMY1*.

Discusión

En este trabajo, confirmamos la marcada contribución del número de copias de *AMY1* con un riesgo menor para presentar Obesidad (OR estimado por copia = 0.84). Cabe mencionar, que este efecto es el mismo encontrado por el meta-análisis realizado en 2,929 adultos de origen europeo y asiático.

Sin embargo, en este estudio, encontramos que el efecto global en el número de copias de *AMY1* con el menor riesgo a presentar Obesidad esta dado principalmente por un aumento marcado en el número de copias. Cabe mencionar que el efecto de un menor número de copias de *AMY1* y la presencia de Obesidad no fue significativa.

La amilasa salival es una enzima monomérica que se une a calcio producida por la glándula parótida principalmente y cataliza la digestión inicial del almidón, siendo este, el alimento representativo en una parte de Estados Unidos (Mandel et al.).

El número de copias se ha correlacionado con la cantidad del amilasa en saliva.(Perry et al.; Falchi et al.).

Así mismo, Perry y cols, demostraron que en poblaciones con una ingesta de almidón, en promedio presentaban un mayor número de copias de *AMY1* en comparación a aquellas poblaciones con una baja ingesta de almidón (6.7 ± 2.3 versus 5.4 ± 2.0 , respectivamente) (Perry et al.).

La población Mexicana tiene un dieta rica en almidón (entre ellos principalmente el maíz y diferentes tipos de frijol) (Sáyago-Ayerdi et al.).

Se propuso que un aumento en la cantidad de amilasa salival (correlacionado con un aumento en el número de copias de *AMY1*) confiere una ventaja a aquellos individuos con una alta ingesta de almidón mejorando la digestión a nivel de boca, estomago e intestino. (Perry et al.).

La industria farmacéutica se ha enfocado principalmente en productos para disminuir la absorción de carbohidratos (siendo la mayor fuente de calorías en la mayoría de las dietas), para mejorar el índice glucémico y disminuir de peso (Barrett and Udani).

Particularmente un estudio clínico reciente mostro que el uso de un inhibidor de la enzima amilasa en saliva (extraído del frijol común) disminuye peso (en promedio 2.9 kg en 12 weeks) (Grube et al.), siendo contradictorio a nuestros resultados.

Es importante mencionar que la expresión de *AMY1* no es exclusiva de las glándulas salivares. Anteriormente se demostró la expresión de *AMY1* en tejido adiposo (Falchi et al.).

Por lo tanto, la amilasa salival puede actuar más allá de la digestión a nivel oral, a este respecto, un estudio en modelo de ratón mostro que el a SNP (rs29982345) cerca de *AMY1*

está asociado al peso en más de 100 diferentes tipos de ratón alimentados con una dieta alta en grasas y en sucrosa (Parks et al.). Esta misma variante mostro una asociación significativa con un enriquecimiento en el género *Enterobacteriaceae* en la microbiota de raton (Parks et al.), el cual ha sido correlacionado a Obesidad en humanos (Karlsson et al.).

Es por esto, que creemos que la amilasa saliva contribuye a modular el tracto gastrointestinal de una forma que todavía no ha sido explorada por completo.

Recientemente, un estudio demostró que en adultos eutróficos con una actividad aumentada de la amilasa salival así como número de copias mejoraban su control glucémico poco después de la ingestión líquida de almidón y no después de la carga oral de glucosa (Mandel and Breslin).

Este estudio y el que realizamos sugiere los efectos benéficos de ser portador de un alto número de copias de *AMY1*, en el metabolismo energético y de la glucosa.

Características Clínicas

Características Clínicas	Casos	Controles	Valor P
N (M / F)	293 (165 / 128)	304 (165 / 139)	0.62
Edad (años)*	9.5 ± 1.7	9.5 ± 1.8	0.88
Estatura (cm)*	140.0 ± 11.6	133.3 ± 11.5	< 0.001
Peso (kg)*	50.2 ± 12.9	29.9 ± 7.6	< 0.001

* Desviación estándar

Aurora Mejía Benítez. *Diabetologia* (2015) 58:290–294

Tabla 1. Características Clínicas de la población de estudio

Efecto del CNV de AMY1 en Obesidad

Cuartiles	Casos		Controles		OR _{por copia} [95% CI]**	P-value
	N	AMY1 CN*	N	AMY1 CN*		
c1 (CN ≤ 5)	110	4.2 ± 0.9	86	4.2 ± 0.8	1.02 [0.74 - 1.40]	0.914
c4 (CN > 8)	38	9.2 ± 0.4	83	10.5 ± 1.8	0.40 [0.25 - 0.64]	3.12 × 10⁻⁴
Total	293	6.1 ± 1.9	304	7.0 ± 2.7	0.84 [0.78 - 0.91]	4.25 × 10⁻⁶

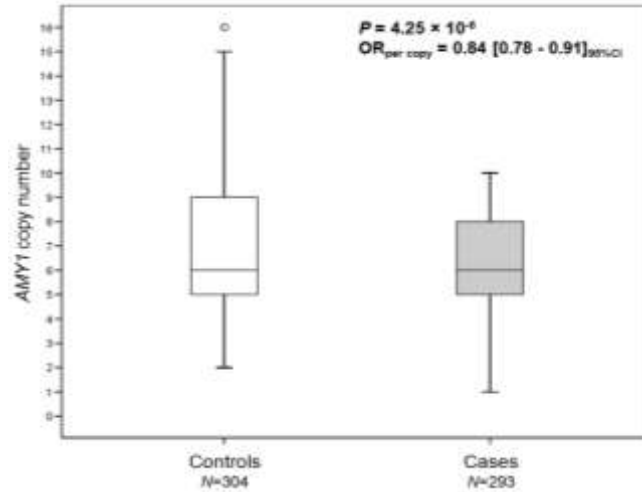
*Data are means ± standard deviation

**Odds ratio per *AMY1* copy from a logistic regression adjusted for age and sex, under an additive model.
CI, confidence interval; CN, copy number; OR, odds ratio; Q, quartile.

Aurora Mejía Benítez. *Diabetologia* (2015) 58:290–294

Tabla 2. Efecto del número de copias de AMY1 y Obesidad

Asociación entre el número de copias y el riesgo de obesidad



Aurora Mejía Benítez. *Diabetologia* (2015) 58:290–294

Figura 4. Asociación entre el número de copias y el riesgo de Obesidad

Referencias

- Barrett, Marilyn L., and Jay K. Udani. "A Proprietary Alpha-Amylase Inhibitor from White Bean (*Phaseolus Vulgaris*): A Review of Clinical Studies on Weight Loss and Glycemic Control." *Nutrition Journal* 10 (2011): 24. Web.
- Bustin, S A et al. "Quantitative Real-Time RT-PCR--a Perspective." *Journal of molecular endocrinology* 34.3 (2005): 597–601. Web. 16 July 2014.
- Carpenter, Danielle et al. "Obesity, Starch Digestion and Amylase: Association between Copy Number Variants at Human Salivary (AMY1) and Pancreatic (AMY2) Amylase Genes." *Human molecular genetics* 24.12 (2015): 3472–80. Web. 10 July 2015.
- Dawes, C et al. "The Functions of Human Saliva: A Review Sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI." *Archives of oral biology* 60.6 (2015): 863–74. Web. 2 Sept. 2015.
- Falchi, Mario et al. "Low Copy Number of the Salivary Amylase Gene Predisposes to Obesity." *Nature genetics* 46.5 (2014): 492–7. Web. 18 June 2015.
- Grube, Barbara et al. "Weight Reduction and Maintenance with IQP-PV-101: A 12-Week Randomized Controlled Study with a 24-Week Open Label Period." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 22.3 (2014): 645–651. Web.
- Karlsson, Caroline L. J. et al. "The Microbiota of the Gut in Preschool Children with Normal and Excessive Body Weight." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 20.11 (2012): 2257–2261. Web.
- Kuczmarski, Robert J. et al. "2000 CDC Growth Charts for the United States: Methods and Development." *Vital and Health Statistics. Series 11, Data from the National Health Survey* 246 (2002): 1–190. Print.

- Mandel, Abigail L. et al. "Individual Differences in AMY1 Gene Copy Number, Salivary A-Amylase Levels, and the Perception of Oral Starch." *PloS One* 5.10 (2010): e13352. Web.
- Mandel, Abigail L., and Paul A. S. Breslin. "High Endogenous Salivary Amylase Activity Is Associated with Improved Glycemic Homeostasis Following Starch Ingestion in Adults." *The Journal of Nutrition* 142.5 (2012): 853–858. Web.
- Parks, Brian W et al. "Genetic Control of Obesity and Gut Microbiota Composition in Response to High-Fat, High-Sucrose Diet in Mice." *Cell metabolism* 17.1 (2013): 141–152. Web.
- Perry, George H. et al. "Diet and the Evolution of Human Amylase Gene Copy Number Variation." *Nature Genetics* 39.10 (2007): 1256–1260. Web.
- Sáyago-Ayerdi, Sonia G. et al. "Starch Digestibility and Predicted Glycaemic Index (pGI) in Starchy Foods Consumed in Mexico." *Starch* 66.1-2 (2014): 91–101. Print.
- Whale, Alexandra S et al. "Comparison of Microfluidic Digital PCR and Conventional Quantitative PCR for Measuring Copy Number Variation." *Nucleic acids research* 40.11 (2012): e82. Web. 8 Sept. 2015.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Analysis of the contribution of *FTO*, *NPC1*, *ENPP1*, *NEGR1*, *GNPDA2* and *MC4R* genes to obesity in Mexican children

Aurora Mejía-Benitez¹, Miguel Klünder-Klünder², Loïc Yengo^{3,4}, David Meyre³, Celia Aradillas⁵, Esperanza Cruz⁶, Elva Pérez-Luque⁷, Juan Manuel Malacara⁸, María Eugenia Garay⁷, Jesús Peralta-Romero⁹, Samuel Flores-Huerta², Jaime García-Mena¹, Philippe Froguel^{3,4,9}, Miguel Cruz⁶ and Amélie Bonnefond^{3,4,10*}

Abstract

Background: Recent genome wide association studies (GWAS) and previous positional linkage studies have identified more than 50 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with obesity, mostly in Europeans. We aimed to assess the contribution of some of these SNPs to obesity risk and to the variation of related metabolic traits, in Mexican children.

Methods: The association of six European obesity-related SNPs in or near *FTO*, *NPC1*, *ENPP1*, *NEGR1*, *GNPDA2* and *MC4R* genes with risk of obesity was tested in 1,463 school-aged Mexican children ($N_{\text{obese}} = 514$; $N_{\text{control}} = 949$). We also assessed effects of these SNPs on the variation of body mass index (BMI), fasting serum insulin levels, fasting plasma glucose levels, total cholesterol and triglyceride levels, in a subset of 1,171 nonobese Mexican children.

Results: We found a significant effect of *GNPDA2* rs10938397 on risk of obesity (odds ratio [OR] = 1.30; $P = 1.34 \times 10^{-5}$). Furthermore, we found nominal associations between obesity risk or BMI variation and the following SNPs: *ENPP1* rs7754561, *MC4R* rs17782313 and *NEGR1* rs2815752. Importantly, the at-risk alleles of both *MC4R* rs17782313 and *NPC1* rs1805081 showed significant effect on increased fasting glucose levels ($\beta = 0.36$ mmol/L; $P = 1.47 \times 10^{-5}$) and decreased fasting serum insulin levels ($\beta = -0.10$ μ U/mL; $P = 1.21 \times 10^{-5}$), respectively.

Conclusion: Our present results suggest that some obesity-associated SNPs previously reported in Europeans also associate with risk of obesity, or metabolic quantitative traits, in Mexican children. Importantly, we found new associations between *MC4R* and fasting glucose levels, and between *NPC1* and fasting insulin levels.

Keywords: Obesity, Mexican children, Single nucleotide polymorphism

Background

Obesity and associated comorbidities (such as cardiovascular diseases, type 2 diabetes, musculoskeletal disorders and some cancers) represent a major public health problem that, in recent years, has reached epidemic proportions. In Mexico, obesity is the most common nutritional disorder of children, and the prevalence of this disease has increased alarmingly over the past decade: recent data from ENSA 2006 ('Encuesta Nacional de Salud', i.e.

The National Health Census) reported an increase in overweight and obesity from 18% in 1999 to 26% in 2006, in young Mexican children (between 5 and 11 years old) [1]. Overweight in childhood or adolescence is a risk factor for overall mortality in adulthood [2].

The prevalence of obesity varies across populations and it is noteworthy that the Mexican population has been disproportionately affected. Although environmental changes (linked to the 'westernization' of ways of life) can explain the increase in prevalence of obesity on a global level, individual variation of body mass index (BMI) persists in the same environment, and the heritability of this trait is very high. Indeed, heritability estimates of BMI range between 40% and 70% according to

* Correspondence: mejia@yahoo.com; ameliebonnefond@gmail.com
¹Medical Research Unit in Biochemistry, UNAM, Bernardo Sepúlveda, 865, Mexico City, Mexico
³CNRS-U498199, Lille Pasteur Institute, Lille, France
Full list of author information is available at the end of the article

studies [3]. The high genetic susceptibility to obesity (and both insulin resistance and type 2 diabetes) in the Mexican population may be ascribed to the American Indian heritage [4].

To date, genome wide association studies (GWAS) and linkage studies, mostly performed in European adult populations, have identified more than 50 loci associated with obesity or BMI [5-10]. However, replication attempts have yielded inconsistent outcomes [11-13]. In particular, replication in other populations is not obvious, and several factors (such as ethnic differences in linkage disequilibrium patterns, ethnic-specific associations, gene \times environment interactions) may puzzle the picture. Furthermore, very few studies have been performed in children presenting with severe obesity in non-European populations.

In the present study, we aimed to perform a follow-up replication study including six European obesity-associated genetic variants, in Mexican children.

Methods

Study participants

In the present study, we analyzed 1,685 children (aged 6 to 12 years) of Mexican origin, from five different states of Mexico (San Luis Potosí, Queretaro, Tijuana, Guanajuato and Mexico city), who were randomly selected and invited to participate in a cross-sectional study between 2007 and 2011 from public and private schools. Child assent was obtained and parents provided written informed consent. We collected data from the children and parent or legal guardian per child by direct questioning.

Participants were scheduled for clinical laboratory evaluation following a 12 h overnight fasting. Blood samples were drawn to assess levels of fasting glucose, fasting insulin, total cholesterol and triglycerides levels. Biochemical variables were measured using an ILab 350 Clinical Chemistry System (Instrumentation Laboratory IL). Weight was measured with a digital scale (Seca) and height was measured with a portable stadiometer (Seca 225). BMI was calculated and classified according to the 'Centers for Disease Control and Prevention 2000' (CDC 2000) reference [14]. CDC 2000 growth charts are based on 5 U.S nationally representative surveys conducted between 1963 and 1994, in which Mexican American children were included [14]. According to those growth charts, for ages 2 to 20 years, overweight was defined as a BMI-for-age between the 85th and 95th percentiles, while obesity was defined when BMI-for-age was higher than the 95th percentile [14,15]. Insulin resistance was defined as: homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) = [(Fasting glucose_(mg/dL)) (Fasting insulin_(μ U/mL))]/405 \geq 3.4 (that is the 90th percentile of HOMA-IR in a population of healthy Mexican children [16,17]).

The study was approved by the local ethics committees (Instituto Mexicano del Seguro Social, i.e. the Mexican national health service; reference number: 2011-000-079) and is in compliance with the Helsinki Declaration.

SNPs Selection and genotyping

To achieve a power of at least 50%, with an odds ratio of 1.25, we only selected SNPs with minor allele frequencies \geq 15% in the Mexican population according to the HapMap database. These SNPs were identified by GWAS or meta-analyses of GWAS in European populations [6,7,9,10]. Furthermore, we selected a SNP that was significantly associated with childhood obesity in a French population, according to a linkage association study [8]. The expected statistical power per SNP (estimated by Quanto software) is reported in Additional file 1: Table S1.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood white cells using a QIAamp DNA kit (Qiagen), purity and integrity was verified by 260/280 nm measurements and by electrophoresis in 0.8% agarose gels, stained with ethidium bromide.

All DNA samples were genotyped for the *MC4R* rs17782313, *NEGR1* rs2815752, *ENPP1* rs7754561, *NPC1* rs1805081, *GNPDA2* rs10938397 and *FTO* rs1421085 using TaqMan assays on an ABI7900 system, following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The genotype success rate was at least 98%, and no deviation ($P \geq 0.01$) from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in our population. Thirty duplicate quality control samples were included and were genotyped with 100% concordance.

Statistical analysis

The effect of SNPs on obesity status was assessed using a logistic regression model adjusted for age, gender and Mexican state (1: San Luis Potosí, 2: Queretaro, 3: Tijuana, 4: Guanajuato and 5: Mexico city), under an additive model. We also analyzed the effect of SNPs on several metabolic quantitative traits (BMI, fasting serum insulin, fasting plasma glucose, total cholesterol and triglycerides) using linear regressions under an additive model adjusted for age, gender and Mexican state. Data for fasting serum insulin and triglycerides were logarithmically transformed before statistical analysis. By applying Bonferroni correction, a significant p-value has been considered when below 1.4×10^{-2} (0.05/36) and a p-value between 0.05 and 1.4×10^{-3} has been considered as nominally significant. All statistical analyses were performed using the SPSS software (version 14.0).

Results

From an initial sample of 1,685 children (between 6 and 12 years old), we extracted 949 lean and 514 obese children (see clinical characteristics in Table 1) for the case-

Table 1 Clinical characteristics of lean and obese Mexican children

Characteristics	Lean children	Obese children	P*
	BMI <85pc N = 949	BMI ≥95pc N = 514	
Female (%)	48.4	43.6	0.04
Age (Years)	9.5 ± 1.9	9.5 ± 1.8	0.383
Anthropometric			
Weight (kg)	32.6 ± 7.8	49.7 ± 13.4	<0.001
Height (cm)	134.3 ± 11.8	139.6 ± 11.7	<0.001
BMI (kg/m ²)	17.7 ± 1.4	25.0 ± 3.4	<0.001
BMI (percentile)	65.8 ± 11.2	97.6 ± 1.4	<0.001
Metabolic factors			
Fasting insulin (μU/mL)	8.6 ± 5.9	14.1 ± 9.4	<0.001
Fasting glucose (mmol/L)	4.7 ± 0.6	4.9 ± 0.6	0.0011
Total Cholesterol (mg/dL)	151.8 ± 29.6	160.1 ± 35.1	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	88.1 ± 38.2	126.6 ± 67.6	<0.001

Data are means ± standard deviation.
 *P-value according to Student's t test comparing lean and obese children.
 BMI, body mass index; pc, percentile.

control study, and 1,171 nonobese children (with BMI < 95th percentile) for the study of metabolic quantitative traits including BMI, fasting serum insulin, fasting plasma glucose, total cholesterol and triglycerides. As expected, obese children exhibited higher values of insulin and cholesterol levels ($P \leq 0.001$) compared to lean children. Insulin resistance was found in 45% of obese children.

In both studies, we genotyped six SNPs that are known to be associated with risk of obesity in European populations: rs17782313 near *MC4R* [6]; rs2815752 near *NEGR1* [7]; rs7754561 near *ENPP1* [8]; rs1805081 in exon 6 of *NPC1* [9]; rs10938397 near *GNPDA2* [7] and rs1421085 in intron 1 of *FTO* [10].

We identified a significant contribution of *GNPDA2* rs10938397 to risk of obesity (G risk allele [in European populations]; odds ratio_{95% confidence interval}: [OR] = 1.30_[1.11;1.53]; $P = 1.34 \times 10^{-3}$; Table 2). Furthermore, we found nominal association between risk of obesity and both *ENPP1* rs7754561 (G risk allele; OR = 0.84_[0.72;0.97]; $P = 0.020$; Table 2) and *MC4R* rs17782313 (C risk allele; OR = 1.40_[1.06;1.83]; $P = 0.016$; Table 2). This last *MC4R* SNP also showed a nominal effect on BMI (C risk allele; $\beta_{\text{standard error}} = 0.41_{[0.16]}$ kg/m²; $P = 0.012$; Table 3). Moreover, we identified a nominal association between *NEGR1* rs2815752 and BMI (A risk allele; $\beta =$

Table 2 Association between SNPs *MC4R* rs17782313, *NEGR1* rs2815752, *ENPP1* rs7754561, *NPC1* rs1805081, *GNPDA2* rs10938397 and *FTO* rs1421085, and obesity in Mexican children

Locus	SNP	RA*	Cases/ Controls	N	RAF (%)	OR [95% CI]	P
<i>NEGR1</i>	rs2815752	A	Lean children	949	74.4	-	-
			Obese children	514	77.6	1.18 [0.99;1.41]	0.068
<i>NPC1</i>	rs1805081	A	Lean children	949	74.6	-	-
			Obese children	514	74.2	1.02 [0.85;1.21]	0.845
<i>ENPP1</i>	rs7754561	G	Lean children	949	48.6	-	-
			Obese children	514	44.2	0.84 [0.72;0.97]	0.020
<i>MC4R</i>	rs17782313	C	Lean children	949	7.3	-	-
			Obese children	514	9.8	1.40 [1.06;1.83]	0.016
<i>GNPDA2</i>	rs10938397	G	Lean children	949	32.2	-	-
			Obese children	514	38.0	1.30 [1.11;1.53]	1.34 × 10⁻³
<i>FTO</i>	rs1421085	C	Lean children	949	19.1	-	-
			Obese children	514	21.1	1.13 [0.93;1.38]	0.228

*We noted the risk-alleles reported in European populations.
 RA, risk-allele; RAF, risk-allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval; P, P-value.

Table 3 Association between SNPs *MC4R* rs17782313, *NEGR1* rs2815752, *ENPP1* rs7754561, *NPC1* rs1805081, *GNPDA2* rs10938397 and *FTO* rs1421085, and metabolic quantitative traits in 1,171 nonobese Mexican children

Locus SNP RA*	BMI		Fasting serum insulin		Fasting plasma glucose		Total cholesterol		Triglycerides	
	β (SE)	P	β (SE)	P	β (SE)	P	β (SE)	P	β (SE)	P
<i>NEGR1</i> rs2815752 A	0.24 (0.10)	0.019	0.01 (0.03)	0.611	0.07 (0.07)	0.353	2.14 (1.44)	0.139	0.01 (0.02)	0.425
<i>NPC1</i> rs1805081 A	-0.16 (0.11)	0.126	-0.10 (0.03)	1.21 × 10⁻³	-0.08 (0.07)	0.278	2.22 (1.52)	0.144	-0.003 (0.02)	0.884
<i>ENPP1</i> rs7754561 G	-0.11 (0.09)	0.209	0.004 (0.03)	0.873	0.01 (0.06)	0.965	2.20 (1.29)	0.087	0.004 (0.02)	0.827
<i>MC4R</i> rs17782313 C	0.41 (0.16)	0.012	0.04 (0.03)	0.362	0.36 (0.11)	1.47 × 10⁻³	2.71 (2.34)	0.247	0.02 (0.03)	0.410
<i>GNPDA2</i> rs10938397 G	0.10 (0.10)	0.288	0.04 (0.03)	0.126	0.10 (0.07)	0.132	1.90 (1.40)	0.176	0.03 (0.02)	0.076
<i>FTO</i> rs1421085 C	-0.17 (0.12)	0.171	-0.06 (0.04)	0.064	-0.14 (0.09)	0.111	3.70 (1.72)	0.032	0.006 (0.02)	0.778

Data for fasting serum insulin and triglycerides were logarithmically transformed before statistical analysis. Units are: BMI in kg/m², fasting serum insulin in μ U/mL, fasting plasma glucose in mmol/L, total cholesterol in mg/dL, and triglycerides in mg/dL.

*We noted the risk-alleles reported in European populations.

RA, risk-allele; SE, standard error; β , effect-size; P, P-value; BMI, body mass index.

0.24_(0.10) kg/m²; $P = 0.019$; Table 3). Of note, we did not find any significant association between risk of obesity (or BMI variation) and either *NPC1* rs2815752 or *FTO* rs1421085 (Tables 2 and Table 3).

In our study of quantitative traits, we found a significant association between *NPC1* rs1805081 and fasting serum insulin levels (A risk allele; $\beta = -0.10_{(0.03)}$ μ U/mL; $P = 1.21 \times 10^{-3}$; Table 3). We also identified an effect of the obesity risk allele of *MC4R* rs17782313 on increased fasting plasma glucose levels (C risk allele; $\beta = 0.36_{(0.11)}$ mmol/L; $P = 1.47 \times 10^{-3}$; Table 3). A trend of association was found between *FTO* rs1421085 and both total cholesterol levels (C risk allele; $\beta = 3.70_{(1.72)}$ mg/dL; $P = 0.032$; Table 3) and fasting serum insulin levels (C risk allele; $\beta = -0.06_{(0.04)}$ μ U/mL; $P = 0.064$; Table 3).

Discussion

From our study based on obese and nonobese Mexican children, we found a significant contribution of the minor allele of *GNPDA2* rs10938397 to increased risk of obesity. The association between *GNPDA2* and BMI had firstly been identified in a meta-analysis of several European GWASs performed by the GIANT consortium [7]. Subsequently, the association signal has been confirmed in other populations: in adults from East-Asia [18,19] and in Chinese children [20]. To our knowledge, the present study is the first confirmation of the *GNPDA2* association signal with risk of obesity in the Mexican population.

Furthermore, we found nominal associations between risk of obesity or BMI and the following SNPs: *ENPP1* rs7754561, *MC4R* rs17782313 and *NEGR1* rs2815752.

Of note, the risk alleles for obesity or increased BMI were the same between Europeans and Mexicans, except for the risk allele of *ENPP1* rs7754561 (in Europeans) that showed a protective effect in Mexicans. Although the association between both *MC4R* and *NEGR1* and risk of obesity has been confirmed in a plethora of studies and populations, the *ENPP1* association signal with obesity is more controversial [21]. To our knowledge, no other studies demonstrate a protective role of the risk allele of *ENPP1* rs7754561. Recently, it has been shown that *ENPP1* overexpression in human adipocyte cell lines resulted in defective adipocyte maturation [22]. If confirmed in other Mexican populations, the protective effect of the *ENPP1* variant may be due to a loss-of-function of the protein.

We did not find any significant contribution of either *NPC1* rs2815752 or *FTO* rs1421085 to obesity or BMI variation. Therefore, the *FTO* association signal with obesity which was found in Mexican adults by Villalobos-Comparán and colleagues [23], was not confirmed in children. Thus, the obesogenic effect of *FTO* would occur later in the Mexican population than in the Europeans [9], but as we lack some statistical power, additional genetic studies on Mexican children would be needed.

Importantly, we identified a significant effect of the risk allele of *NPC1* rs1805081 on decreased fasting serum insulin levels. *NPC1* encodes Niemann Pick disease type C1 protein that mediates intracellular cholesterol trafficking via binding of cholesterol to its N-terminal domain. Very recently, Jelinek and colleagues have reported that *Npc1* haploinsufficiency developed

abnormal metabolic features (including hyperinsulinemia) and increased susceptibility to weight gain in mice [24]. We could suspect that the variant may have a gain-of-function effect in Mexican children. Of note, we did not report any association between the *NPC1* variant and obesity or BMI variation, and this association signal remains quite controversial according to population studies [20,25,26].

Furthermore, we identified an effect of the risk allele of *MC4R* variant and increased fasting plasma glucose levels. To our knowledge, no previous study has shown this association. However, two recent large meta-analyses of GWAS identified a significant association between the *MC4R* locus and type 2 diabetes risk, in European and Asian populations [27,28]. Of note, our present association with fasting plasma glucose levels remained significant after adjustment for BMI (data not shown). Altogether, these findings would suggest a potential effect of *MC4R* polymorphisms on decreased pancreatic beta-cell function.

Conclusion

In summary, in our sample of Mexican children, we replicated four European obesity-related genes (*GNPDA2*, and nominally, *NEGR1*, *MC4R* and *ENPP1*) in the same direction of effect as previous findings, except for *ENPP1*. Interestingly, we found two novel association signals: between *NPC1* variant and fasting serum insulin levels, and between *MC4R* variant and fasting plasma glucose levels. These findings should deserve some confirmatory studies in other Mexican populations.

It is noteworthy that these well established genetic associations with obesity explain very little of the genetic risk for pediatric phenotype, suggesting the existence of additional loci whose number and effect size remain unknown, which guarantee intense additional investigations in the near future.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Expected statistical power for reaching an odds ratio of 1.25 in the present obesity case-control study ($N_{\text{cases}} = 514$, $N_{\text{controls}} = 949$).

Abbreviations

β : Effect size; BMI: Body mass index; CI: Confidence interval; GWAS: Genome-wide association study; HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance; OR: Odds ratio; P: P-value; pc: Percentile; RA: Risk allele; RAf: Risk allele frequency; SE: Standard error; SNP: Single nucleotide polymorphism.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Authors' contributions

AMB performed the genotyping, and contributed to statistical analyses and the writing of the paper. All wrote the paper. DM, JGM, PC and MC revised the paper and contributed to discussions. LY and AB performed the statistical

analyses. AMR, MRC, CA, EC, EP, JBA, MRS, JPR, SFH, JGM and MC contributed to recruitment and clinical data of the Mexican children. All the authors approved the final version of the submitted draft.

Acknowledgements

We are sincerely indebted to all participants of the present study. The study was supported by the EU funded EUROCHIP 197 consortium (European Obesity Consortium studying the Hypothalamus and its interaction with the Periphery). We also thank the IMSS Foundation A.C., the Gonzalo Ro Azeiteo Foundation (A.P. and Orvestas). The project was supported by CONACYT SALUD 2005-C02-14432, and Proyectos Prioritarios F15/055/99/019/011. M.C. is a recipient of an IMSS Foundation Scholarship. Mexico A. M.-B. was supported in part by Fellowship 233834 by CONACYT and by Orvestav.

Author details

¹Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico. ²Community Health Research Department, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ministry of Health (SSA), Mexico City, Mexico. ³CNRS UMR8199, Ulsé Pasteur Institute, Ulsé, France. ⁴Ulsé Nord de France University, Ulsé, France. ⁵Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics, Michael DeGroote Centre for Learning & Discovery, McMaster University, Hamilton, Canada. ⁶Faculty of Medicine, University of San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico. ⁷Medical Science Department, University of Guanajuato, Guanajuato, Mexico. ⁸Medical Research Unit in Biochemistry, UMAE Bernardo Sepúlveda, IMSS, Mexico City, Mexico. ⁹Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, UK. ¹⁰Present address: Inserm-U695, Paris 7 University, Paris, France.

Received: 26 July 2012 Accepted: 29 January 2013

Published: 1 February 2013

References

1. Olsh A, Rivera J, Sharratt T, Rojas R, Wilgardo S, Hernández M, Sepúlveda J: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, Mexico City, Mexico Instituto Nacional de Salud Pública; 2006.
2. Arici A: Does overweight in childhood have an impact on adult health? *Nutr Rev* 2005, 63(4):139-142.
3. Allison DB, Kaprio J, Kozlowski M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K: The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996, 20(6):501-508.
4. Bonaldi E, Koch S, Willett J, Oberholzer J, Egger G, Trajter G, Albrichter M, Borudonno PC, Muggen M: Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes* 1998, 47(10):1645-1649.
5. Spillner EK, Willet CJ, Berndt SJ, Mondul RL, Thornton G, Jackson AL, Allen HL, Lindgren CM, Luu J, Vogli R, et al: Association analyses of 248,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2011, 43(11):917-948.
6. Loos RE, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao ZH, Prokopenko I, Menni M, Freathy RA, Attwood AP, Beckers M, et al: Common variants near *MC4R* are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 2008, 40(6):68-75.
7. Willet CJ, Spillner EK, Loos RE, Li S, Lindgren CM, Heid IM, Berndt SJ, Elliott AL, Jackson AL, Lamina C, et al: Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 2009, 41(1):25-34.
8. Meyer D, Bouvard-Ribeil N, Soukris A, Semson C, Lecroq C, Vain V, Ghassani M, Wachter C, Herberg S, Chagnon G, et al: Variants of *ENPP1* are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat Genet* 2005, 37(8):863-867.
9. Meyer D, Delplanque J, Cheser JC, Lecroq C, Lobizzo S, Gellera S, Durand E, Vain V, Degraeve F, Ponnica C, et al: Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet* 2009, 41(2):157-158.
10. Froyling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rouzet NN, et al: A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007, 316(5835):889-894.

11. Dina C, Meyre D, Sarnon C, Tichet J, Matt M, Jouret B, Charles MA, Balkau B, Froguel P: **Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity"**. *Science* 2007, **315**:585B-587. [author reply 187](#)
12. Roségref D, Bombard A, Riembach C, Schwahn C, Kayser A, Kruger A, Tesmann G, Gelsler I, Kromer HK, Volker H: **Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity"**. *Science* 2007, **315**:585B:187. [author reply 187](#)
13. Lyon HN, Eriksson V, Finney A, Frid M, Lasky-Su J, Zhu X, Thorkildsen G, Gunnarsdottir S, Walters GB, Thorsteinsdottir U, et al: **The association of a SNP upstream of *IRS1G2* with body mass index is reproduced in several but not all cohorts**. *PLoS Genet* 2007, **3**:e1461.
14. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal DM, Mei Z, Weir CJ, Curtin LR, Flegal AF, Johnson CL: **CDC Growth Charts for the United States: methods and development**. *Vital Health Stat* 11 2000, **2002**:2465-1-190.
15. Barlow SE: **Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report**. *Pediatrics* 2007, **120**(Suppl 4):S164-S192.
16. García-Cuevas B, García-Lacalle C, Jiménez-Lobo C, González-Vergaz A, Cabo Rey C, Alcazar-Villar JA, Diaz-Martinez E: **(The HOMA and QUICKI indexes, and insulin and C-peptide levels in healthy children. Cut off points to identify metabolic syndrome in healthy children)**. *Ann Pediatr (Barc)* 2007, **66**(3):487-490.
17. Juárez-López C, Wunder-Kunder M, Medina-Bravo P, Medelgal-Acosta A, Mesa-Díaz E, Flores-Huerta S: **Insulin resistance and its association with the components of the metabolic syndrome among obese children and adolescents**. *BMC Public Health* 2010, **10**:2318.
18. Cheung CY, Tso AW, Cheung BM, Xu A, Ong KL, Fong CH, Wei NW, Janus ED, Sham PC, Lam KY: **Obesity susceptibility genetic variants identified from recent genome-wide association studies: implications in a Chinese population**. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, **95**(3):1395-1403.
19. Takahashi F, Yamamoto K, Katsuya T, Nabika T, Sugiyama T, Fujiki A, Isono M, Ohnishi K, Fujitani T, Nakashima E, et al: **Association of genetic variants for susceptibility to obesity with type 2 diabetes in Japanese individuals**. *Diabetologia* 2011, **54**(6):1356-1359.
20. Wu L, Ji B, Zhang M, Shen Y, Zhao X, Cheng H, Hou G, Sun D, Oei J, Wang X, et al: **Associations of six single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes with BMI and risk of obesity in Chinese children**. *Diabetes* 2010, **59**(12):2358S-169S.
21. Loos RJ: **Recent progress in the genetics of common obesity**. *Br J Clin Pharmacol* 2009, **68**(3):311-325.
22. Liang J, Fu M, Gockola E, Chubbak M, Altshuler N: **Role of ENPP1 on adipocyte maturation**. *PLoS One* 2007, **2**:e18682.
23. Villalobos-Corpeán M, Torres-Flores-Domínguez M, Torres-Villanueva-Molina M, Rodríguez-Cruz M, García-Llata AC, Robles L, Huertas-Viquez A, Saucedo-Villanueva N, López-Alarcón M, Sánchez-Munoz F, et al: **The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population**. *Obesity (Silver Spring)* 2008, **16**(10):2296-2301.
24. Jébrak D, Mhawed Y, Birk A, Beaud JF, Haddenreich BA, Genot WB: **Npc1 haploinsufficiency promotes weight gain and metabolic features associated with insulin resistance**. *Hum Mol Genet* 2011, **20**(2):317-321.
25. den Hoed M, Luan J, Langenberg C, Cooper C, Sayer AA, Jameson K, Burnett M, Nivinski M, Hingorani AD, Grotzinger A, et al: **Evaluation of common genetic variants identified by GWAS for early onset and morbid obesity in population-based samples**. *Int J Obes (Lond)* 2012, doi:10.1038/sj.ijo.2012.234.
26. Hotta K, Nakamura M, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Kamohara S, Miyazaki N, Kozaki K, Komatsu R, Itoh N, et al: **Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM16, GNPDA2, BDNF, FAIM2 and MC4R in a Japanese population**. *J Hum Genet* 2009, **54**(12):727-731.
27. Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Fennell T, Segre AV, Steinthorsdottir V, Stawbridge RJ, Khan H, Galanter H, Mahajan A, et al: **Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes**. *Nat Genet* 2012, **44**(5):661-669.
28. Ji B, Takeuchi F, Chandak GR, Koo H, Pan HW, Zhou DP, Pan HY, Mi Z: **Common polymorphism near the MC4R gene is associated with type 2 diabetes: data from a meta-analysis of 123,373 individuals**. *Diabetologia* 2012, **55**(10):2060-2066.

doi:10.1186/1471-2350-14-21
Cite this article as: Mejía-Benitez et al.: Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NRG1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Medical Genetics* 2013 **14**:21.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit



Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase *AMY1* gene on obesity risk in Mexican children

María A. Mejía-Benítez · Amélie Bonnefond · Loïc Yengo · Marlène Huyvaert · Aurélie Dechaume · Jesús Peralta-Romero · Miguel Klünder-Klünder · Jaime García Mena · Julia S. El-Sayed Moustafa · Mario Falchi · Miguel Cruz · Philippe Froguel

Received: 14 August 2014 / Accepted: 29 September 2014 / Published online: 14 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Aims/hypothesis Childhood obesity is a major public health problem in Mexico, affecting one in every three children. Genome-wide association studies identified genetic variants associated with childhood obesity, but a large missing heritability remains to be elucidated. We have recently shown a strong association between a highly polymorphic copy number variant encompassing the salivary amylase gene (*AMY1* also known as *AMY1A*) and obesity in European and Asian adults. In the present study, we aimed to evaluate the association between *AMY1* copy number and obesity in Mexican children.

Methods We evaluated the number of *AMY1* copies in 597 Mexican children (293 obese children and 304 normal weight controls) through highly sensitive digital PCR. The effect of *AMY1* copy number on obesity status was assessed using a logistic regression model adjusted for age and sex.

Results We identified a marked effect of *AMY1* copy number on reduced risk of obesity (OR per estimated copy 0.84, with the number of copies ranging from one to 16 in this population; $p=4.25 \times 10^{-6}$). The global association between *AMY1* copy number and reduced risk of obesity seemed to be mostly driven by the contribution of the highest *AMY1* copy number. Strikingly, all children with >10 *AMY1* copies were normal weight controls.

Conclusions/interpretation Salivary amylase initiates the digestion of dietary starch, which is highly consumed in Mexico. Our current study suggests putative benefits of high number of *AMY1* copies (and related production of salivary amylase) on energy metabolism in Mexican children.

Keywords *AMY1* · *AMY1A* · Childhood obesity · Copy number variation · CNV · Digital PCR · Genetics · Mexican children · Salivary amylase

María A. Mejía-Benítez and Amélie Bonnefond contributed equally to this study.

M. A. Mejía-Benítez · J. García Mena
Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

M. A. Mejía-Benítez · A. Bonnefond · L. Yengo · M. Huyvaert · A. Dechaume · P. Froguel
European Genomic Institute for Diabetes (EGID), FR 3508 Lille, France

M. A. Mejía-Benítez · A. Bonnefond (✉) · L. Yengo · M. Huyvaert · A. Dechaume · P. Froguel (✉)
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 8199, Lille Pasteur Institute, 1 rue du Prof Calmette, 59019 Lille Cedex, France
e-mail: amelie@good.ibl.fr
e-mail: froguel@good.ibl.fr

M. A. Mejía-Benítez · A. Bonnefond · L. Yengo · M. Huyvaert · A. Dechaume · P. Froguel
Lille 2 University, Lille, France

J. Peralta-Romero · M. Cruz
Medical Research Unit in Biochemistry, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, Mexico City, Mexico

M. Klünder-Klünder
Community Health Research Department, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ministry of Health (SSA), Mexico City, Mexico

J. S. El-Sayed Moustafa · M. Falchi · P. Froguel
Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, UK

Abbreviations

CNV	Copy number variation
GWAS	Genome-wide association study
NCTs	Non-template controls
SNP	Single nucleotide polymorphism

Introduction

Childhood obesity has become a major public health problem both in westernised and more recently in developing countries [1]. In Mexico, the prevalence of overweight or obesity among children aged between 5 and 11 years has dramatically increased from 26.9% in 2006 to 34.4% in 2012 [2].

Although the epidemic of obesity is attributed mainly to changes in the environment, variations in susceptibility have been attributed to differences in the genetic backgrounds of individuals exposed to similar so-called 'obesogenic' environmental pressures [3]. Indeed, the heritability of BMI has been estimated to range between 40 and 70% [3, 4]. Moreover, at least one in every 20 obese children carries a single mutation (or chromosome abnormality) causing severe impairment in appetite regulation and early-onset overweight [3].

Nevertheless, the vast majority of obese children are thought to have a polygenic form of obesity. Recently, genome-wide association studies (GWAS) have identified >60 frequent single nucleotide polymorphisms (SNPs) that slightly increase BMI [5], and some also increase the risk of early-onset obesity [6–8]. However, <3% of the phenotypic variance in BMI has been explained by these loci [5], suggesting that other forms of DNA variation (including copy number variation [CNV]) may explain this large missing heritability. In this regard, we recently developed a system biology approach for the identification of potential gene-dosage effects, combining transcriptomics and GWAS analyses in sibling-pairs discordant for obesity [9]. This approach enabled the identification of a region mapping of both salivary and pancreatic amylase genes (*AMY1* and *AMY2* [also known as *AMY1A* and *AMY2B*], respectively), which was strongly associated with obesity risk and fat mass [9].

Amylase is responsible for starch hydrolysis, and CNV at this locus (ranging from one to 20 copies for *AMY1*) evolved as an adaptation to dietary habits; populations with high starch consumption carry larger number of copies than others that have maintained an ancestral pre-agriculture way of life [10, 11]. We reported that reduced *AMY1* copy number was associated with increased BMI (change in BMI per copy = 0.15 kg/m²) and obesity risk (OR per copy 1.19) in European and Asian adult populations [9]. Furthermore, *AMY1* copy number was shown to be strongly correlated with the amount of serum amylase [9, 10]. These results provided a presumed genetic link between carbohydrate metabolism and obesity. However, the

contribution of *AMY1* copy number to the risk of childhood obesity remains unknown.

In the present study, we assessed the association between *AMY1* copy number and obesity risk in 597 Mexican children.

Methods

Study participants We analysed 597 Mexican children (293 obese children and 304 normal weight controls) from a cohort population fully described elsewhere [12]. The cases and controls were optimally matched for age and sex (Table 1).

BMI-for-age was calculated and classified according to the 2000 Centers for Disease Control and Prevention growth charts [13]. Normal weight was defined as a BMI-for-age below the 85th percentile, while obesity was defined as a BMI-for-age above the 95th percentile [13]. No information on the pubertal status of the children was available.

Child assent was obtained and parents (or legal guardian) provided written informed consent. The study was approved by the local ethics committees of the Mexican National Health Service ('Instituto Mexicano del Seguro Social', reference number 2011-000-079) and was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki.

Digital PCR Digital PCR analysis was performed on the BioMark System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) using the qdPCR 37K Digital Array (Fluidigm) according to manufacturer's recommendations. This digital array consists of 48 panels, each containing 770 individual reaction chambers. The final reaction mix for a digital panel comprised 7.2 ng DNA (DNA concentration was measured using the Qubit dsDNA HS Assay kit [Life Technologies, Carlsbad, CA, USA]), 2 µl TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 0.4 µl 20× GE Sample Loading Reagent (Fluidigm), 0.2 µl *AMY1* TaqMan assay (Hs07226362_cnc; Life Technologies) and 0.2 µl *RNase P* human TaqMan Copy Number Reference (Life Technologies). A total of 10 µl of 1× GE Sample Loading Reagent (Fluidigm) with 4 µl sample mix were aliquoted separately into inlet on the digital array and were distributed throughout the partitions within each panel using an automated IFC controller-MX (Fluidigm). Each DNA sample was loaded in quadruplicate, with single

Table 1 Clinical characteristics of the study participants

Characteristics	Obese cases	Normal weight controls	<i>p</i>
<i>n</i> (male/female)	293 (165/128)	304 (165/139)	0.62
Age (years)	9.5±1.7	9.5±1.8	0.88
Height (cm)	140.0±11.6	133.3±11.5	<0.001
Weight (kg)	50.2±12.9	29.9±7.6	<0.001

Data are mean ± SD

replicate outliers removed. When the estimated copy number of *AMY1* was above 10, the amount of DNA was reduced to 5.4 ng (in the final reaction mix) so as to avoid panel saturation. These DNA samples (with *AMY1* copy number ≥ 10) were finally re-loaded in octuplicate, with single replicate outliers removed. When we observed more than two outliers within the quadruplicate or octuplicate, the digital PCR for those samples was performed again. Outliers were defined as follows: (1) difference in estimated copies of *AMY1* ≥ 2 ; (2) detection of >600 positive chambers for *AMY1*; and/or (3) detection of <50 positive chambers for *RNase P*.

Of note, 11 non-template controls (NTCs) were analysed (using reaction mix with no template DNA). We did not detect any positive chambers in these NTCs.

We and others previously demonstrated that microfluidic digital PCR was a sensitive method to measure highly polymorphic CNVs [9, 14].

Statistical analyses The median of *AMY1* copy number distribution amounted to six copies. In order to have 50% of individuals (cases and controls) in the lower half and 50% of individuals (cases and controls) in the upper half, we randomly ranked individuals with six copies and assigned some of them to the lower half and the others to the upper half.

The effect of *AMY1* copy number on obesity status was assessed using logistic regression adjusted for age and sex, under an additive model. We have not adjusted for population stratification. Mexicans are a mixture of Native American, European and African ancestry. Thus, further work would be needed to confirm that the association is not partly confounded. However, the adjustment for the different states of residence of cases and controls (i.e. San Luis Potosí, Querétaro, Tijuana, Guanajuato and Mexico city) did not change (even slightly) the present results (data not shown).

The statistical analyses were performed with SPSS (version 14.0, IBM, Armonk, NY, USA) and R (version 3.0, www.r-project.org).

Results

In the 597 Mexican children investigated (including 304 normal weight controls and 293 obese cases), the estimated number of copies of *AMY1* ranged from one to 16 (Fig. 1).

Using a logistic regression model adjusted for age and sex, we found a strong association between *AMY1* copy number and reduced risk of obesity (OR per estimated copy 0.84 [95% CI 0.78, 0.91] having in mind that the number of copies ranges from one to 16 in this population; $p=4.25 \times 10^{-6}$ [Fig. 1; Table 2]). The mean number of copies of *AMY1* was 6.1 ± 1.9 in cases compared with 7.0 ± 2.7 in controls (Table 2).

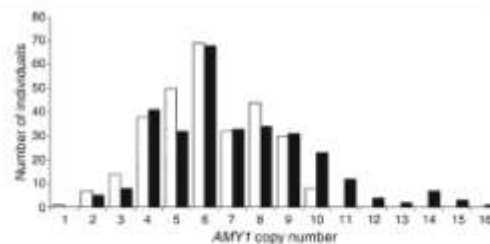


Fig. 1 Distribution of *AMY1* copy number in 597 Mexican children, including 304 normal weight controls (black bars) and 293 obese cases (white bars)

Subsequently, we wondered whether or not the significant effect of *AMY1* copy number on obesity was homogeneous throughout the distribution of *AMY1* copy number within the study group. The mean number of copies of *AMY1* was lower in obese cases than in normal weight controls in the lower or upper half of *AMY1* copy number distribution (4.6 ± 1.1 vs 5.0 ± 1.1 , 7.6 ± 1.2 vs 9.1 ± 2.1 , respectively [Table 2]). However, using a logistic regression model adjusted for age and sex, we found that the contribution of *AMY1* copy number to obesity was much stronger in the upper half of *AMY1* copy number distribution than in the lower half (OR per estimated copy 0.54 [95% CI 0.44, 0.65]; $p=3.91 \times 10^{-10}$ vs OR per estimated copy 0.76 [95% CI 0.62, 0.94]; $p=0.0122$, respectively [Table 2]). Furthermore, all participants with >10 copies of *AMY1* ($n=29$ [Fig. 1]) were normal weight controls. These results suggest that the global association between *AMY1* copy number and reduced risk of obesity might be mostly driven by the contribution of the highest *AMY1* copy number in these Mexican children.

Discussion

In the present study, we confirmed the marked contribution of *AMY1* copy number to reduced obesity risk (OR per estimated copy 0.84). Of note, this effect was similar between the Mexican children included in the current study and our previous meta-analysis that included 2,929 adults of European or Asian origin (593 cases and 2,336 controls) [9]. However, in the present study, we found that the global effect of *AMY1* copy number on reduced obesity risk may be largely driven by the marked contribution of the highest number of *AMY1* copies to obesity risk. While we did not find a significant effect of lower *AMY1* copy number on childhood obesity risk, the highest *AMY1* copy number seems to strongly protect against obesity in Mexican children.

Salivary amylase is a monomeric calcium-binding enzyme produced by the salivary glands that catalyses the initial digestion of dietary starch, which represents 50% of the total

Table 2 Effect of *AMY1* copy number on obesity risk in the total number of cases and controls, and in the individuals with *AMY1* copy number above or below the median of *AMY1* copy number distribution (which amounted to six copies)

Distribution of <i>AMY1</i> CN	Cases		Controls		OR _{per copy} (95% CI) ^a	p
	n	<i>AMY1</i> CN	n	<i>AMY1</i> CN		
CN ≤6	146	4.6±1.1	152	5.0±1.1	0.76 (0.62, 0.94)	0.0122
CN ≥6	147	7.6±1.2	152	9.1±2.1	0.54 (0.44, 0.65)	3.91 × 10 ⁻³⁰
Total	293	6.1±1.9	304	7.0±2.7	0.84 (0.78, 0.91)	4.25 × 10 ⁻⁶

Data are means ± SD

^aOR per *AMY1* copy from a logistic regression adjusted for age and sex, under an additive model
CN, copy number

carbohydrate content of the US diet [15]. Importantly, Perry et al demonstrated that populations with starchy food resources carried, on average, more *AMY1* copies than those with traditional diets with few starchy foods (6.7±2.3 vs 5.4±2.0, respectively) [10]. The Mexican population has a diet rich in various starchy foods (comprising maize, wheat and different varieties of common bean) [16]. In Mexico, the daily consumption of corn tortilla has been estimated at approximately 325 g, supplying 70% of the calories and half of the proteins, and the available starch content in the tortilla has been estimated to be 63–73% following processing conditions (compared with 80% for white bread) [17]. It was proposed that higher amount of salivary amylase (which correlate with greater numbers of *AMY1* copies) confers a fitness advantage for individuals consuming a highly starchy diet by improving digestion in the oral cavity, stomach and intestines [10].

A growing body of research from the pharmaceutical industry has focused on products that slow the absorption of carbohydrates (which is the greatest source of calories in most diets) in an effort to improve glycaemic control and reduce weight [18]. In particular, a recent clinical study showed that the use of an inhibitor of salivary amylase (extracted from common white bean) was associated with modest decrease in weight (on average, 2.9 kg in 12 weeks) [19], which seems to be in contradiction with the findings of our study. However, it is noteworthy that the expression of *AMY1* is not restricted to salivary glands. We previously showed a high *AMY1* expression in adipose tissue [9]. Therefore, salivary amylase may also act beyond nutrient digestion in the mouth. In this respect, a recent mouse genetic linkage study showed that a SNP (rs29982345) close to *Amy1* was significantly associated with weight gain in >100 different strains of mice fed a high-fat, high-sucrose diet [20]. The same SNP showed significant association with an enrichment of the genera *Enterobacteriaceae* in the gut microbiota of the mice [20], which was reported to be correlated with obesity in humans [21]. Therefore, salivary amylase may contribute to modulation of the gastrointestinal tract function in a way that remains to be fully explored.

Recently, a study has demonstrated that non-obese adults with high salivary amylase activity (and high *AMY1* copies) presented with improved glycaemic control following liquid starch ingestion (and not after oral glucose load) [22]. The findings from that study along with our results suggest the putative benefits of carrying a higher number of *AMY1* copies and of the highly related production of salivary amylase on glucose and energy metabolism, in particular in populations like Mexicans with a diet rich in starch.

Acknowledgements We are sincerely indebted to all participants of the present study.

Duality of interest The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Contribution statement MAMB contributed to acquisition of data and to writing the manuscript. All designed the study, performed the statistical analyses and wrote the manuscript. LY performed the statistical analyses and contributed to the discussion. MH and AD contributed to acquisition of data and reviewed/edited the manuscript. JGM, JPR and MKK reviewed/edited the manuscript and contributed to acquisition of data. JSESM and MF contributed to interpretation of data and reviewed/edited the manuscript. MC contributed to acquisition of data and reviewed/edited the manuscript. PF designed the study, wrote the manuscript and is the guarantor of this work. All the authors approved the final version of the submitted draft.

Funding The study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). MAMB was supported by CONACyT Fellowship #233834 and by Cirvestar.

References

1. Waters E, de Silva-Sanigorski A, Hall BJ et al (2011) Interventions for preventing obesity in children. *Cochrane Database Syst Rev*, Issue 12, Art no. CD001871
2. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012) Resultados Nacionales. Inst Nac Salud Pública. <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
3. El-Sayed Moustafa JS, Froguel P (2013) From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nat Rev Endocrinol* 9:402–413