



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE RIESGO PARA
DIABETES TIPO 2 Y DISTINTAS COMORBILIDADES EN LA POBLACIÓN
MEXICANA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MARCO ALBERTO GAMBOA MELÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO DEL INNSZ

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE RIESGO PARA DIABETES TIPO 2 Y DISTINTAS COMORBILIDADES EN LA POBLACIÓN MEXICANA.

Esta tesis doctoral se realizó en la Unidad Periférica de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), cuya sede se encuentra en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), bajo la tutoría de la Dra. María Teresa Tusié Luna.

Este proyecto de investigación contó con el apoyo de CONACYT (40400M, 14495) y DGAPA-UNAM (IN227007). Durante el proceso del trabajo de la tesis doctoral se contó con la beca de CONACYT con número de CVU 100428.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

- Dra. María Teresa Tusié Luna, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.
- Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.
- Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas, Departamento de Endocrinología y Metabolismo del INCMNSZ.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Secretario: Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

Vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón

Vocal: Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Vocal: Dr. Gabriel Manjarrez Gutiérrez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Posgrado de Ciencias Biomédicas por ser parte de esta gran institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo que me dio a través de una beca de Doctorado.

A la Dra. María Teresa Tusié Luna por sus comentarios y su apoyo como tutora en toda mi estadía en su laboratorio.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt y al Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas por sus comentarios y sugerencias durante todo el Doctorado en su papel de asesores del comité tutorial.

A la Dra. Hortensia Moreno Macías por su apoyo y la gran contribución hecha a este trabajo de investigación.

A Maribel Rodríguez Torres, Salvador Ramírez Jiménez, Laura Riba, Rosario Rodríguez Guillen y María Luisa Ordoñez Sánchez por su apoyo técnico.

A María Teresa Guerra García por su amistad y el intercambio de ideas.

A todos los miembros de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica.

A las personas que participaron en este estudio, sin ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo de investigación.

A mi Jurado de Examen de Grado, por su tiempo y comentarios en la revisión de esta tesis doctoral.

TLAZOCAMATI

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES[†] CONSTRUCTORES DE MI VIDA Y EDUCACIÓN

A MI ESPOSA ERICKA POR SU AMOR INCONDICIONAL, GRAN APOYO Y LA CONSTRUCCIÓN DE NUESTRA FAMILIA

A MIS HERMANDOS POR SU APOYO EN MI DESARROLLO ACADÉMICO Y ESTAR SIEMPRE EN MI VIDA

A LA FAMILIA IZETA MAYORGA POR INTEGRARME A ELLOS

A TODOS MIS AMIGOS POR SU AMISTAD INCONDICIONAL Y ENTRAÑABLE

A TODOS, TLAZOCAMATI

El secreto de la sabiduría, del poder y del conocimiento es la humildad.

Ernest Hemingway

La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia.

Sócrates

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton

¿Es que en verdad se vive aquí en la tierra?

¡No para siempre aquí!

Un momento en la tierra,

si es de jade se hace astillas,

si es de oro se destruye,

si es plumaje de ketzalli se rasga,

¡No para siempre aquí!

Un momento en la tierra.

Nezahualcóyotl

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	RESEÑA HISTÓRICA.....	1
1.2	EPIDEMIOLOGÍA.....	2
1.2.1	Diabetes de Inicio Temprano.....	4
1.3	DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS.....	4
1.3.1	Diabetes Tipo 1 (DT1).....	5
1.3.2	Diabetes Tipo 2 (DT2).....	5
1.3.3	Diabetes tipo MODY.....	5
1.3.4	Diabetes Neonatal.....	5
1.3.5	Diabetes Gestacional.....	5
1.4	CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES.....	6
II.	BASES MOLECULARES Y FISIOLÓGICAS DE LA SECRECIÓN Y ACCIÓN DE LA INSULINA	7
2.1	HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA: PAPEL DE LA INSULINA.....	7
2.2	BIOSÍNTESIS DE LA INSULINA.....	7
2.3	SECRECIÓN DE INSULINA.....	8
2.4	ACCIÓN DE LA INSULINA.....	9
2.4.1	Vía de señalización de la PI3K.....	11
2.4.2	Vía de señalización de las MAP cinasas.....	11
2.4.3	Vía de señalización Cbl-CAP.....	13
III.	FISIOPATOLOGÍA DE LA DT2.....	14
3.1	RESISTENCIA A LA INSULINA.....	14
3.1.1	Resistencia a la Insulina: El Papel de la Obesidad e Inflamación.....	16
3.2	DISFUNCIÓN DE LA CÉLULA BETA DEL PÁNCREAS.....	19
3.2.1	Estrés del Retículo Endoplásmico.....	19
3.2.2	Glucolipototoxicidad.....	19
3.2.3	Lipotoxicidad Mediada por Colesterol.....	21
IV.	BASES GENÉTICAS DE LA DIABETES TIPO 2.....	22
4.1	ANTECEDENTES.....	22
4.2	ANÁLISIS DE LIGAMIENTO.....	23
4.3	GENES CANDIDATO.....	24
4.4	ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS).....	25
4.5	LIPOTOXICIDAD MEDIADA POR COLESTEROL: GENES INVOLUCRADOS.....	29
V.	PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	32

5.1 JUSTIFICACIÓN.....	32
5.2 HIPOTESIS.....	32
5.3 OBJETIVOS.....	33
5.3.1 Objetivo General.	33
5.3.2 Objetivos Específicos.	33
5.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
VI. METODOLOGÍA.....	35
6.1 DEFINICIONES.....	35
6.2 DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	35
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	36
6.4 EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS METABÓLICOS.....	36
6.5 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO Y GENOTIPIFICACIÓN.....	36
6.6 DISEÑO DE OLIGOS Y PCR DE PUNTO FINAL.....	37
6.7 SECUENCIACIÓN DIRECTA.....	37
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
VII. RESULTADOS.....	40
7.1 EVALUACIÓN DE VARIANTES COMUNES DESCRITAS EN OTRAS POBLACIONES.....	42
7.1.1 Distribución de las frecuencias alélicas de los SNPs evaluados.	42
7.1.2 Análisis de asociación al rasgo de DT2 y el efecto de la estratificación de la población.	42
7.1.3 Análisis de Asociación con DT2 en subgrupos con distintos fenotipos.	46
7.1.4 Análisis de asociación con rasgos cuantitativos y con obesidad.	47
7.1.5 Evaluación del Efecto Acumulado de los SNPs Estudiados.....	47
7.2 BÚSQUEDA DIRIGIDA DE VARIANTES EN GENES RELACIONADOS A LA LIPOTOXICIDAD.....	48
7.2.1 Secuenciación del Gen Candidato LXR- β	48
7.2.2 Análisis de Asociación de las Variantes de Interés de los Genes Candidato.....	50
VIII. DISCUSIÓN.....	53
8.1 EVALUACIÓN DE VARIANTES COMUNES DESCRITAS EN OTRAS POBLACIONES.....	53
8.2 VARIANTES EN GENES RELACIONADOS A LA LIPOTOXICIDAD.....	58
IX. CONCLUSIONES.....	61
X. PERSPECTIVAS.....	62
XI. REFERENCIAS.....	63
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Criterios para el Diagnóstico de la DM (ADA)</i>	6
<i>Tabla 2. Características generales de la población de estudio y de la estratificación por edad de inicio de la DT2.</i>	40
<i>Tabla 3. Características generales de la población de estudio mediante la estratificación por la obesidad.</i>	41
<i>Tabla 4. Distribución de la frecuencia de los alelos de riesgo de los 21 SNPs estudiados en la población Mexicana con sus grupos estratificados, y la comparación con los europeos.</i>	43
<i>Tabla 5. Análisis de asociación con DT2 en la población mexicana y el efecto confusor de la ancestría amerindia.</i>	44
<i>Tabla 6. Análisis de asociación con DT2 en la población mestiza mexicana de acuerdo a la edad de inicio de la DT2.</i>	45
<i>Tabla 7. Análisis de asociación con DT2 en la población mestiza mexicana de acuerdo al estado de obesidad.</i>	46
<i>Tabla 8. Comparación de los efectos entre los análisis de asociación reportados en Europeos y los obtenidos en la población mexicana.</i>	48
<i>Tabla 9. Análisis de secuenciación de la región promotora y codificante del gen LXR-β.</i>	50
<i>Tabla 10. Análisis de asociación de la variante rs17373080 del gen LXR-β con DT2.</i>	50
<i>Tabla 11. Análisis de asociación de la variante rs9282541 del gen ABCA1 con DT2, obesidad y HDL.</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Prevalencia nacional de Diabetes Mellitus (DM) en adultos reportada en Encuestas Nacionales de Salud.</i>	3
<i>Figura 2 Fisiología de la célula β del páncreas (secreción de insulina).</i>	8
<i>Figura 3. Acción de la Insulina.</i>	10
<i>Figura 4. Vías de señalización del Receptor de la Insulina.</i>	12
<i>Figura 5. Fisiopatología de la DT2.</i>	15
<i>Figura 6. Mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a la insulina.</i>	18
<i>Figura 7. Factores genéticos y ambientales que participan en el desarrollo de la DT2.</i>	23
<i>Figura 8. Variantes genéticas asociadas con DT2.</i>	28
<i>Figura 9. Electroferograma de la secuencia del exón 4 LXR-β.</i>	49
<i>Figura 10. Electroferograma de la secuencia del exón 6 LXR-β.</i>	49
<i>Figura 11. Electroferograma de la secuencia de la región promotora de LXR-β.</i>	49

ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA Carboxilasa	IRS	Sustrato del Receptor de Insulina
ADA	Asociación Americana de Diabetes	INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	LD	Desequilibrio de ligamiento
ADP	Difosfato de Adenosina	LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
ARN	Ácido Ribonucleico	MAPK	Protein Cinasas Activadas por Mitógenos
ATP	Trifosfato de Adenosina	MODY	Diabetes Monogénica de la Juventud
CTOG	Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa	NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
DM	Diabetes Mellitus	NEFA	Ácidos Grasos no Esterificados
DT1	Diabetes Tipo 1	OMS	Organización Mundial de la Salud
DT2	Diabetes Tipo 2	OR	Razón de Momios
ENSA	Encuesta Nacional de Salud	PAD	Presión Arterial Diastólica
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	PAS	Presión Arterial Sistólica
ERAD	Degradación Asociadas al Retículo Endoplásmico	PDE3B	Fosfodiesterasa 3B
FADH ₂	Flavín Adenín Dinucleótido	PI3K	Fosfoinositol-3-Cinasa
FAS	Ácido Graso Sintasa	PIP ₂	Fosfatidil Inositol Bifosfato
GLUT2	Transportador de Glucosa 2	PIP ₃	Fosfatidil Inositol Trifosfato
GLUT4	Transportador de Glucosa 4	PKB	Proteína Cinasa B
GSIS	Secreción de Insulina Estimulada por la Glucosa	RE	Retículo Endoplásmico
GSK-3	Glucógeno Sintasa Cinasa 3	RI	Receptor de Insulina
GWAS	Estudios de Asociación al Genoma Completo	SM	Síndrome Metabólico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad	SNP	Polimorfismos de un Solo Nucleótido
IMC	Índice de Masa Corporal	SUR1	Receptor 1 de Sulfonilurea
		TCA	Ciclo del Ácido Tricarboxílico
		UPR	Respuesta a Proteínas no Plegadas

RESUMEN

La Diabetes Tipo 2 (DT2) se caracteriza por concentraciones elevadas de glucosa en sangre. Varios estudios han identificado *loci* asociados con DT2 en poblaciones europeas y asiáticas, pero pocas han sido evaluadas en la población mexicana. Este trabajo examinó a 24 variantes genéticas, previamente identificadas en otras poblaciones, si se asociaban con DT2 en la población mexicana. Adicionalmente, examinamos la asociación con DT2 de variantes de genes relacionados con la lipotoxicidad.

24 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) dentro o cerca de 21 genes (*KCNJ11*, *PPARG*, *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/2B*, *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *ARHGEF11*, *JAZF1*, *CDC123/CAMK1D*, *FTO*, *TSPAN8/LGR5*, *KCNQ1*, *THADA*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL* y *RALGPS2*) fueron genotipificados en la población mexicana. Un estudio de asociación caso control se realizó en 990 sujetos normoglucémicos y 1027 pacientes con DT2. Adicionalmente, el gen *LXR beta* fue secuenciado parcialmente en 109 sujetos y en el promotor se encontró el SNP rs17373080. Este SNP y la variante genética R230C del gen *ABCA1* se genotipificaron en toda la población de estudio mediante PCR en Tiempo Real. La estratificación de la población se analizó mediante un panel de 104 marcadores informativos de ancestría.

Los SNPs rs13266634 (*SLC30A8*), rs7923837 (*HHEX*), rs10811661 (*CDKN2A/2B*), rs4402960 (*IGF2BP2*), rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*) y rs2237892 (*KCNQ1*) se asociaron con DT2 en toda la población. Además, rs7754840 (*CDKAL1*) se asoció en el subgrupo de diabéticos no obesos, mientras que rs7903146 (*TCF7L2*) se asoció en el subgrupo de diabéticos de inicio temprano. En los genes relacionados a la lipotoxicidad, la asociación con DT2 se encontró para rs17373080 (*LXR beta*) en los subgrupos de diabéticos no obesos y de diabéticos de inicio temprano. Finalmente la variante genética R230C no se asoció con DT2, pero se asoció con obesidad y niveles bajos de HDL. En este trabajo 9 variantes genéticas se asociaron con DT2 en la población mexicana.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes (T2D) is characterized by high levels of blood glucose. Several studies have identified different T2D susceptibility loci, mainly in European and Asian populations, but few of them have been evaluated in the Mexican population. The aim of this study was to examine the extent to which 24 common genetic variants previously associated with T2D are associated in Mexican population. Additionally, we examined the association with T2D genetic variants present in two genes related to lipotoxicity.

Twenty-four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in or near genes (*KCNJ11*, *PPARG*, *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/2B*, *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *ARHGEF11*, *JAZF1*, *CDC123/CAMK1D*, *FTO*, *TSPAN8/LGR5*, *KCNQ1*, *THADA*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL*, and *RALGPS2*) were genotyped in Mexican population. A case-control association study comprising 1,027 type 2 diabetic individuals and 990 normoglycemic individuals was conducted. In addition, the *LXR beta* gene was partially sequenced in 109 individuals. The genetic variant rs17373080 was found in the promoter. This variant and the R230C variant of the *ABCA1* gene were genotyped in the total population by Real Time PCR. To account for population stratification, a panel of 104 ancestry informative markers was analyzed.

Association to T2D was found for rs13266634 (*SLC30A8*), rs7923837 (*HHEX*), rs10811661 (*CDKN2A/2B*), rs4402960 (*IGF2BP2*), rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*), and rs2237892 (*KCNQ1*). In addition, rs7754840 (*CDKAL1*) was associated in the nonobese type 2 diabetic subgroup, and for rs7903146 (*TCF7L2*), association was observed for early-onset T2D. In lipotoxicity related genes, association to T2D was found for rs17373080 (*LXR beta*) in the early-onset type 2 diabetic and in the non-obese diabetic subgroups. The R230C variant was not associated with T2D. However, an association with low HDL-c levels and with obesity was found. We found the association of nine genetic variants with T2D in Mexican population.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 RESEÑA HISTÓRICA

La Diabetes era ya conocida antes de la era cristiana. En el manuscrito descrito por Ebers, en el siglo XV A. C., se describen síntomas que parecen corresponder a la Diabetes. En el siglo II DC, Arateo de Capadocia, un médico griego residente de Roma, acuñó el término Diabetes que en griego significa Sifón refiriéndose al síntoma más llamativo (la exagerada emisión de la orina). En ese mismo siglo, Galeno se refirió también a esta enfermedad, mientras que en el siglo XI, Avicena habla con precisión de esta afección en su famoso Canon de la Medicina. En 1679 en Oxford, Thomas Willis hizo una descripción magistral de la enfermedad quedando desde entonces reconocida por su sintomatología como entidad clínica. Fue él quien, refiriéndose al sabor dulce de la orina, le dio el nombre de **Diabetes Mellitus** (sabor a miel). Mathew Dobson de Inglaterra informó que los pacientes diabéticos tenían azúcar en la sangre y en la orina, demostrando en 1775, su presencia en la orina. Un año después, Thomas Cawley informó acerca de un páncreas reseco de cálculos en la autopsia de un paciente diabético, publicada en el "London Medical Journal" en 1788. John Rollo, ayudado por William Cruickshank, diseñó en 1797, la primera aproximación racional al tratamiento dietético de la enfermedad, proponiendo una dieta pobre en hidratos de carbono y rica en carne, con complementos a base de antimonio, opio y digital. Con esta dieta anorética Rollo observó que se reducía el azúcar en la sangre y consiguió una mejora de la sintomatología en algunos casos. En 1815, Chevreuil demostró que el azúcar de la sangre se comportaba como el de las uvas (dextrosa o glucosa). De esta forma se fueron confirmando las predicciones de Rollo que decían que en la Diabetes, la excreción de azúcar estaba provocada por un aumento del azúcar en la sangre y que el origen de la diabetes estaba fuera de los riñones.

Los primeros trabajos experimentales relacionados con el metabolismo de los glúcidos fueron realizados por Claude Bernard quien descubrió, en 1848, el glucógeno hepático y provocó la aparición de glucosa en la orina excitando los centros bulbares mediante pinchaduras [1, 2]. En 1869 un joven médico berlinés, Paul Langerhans mientras trabajaba en su tesis doctoral, había observado unos racimos de células pancreáticas bien diferenciadas de las demás y que podían ser separadas de los tejidos de los alrededores. Langerhans se limitó a describir estas células sin entrar a tratar de averiguar cuál era su función. Para 1875 Bouchardat señaló la importancia de la obesidad y de la vida sedentaria en el origen de la diabetes y siguió los puntos esenciales del régimen dietético de Rollo, pero se añadió otro factor: "alentar el trabajo duro", tras observar que el trabajo muscular tenía efectos paliativos sobre la glucosuria y la hiperglucemia. Lancereaux Bouchardat, en su experiencia clínica distinguía al menos 2 tipos diferentes de Diabetes: 1) el tipo grave de las personas más jóvenes que apenas respondían a su régimen y 2) el tipo de las personas mayores y obesas que respondían de forma admirable al tratamiento prescrito basado en la dieta y el ejercicio físico. Esto llevó a Bouchardat a proponer que la forma más grave era de origen pancreático ayudado por las autopsias realizadas [1, 2]. Este y otros trabajos clínicos llevaron a Von Mering y a Mikowski (1889) a operar 2 perros haciendo una pancreotomía completa. En menos de un día los animales presentaron micciones frecuentes y voluminosas, con glucosuria, además demostraron que el páncreas era la glándula de secreción interna. En 1893 Hedon confirma estos resultados y Laguesse destacó las observaciones de

Langerhans y propuso que los grupos de células acinares (denominándolas **islotos de Langerhans**) constituían una glándula secretora dentro del páncreas. Sus ideas fueron continuadas por Jean de Meyer quien denominó "insulina" a la sustancia procedente de los islotos (en latín islote se denomina "insulina") que debía poseer una actividad hipoglucemiante pero que todavía era hipotética [1, 2]. Cabe mencionar que el término hormona fue introducido por Bayliss y Ernest Starling en 1902, para designar un material químico específico elaborado por una glándula sin conducto y vertido a la sangre que se transporta a otras partes del organismo y ejerce efectos sobre tejidos blancos. Ante todas estas evidencias el trabajo experimental se desarrolló en dos direcciones: 1) el estudio minucioso de los islotos donde se describieron diferentes tipos celulares y producción de varias hormonas y 2) la búsqueda de la hormona (insulina) como fármaco potencial. Frederick Banting joven cirujano, John McLeod profesor de fisiología, Charles Best estudiante de posgrado y J. B. Collip químico experto, lograron en 1921 y 1922 aislar la insulina y demostrar su efecto hipoglucemiante reuniendo todos los criterios que debía cumplir una insulina con actividad terapéutica y produjeron el primer preparado de insulina útil y con eficacia constante para el tratamiento de la diabetes humana. Sin embargo, sólo Banting y McLeod recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1923. Finalmente en 1954, Frederick Sanger y sus colaboradores de la Universidad de Cambridge dilucidaron la estructura y secuencia de la insulina, la cual ya ha sido clonada y producida a gran escala a nivel mundial [1, 2].

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La Diabetes Mellitus (DM) es una de las enfermedades crónica-degenerativas más comunes en casi todos los países y el número de personas con esta enfermedad se incrementa debido a que existe un mayor crecimiento de la población, envejecimiento de la misma, mayor urbanización, incremento de la obesidad y la disminución de actividad física [3, 4]. En el año 2000, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que el número de personas con diabetes mellitus a nivel mundial fue de 171 millones, pronosticando que esta cifra se incrementaría a 366 millones para el año 2030. La prevalencia mundial estimada del año 2000 fue de 2.8% y la proyectada para el año 2030 fue de 4.4% y en el año 2005, la OMS reporta que hubo 1.1 millones de muertes atribuidas a la diabetes mellitus en el mundo [4, 5]. Sin embargo, en el año 2010, se publicó otro reporte en donde se estimó que el número de personas con esta enfermedad equivale a 285 millones cuya prevalencia es de 6.4%, la cual es superior a la prevalencia que se estimó para el año 2030 en el reporte del año 2000 (4.4%). El reporte de 2010 proyecta que para el año 2030 habrá un aumento a 439 millones de personas con diabetes cuya prevalencia se estima en 7.7%. La prevalencia regional más alta de la enfermedad en el año 2010 se encuentra en Norteamérica, mientras que el país con mayor prevalencia es Nauru (30.9%), seguido de los Emiratos Árabes Unidos (18.7%) y Arabia Saudita (16.8%). Por su parte, el país que tiene mayor número de adultos con DM es la India (50.8 millones), seguido por China (43.2 millones) y Estados Unidos (26.8 millones) [3]. Además se estimó que el costo económico en salud a nivel global, para la DM alcance los 36 billones de dólares americanos para 2010 y se espera que ascienda a los 490 billones para el año 2030. Globalmente, se ha anticipado que el 12% del gasto en salud, que representa 1330 dólares americanos por persona, sea gastado para esta enfermedad [6].

En México, la DM se ha vuelto una de las enfermedades más importantes. Ya en 1990 alcanzó el cuarto lugar como causa de mortalidad general, pero a partir del año 2000 la diabetes es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres [7]. De acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA), la prevalencia nacional de diabetes mellitus para adultos mayores de 20 años fue de 7.5%, de los cuales el 77.3% ya conocía el diagnóstico y el 22.7% se diagnosticó durante la encuesta [8]. Sin embargo, en el año 2006, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 estimó la prevalencia de DM en 14,4%, lo que representa alrededor de 7.31 millones de adultos con esta enfermedad. La proporción de los diabéticos con diagnóstico previo fue de 7.34%, mientras que los que no se sabían diabéticos y fueron diagnosticados durante la encuesta representaron el 7.07% (Figura 1). Adicionalmente, la DM estuvo más presente en el medio urbano (15.48%) que en el rural (10.39%), mientras que en los hombres fue más prevalente (15.82%) en comparación con las mujeres (13.20%). Además, esta encuesta reveló a través de los niveles de Hemoglobina glucosilada, que solo el 5.29% de la diabéticos previamente diagnosticados llevaron a cabo un buen control glucémico, el 38.4% un control pobre y el 56.2% mostraron un pésimo control de glucosa en sangre, lo cual es muy alarmante [9]. Recientemente, se presentaron resultados preliminares de la ENSANUT 2012 donde la proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes fue de 9.2% superando a lo reportado por la ENSANUT 2006 (7.3%) y la ENSA 2000 (4.6%) (Figura 1). No obstante, es importante señalar que no se cuenta todavía con las cifras de medición de glucosa en la ENSANUT 2012, por lo cual la prevalencia de diabetes será reportada una vez que se cuente con el análisis de laboratorio de los sueros obtenidos de los participantes [10].

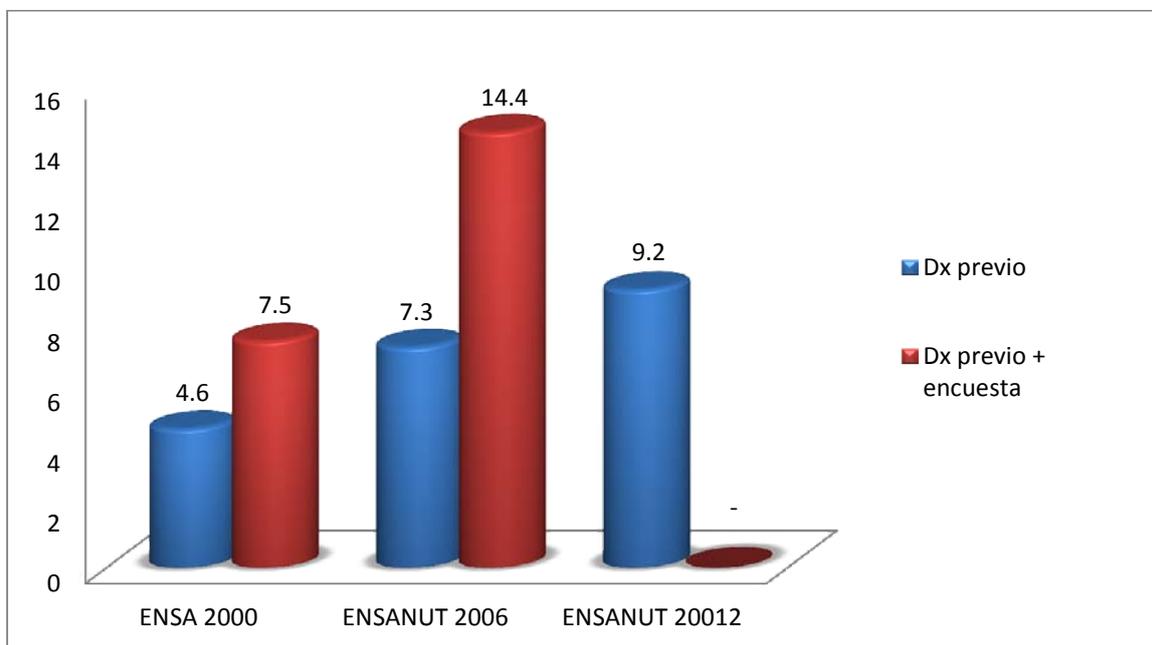


Figura 1 Prevalencia nacional de Diabetes Mellitus (DM) en adultos reportada en Encuestas Nacionales de Salud. Las columnas azules representan la prevalencia de DM con diagnóstico previo a la encuesta. Las barras rojas representan la prevalencia de DM total (prevalencia con diagnóstico previo más la encontrada en la encuesta). No se cuenta con la prevalencia de DM encontrada durante la ENSANUT 2012 por lo cual no se representa la prevalencia total de 2012.

1.2.1 Diabetes de Inicio Temprano.

Estudios epidemiológicos indican un aumento de la DT2 en sujetos jóvenes (menores de 45 años) aun cuando son excluidas las formas monogénicas de esta enfermedad denominadas de tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), la cual se describirá más adelante. Estos pacientes jóvenes podrían presentar una mayor predisposición genética, puesto que la prevalencia de diabetes en los padres fue mayor que en pacientes de mayor edad (inicio tardío). A esta forma de la enfermedad se le ha considerado como *diabetes de inicio temprano* [11-13]. En consecuencia, estos pacientes tienen una mayor exposición a la hiperglucemia y otras anormalidades metabólicas que conllevan al desarrollo más temprano de las complicaciones de la DM [14]. Asimismo, se ha observado que estos diabéticos exhiben una forma más severa de la enfermedad por lo cual requieren tratamiento con insulina en edades más tempranas [15].

En México, existen estudios que abarcan a sujetos diabéticos de inicio temprano (edades entre 20 y 40 años) resumidos en una revisión que muestra las características clínicas, metabólicas y genéticas de estos individuos [16]. En el año 2002, un estudio mostró que el 14% de los diabéticos eran de inicio temprano y tenían menores concentraciones plasmáticas de HDL e hipertrigliceridemia severa que los diabéticos de mayor edad [17]. Además, la ENSANUT 2006 mostró un aumento de la diabetes de inicio temprano puesto que estuvo presente en el 21.5% de los diabéticos, en los cuales se observó además una prevalencia mayor de obesidad e hipertrigliceridemia que en los diagnosticados después de los 40. Recientemente, se publicó un estudio realizado en la Clínica de Diabetes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), observándose que los pacientes con diabetes de inicio temprano constituyen 27.8 % de la población que se atiende en esta institución. Estos pacientes se caracterizan por tener antecedentes familiares de diabetes, 68.8% tenía antecedentes personales de obesidad y la mayoría (66.2%) presentó descontrol glucémico crónico, además de tener complicaciones asociadas a la enfermedad [18].

1.3 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA) la DM es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de la misma o ambos. La hiperglucemia crónica está asociada con la disfunción y fallo en diferentes órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, hígado, corazón y vasos sanguíneos, además de que la hiperglucemia conduce a una susceptibilidad a infecciones. Los síntomas de la hiperglucemia incluyen la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y visión borrosa. Por otro lado, las complicaciones a largo plazo involucran la retinopatía diabética (con pérdida potencial de la visión), nefropatía (conduciendo a un fallo renal), neuropatía periférica (riesgo para úlceras en pies, amputaciones) y neuropatía autonómica (causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares entre otros) [19]. La clasificación de DM según la ADA es la siguiente:

1.3.1 Diabetes Tipo 1 (DT1).

Esta forma de diabetes (anteriormente denominada insulino-dependiente) es inmuno-mediada y representa alrededor del 5-10% de los casos de DM. Es resultado de una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas productoras de insulina, que conlleva a una deficiencia absoluta de insulina, por lo cual el paciente depende de inyecciones de esta hormona para poder sobrevivir. Los marcadores de la destrucción inmune de las células β incluyen autoanticuerpos de las células de los islotes, autoanticuerpo a la insulina, autoanticuerpos a GAD y autoanticuerpos a las fosfatasa de tirosina IA-2 e IA-2 β [19].

1.3.2 Diabetes Tipo 2 (DT2).

Es la forma más común, representando entre el 90% al 95% de los casos de DM (anteriormente denominada no insulino-dependiente). Se presenta en diabéticos que cursan con resistencia a la insulina y generalmente tienen una deficiencia relativa de insulina y no presentan destrucción autoinmune de las células beta del páncreas. La mayoría de estos pacientes son obesos, y la obesidad por sí misma y en algún grado promueve resistencia a la insulina. Esta forma de diabetes frecuentemente no es diagnosticada por muchos años, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente en etapas tempranas y no es lo suficientemente severa para que el paciente se observe cualquiera de los síntomas clásicos de la diabetes. El riesgo de desarrollar esta forma de DM se incrementa con la edad, obesidad y la falta de actividad física, además de estar asociada a una fuerte predisposición genética [19].

1.3.3 Diabetes tipo MODY.

Es una forma que está asociada con defectos monogénicos de la célula β del páncreas. Se caracteriza por hiperglucemia en edades tempranas (antes de los 25 años), debido a un daño en la secreción de insulina con efectos mínimos en su acción. Esta enfermedad está determinada genéticamente puesto que existen mutaciones en 6 diferentes *loci* genéticos con una herencia autosómica dominante. Las formas más comunes de la diabetes tipo MODY están asociadas con mutaciones en el gen que codifica a HNF-1 α , y en el gen de la Glucocinasa. Las formas menos comunes de esta enfermedad se dan debido a mutaciones en genes que codifican los factores de transcripción HNF-4 α , HNF-1 β , IPF-1 y NeuroD1 [19].

1.3.4 Diabetes Neonatal.

Es una forma de diabetes permanente o transitoria que se diagnostica en los primeros 6 meses de vida y no existe presencia de destrucción autoinmune de las células β del páncreas. El defecto genético más común causa una enfermedad transitoria debido a un defecto en *ZAC/HYAMI*, mientras que la diabetes neonatal permanente se debe a un defecto en la codificación del gen *KCNJ11* [19].

1.3.5 Diabetes Gestacional.

Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa de severidad variable que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Aunque la mayoría de los casos se resuelven después del parto, la definición se aplica si la condición persiste o no después del mismo [19].

1.4 CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES

Por décadas el diagnóstico de diabetes se ha basado en los criterios de las concentraciones de glucosa. Para el diagnóstico de la DM (pero no de la Diabetes Gestacional), existen 4 formas de realizarlo de acuerdo a la ADA, y se diagnostica cuando:

1. Los niveles en sangre de la hemoglobina glucosilada (Hb-A1C) es mayor o igual a 6.5%.
2. Los niveles de glucosa sanguínea en ayuno (al menos 8 horas) es mayor o igual a 126 mg/dL (7.0mmol/L).
3. Cuando en la medición a las 2 horas del examen de la Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG), los niveles de glucosa en sangre son mayores a 200mg/dl (11.1mmol/L). Este examen consiste en la administración de 75 gr de glucosa en 375 mL de agua en ayuno realizándose mediciones de glucosa, antes de la administración y a las 2 horas de la misma.
4. El paciente presente los síntomas clásicos de hiperglucemia y los niveles de glucosa (tomados al azar) sean mayores o iguales a 200mg/dL (11.1mmol/L) [19].

La tabla 1 muestra los criterios para el diagnóstico de diabetes, además de los puntos de corte para normoglucemia y la intolerancia a la glucosa.

Tabla 1. Criterios para el Diagnóstico de la DM (ADA)

Diagnóstico	Normoglucemia	Intolerancia a la Glucosa	Diabetes Mellitus
Hemoglobina glucosilada	< 5.7%	5.7-6.4%	≥ 6.5%
Glucosa en ayuno	< 100 mg/dl (5.6 mmol/L)	100 -125 mg/dl (5.6-6.9 mmol/L)	≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L)
CTOG a las 2 horas	< 140 mg/dl (57.8 mmol/L)	140-199 mg/dl (7.8-11.0 mmol/L)	≥ 200mg/dl (11.1 mmol/L)
Glucosa con síntomas de hiperglucemia	< 140 mg/dl (57.8 mmol/L)	140-199 mg/dl (7.8-11.0 mmol/L)	≥ 200mg/dl (11.1 mmol/L)

II. BASES MOLECULARES Y FISIOLÓGICAS DE LA SECRECIÓN Y ACCIÓN DE LA INSULINA

2.1 HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA: PAPEL DE LA INSULINA

La insulina es una hormona anabólica clave que se encarga de regular las concentraciones de glucosa en sangre. El balance existente entre la secreción de la insulina en la célula β y la acción de esta hormona en los tejidos periféricos (principalmente hígado, músculo y tejido adiposo) mantiene dicha regulación. A pesar de que existen periodos de alimentación y de ayuno, las personas sanas mantienen concentraciones de glucosa en sangre (glucemia) dentro de unos límites estrechos, lo cual se debe a la acción de la insulina, que junto con el glucagón, son las hormonas reguladoras encargadas de la normoglucemia [20]. En un individuo sano en ayuno, los niveles de glucosa en sangre, se mantienen dentro de los límites normales (< 100 mg/dL o bien, < 5.6 mmol/L). En el ayuno, la mayor parte de la glucosa es producida por el hígado, y alrededor de la mitad es usada para el metabolismo de la glucosa en el cerebro y la parte restante es usada por varios tejidos principalmente músculo y en menor medida el tejido adiposo. En esta condición de ayuno los niveles de insulina son bajos, mientras que los de la hormona glucagón son altas, esto conduce a que el hígado sea capaz de incrementar cuatro veces o más la síntesis de glucosa. Sin embargo, después de una comida (estado postprandial), la insulina es secretada en grandes cantidades por el páncreas lo cual inhibe la producción de glucosa en hígado y por el contrario se favorecerá la captación de la misma en el músculo y en menor medida por el tejido adiposo [21]. En resumen, el papel de la insulina a nivel metabólico es el siguiente: **a)** Promueve la captación de glucosa en los tejidos periféricos (hígado, músculo y tejido adiposo) e inhibe la síntesis de glucosa en hígado (gluconeogénesis). **b)** Aumenta la síntesis de lípidos (lipogénesis) principalmente los triglicéridos y suprime su degradación (lipólisis). **c)** Aumenta la síntesis de glucógeno a partir de glucosa (glucogénesis) para su almacenamiento en hígado y músculo. **d)** Promueve la síntesis de proteínas principalmente en músculo e hígado.

2.2 BIOSÍNTESIS DE LA INSULINA.

La insulina fisiológicamente activa está compuesta de 51 aminoácidos cuyo peso molecular es 5.8 kDa, sin embargo, el gen de esta hormona codifica una proteína que contiene 110 aminoácidos conocida como **preproinsulina**. Esta proteína contiene un péptido señal hidrofóbico en el lado amino terminal que le sirve para su translocación al lumen del retículo endoplásmico, donde se escinde por una peptidasa originándose la **proinsulina**, que contiene 3 puentes disulfuro [22]. Siguiendo su maduración, la proinsulina es transportada desde el retículo endoplásmico a las vesículas secretorias inmaduras del aparato de Golgi. En este organelo de la célula, la proinsulina se escinde originándose la **insulina activa** y el **péptido C** que finalmente son almacenados en los gránulos de secreción de la insulina maduros [23].

2.3 SECRECIÓN DE INSULINA

El páncreas es el órgano encargado de producir la insulina y las células β de este órgano contienen los llamados islotes de Langerhans donde se secreta dicha hormona. Estas células β son células endocrinas y altamente especializadas que se encargan de la producción, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de la insulina en respuesta a cambios en las concentraciones de nutrientes. Estas células continuamente monitorean la concentración de glucosa en sangre, y ante un aumento de ella, responde con una liberación adecuada de insulina [24]. Estas células endocrinas también responden a muchos nutrientes que circulan en la sangre, incluyendo otros monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos quienes pueden actuar como secretagogos de la insulina. Sin embargo, la glucosa es el sustrato que induce una secreción de insulina más robusta en pocos minutos al inicio del estímulo, el cual se mantiene mientras los niveles en plasma de la glucosa sean elevados [25].

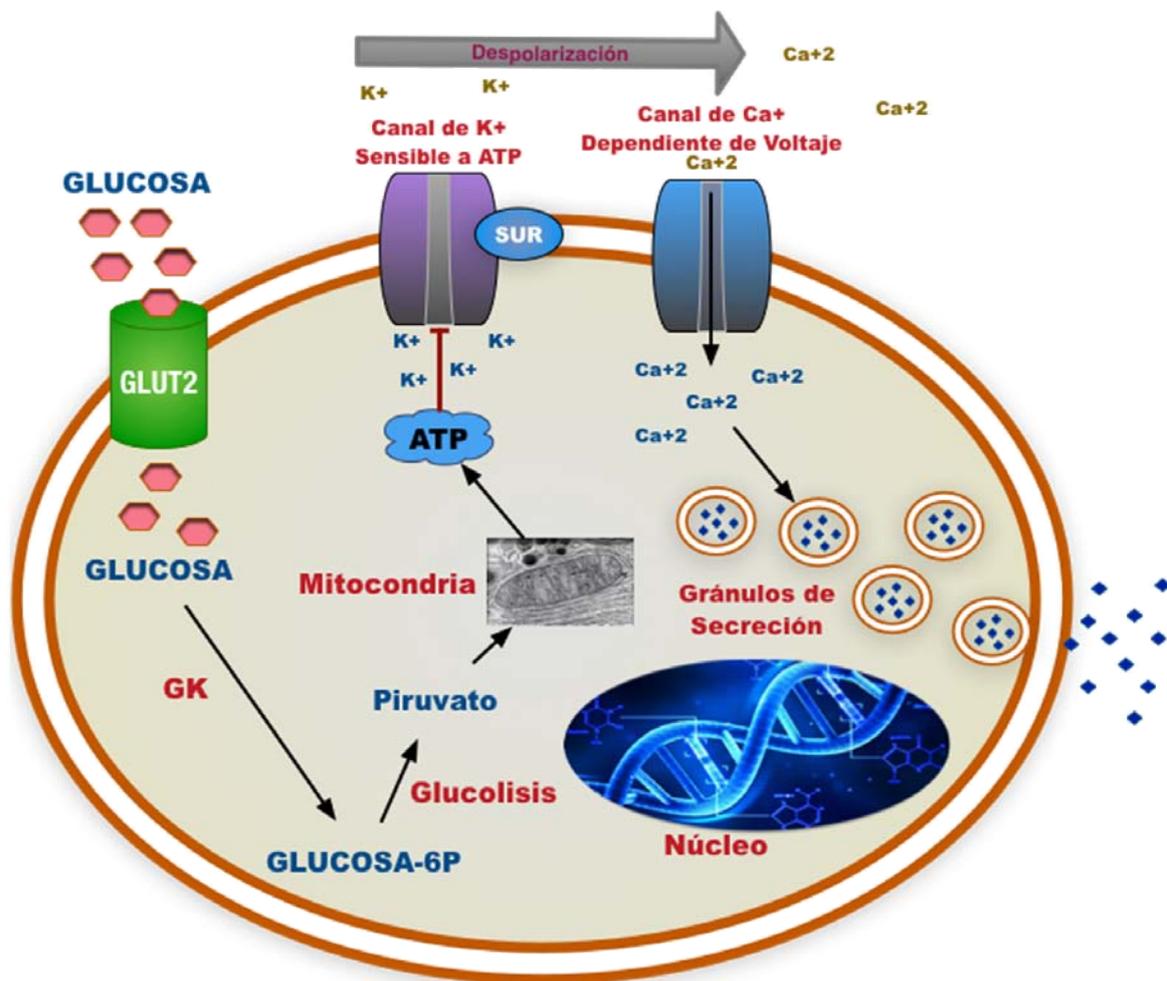


Figura 2 Fisiología de la célula β del páncreas (secreción de insulina). Diagrama esquemático de la célula β que muestra el mecanismo molecular de la secreción de la insulina. La glucosa entra a la célula β a través de GLUT2, donde es fosforilada por la Glucocinasa (GK) produciéndose glucosa-6-fosfato que es el paso limitante de la vía de la glucólisis. Al final de esta vía metabólica se obtiene piruvato y su posterior oxidación en la mitocondria produce un incremento de la relación ATP/ADP, lo cual produce el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP. Este proceso de cierre de canales, permite la despolarización de la membrana de la célula β lo que provoca la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y el flujo de iones de calcio para que finalmente los gránulos que contienen la insulina se fusionen con la membrana y la insulina sea liberada.

La secreción de insulina estimulada por la glucosa (GSIS por sus siglas en inglés) ocurre en dos fases (respuesta bifásica), en donde la primera fase es transitoria y la liberación de esta hormona empieza a los pocos minutos del estímulo después de la cual declina. La segunda fase de la secreción de insulina es más sostenida, empezando minutos después de la primera, donde la secreción se incrementa gradualmente hasta llegar a un pico a los 30-40 minutos [26]. El mecanismo molecular de la secreción de insulina se muestra en la figura 2, e inicia cuando las células β del páncreas monitorean un aumento en la concentración de glucosa en sangre. El transportador de glucosa 2 (GLUT2) es expresado constitutivamente en las células β y es el sensor principal de glucosa. La glucosa es captada rápidamente por estas células a través de GLUT2 por difusión facilitada. Una vez que la glucosa se encuentra dentro de estas células, es fosforilada por la glucocinasa (Hexocinasa IV) para formar glucosa-6-fosfato, siendo el paso limitante de la glucólisis. Esta fosforilación incrementa el flujo glucolítico produciendo piruvato como producto terminal de la glucólisis [27]. Es entonces que se inicia la oxidación del piruvato a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en la mitocondria para producir ATP. En el inicio de esta oxidación, el piruvato entra a la mitocondria y es descarboxilado a Acetil-CoA, la cual entra en el TCA, del cual resulta la producción de NADH y FADH₂ que son equivalentes reductores [28]. Al final del proceso de oxidación, estos equivalentes son oxidados en la cadena respiratoria para finalmente producir ATP. El aumento de la proporción de ATP/ADP en el citoplasma debido a la generación de ATP por la oxidación de la glucosa conduce a la activación del receptor 1 de sulfonilurea (SUR1) lo cual conduce al cierre de los canales de potasio sensibles a ATP provocando la despolarización de la membrana plasmática de la célula β . Este cambio de polaridad permite la apertura de los canales de Calcio dependientes de voltaje provocando un flujo de calcio extracelular hacia el interior de la célula, proceso que sirve de señal para la fusión de los gránulos que contienen a la insulina con la membrana celular y por lo tanto se induce la secreción de insulina [29] (Figura 2). Una vez secretada, la insulina viaja a través del torrente sanguíneo hacia los tejidos blancos para ejercer su acción en las células de dichos tejidos.

2.4 ACCIÓN DE LA INSULINA

Un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es la rápida acción que ejerce la insulina sobre los tejidos blanco después de ser secretada por el páncreas. Para que exista la acción de la insulina, es indispensable que las células de dichos tejidos tengan el receptor de insulina (RI), por lo que aquellos tejidos cuyas células no tengan dicho receptor no sufrirán ningún efecto con la presencia de insulina. El RI es una proteína que pertenece a una familia con actividad intrínseca de tirosin-cinasas. Estructuralmente este receptor está compuesto por cuatro subunidades (tetramérica), 2 subunidades α extracelulares y 2 subunidades β transmembranales, estas cuatro subunidades están unidas por puentes disulfuro [30]. Cuando la insulina se une a las subunidades α se induce un cambio conformacional del receptor, lo que conlleva a la autofosforilación en residuos de tirosina presentes en las subunidades β del receptor, lo que desencadena una cascada de señalización que da como resultado final la acción de la insulina en los tejidos blanco [31-33]. Como ya se mencionó, la acción de la insulina en dichos tejidos

promueve varios efectos metabólicos, además de la diferenciación y crecimiento celular (efectos mitogénicos). Los efectos metabólicos promovidos por la unión de la insulina a su receptor en los tejidos blanco, son los siguientes (Figura 3):

- En tejido adiposo y músculo se promueve la captación de glucosa a través de GLUT4
- La glucogénesis se favorece en hígado y músculo.
- En hígado se suprime la gluconeogénesis
- La lipogénesis se promueve principalmente en tejido adiposo.
- En el tejido adiposo se suprime la lipólisis.
- La síntesis de proteínas se promueve principalmente en hígado y músculo.

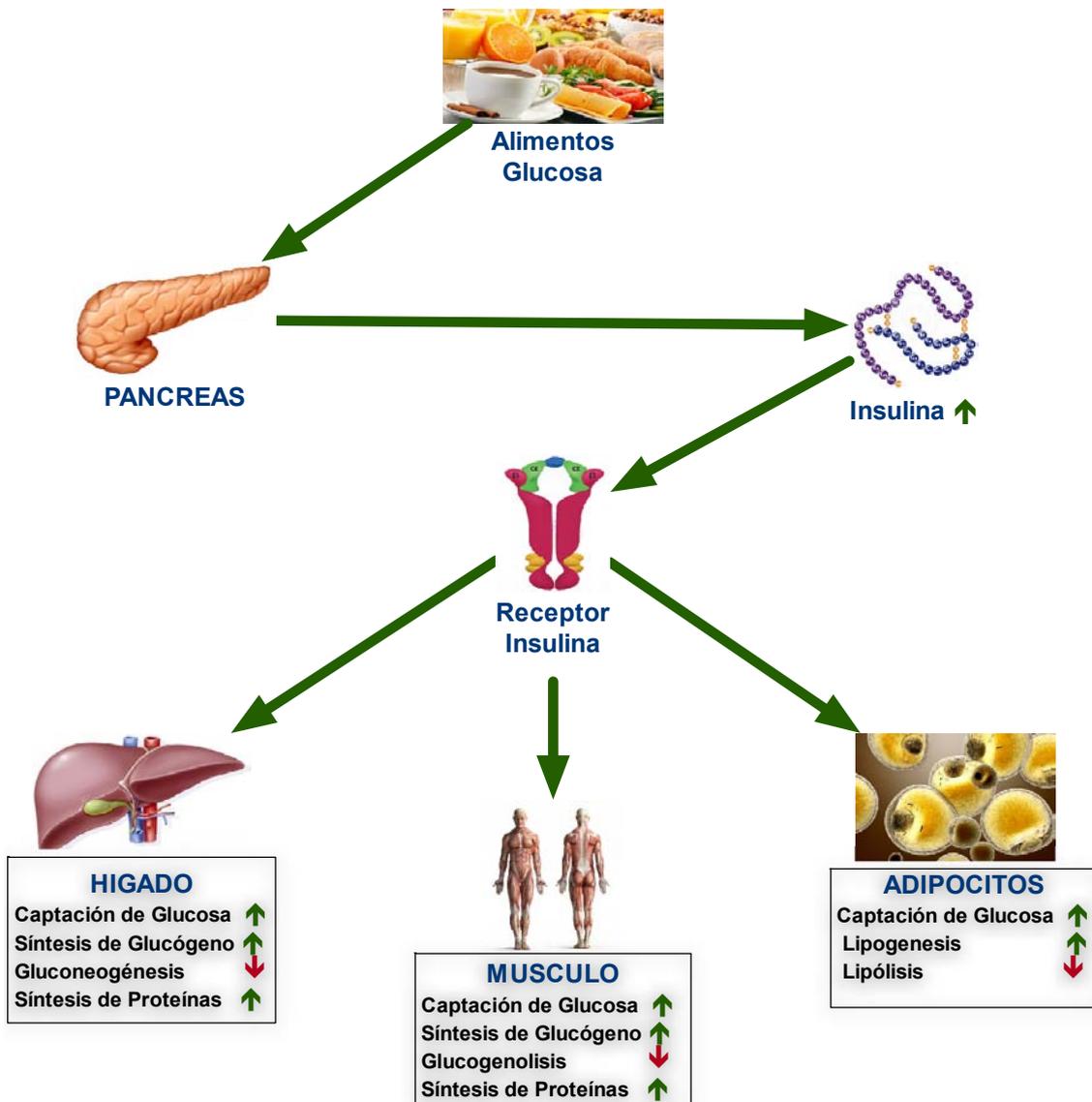


Figura 3. Acción de la Insulina. La insulina promueve varios efectos metabólicos, además de la diferenciación y crecimiento celular (efectos mitogénicos). La glucosa sanguínea llega al páncreas e induce la secreción de insulina y a través del sistema circulatorio llega a sus tejidos blanco. La insulina se une a su receptor lo que promueve los efectos metabólicos en hígado, músculo y tejido adiposo.

La activación del RI inicia cuando se une la insulina a sus subunidades α lo cual induce la autofosforilación del receptor en sus residuos de tirosina iniciando así las cascadas de señalización dentro de las células en los tejidos blanco. Existen tres vías principales de transducción de señales que son activadas por la acción de la insulina mostradas en la figura 4 y son las siguientes: **1) la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), 2) la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y 3) la vía Cbl-CAP.**

2.4.1 Vía de señalización de la PI3K.

Como se observa en la figura 4, esta vía es el mecanismo principal por el cual la insulina ejerce sus efectos metabólicos antes mencionados. Una vez que la insulina se une a su receptor, éste se activa autofosforilándose en sus residuos de tirosina, con lo cual se activan reclutándose y fosforilándose proteínas adaptadoras llamados sustratos del receptor de insulina (IRSs) [34]. La fosforilación de IRS permite la unión y activación mediante fosforilación de las proteínas que contienen dominios SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src) como PI3K que fosforila, a su vez, a los fosfolípidos de la membrana plasmática fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4-P) y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI4,5-P₂), generando los productos PIP₂ y PIP₃ que finalmente activan a la enzima AKT, también denominada PKB [35, 36]. AKT regula los siguientes efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de múltiples sustratos *rio abajo* (figura 4) [34, 36-39].

- a) **Captación de glucosa.** Una vez que AKT es activada por la vía descrita anteriormente, ésta fosforila a AS160 que activa a Rab-GTP estimulándose la translocación de GLUT4 de los compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, promoviendo la captación de glucosa principalmente en músculo y adipocitos.
- b) **Glucogénesis en hígado y músculo.** AKT activada induce la síntesis de glucógeno en el músculo esquelético e hígado a través de la inhibición de GSK-3.
- c) **Supresión de la gluconeogénesis.** La señalización de la insulina inhibe la síntesis de glucosa en hígado debido a que AKT induce la ruptura de la unión de CREB/CBP/Torc2 y la inhibición del factor de transcripción FOXO1 mediante su fosforilación.
- d) **Lipogénesis en tejido adiposo.** La síntesis de lípidos se lleva a cabo cuando AKT activa a factores de transcripción lipogénicos como SREBP-1c, USF1 y LXR.
- e) **Supresión de la lipólisis.** Por el contrario, la insulina inhibe la degradación de lípidos cuando AKT activa PDE3B mediante su fosforilación lo que inhibe la vía PKA/HSL.
- f) **Síntesis de proteínas.** AKT también activa a mTORC1, lo cual promueve la síntesis de proteínas a través de p70s6k y la inhibición de 4E-BP1.

2.4.2 Vía de señalización de las MAPK.

Esta es la vía principal por la cual la insulina regula los efectos mitogénicos de las células (figura 4). La activación del RI por parte de la insulina permite la activación de proteínas adaptadoras Shc a través de sus dominios SH2, lo cual une al complejo Grb2/SOS. SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina capaz de activar a Ras, lo cual desencadena el inicio de la cascada de señalización de las MAP cinasas. Ras activa a Raf-1, lo cual dispara una cascada de cinasas que resulta en la fosforilación y activación de

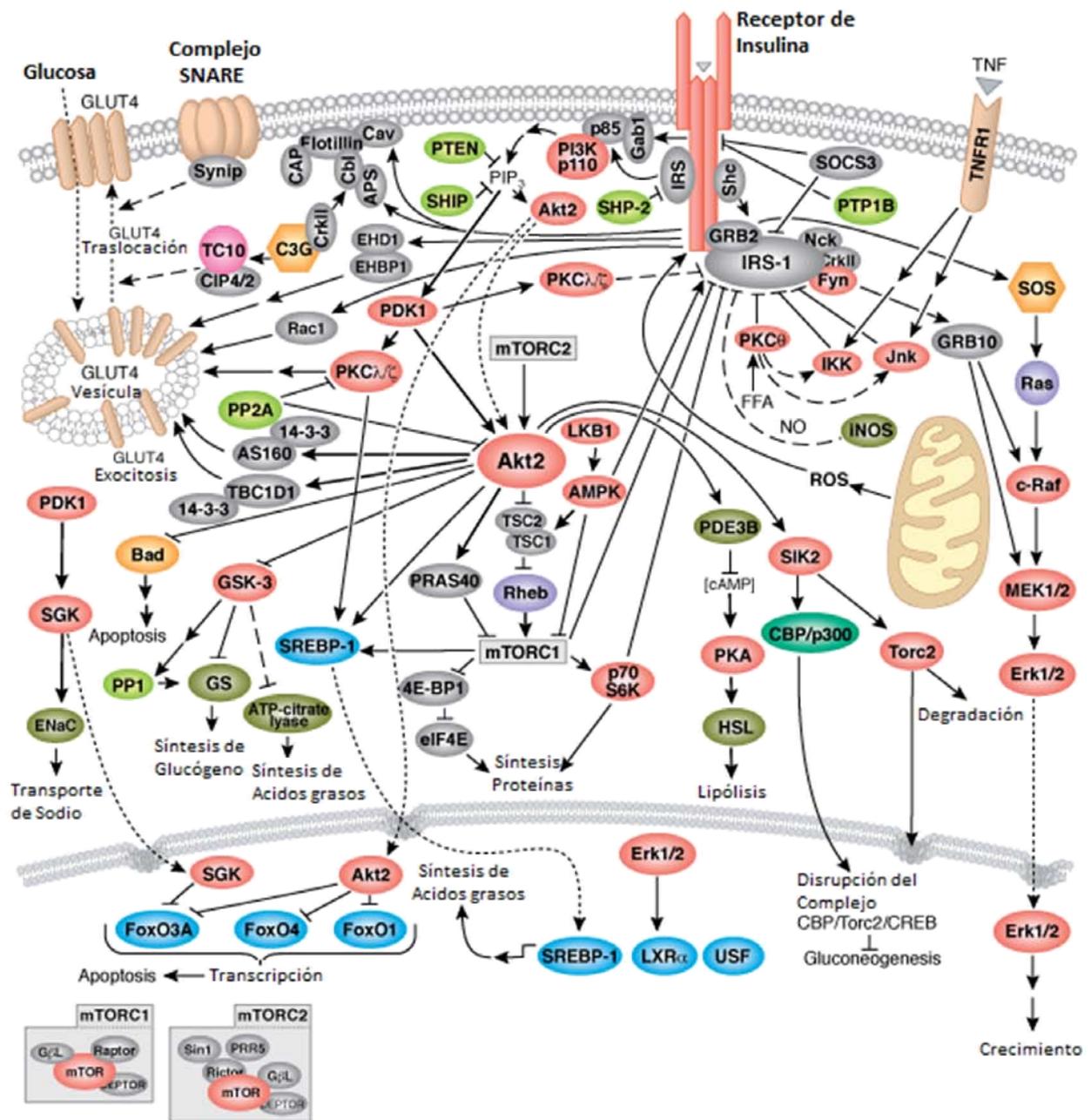


Figura 4. Vías de señalización del Receptor de la Insulina. Figura modificada de *Cell Signaling Technology* (<http://www.cellsignal.com/>). La insulina se une a su receptor el cual se activa mediante la autofosforilación, lo cual recluta y activa por fosforilación diversas proteínas adaptadoras. Tres vías de señalización derivan de la activación del receptor de la insulina. La primera es la vía de PI3K, que implica la activación en forma secuencial de las proteínas IRS quien activa a PI3K, lo que promueve la formación de PIP3, quien activa a la cinasa AKT/PKB. AKT activa a varias proteínas que da como resultado los cambios metabólicos ejercidos por la insulina. Estos cambios metabólicos involucran una mayor captación de glucosa por los tejidos blanco, aumento de la glucogénesis y lipogénesis, inhibición de la gluconeogénesis y la lipólisis, además un aumento en la síntesis de proteínas. La segunda vía implica efectos mitogénicos que corresponde a la cascada de señalización de las MAP cinasas que inicia con la activación de Shc por parte del receptor de la insulina, lo que recluta a GRB2-SOS, provocando la activación de RAS, quien activa a RAF, lo que desencadena la activación de las MAP cinasas (MEK1/2) quienes activan a ERK1/2. Esta vía promueve el crecimiento y proliferación celular. La tercera vía corresponde a Cbl-CAP. Cuando la insulina activa a su receptor se inicia el reclutamiento de CAP y Crk, lo que activa a C3G, quien activa a TC10, promoviendo la translocación de GLUT4 para aumentar la captación de glucosa en los tejidos blanco.

MEK1 y MEK2, quienes activan a través de la fosforilación en residuos de tirosina y treonina a las cinasas ERK1 y ERK2. Las cinasas ERKs fosforilan varios blancos entre los que se encuentran varios factores de transcripción, que participan principalmente en la regulación de la expresión genética mediando el crecimiento y diferenciación celular. [34, 36, 39].

2.4.3 Vía de señalización Cbl-CAP.

En la figura 4 se muestra que esta vía, al igual que la vía PI3K, promueve la captación de glucosa. El proto-oncogen Cbl es fosforilado en un residuo de tirosina por el RI, lo cual conduce a que se una con la proteína adaptadora CAP. El complejo Cbl-CAP se trasloca a la membrana celular donde Cbl interactúa con la proteína adaptadora Crk, la cual se asocia con C3G. Esta asociación, activa a C3G quien realiza la activación de la pequeña GTPasa TC10, quien también promueve la translocación de GLUT4 a la membrana celular con lo cual ayuda a la captación de glucosa en los tejidos blanco de la insulina [36, 39]

III. FISIOPATOLOGÍA DE LA DT2

La DT2 se caracteriza por la presencia, tanto de la **resistencia a la insulina** dada en tejidos periféricos, como a una **disminución en la secreción de la insulina** en las células beta del páncreas. Es así como la homeostasis de la glucosa depende de un mecanismo de retroalimentación, en donde la glucosa plasmática estimula la secreción de insulina y se promueve la acción de esta hormona en los tejidos periféricos. La acción de la insulina involucra la captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos (principalmente del músculo esquelético) e inhibiendo, tanto la síntesis de glucosa en hígado, como la liberación de lípidos almacenados en el tejido adiposo. Sin embargo, en la DT2, existen dos mecanismos fisiopatológicos principales, el primero conlleva en una disminución en la acción de la insulina (**resistencia a la insulina**), y el segundo mecanismo consiste en defectos en la secreción de la insulina (**disfunción de la célula β**) lo cual conduce a múltiples desórdenes metabólicos, incluyendo hiperglucemia que es la característica principal de la DT2 (figura 5) [40]. El primer mecanismo que consiste en la **resistencia de la insulina**, afecta principalmente al hígado provocando un incremento en la producción de glucosa hepática, además también afecta a los tejidos periféricos observándose a una disminución en la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y el tejido adiposo. [41]. Por otro lado, el segundo mecanismo que incluyen defectos en la secreción de insulina, ocurre como resultado de la **disfunción de la célula β** del páncreas, lo cual involucra una disminución de la masa de la célula beta y el deterioro de funciones claves de la célula beta como la GSIS. La presencia de resistencia a la insulina junto con la disfunción de la célula β desencadena la DT2 (Figura 5) [40].

3.1 RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina está presente cuando los efectos biológicos de la insulina son menores tanto para la disposición de glucosa en tejidos, como para la supresión en la producción hepática de glucosa endógena [42]. La insulina activa una serie de mecanismos para la síntesis de glucógeno, de proteínas, de ARNm, y para la translocación de transportadores de glucosa a la superficie celular que influyen en la proliferación y supervivencia celular. La resistencia a la insulina resulta de mecanismos que bloquean la vía de señalización de la insulina en las células que contienen el Receptor de Insulina (células blanco) [21, 43]. En estados de resistencia a la insulina, una o más de los mecanismos moleculares que bloquean dicha señalización están involucrados. Como se muestra en la figura 6, procesos biológicos pueden inhibir los efectos positivos *río abajo* que promueven la fosforilación en residuos de tirosina del receptor de insulina y de las proteínas IRS. Uno de estos procesos consiste en la defosforilación de los residuos de tirosinas realizada por las protein-tirosin fosfatasas. Otro mecanismo involucra la fosforilación específica en residuos de serina y treonina del receptor de insulina y las proteínas IRS, lo cual reduce su capacidad para actuar como sustrato de la actividad tirosin-cinasa del receptor de insulina inhibiendo el acoplamiento de sus principales efectores que se encuentran *río abajo* de la vía de señalización de la insulina [44]. Se han identificado varias serin-cinasas de IRS que bloquean la señalización de la insulina, lo cual incluye a las protein-cinasas activadoras de mitógenos, cinasa c-Jun, protein-cinasa C atípica y la fosfatidil-inositol-3'-cinasa, entre otras [45]. Otros procesos que pueden interferir con la señalización de la insulina a través de

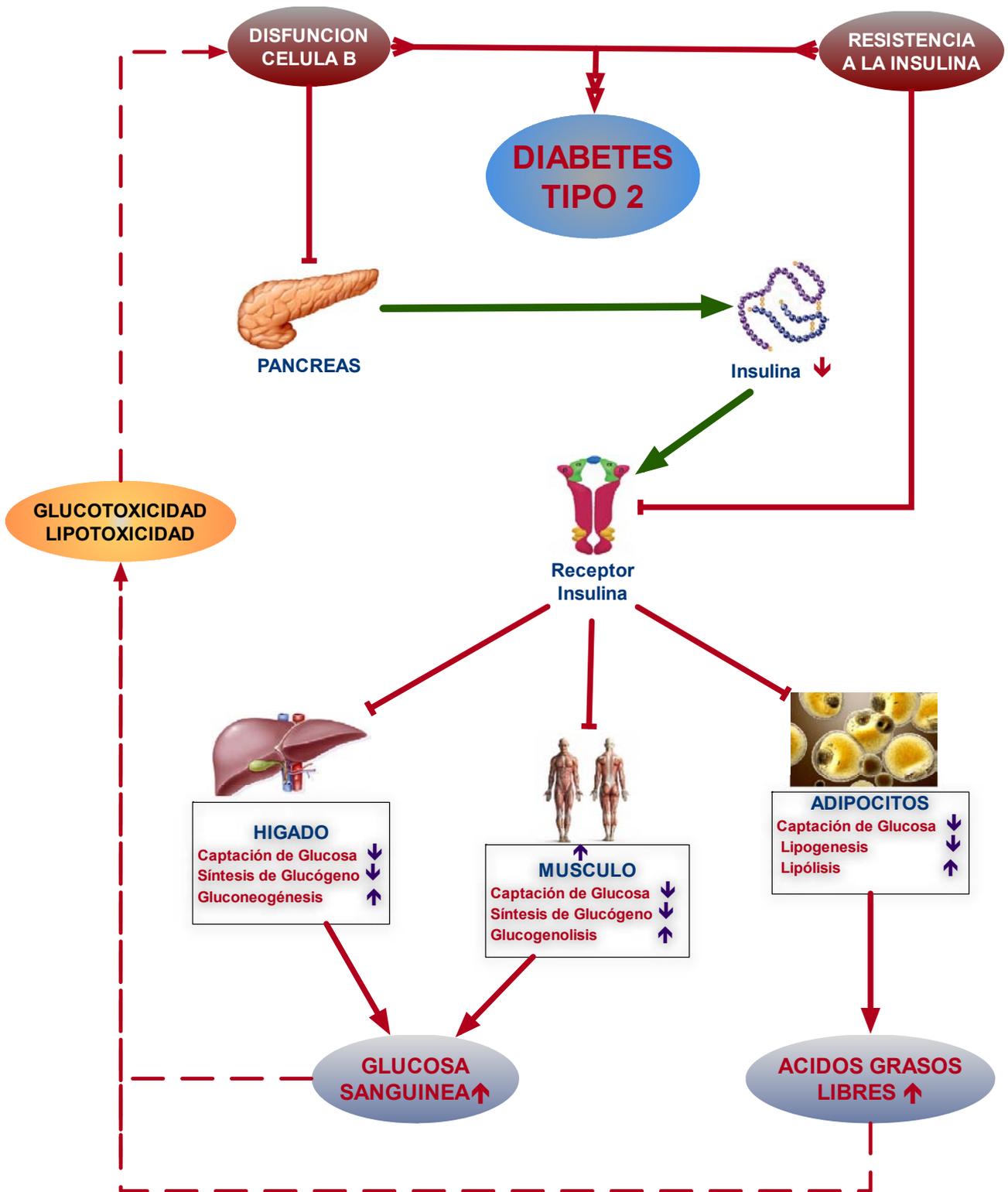


Figura 5. Fisiopatología de la DT2. La presencia de DT2 se deriva de 2 mecanismos fisiopatológicos, la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula β . La Resistencia a la Insulina conlleva a la inhibición de la acción de la insulina, ya que la señalización del complejo Insulina-Receptor es bloqueada. Por su parte, la disfunción de la célula β del páncreas conlleva a una disminución en la secreción de insulina. Estos 2 mecanismos conducen a un estado de hiperlipidemia e hiperglucemia característico de esta enfermedad. Tanto la hiperglucemia como los ácidos grasos libres generan la glucolipotoxicidad en las células β del páncreas lo que empeora la situación del paciente.

la internalización y la pérdida del receptor de insulina de la superficie celular y la degradación de las proteínas IRS [46]. Miembros de la familia de proteínas supresoras de la señalización por citocinas (SOCS), promueven la ubiquitinización de las proteínas IRS y su subsecuente degradación en el proteosoma [47]. Todos estos procesos que bloquean la vía de señalización de la insulina en los tejidos blanco, tienen como consecuencia una disminución en la acción de la insulina en los tejidos que contienen las células blanco.

3.1.1 Resistencia a la Insulina: El Papel de la Obesidad e Inflamación.

El principal factor de riesgo para el desarrollo de la DT2 es la obesidad que consiste en un desbalance crónico en la ingesta calórica y el gasto energético que conlleva a un exceso en el almacenamiento de nutrientes en el tejido adiposo [48]. La resistencia a la insulina está fuertemente asociada a la obesidad y la inactividad física. Diversos mecanismos que median esta interacción como hormonas circulantes, citocinas y combustibles metabólicos, tales como los ácidos grasos no esterificados (NEFA) generados en el adipocito modulan la acción de la insulina [21]. La obesidad implica un incremento en la concentración de triglicéridos almacenados, especialmente en los depósitos visceral y subcutáneo, lo cual trae como consecuencia un mayor número de adipocitos más grandes que por sí mismos son resistentes a la capacidad de la insulina de suprimir la lipólisis. Esto trae como consecuencia el aumento de la liberación de NEFA y glicerol en la circulación, lo cual agrava la resistencia a la insulina en músculo esquelético y el hígado [49] (Figura 6). En individuos delgados, los tejidos metabólicos especializados como tejido adiposo, hígado y músculo esquelético rápidamente estabilizan el exceso de nutrientes almacenándolos como triglicéridos y glucógeno. Sin embargo, con una dieta hipercalórica crónica, la capacidad de almacenamiento de estos tejidos especializados eventualmente se ve rebasada, provocando que las células implicadas en el almacenaje de nutrientes colapsen debido al exceso de nutrientes los cuales terminan distribuyéndose dentro de los compartimentos fisiológicos provocando una disfunción celular intrínseca y extrínseca [43, 50]. La disfunción celular inducida por la obesidad, activa un amplio rango de cascadas de señalización contrarreguladoras de la acción de la insulina y responsivas a estrés metabólico esquematizadas en la figura 6. Estas vías incluyen la activación de la cinasa amino terminal de c-Jun (JNK), la cinasa β del inhibidor del factor nuclear κ B (IKK β), *endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling 1* (IRE-1), *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *extracelular signal-regulated kinases* (ERKs), protein cinasa C- θ (PKC θ), proteínas SOCS y la protein cinasa activadora de RNA (PKR) [43, 50-55]. Como se muestra en la figura 6, todas estas vías colaboran para producir dos efectos metabólicos importantes. 1) Cada vía converge e inhibe la vía de señalización de la insulina, principalmente a través de la fosforilación en residuos de serina de las proteínas IRS. 2) Estas señales convergen en dos vías principales de inflamación, JNK e IKK β , iniciando y aumentando el estado inflamatorio dentro de los tejidos metabólicos, que se produce a través de la translocación de NF κ B al núcleo donde afecta la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria [56, 57].

La acumulación de triglicéridos en los depósitos viscerales sugiere un defecto en la oxidación de lípidos en la mitocondria en pacientes con DT2 [58]. En músculo esquelético, este defecto solo o acompañado con un incremento en la liberación de ácidos grasos libres al plasma, conduce intracelularmente a niveles elevados de *fatty acyl CoA*, diaciglicerol y ceramidas [59, 60]. Los metabolitos formados bajo estas circunstancias activan a PKC quien inhibe mediante fosforilación en los residuos de serina a las proteínas

IRS [61]. Debido a estas fosforilaciones, la actividad del receptor de insulina sobre las proteínas IRS junto con la actividad de PI3K se ve reducida provocando una disminución en la actividad de AKT, provocando una reducción en la síntesis de glucógeno y la disminución en la translocación de GLUT4 [62]. En el tejido hepático, la disminución de la β -oxidación en mitocondria (así como en músculo esquelético) conduce a la acumulación de metabolitos de ácidos grasos intracelulares [63, 64]. Estos metabolitos afectan adversamente la vía de señalización de la insulina, provocando la reducción de la síntesis de glucógeno hepático y un incremento en la gluconeogénesis [62, 65].

El tejido adiposo se ha descrito como un órgano endocrino que juega un papel central en el metabolismo, cuyas células, los adipocitos, tienen un papel regulador en el desarrollo de resistencia a la insulina debido a que producen adipocinas (un grupo de hormonas y citocinas), tales como leptina, adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), entre otras [48, 66]. La leptina y adiponectina se han clasificado como “anti-diabetogénicas” debido a la capacidad que tienen de disminuir la síntesis de triglicéridos, estimular la β -oxidación, e incrementar la acción de la insulina en hígado y músculo esquelético a través de la vía de señalización de AMPK que está implicada en varias respuestas metabólicas como la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético durante el ejercicio [40, 67, 68]. Por su parte el aumento en las concentraciones de NEFA y citocinas inflamatorias liberadas por el tejido adiposo afectan adversamente las cascadas de señalización de la insulina, puesto que se activan cinasas como las isoformas de PKC atípica que activan a IKK β y JNK [60, 69-71]. Además la citocina TNF- α incrementa la lipólisis en el adipocito, lo que incrementa los niveles de NEFA y también tiene efectos negativos directos en la señalización de la insulina [72, 73]. Otra citocina, la IL-6, también inhibe la acción de la insulina aumentando la expresión de las proteínas SOCS [47, 74, 75]. La activación inflamatoria dentro de los tejidos metabólicos potencia la resistencia a la insulina y las enfermedades metabólicas por tres vías principales:

1. Las cascadas de señales inflamatorias, inhiben la señalización de la insulina a través de fosforilaciones directas en residuos de serina en las proteínas IRS a través de JNK e IKK β [53].
2. La secreción de mediadores inflamatorios reclutan leucocitos, principalmente macrófagos a los tejidos estresados aumentando aún más la respuesta inflamatoria [55, 76].
3. Los mediadores inflamatorios secretados *comunican* la resistencia a la insulina a los macrófagos reclutados sistemáticamente y localmente que están predispuestos a un fenotipo inflamatorio [55, 56, 76].

En general, la inhibición de las vías de señalización de la insulina en sus tejidos blanco, comienzan a mostrar las siguientes características de la resistencia a la insulina: un incremento tanto en la lipólisis en adipocitos, gluconeogénesis en hígado, glucogenólisis, y lipogénesis en hígado, así como la disminución en la captación de glucosa en músculo. Además, los cambios en la población de las células inmunes que ocurren en esos tejidos tienen una importancia sistemática similar a lo que ocurre en el tejido adiposo [56].

En resumen, la evidencia muestra que la resistencia a la insulina, es en parte, provocada por los cambios en la producción de hormonas y citocinas en el hígado, adipocitos y por la infiltración de leucocitos en respuesta a una exposición crónica a lípidos y otros componentes metabólicos [40].

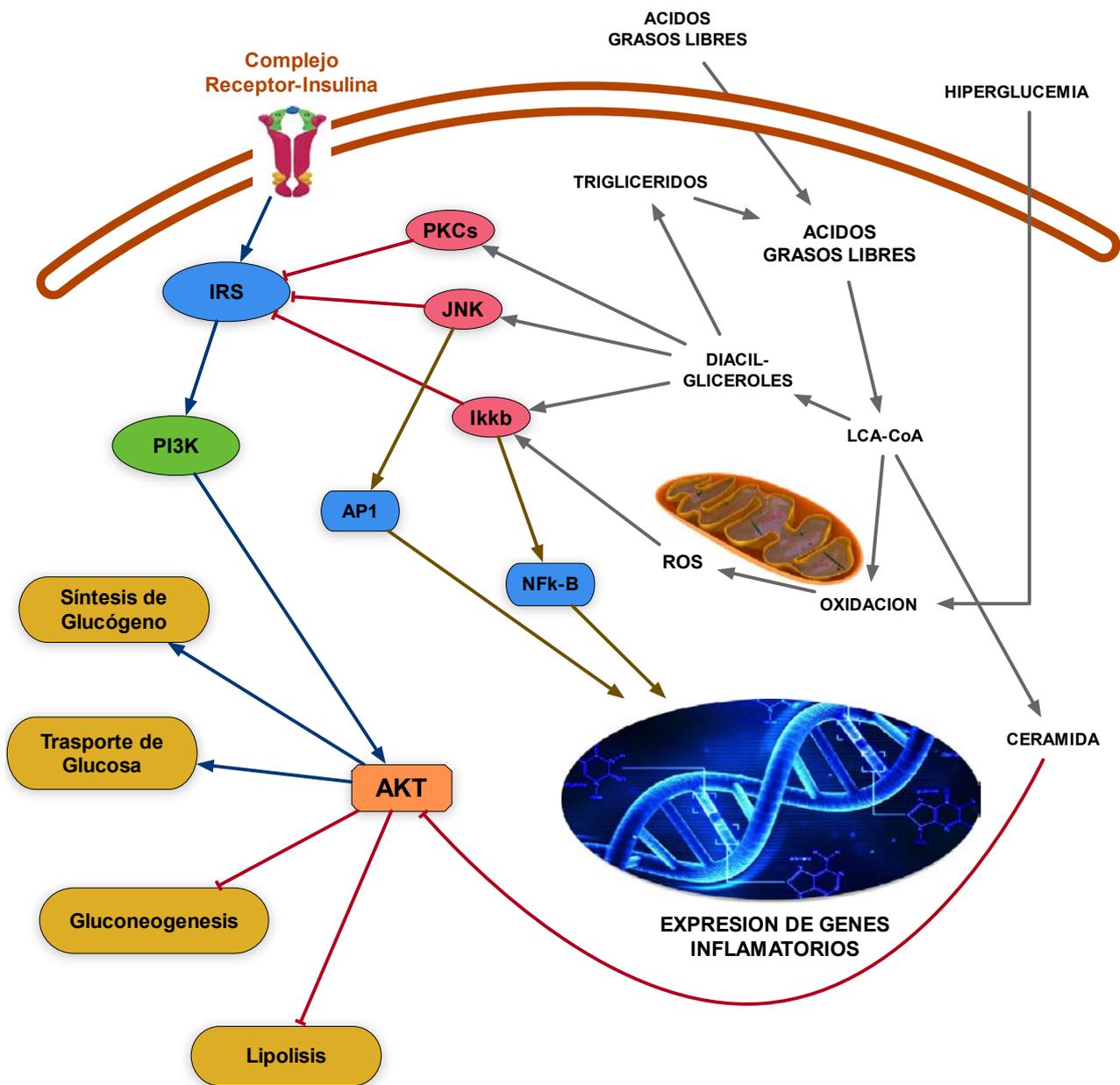


Figura 6. Mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a la insulina. Diagrama que muestra como el exceso de nutrientes (los ácidos grasos libres y glucosa), son capaces de inhibir las vías de señalización del receptor de la insulina que participan en la homeostasis de la glucosa y de los lípidos. Se muestra la vía de PI3K que termina en la activación de AKT, de la cual se promueven las diferentes acciones de la insulina. En presencia de concentraciones altas de glucosa y ácidos grasos libres se promueve la formación de diacilgliceroles, ROS y ceramidas, entre otros compuestos. Estos metabolitos permiten la activación de PKCs, JNK e Ikkb, los cuales inhiben a IRS y promueven la expresión de genes inflamatorios, mientras que las ceramidas son capaces de inhibir a AKT. Todos estos procesos inhiben que la acción de la insulina se lleve a cabo dentro de sus células blanco.

3.2 DISFUNCIÓN DE LA CÉLULA BETA DEL PÁNCREAS

La obesidad suele conducir a la resistencia a la insulina, sin embargo, solo una parte de los obesos que son resistentes a la insulina desarrollan la DT2. Se sabe que en las etapas más tempranas de esta enfermedad, la resistencia a la insulina es contrarrestada por un incremento en la masa y función de las células β (aumento en la proliferación y neogénesis) [77, 78]. Sin embargo, si persisten las condiciones adversas que afecten a dichas células, éstas finalmente sucumben debido a diferentes mecanismos provocando una disminución en las funciones de las células β (expresión de la insulina, daño en la GSIS, etc.) y finalmente la apoptosis [79, 80]. Estos eventos son el factor disparador de la DT2 puesto que existe un daño en las células β , lo cual involucra una disminución en la masa de estas células y un daño de sus funciones clave que resulta de varios mecanismos incluyendo el estrés del Retículo Endoplásmico y la Glucolipototoxicidad [40, 81].

3.2.1 Estrés del Retículo Endoplásmico.

El Retículo Endoplásmico (RE) es un organelo celular involucrado en el almacenamiento de Calcio, producción de lípidos y la biosíntesis de proteínas las cuales maduran en este organelo ya que son plegadas apropiadamente, ensambladas y transportadas a su destino final para realizar su función. Sin embargo, diversas condiciones pueden interrumpir la homeostasis del RE conduciendo a la acumulación de proteínas no plegadas apropiadamente dentro del lumen del RE lo que provoca su estrés [82, 83]. El estrés del RE activa un proceso complejo y adaptativo denominado **Respuesta a Proteínas no Plegadas (UPR** por sus siglas en inglés) [83, 84]. El mecanismo de UPR es encendido por tres transductores PERK, IRE1a y ATF6a que disminuyen la traducción de proteínas y aumentan la activación de genes UPR, además las células activan una vía para desechar las proteínas mal plegadas del RE a lo que se denomina **Degradación Asociadas al RE (ERAD** por sus siglas en inglés) [83, 85]. En el caso de la célula β , cuando la demanda de insulina sobrepasa la capacidad de plegamiento del RE, se activa el UPR crónicamente. Se ha mostrado que algunos estímulos, como altos niveles de ácidos grasos libres y glucosa, provocan una acumulación sostenida de insulina mal plegada dentro del lumen del RE [82, 86]. La acumulación de insulina mal plegada dispara la activación crónica de la UPR induciendo la disfunción de la célula β y a la muerte celular [87, 88]. La apoptosis, provocada por el estrés del RE, puede ser inducida por la UPR a través de la activación prolongada de la cascada de señalización IRE1-TRAF2-ASK1 y la vía JNK, además de que CHOP también juega un papel crucial en la apoptosis [62, 89, 90].

3.2.2 Glucolipototoxicidad

La Glucolipototoxicidad se refiere a los efectos adversos y combinados de las concentraciones elevadas de glucosa y ácidos grasos sobre la función y la supervivencia de la célula β del páncreas. La combinación de concentraciones excesivas de esos metabolitos conduce a una disminución en la secreción y expresión génica de la insulina, y finalmente a la muerte de dichas células a través de la apoptosis [91].

Para el caso de **glucotoxicidad**, diversos estudios han mostrado que elevación crónica de las concentraciones de glucosa en sangre afecta la función de la célula β y la sensibilidad a la insulina [92].

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la pérdida de función en la célula β debido a la hiperglucemia, aunque el factor principal parece ser una alteración en el metabolismo energético intracelular y el estrés oxidativo, así como la disfunción mitocondrial. Otras vías vinculadas a la hiperglucemia incluyen al estrés de RE (descrito anteriormente) la hipoxia y la apoptosis inducida por citocinas [93, 94]. En la célula β , el metabolismo oxidativo de la glucosa conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que son eliminados por enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, sin embargo, las células β son especialmente vulnerables a este mecanismo, debido a que tienen niveles muy bajos de enzimas antioxidantes [95]. Es por ello que la hiperglucemia se ha relacionado con la generación de ROS en los islotes pancreáticos lo cual induce el estrés oxidativo y al daño en los componentes celulares. Las ROS ejercen sus efectos dañinos en estas células afectando la función de la mitocondria, la cual juega un papel crucial en la GSIS y en la regulación de la masa de la célula β [96]. El aumento del flujo de glucosa a través de la fosforilación oxidativa incrementa la producción de ROS activando a la proteína desacoplante 2 (UCP2), lo cual reduce el potencial de membrana mitocondrial. Este proceso provoca la generación de calor, por lo tanto existe una disminución en la síntesis de ATP lo que implica una disminución en la secreción de la insulina [81].

En el caso de la **lipotoxicidad** se ha observado que la exposición prolongada de niveles farmacológicos de ácidos grasos daña la función de la célula β . Estudios prospectivos en sujetos en riesgo para el desarrollo de DT2, evidenció una correlación de la obesidad abdominal con la pérdida de la función de la célula β y que el aumento de las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFA) son factores de riesgo para el desarrollo de DT2 [97, 98]. Por su parte, se ha mostrado que los ácidos grasos disminuyen la GSIS y la expresión génica de la insulina, además de aumentar la apoptosis y necrosis de las células *in vitro* [99, 100]. Los mecanismos de lipotoxicidad descritos refieren que los ácidos grasos inducen estrés del RE, debido a una alta estimulación de la esterificación de NEFAs, lo cual reduce la capacidad del RE para llevar a cabo otros procesos. Además se ha mostrado que NEFA, también induce estrés oxidativo y pueden servir de sustrato para la formación de ceramidas y otros metabolitos, lo cual conlleva a procesos pro-apoptóticos y reduce la expresión génica de insulina [101-103].

La hipótesis de la glucolipotoxicidad establece que las concentraciones altas de ácidos grasos junto con la hiperglucemia contribuyen al daño en la célula β , y que ni los ácidos grasos ni la glucosa, por si solos, pueden provocar una toxicidad en estas células de manera significativa. Ahora se sabe que la hiperglucemia es requerida para que se lleven a cabo los efectos adversos de la lipotoxicidad, incluyendo la inhibición de la GSIS. Es por ello que el término glucolipotoxicidad es más apropiado en la descripción del proceso que conlleva a la disfunción de la célula β [91, 104]. Cuando las concentraciones de glucosa y de ácidos grasos son elevadas, el metabolismo intracelular de la glucosa conduce a la formación de citrato y la generación de malonil-CoA en el citosol. Debido a que la actividad de ácido graso sintasa es menor que la de acetil-CoA carboxilasa en la célula β , el efecto predominante de malonil-CoA es inhibir la actividad de CPT-1, lo cual bloquea la oxidación de los ácidos grasos, provocando la acumulación de LC-CoA en el citosol, lo que afecta la función de estas células [81, 91].

3.2.3 Lipotoxicidad Mediada por Colesterol

Recientemente, se ha propuesto que la homeostasis del colesterol es importante para un funcionamiento adecuado de la secreción de la insulina en células β y la implicación de un posible rol del metabolismo del colesterol en la lipotoxicidad en dichas células [105]. Sin embargo, son pocos los estudios reportados del papel del colesterol en la lipotoxicidad de la célula β , no obstante, existen reportes del papel del colesterol en la toxicidad de otros tipos celulares. Estudios recientes en hepatocitos, muestran que la distribución del colesterol libre es un factor importante en la apoptosis de las células hepáticas. Además, se ha reportado que el incremento de colesterol libre en la mitocondria es tóxico para las células neuronales y hepáticas debido a que promueve la reducción del Glutati6n mitocondrial. [106, 107] Adem6s, se ha observado que el tratamiento con 6cido lipoico en los hepatocitos, incrementa las concentraciones de 6cidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, disminuyendo la fracci6n total de los 6cidos grasos saturados, asimismo previene el desplazamiento de colesterol libre de la membrana celular al citoplasma de los hepatocitos sugiriendo que la distribuci6n del colesterol libre es importante en la lipotoxicidad de las c6lulas [108]. En el caso de la c6lula β del p6ncreas, el pre-tratamiento con palmitato en estas c6lulas, promovió la remodelaci6n de los microdominios de la membrana del RE, evidenciando que la p6rdida de esfingomielina es clave para iniciar la lipotoxicidad en la c6lula β a trav6s del estr6s del RE. Esto resulta importante al saber que la esfingomielina y el colesterol se asocian f6sicamente en estos microdominios, adem6s se observ6 que el colesterol libre fue modulado por el tratamiento con palmitato y por la sobre-expresi6n de Glucosil Ceramida Sintasa contribuyendo a la disrupci6n de los microdominios de este organelo [109]. Otro estudio realizado en modelos animales mostr6 una relaci6n entre los niveles altos de colesterol en suero con la disminuci6n en la secreci6n de insulina, la cual se restaur6 mediante la reducci6n de las concentraciones de colesterol. Adem6s el exceso de colesterol intracelular inhibe la secreci6n de insulina debido a que existe un incremento en la dimerizaci6n de nNOS provocando que la Glucocinasa quede inactivada puesto que queda anclada en los gr6nulos de secreci6n [110]. Adicionalmente, se ha mostrado que la alteraci6n del transportador de colesterol ABCA1 en ratones a trav6s de la inactivaci6n selectiva de este gen en la c6lula β provoca defectos en el eflujo del colesterol observ6ndose una acumulaci6n de colesterol intracelular, conduciendo a un defecto severo en la GSIS y a la intolerancia a la glucosa manifest6ndose como DT2 en este modelo animal [111]. La acumulaci6n de colesterol en las c6lulas β del p6ncreas y el posible papel en el desarrollo de la DT2 provee un nuevo modelo de lipotoxicidad de 6stas c6lulas.

IV. BASES GENÉTICAS DE LA DIABETES TIPO 2

4.1 ANTECEDENTES

El desarrollo de la DT2 es de etiología compleja debido a que es una enfermedad multifactorial, por lo cual es importante reconocer que los factores ambientales son determinantes en el desarrollo de la enfermedad; entre los cuales se reconoce a la obesidad, el sedentarismo, ambiente intrauterino, consumo excesivo de ácidos grasos saturados, bajo peso al nacer, entre otros. [112, 113]. Sin embargo, se sabe que algunas personas expuestas al mismo ambiente, suelen tener mayor susceptibilidad a padecer la diabetes que otras. Aunque se conoce parcialmente, el papel de la genética en la DT2 está bien documentada y de ahí, que el desarrollo de esta enfermedad es el resultado de la interacción entre los factores ambientales y un fuerte componente genético sustentado por distintas líneas de evidencia (figura 7) [114]. De acuerdo a estudios de agregación familiar el riesgo de desarrollar DT2 es del 40% para aquellos sujetos que tienen un padre afectado, mientras que aquellos que tienen a ambos padres diabéticos tienen un riesgo del 70% [115]. Además, el componente genético también se ha sustentado al encontrar que la concordancia de los gemelos monocigotos para la enfermedad es mayor que para los gemelos dicigotos [116]. Adicionalmente, tomando en cuenta estos estudios, las estimaciones de heredabilidad de esta enfermedad oscilan entre el 20 al 80%, por lo que el componente genético es determinante para la susceptibilidad en el desarrollo de la DT2 [117, 118].

En los primeros estudios que se realizaron para dilucidar el componente genético de la DT2, se determinó que los familiares de primer grado de los pacientes diabéticos tienen una prevalencia mayor de la diabetes (10-30%) comparado con sujetos que no tienen historia familiar de la enfermedad (1-6%) [117, 119, 120]. Además, los factores de riesgo a diabetes como la prediabetes, el aumento en los niveles de insulina en ayuno, y la disminución en la sensibilidad de insulina, se asocian a la historia familiar de diabetes [121]. Adicionalmente, los estudios en gemelos, muestran que el grado de concordancia en gemelos monocigotos es aproximadamente 70% comparados con el 20-30% en los gemelos dicigotos [122-124].

Dentro de la arquitectura genética de la DT2, existe un pequeño porcentaje, menor al 2%, que se debe a causas monogénicas, clasificándose como Diabetes Monogénica de la Juventud o MODY (*Monogenic diabetes of the Young*) ya que estos pacientes presentan la enfermedad a una edad temprana (menor a 25 años). [125]. MODY representa una forma monogénica de diabetes con herencia autosómica dominante y es resultado de mutaciones en seis genes (en distintas familias) que convergen en vías que involucran la disfunción de la célula β y de la GSIS. [126]. Las mutaciones que provocan las seis formas de MODY se encuentran en los genes que codifican para Glucocinasa (MODY2), los factores de transcripción HNF1 α (MODY3), HNF4 α (MODY1), HNF1 β (MODY5), PDX1 (MODY4) y NeuroD1 (MODY6) [127]. Sin embargo, la DT2 más común es una enfermedad multifactorial y poligénica que se desarrolla a través de una compleja interacción entre los factores ambientales y el componente genético. Dilucidar específicamente este componente genético no ha sido una tarea fácil y a través del tiempo se han desarrollado diferentes estrategias y herramientas metodológicas que se describen a continuación.

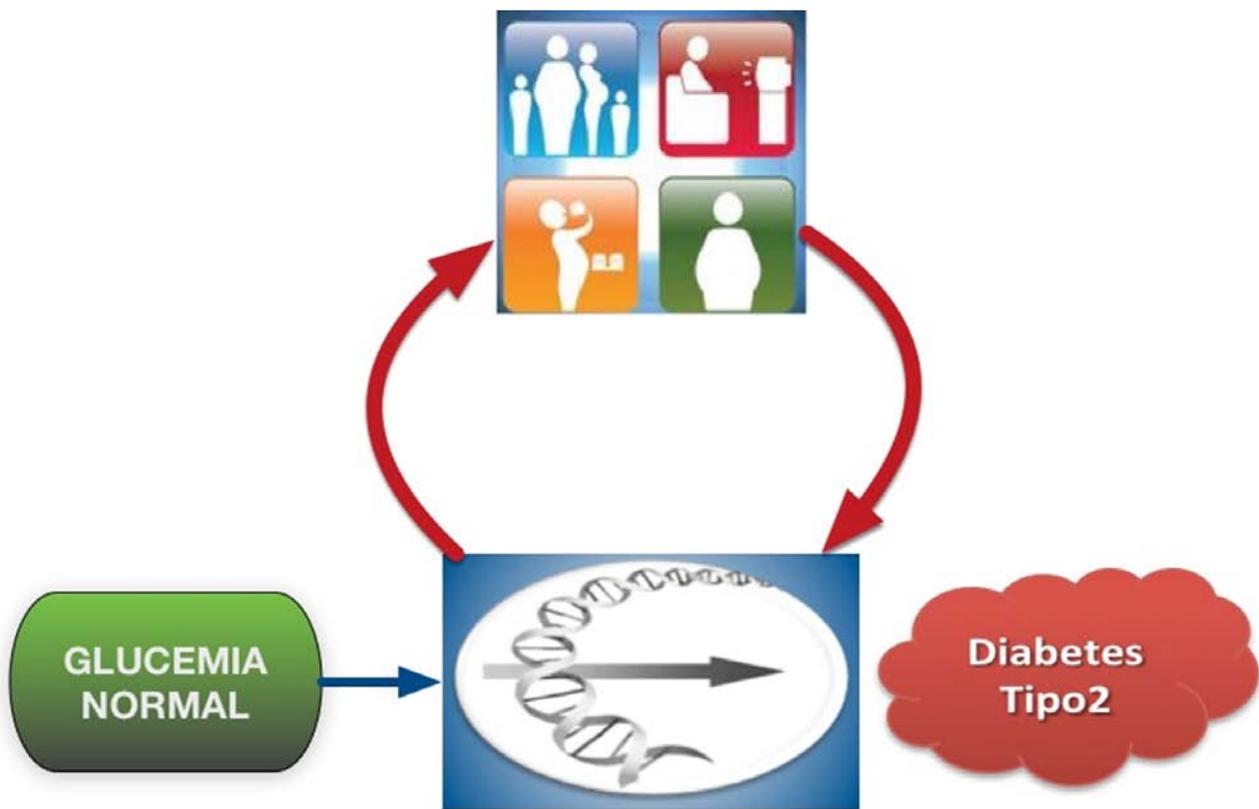


Figura 7. Factores genéticos y ambientales que participan en el desarrollo de la DT2. La DT2 es una enfermedad compleja provocada por una combinación de factores genéticos y ambientales (desnutrición fetal, obesidad, sedentarismo, alimentación no saludable, etc.) que interactúan entre sí produciendo resistencia a la insulina y disfunción de la célula β del páncreas, lo que finalmente conlleva al desarrollo de la DT2.

4.2 ANALISIS DE LIGAMIENTO

Los análisis de ligamiento analizan regiones cromosómicas compartidas por familiares, en donde se usan marcadores polimórficos (minisatélites, microsatélites, SNPs, etc.). El ligamiento es la tendencia de los genes y diversos marcadores genéticos de ser heredados juntos, debido a que se encuentran contiguos en un cromosoma, y es un primer paso para aislar un gen mediante su localización en un área específica del cromosoma. Los análisis de ligamiento mapean todo el genoma a través de cientos de marcadores genéticos, sin embargo, estos estudios tienen una resolución pobre debido a que utilizan una densidad baja de marcadores en todo el genoma y las regiones identificadas por ligamiento generalmente incluyen cientos de genes [114]. Estos análisis han sido exitosos para identificar variantes “raras” con efectos mayores, pero han sido poco exitosos en encontrar genes asociados con DT2 con efecto modesto. No obstante, con esta estrategia se lograron identificar algunos genes que han sido replicados mediante otras estrategias.

CAPN10. El gen de Calpaina-10 codifica para una cisteín-proteasa que es parte de la familia de las calpaínas, que son enzimas con actividad de proteasa, y que juegan diversos papeles en la remodelación intracelular, secreción de insulina y activación de apoptosis. *CAPN10* fue el primer gen descubierto a través

de los análisis de ligamiento cuando un *locus* en el cromosoma 2q37 se asoció a DT2 en 1996 en una población México-Americana, y posteriormente, mediante clonación posicional se identificó este gen [128, 129]. Estudios subsecuentes no confirmaron esta asociación en todas las poblaciones, aunque finalmente en un meta-análisis se confirmó dicha asociación [130-132].

TCF7L2. Este gen fue mapeado con una fuerte señal en el cromosoma 10q, en una población México-Americana [133]. Esta región fue analizada más finamente en distintas poblaciones Europeas y Asiáticas observándose que el *locus* de riesgo se encontraba en el intrón 3 de este gen [134]. Hasta el momento, la asociación a DT2 de las variantes de *TCF7L2* son las que más se han replicado y confieren el mayor riesgo al desarrollo de la DT2 en poblaciones de origen europeo [135].

4.3 GENES CANDIDATO

En los estudios de genes candidato se analiza un grupo pequeño de genes de los cuales se sospecha pueda participar en la patogénesis de la DT2, o bien, si el gen está localizado físicamente dentro de una región del genoma donde se sabe que contiene el gen. La estrategia más usada se enfoca en genes conocidos que se encuentran involucrados en el metabolismo de la glucosa, secreción de la insulina, receptores de insulina y su señalización, además del metabolismo de lípidos, entre otros. Sin embargo, muchos genes estudiados mediante esta estrategia no han dado resultados positivos. Solo un número pequeño de genes se han asociado con DT2, replicándose en otros estudios, estos incluyen a los genes *PPAR γ* , *KCNJ11* y *WFS1*.

PPAR γ . Este gen codifica para un receptor nuclear involucrado en la adipogénesis y es un blanco molecular de las tiazolidinas, las cuales se usan comúnmente como un medicamento anti-diabético, por lo cual fue un gen candidato muy atractivo. Dentro de este gen se encontró un SNP no sinónimo que provoca un cambio de prolina a arginina en la posición 12 de la proteína (Pro12Ala). Este polimorfismo incrementa en un 20 % el riesgo a desarrollar DT2 [136, 137].

KCNJ11. Este gen codifica para un canal de potasio sensible a ATP, involucrado en la secreción de insulina mediante la regulación del potencial de membrana, es codificado por este gen. Mutaciones que activan esta proteína provocan la diabetes neonatal, por lo que este gen fue propuesto gen candidato. Se encontró un SNP no sinónimo (E23K) en la posición 23 de la proteína que se asoció con DT2, observación que fue posteriormente replicada en distintas poblaciones. Adicionalmente, esta variante se asoció con una disminución en la secreción de la insulina en varias poblaciones [138-141].

WFS1. Este gen codifica para una proteína llamada wolframina, una glicoproteína cuyo defecto provoca el Síndrome de Wolfram caracterizado por diabetes insípida en etapas tempranas, afectación ocular (atrofia óptica) y sordera [142-144]. *WFS1* parece estar involucrado en la función de la célula β del páncreas y algunos SNPs se asociaron inicialmente con DT2 confirmándose en otros estudios [145-148].

ARHGEF11. Este gen se localiza en el cromosoma 1q21 y es uno de los activadores de las proteínas Rho GTPasas involucradas en la vía de señalización de las proteínas G. Diversos estudios mostraron la asociación de la variante no sinónima R1467H (rs945508) de este gen con DT2 en poblaciones como los Amish, Pima, alemanes, coreanos y chinos [149-153].

4.4 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS).

Las limitaciones de los estudios de ligamiento y los estudios de genes candidato han llevado a la identificación de pocos genes asociados con DT2. Sin embargo, un avance significativo en el entendimiento de las bases genéticas de rasgos complejos como la DT2, fue facilitado por el arribo de los estudios de asociación al genoma completo (GWAS, Genome Wide Association Scan). A partir del desarrollo de estrategias de tipificación masiva que aunado a la información sobre la estructura de haplotipos (proyecto HapMap) fue posible realizar los GWAS mediante el uso de la tecnología de chips de DNA [154]. Con esta tecnología es posible analizar millones de SNPs de manera simultánea, para establecer diferencias en las frecuencias alélicas o genotípicas de estos SNPs entre casos (sujetos con DT2) y controles (sujetos normoglucémicos), lo cual ha facilitado de manera exponencial la disección parcial del componente genético de la DT2. Encontrar un SNP particular con mayor frecuencia en los sujetos con la enfermedad (casos) *versus* los individuos control, sugiere que el SNP está asociado con esta enfermedad (en este caso DT2). Para este tipo de estudios, se requiere obtener un valor de significancia P de 5×10^{-8} , debido a que cada GWAS involucra cientos de miles de pruebas de asociación por lo que se definió una corrección de Bonferroni para un millón de pruebas estadísticas, disminuyendo así el número de falsos positivos [155]. Debido a que no existe hipótesis alguna de la participación de algún gen en la enfermedad, esta estrategia no tiene ningún sesgo *a priori*, de esta forma se ha logrado detectar regiones génicas inesperadas ampliando con ello el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la DT2 [156, 157]. Con el paso del tiempo, el número de variantes asociadas a DT2 ha llegado a ser de alrededor de 60, incluyendo cuatro de ellos que corresponden a genes que ya habían sido reportados por otras estrategias, confirmando así, la contribución de estos genes en el riesgo para DT2 (*TCF7L2*, *KCNJ11*, *WSF1* y *PPAR γ*) donde una variante en *TCF7L2* (rs7903146), identificada por los análisis de ligamiento, representa la de mayor riesgo reportado en los primeros GWAS [158-161].

El primer GWAS sobre DT2 fue publicado en febrero de 2007 y fue llevado a cabo en una población de Francia. Este estudio identificó asociaciones de variantes nuevas cerca o dentro de los genes *HHEX*, *SLC30A8*, *LOC387761* y *EXT2* con DT2, y validó la asociación en *TCF7L2* [160]. Unos meses después se publicaron otros cuatro GWAS, tres de ellos compartieron resultados antes de su publicación. La compañía CODE Genetics y sus colaboradores confirmaron la asociación entre DT2 y *SLC30A8*, *HHEX* e identificaron una nueva variante en *CDKAL1* [162]. Por su parte, los 3 grupos (WTCCC/UKT2D, FUSION y DGI) que colaboraron y publicaron sus resultados en el mismo número de la revista *Science*, replicaron las asociaciones entre DT2 y las variantes en *SLC30A8* y *HHEX*, además de encontrar nuevas asociaciones en *CDKAL1*, *CDKN2A/2B* e *IGF2BP2*, y validaron las asociaciones en los genes *PPAR γ* y *KCNJ11* [158, 159, 161]. Asimismo, se identificó una fuerte asociación entre variantes en el gen de *FTO* y DT2, sin embargo, el

efecto observado se dio mayormente a través del incremento del IMC demostrado por Frayling y colaboradores [159, 161, 163]. De esta forma, con la excepción de *LOC387761* y *EXT2*, esta primera generación de GWAS confirmó 8 *loci* (*TCF7L2*, *PPAR γ* , *KCNJ11*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKAL1*, *CDKN2A/2B* e *IGF2BP2*) de susceptibilidad con DT2 a través de distintos estudios hechos principalmente en poblaciones de origen europeo. En el 2008, se realizó un esfuerzo para aumentar el tamaño de muestra con el objetivo de detectar variantes comunes con efectos modestos. Para ello, los 3 grupos que colaboraron anteriormente (WTCCC/UKT2D, FUSION y DGI) conformaron un consorcio internacional (DIAGRAM) en donde se combinaron sus datos dentro de un estudio de meta-análisis. La publicación de este estudio mostró la identificación de 6 nuevas variantes asociadas con DT2 dentro o cerca de los genes *JAZF1*, *CDC123/CAMKID*, *TSPAN8/LGR5*, *THADA*, *ADAMTS9* y *NOTCH2*, los cuales fueron evaluados para rasgos cuantitativos en otra publicación [164, 165]. Todos estos estudios se realizaron en poblaciones de origen europeo y rápidamente muchas de las nuevas variantes se replicaron en otras poblaciones, principalmente en la asiática. Adicionalmente, se determinó que la mayoría de los genes encontrados, están involucrados con defectos en la función de la célula β [166-173]. Interesantemente, en ese mismo año se publicaron los resultados de 2 GWAS realizados en la población asiática, donde se reportó la asociación entre DT2 y variantes novedosas que se encontraron en LD dentro del gen *KCNQ1*. [174, 175]. En los estudios previos, estas asociaciones no fueron evidentes en la población europea debido a que las frecuencias de los alelos de riesgo eran menores en esta población. Como demuestran estos últimos estudios, realizar este tipo de estudios en poblaciones distintas a la europea será determinante para la identificación de nuevas variantes genéticas de riesgo para DT2. Un año antes (2007), se realizó un GWAS en una población México-americana con el objetivo de identificar SNPs asociados con DT2. Este estudio reportó asociaciones entre DT2 y variantes cercanas o dentro de los genes *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL* y *RALGPS2*, sin embargo, la significancia no alcanzó el nivel de los estudios GWAS ($P \leq 5 \times 10^{-8}$) y el tamaño de muestra fue pequeño por lo que dichas asociaciones no han sido replicadas [176]. De manera interesante, la mayoría de los genes de susceptibilidad a DT2, parecen influir en mayor medida en la secreción a la insulina y no en el mecanismo de la resistencia a la insulina. Por ejemplo las variantes de riesgo de *SLC30A8*, *HHEX*, *IGF2BP2* y *CDKAL1* se asociaron con un defecto en la respuesta a la insulina en las pruebas de tolerancia a la glucosa, mientras que variantes en *CDKN2A/2B* se han asociado con un daño en la GSIS [162, 166, 167, 177, 178]. Por su parte, variantes en *PPAR γ* , *ARHGEF11* y *FTO* se han asociado con resistencia a la insulina o HOMA-IR, y se ha sugerido que las variantes que modulan la acción de la insulina podrían tener un mayor efecto sobre la susceptibilidad a DT2 con la presencia de la obesidad, como en el caso de *FTO* [150, 179, 180].

El presente trabajo de investigación se diseñó a finales de 2008 por lo que tomó en cuenta los resultados de los estudios mencionados anteriormente para la evaluación de estas variantes y su relación con la DT2 en una población mexicana. Sin embargo, los estudios en los siguientes años siguieron reportando nuevas variantes asociadas con DT2 y/o sus rasgos glucémicos como se observa en la figura 8. Algunos estudios examinaron los rasgos cuantitativos relacionados a DT2 en participantes sin la enfermedad (controles), donde se identificaron SNPs que tienen influencia tanto en la función de la célula β como en la resistencia a la insulina. En 2009, una variante en *IRS1* se asoció con resistencia a la insulina e hiperinsulinemia en un

GWAS realizado en poblaciones de origen europeo, cuyo alelo de riesgo se asoció con la reducción de la expresión proteica de IRS1 en biopsias de músculo humano [181]. Un año después, en 2010 se realizaron más estudios en poblaciones asiáticas donde se encontraron asociaciones novedosas que alcanzaron la significancia estadística a nivel de los GWAS en *PTPRD*, *SRR*, *UBE2E2* y *CDC4B*, reforzando la idea de estudiar poblaciones de diversos orígenes étnicos debido a las diferencias en las arquitecturas genéticas entre las poblaciones [182-185]. Diversos estudios, reportaron la asociación de *G6PC2*, *MTNR1B* y *GCK* con los niveles de glucosa en ayuno, que fue confirmado por otros reportes [186-190]. Los análisis de Meta-análisis de ese año del consorcio MAGIC evaluaron 21 GWAS con el objetivo de identificar SNPs asociados con glucosa en ayuno, insulina en ayuno, HOMA- β y HOMA-IR.

Este análisis identificó 9 variantes nuevas dentro o cerca de los genes *ADCY5*, *MADD*, *CRY2*, *ADRA2A*, *FADS1*, *PROX1*, *SLC2A2*, *GLIS3* y *C2CD4B* que se asociaron con glucosa en ayuno, mientras que, variantes en *GCKR* e *IGF1* se asociaron con insulina en ayuno y HOMA-IR. Adicionalmente, se confirmaron asociaciones previas de rasgos glucémicos con variantes genéticas de *DGKB-TMEM195*, *GCKR*, *G6PC2*, *MTNR1B* y *GCK* [191]. En otro Meta-análisis que incluyó datos de nueve GWAS, identificó 5 variantes dentro o cerca de los genes *GIPR*, *ADCY5*, *GCKR*, *VPS13C* y *TCF7L2* y su asociación con glucosa en pruebas de tolerancia a la glucosa de 2 horas [192]. En junio de 2010 el consorcio DIAGRAM se unió con otros grupos dando origen a un consorcio mayor denominado DIAGRAM Plus. Estos grupos de investigación encontraron asociación entre DT2 y 12 SNPs novedosos encontrados dentro cerca de los genes *BCL11A*, *ZBED3*, *KLF14*, *TP53NP1*, *TLE4*, *CHCHD9*, *ARAP1*, *HMG2A*, *HNF1A*, *ZFAND6*, *PRC1* y *DUSP9*, además de replicar *MTNR1B* e *IRS1* [193]. En el 2011 hubo una menor cantidad de estudios al respecto, aun así, estos reportes, además de replicar algunas variantes, lograron describir variantes nuevas que se asociaron con DT2 en poblaciones de origen asiático (*HMG20A*, *GRB14*, *ST6GAL1*, *VPS26A*, *AP3S2*, y *HNF4A*) [194, 195]. En 2012 distintos estudios describieron variantes nuevas relacionadas con la DT2, y rasgos como insulina y glucosa en ayuno. Inicialmente se llevó a cabo un estudio de meta-análisis a gran escala que comprendió 39 estudios de asociación multiétnicos con DT2. Mediante el análisis de 25 estudios se reportaron 3 nuevas variantes (*GATAD2A*, *CLIP2* y *PBX4*) en poblaciones de origen europeo, mientras que el análisis de ocho estudios distintos se describió una nueva variante (*HMG2A*) en los afroamericanos, y cuando se tomó en cuenta a todos los 39 estudios multiétnicos se encontró una nueva asociación de *BCL2* con DT2 [196]. Otros estudios de meta-análisis encontraron variantes nuevas que se asociaron con insulina en ayuno (*LYPLAL1*, *COBLL1-GRB14*, *IRS1*, *PDGFC*, *UHRF1BP1*, *PPP1R3B*, *HIP1*, *TET2*, *YSK4*, *PEPD* y *FAM13A*), y además describieron nuevas variantes asociadas con glucosa en ayuno dentro o cerca de los genes *DPYSL5*, *PCSK1*, *PPP1R3B*, *ARAP1*, *OR4S1*, *PDX1* y *FOXA2*, *IBKAP*, *DNLZ*, *WARS*, *KL*, *TOP1*, *P2RX2*, *AMT*, *RREB1* y *GLS2* [197, 198]. Finalmente, diversos meta-análisis reportaron la asociación entre DT2 y nuevas variantes genéticas (*ANK1*, *PSMD6*, *ZFAND3*, *PEPD*, *GLIS3*, *KCNK16*, *MAEA*, *GCC1*, *ZMIZ1*, *KLHDC5*, *TLE1*, *ANKRD55*, *CILP2*, *MC4R*, *BCAR1*, *TLE4*, *CCND2* y *GIPR*), además de replicar la asociación de variantes previamente reportadas [199-201]. En ese mismo año, logramos publicar parte de los resultados de este proyecto de investigación donde replicamos las asociaciones entre DT2 y algunas de las variantes descritas en las 2 primeras etapas de los GWAS (2007 y 2008) [202]. En años recientes (2013 y 2014) son pocos los estudios llevados a cabo, pues tan solo en 2013 se describieron alrededor de 5 variantes genéticas nuevas (*COBLL1*, *MACF1*, *GRK5*, *RASGRP1*, *SGCG* y *TMEM163*)

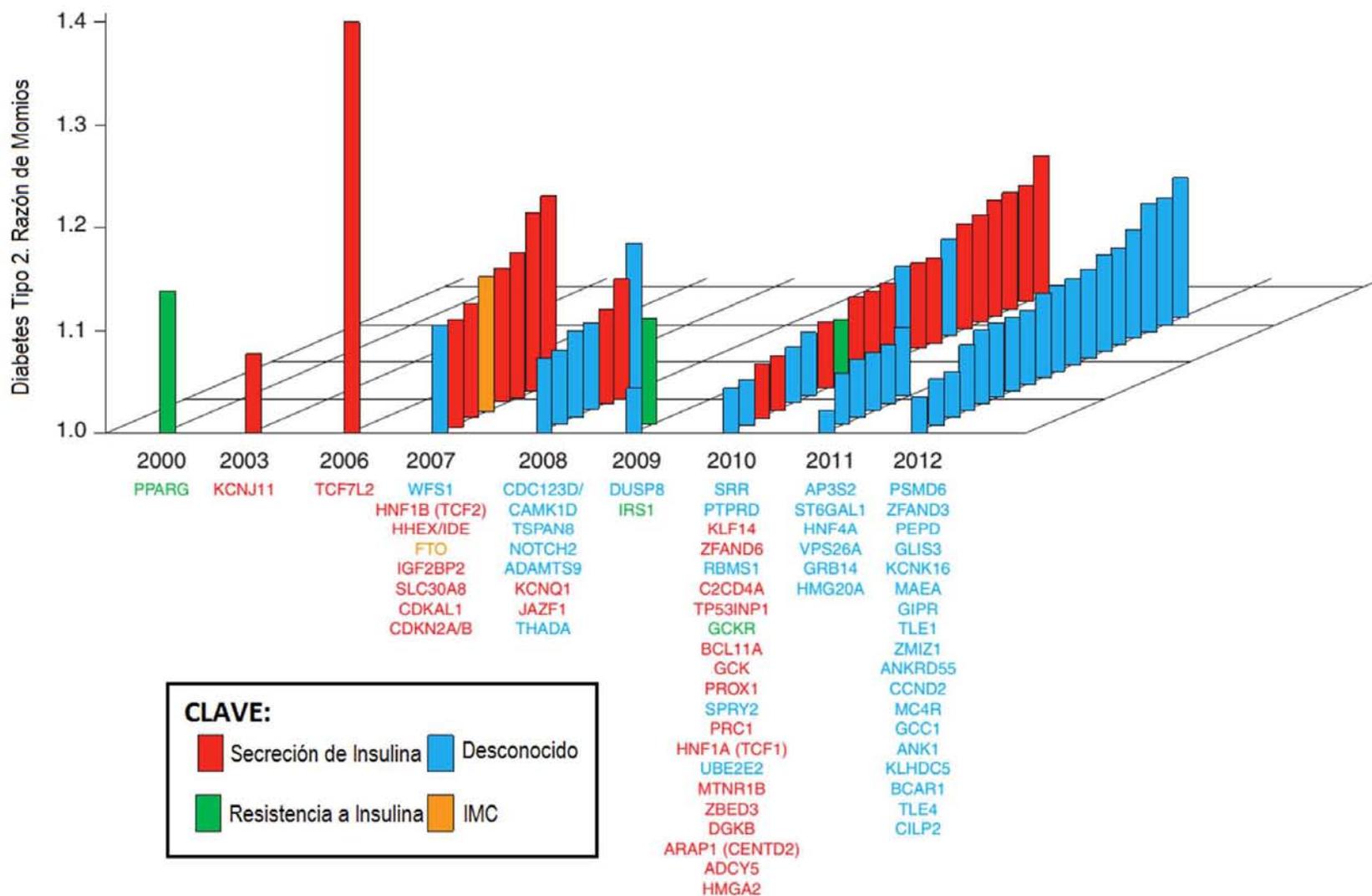


Figura 8. Variantes genéticas asociadas con DT2. Figura modificada de Yaghoobkar, H., et al *Genome Biol.* 2013; 14(3):203. Las barras y el eje de las Y ilustran el tamaño del efecto (razón de momios) que confiere cada variante en el riesgo a DT2. El eje de las X nos indica el año en el cual fueron descritas las variantes genéticas. Los colores indican el posible mecanismo por el cual las variantes genéticas ejercen su efecto.

asociadas con DT2, y 3 variantes genéticas se asociaron con proinsulina en ayuno (*TBC1D30*, *KANK1* y *PAM*), donde se utilizó la secuenciación del Exoma Completo [203-207]. Adicionalmente, en 2014 un GWAS y un meta-análisis describieron 10 variantes nuevas asociadas con DT2 (*MIR129-LEP*, *GPSM1 SLC16A13*, *TMEM154*, *SSR1-RREB1*, *FAF1*, *POU5F1-TCF19*, *LPP*, *ARL15* y *MPHOSPH9*), mientras que un estudio del exoma completo describió la asociación de 4 variantes dentro o cerca de 3 genes *CCND2*, *PAM* y *PDX1* [208-210]. Por su parte, nuestro grupo de investigación participó en 2 estudios realizados en la población latinoamericana, incluyendo a la población mexicana. Un GWAS reveló la asociación de una variante cerca del gen *SLC16A11* con DT2, mientras que el segundo estudio, realizado a través de la secuenciación del exoma completo, describió una variante genética no sinónima (p.E508K) en el gen *HNF1A* que incrementa cinco veces el riesgo a padecer DT2 [211, 212].

4.5 LIPOTOXICIDAD MEDIADA POR COLESTEROL: GENES INVOLUCRADOS

La DT2 se caracteriza por una alta concentración de glucosa en sangre y dislipidemia que consiste en concentraciones elevadas de triglicéridos y usualmente bajas concentraciones de colesterol HDL [213]. En pacientes diabéticos obesos, la acumulación de lípidos en exceso en las células β del páncreas es una de las principales causas del defecto secretorio de insulina y que se ha denominado como lipotoxicidad [214]. Además de la contribución de la hiperlipidemia crónica en la disfunción de la célula β , se ha observado la participación de la hiperglucemia (glucotoxicidad) de manera interdependiente, es decir, la combinación de altas concentraciones de lípidos y glucosa conduce a la disminución en la secreción de insulina, afectación en la expresión de esta hormona y muerte celular por apoptosis de la célula β [91, 99]. Además, se ha observado que las enzimas lipogénicas como la Ácido graso sintasa (FAS) y la Acetil-CoA carboxilasa (ACC), están altamente reguladas en las células β de acuerdo al estatus nutricional y también se ha observado en animales diabéticos un aumento en la expresión de sus genes en estas células [215, 216]. Como ya mencionó la homeostasis del colesterol es importante para un funcionamiento adecuado de la secreción de la insulina en células β . El colesterol es un componente primario de la membrana celular, ya que modula la fluidez y permeabilidad de la membrana. Este metabolito deriva de la biosíntesis endógeno y de la dieta [217]. El transporte reverso del colesterol, es la vía por la cual, el colesterol acumulado es transportado desde los tejidos periféricos hacia el hígado seguido por su excreción en forma de ácidos biliares [218]. Un estudio realizado en modelos animales encontró una relación entre los niveles altos de colesterol en suero con la disminución en la secreción de insulina, la cual se restauró mediante la reducción de las concentraciones de colesterol. En este mismo estudio, se demostró que el exceso de colesterol intracelular inhibe la secreción de insulina debido a que existe un incremento en la dimerización de nNOS provocando que la glucocinasa quede inactivada puesto que queda anclada en los gránulos de secreción [110]. En las células de los tejidos periféricos, el exceso de colesterol es removido a través de ABCA1, que es un transportador de colesterol, mediante el eflujo del colesterol hacia la ApoA-1 formando las HDL nacientes, las cuales se esterifican originándose las partículas de HDL maduras [219, 220].

En 1999, *ABCA1* fue identificado como el gen defectuoso en la enfermedad de Tangier, que es una condición caracterizada por la disminución extrema de las concentraciones plasmáticas del colesterol HDL, la acumulación de esteroides en los macrófagos y el aumento en la incidencia de la enfermedad cardiovascular [221-229]. Adicionalmente, la alteración del transportador de colesterol *ABCA1* en ratones, mediante la inactivación selectiva de este gen en la célula β , provoca defectos en el eflujo del colesterol observándose una acumulación de colesterol intracelular, conduciendo a un defecto severo en la GSIS y a la intolerancia a la glucosa manifestándose como DT2 en este modelo animal [111]. Además de las mutaciones que provocan la enfermedad de Tangier, dentro del gen *ABCA1* se han descrito variantes genéticas que juegan un papel importante en los niveles plasmáticos del colesterol HDL en distintas poblaciones [230]. De manera interesante, la variante R230C (rs9282541) del gen *ABCA1* fue reportada inicialmente en sujetos con hipoalfalipoproteinemia familiar de una población de Oji-Crees [231]. Posteriormente, se estudió en la población mexicana donde se asoció consistentemente con concentraciones bajas de colesterol HDL, mientras que en algunos estudios se ha asociado con obesidad y SM [232-234]. Adicionalmente, solo existe un reporte que ha estudiado a la variante R230C en la población infantil, reportándose la asociación de R230C a niveles bajos de HDL en niños en edad escolar [235]. También se ha evidenciado la funcionalidad de esta variante mediante estudios *in vitro*, que reportaron una reducción del 27% del eflujo del colesterol [236]. Un estudio reciente, sugiere que la domesticación del maíz fue una de las fuerzas evolutivas que incrementó la frecuencia de esta variante en América representando un ejemplo de coevolución "gen-cultura" [237]. En este sentido, existen dos estudios que evalúan un portafolio dietético hecho de alimentos naturales (nopales, chícharo, soya y avena) donde encontraron que aquellos sujetos que portaban los genotipos de riesgo (R230C y C230C) de la variante R230C tuvieron una mejor respuesta a los tratamientos dietéticos, aumentando sus concentraciones de HDL-colesterol, adiponectina y una reducción mayor de su peso corporal en comparación a los sujetos que portaban el genotipo silvestre (R230R) [238, 239].

Otros posibles genes candidato implicados en la lipotoxicidad mediada por colesterol son los receptores nucleares LXRs (receptores nucleares), que son factores de transcripción activados por ligando y pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares [240]. Existen dos isoformas LXR- α y LXR- β , codificadas por dos genes (*NR1H3* y *NR1H2*, respectivamente) que comparten alrededor del 77% de identidad de sus secuencias de aminoácidos en sus dominios de unión al ligando y al DNA [241]. LXR- α se expresa principalmente en hígado, tejido adiposo, intestino y riñón; mientras que LXR- β se expresa ubicuamente [241, 242]. LXRs son factores de transcripción clave que regulan genes lipogénicos y juegan un papel importante en la homeostasis del colesterol, glucosa y triglicéridos, cuyos ligandos endógenos son derivados oxidados del colesterol (oxiesteroides) [240, 243, 244]. Estos factores de transcripción parecen mejorar el metabolismo de la glucosa en diferentes niveles. En modelos experimentales inhiben la gluconeogénesis hepática y la captación de glucosa [245, 246]. Por su parte, la activación de LXR promueve la captación de glucosa y su oxidación en el músculo, además de inducir la expresión de GLUT4 en adipocitos, y de incrementar la secreción de insulina dependiente de glucosa *in vitro* de líneas celulares pancreáticas [247-249]. Sin embargo, se demostró que la activación crónica de LXR conduce a la acumulación de lípidos y a la apoptosis en los islotes pancreáticos de ratones y en las células INS-1, lo que

sugiere su contribución a la disfunción de la célula beta inducida mediante lipotoxicidad [250]. Como moduladores clave de la homeostasis del colesterol los LXRs controlan la expresión a CYP7A1, los transportadores de colesterol ABC y a Apo-E que son necesarios para el transporte y eflujo del colesterol [251, 252]. En este sentido, es a través de la activación de genes que codifican a transportadores de colesterol (ABCA1, ABCG1), apolipoproteínas (APOE) y enzimas que metabolizan los lípidos, que los factores de transcripción LXRs, desencadenan el transporte reverso del colesterol de los tejidos periféricos [253, 254]. En estudios realizados en ratones *knockouts* de LXR- α y con dieta rica en colesterol, no se activó la expresión de la enzima CYP7A1, lo que provocó la acumulación de esteres de colesterol en el hígado, sugiriendo que la conversión de colesterol en ácidos biliares es controlado por LXR- α [252, 255]. Por su parte, el ratón *knockout* de LXR- β , exhibe una tolerancia a la glucosa más baja y una reducción de la GSIS basal comparado con el ratón silvestre, además de ser la única isoforma que se expresa en las células β del páncreas [256, 257]. Tomando en cuenta estos resultados, fue que se propuso evaluar a LXR- β como gen candidato.

V. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

5.1 JUSTIFICACIÓN

Debido a que la DT2 tiene una prevalencia alta en la población mexicana, el estudio de esta enfermedad es prioritario en nuestro país. Como ya se mencionó anteriormente, la DT2 se caracteriza por la presencia de la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula β . Esta enfermedad se desencadena cuando existe una interacción entre los factores ambientales y genéticos. En el capítulo anterior se mostró que la contribución del fondo genético de esta enfermedad es muy relevante y a su vez compleja, debido a que se encuentran implicados múltiples genes y variantes en la predisposición genética a la DT2, por lo tanto, el estudio del componente genético de riesgo en nuestra población es imperante. Como resultado de la heterogeneidad genética de la DT2 y a pesar de que las variantes genéticas de riesgo identificadas están presentes en las distintas poblaciones humanas, no todas se han asociado al riesgo para DT2 en los distintos grupos étnicos, por lo que es importante definir la contribución de las variantes genéticas comunes, ya reportadas en otras poblaciones, en el riesgo a la DT2 en nuestra población. Adicionalmente, es de vital importancia la búsqueda intencionada de otras posibles variantes comunes y propias de nuestra población en genes involucrados en los mecanismos de lipotoxicidad de la célula β pancreática. Es por ello que este proyecto comprendió dos etapas, la primera para la evaluación de principales variantes genéticas reportadas como de riesgo a DT2 en otras poblaciones. La segunda etapa, implicó la búsqueda de variantes genéticas en genes candidato implicados en la lipotoxicidad de la célula β y su posible participación con la DT2.

5.2 HIPOTESIS

Dado que la población mestiza-mexicana tiene una prevalencia alta de DT2, además de tener dentro de su mestizaje un componente Europeo importante, las variantes cercanas o dentro de los genes *KCNJ11*, *PPARG*, *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/B*, *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *ARHGEF11*, *FTO*, *JAZF1*, *CDC123/CAMK1D*, *TSPAN8/LGR5*, *THADA*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, *KCNQ1*, *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL* y *RALGPS2*, así como variantes genéticas identificadas de los genes *ABCA1* y *LXR- β* , se asocian con DT2 en la población mestiza-mexicana.

5.3 OBJETIVOS

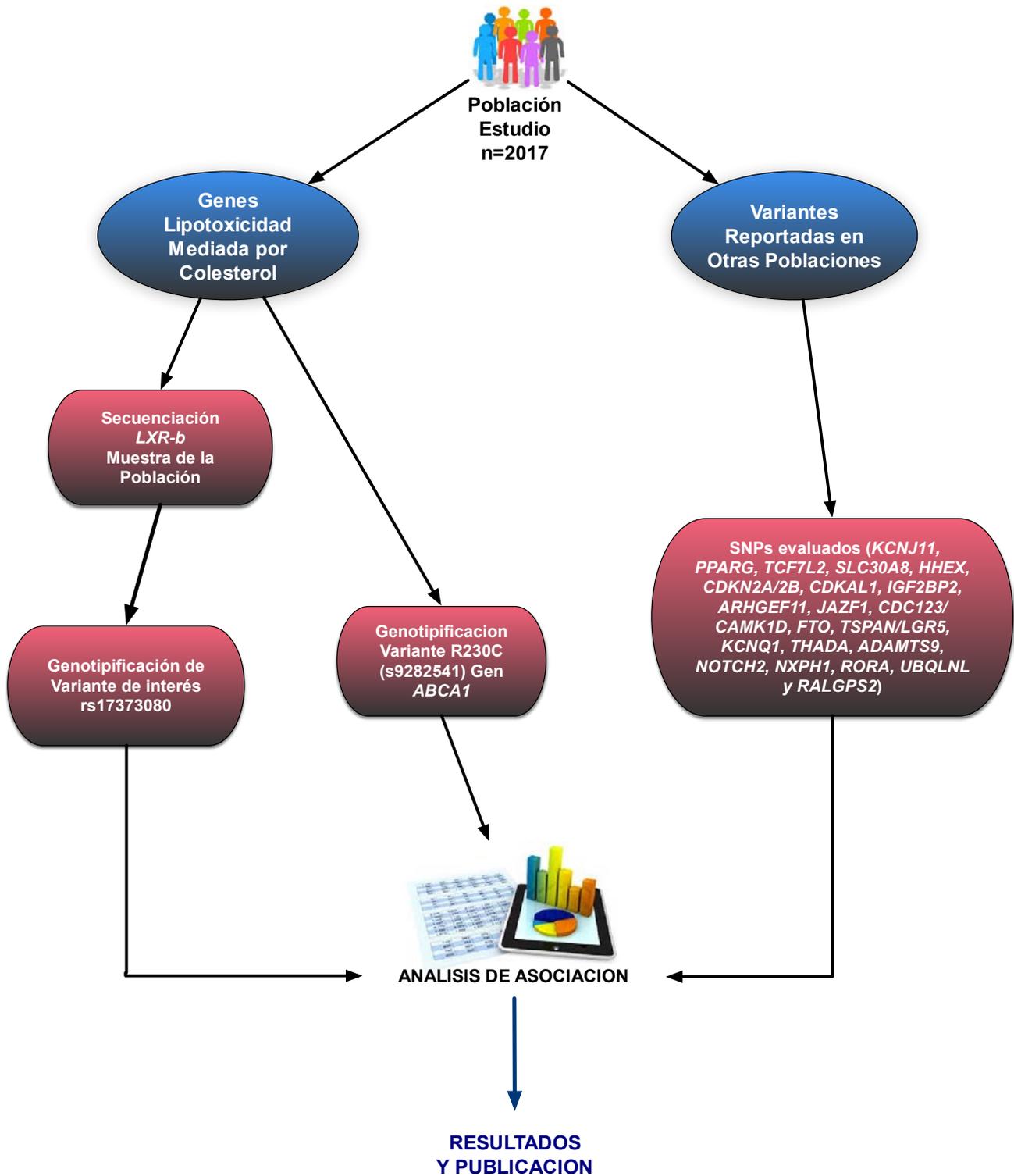
5.3.1 Objetivo General.

- Evaluar la asociación con DT2 de las variantes genéticas descritas en otras poblaciones y de las variantes identificadas en genes relacionados a la lipotoxicidad mediada por colesterol.

5.3.2 Objetivos Específicos.

- Evaluar la asociación de las variantes genéticas con DT2 descritas en otras poblaciones (*KCNJ11*, *PPARG*, *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/B*, *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *ARHGEF11*, *FTO*, *JAZF1*, *CDC123/CAMK1D*, *TSPAN8/LGR5*, *THADA*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, *KCNQ1*, *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL* y *RALGPS2*), en un grupo de individuos caso-control de la población mexicana.
- Buscar mediante secuenciación directa variantes del gen candidato *LXR-β*, en una submuestra inicial de la población de estudio.
- Evaluar la contribución de las variantes identificadas de *LXR-β* y de R230C del gen *ABCA1*, relacionadas a lipotoxicidad, en la susceptibilidad a la DT2 en un grupo de individuos caso-control de la población mexicana.

5.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. METODOLOGÍA

Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), y del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Previamente, se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos incluidos en este estudio. El estudio comprendió de dos partes, la primera parte correspondió a la evaluación de variantes genéticas comunes que se asociaron con DT2 reportadas en otras poblaciones, principalmente de origen europeo. La segunda parte correspondió a la búsqueda dirigida, mediante secuenciación directa, de variantes en el gen *LXR-β* relacionado con la lipotoxicidad mediado por colesterol.

6.1 DEFINICIONES

Diabetes Tipo 2 (DT2). El diagnóstico de DT2 se basó de acuerdo a los criterios de la *American Diabetes Association 2007* [258] que incluyen al menos una de las siguientes características: 1) niveles de glucosa en ayuno ≥ 125 mg/dL, 2) niveles de glucosa casuales ≥ 200 mg/dL, y 3) tratamiento actual con hipoglucemiantes.

Diabetes de inicio temprano. La DT2 fue diagnosticada a una edad < 45 años.

Diabetes de inicio tardío. La DT2 fue diagnosticada a una edad ≥ 45 años

6.2 DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO.

El estudio incluyó una población de 2017 sujetos no relacionados y mayores de 18 años de la población mestiza mexicana. El grupo control incluyó 990 sujetos normoglucémicos (glucosa en ayuno ≤ 100 mg/dL (392 hombres y 598 mujeres), de los cuales 692 no presentaron obesidad ($IMC < 30$ kg/m²) y 298 si la presentaron ($IMC \geq 30$ kg/m²). Además, se incluyeron 1027 sujetos con DT2 (casos), de los cuales 527 (216 hombres y 313 mujeres) fueron reclutados en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ y de otras 3 clínicas de referencia de la ciudad de México; mientras que 498 diabéticos (151 hombres y 313 mujeres) fueron reclutados de la Encuesta Nacional de Salud del año 2000 (ENSA 2000). Del total de los casos, 643 no presentaron obesidad ($IMC < 30$ kg/m²) y 384 fueron obesos ($IMC \geq 30$ kg/m²). El estudio de la variante rs17373080 de *LXR-β* incluyó solo una muestra de 1602 sujetos no relacionados y mayores de 18 años de la población mestiza mexicana. Esta muestra tomó en cuenta a la población de la primera parte del estudio exceptuando a los sujetos reclutados de la Encuesta Nacional de Salud del año 2000 (ENSA 2000). El grupo control incluyó 1097 sujetos normoglucémicos, de los cuales 772 no presentaron obesidad y 325 si la presentaron, mientras que el número de casos comprendió de 505 sujetos, de los cuales 320 no eran obesos y 185 eran obesos. Para los estudios de secuenciación se tomó una muestra de 109 sujetos de esta población de estudio (1602 sujetos), de los cuales 60 correspondieron a sujetos controles y los otros 60 fueron pacientes diabéticos. Para cada uno de los 2 grupos (casos y controles), 30 sujetos eran obesos y los otros 30 no tuvieron obesidad.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Controles:

- Sujetos no relacionados entre sí, cuyos padres y abuelos nacieron en México.
- Sujetos cuya edad fue mayor o igual a 45 años.
- Sujetos sin antecedentes familiares de DT2 en padres y abuelos.

Casos:

- Sujetos no relacionados entre sí, cuyos padres y abuelos nacieron en México.
- Sujetos mayores a 18 años de edad.
- Diagnóstico de DT2 de acuerdo a los criterios mencionados anteriormente.

6.4 EVALUACIÓN ANTROPOMÉTRICA Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS METABÓLICOS.

En estudios previos, el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ, a través de personal capacitado se realizaron las mediciones de peso, talla circunferencia de cintura y presión arterial. El Índice de Masa Corporal (IMC) se calculó como el peso en kilogramos dividido por la talla en metros al cuadrado. En esta misma institución las muestras de sangre venosa se obtuvieron con 9 a 12 horas de ayuno de cada participante. La concentración sérica de glucosa se midió usando el método de glucosa oxidasa, mientras que las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol total, y colesterol HDL se midieron por métodos enzimáticos colorimétricos usando el Synchron autoanalyzer (Beckman Co). El colesterol LDL se calculó por la fórmula de Friedewald [259]. La concentración de insulina se midió por radioinmunoensayo. El índice HOMA fue calculada mediante la Homeostasis Model Assessment (HOMA1-IR o InHOMA), cuya fórmula es $[(\text{insulina en ayuno en IU/L}) \times (\text{glucosa en ayuno en mmol/L})/22.5]$, descrita en 1985 [260]. Además se obtuvieron otros tres índices HOMA: HOMA2 %B (mide el porcentaje del funcionamiento de la célula β), HOMA2 %S (mide el porcentaje de la sensibilidad a la insulina) y HOMA2 %IR, (es el recíproco de HOMA2 %S) [261]. El cálculo de estos tres parámetros se realizó mediante *HOMA calculator* (<http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator>). Para cada sujeto de estudio se elaboró una hoja de recolección de datos en la cual se recabó información sociodemográfica, datos antropométricos y antecedentes clínicos personales y heredofamiliares (Anexos).

6.5 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO Y GENOTIPIFICACIÓN.

El DNA genómico de los sujetos de todo el trabajo de investigación, fue obtenido a partir de sangre total utilizando un kit comercial (QIAamp 96 DNA Blood Kit, Qiagen). La cuantificación del DNA se realizó mediante el espectrofotómetro de alta precisión NanoDrop ND-1000. Las variantes genéticas evaluadas en la primera etapa del estudio, correspondieron a aquellas identificadas en los reportes de la primera generación de GWAS y que fueron replicadas en otras poblaciones [158-161, 164, 174]. Adicionalmente, se evaluaron variantes genéticas identificadas en poblaciones Pima y México-americanas debido a que la

población mexicana tiene un alto componente genético amerindio [150, 176]. En los participantes de la primera etapa del estudio se obtuvieron los genotipos de 24 SNPs cerca o dentro de 21 de los siguientes genes: *KCNJ11* (rs5219), *PPARG* (rs1801282), *TCF7L2* (rs7903146), *SLC30A8* (rs13266634), *HHEX/KIF1/IDE* (rs1111875 y rs7923837), *CDKN2A/2B* (rs10811661), *CDKAL1* (rs7754840 y rs10484634), *IGF2BP2* (rs1470579 y rs4402960), *ARHGEF11* (rs945508), *JAZF1* (rs864745), *CDC123/CAMK1D* (rs12779790), *FTO* (rs8050136), *THADA* (rs7578597), *TSPAN8* (rs7961581), *KCNQ1* (rs2237892), *ADAMTS9* (rs4607103), *NOTCH2* (rs10923931), *NXPH1* (rs757705), *RORA* (rs7164773), *UBQLNL* (rs979752), y *RALGPS2* (rs2773080). La genotipificación se realizó a través de ensayos KASPAR (Kbiosciencias U.K.), donde se seleccionaron aleatoriamente un grupo de muestras duplicadas para confirmar los resultados de los genotipos obtenidos.

En la segunda etapa del estudio las variantes de interés rs17373080 del gen *LXR-β* y rs9282541 del gen *ABCA1* se genotipificaron mediante el uso sondas Taqman (Perkin-Elmer) diseñada específicamente para ambos SNPs usando el termociclador de PCR en tiempo real Rotor-Gene Q 5-Plex con canal HRM (Qiagen). No se observaron genotipos diferentes en 15 muestras duplicadas y se obtuvo más del 98% de los genotipos de las muestras. No se observó ninguna desviación en el equilibrio de Hardy-Weinberg para estas variantes en la población de estudio.

Adicionalmente, 104 marcadores informativos de ancestría (AIMs) fueron genotipificados para tomar en cuenta la estratificación de la población en 1372 sujetos de estudio. Los AIMs fueron genotipificados en el Biomedical Genomics Center, University of Minnesota. Se llevaron a cabo cuatro ensayos de PCR multiplex que contenían 28, 27, 26 y 26 marcadores respectivamente, seguido por la obtención de productos derivados de extensiones de *primers* de una sola base usando iPLEX (Sequenom, San Diego, CA). Los productos obtenidos fueron medidos con el MassARRAY CompactSystem (Sequenom) y analizados por espectrometría de masas usando el software TYPER (Sequenom) que generó los genotipos.

6.6 DISEÑO DE OLIGOS Y PCR DE PUNTO FINAL

La secuencia del DNA genómico del gen *LXR-β* fue obtenida a través de la base de datos reportada por el proyecto *Ensembl* (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens). A partir de esta secuencia se diseñaron pares de oligonucleótidos para llevar a cabo la amplificación de la región promotora proximal y de cada uno de los exones del gen conteniendo la región exón-intron mediante el uso el software FastPCR 6.0. Los productos de PCR se obtuvieron mediante la amplificación de la región promotora y de los exones a través del termociclador de PCR de punto final GeneAmp 9700 (Applied Biosystems).

6.7 SECUENCIACIÓN DIRECTA.

Los fragmentos de PCR obtenidos, se purificaron mediante las columnas de sílica QIAquick (Qiagen). Estos fragmentos, se utilizaron para la reacción de secuenciación de cada exón y la región promotora del gen candidato con el kit BigDye (Applied Biosystems) mediante PCR de punto final con el termociclador

GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Posteriormente, los fragmentos se purificaron por columnas de Sephadex y se realizó el análisis de secuencia de cada uno de ellos a través del secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos antropométricos y bioquímicos fueron evaluados mediante pruebas de sesgo y curtosis, determinándose que no tenían distribución normal, por lo cual para el análisis se usaron pruebas no paramétricas. Para la comparación entre grupos se calculó la mediana con los percentiles 25 y 75 de las características clínicas y antropométricas mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Además se realizó un análisis descriptivo de prevalencias o proporciones de las diferentes categorías usadas en el estudio y se evaluaron las diferencias entre los grupos mediante las pruebas de X^2 para estas variables. El software R versión 2.7.1 (<http://www.r-project.org>) fue usado para determinar las frecuencias de los genotipos de todas las variantes genéticas evaluadas, además de la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg y el cálculo del desequilibrio de ligamiento (LD) para las variantes dentro de un mismo cromosoma. Para todas las variantes genéticas evaluadas, los alelos de riesgo reportados previamente en estudios de asociación con DT2, correspondieron a los mismos encontrados en este estudio.

Todos los análisis de asociación genética se realizaron mediante un modelo genético aditivo. Una asociación fue considerada estadísticamente significativa con un valor nominal de $P \leq 0.05$. La corrección por comparaciones múltiples no fue considerada debido a que los SNPs evaluados fueron estudiados previamente en poblaciones de origen europeo y posteriormente fueron replicados en otras poblaciones, por lo cual no es posible detectar efectos debido solo a la fluctuación estadística. Para evaluar la asociación de los SNPs con DT2 se realizaron modelos de regresión logística ajustando por variables confusoras (sexo, edad e IMC) para obtener las razones de momios (ORs) con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%) usando el paquete estadístico STATA/SE 10.0 software (StataCorp LP, College Station, TX). La ancestría de cada uno de los 1372 individuos se estimó usando los datos obtenidos de los genotipos de los 104 AIMS usando el software STRUCTURE 2.2. Se evaluaron las medias y las correlaciones entre los tres vectores de ancestría (Nativo-Americano, Europeo y Africano). Debido a que no en todos los participantes del estudio (645 sujetos) fue posible obtener la información de ancestría, se idearon diferentes alternativas para imputarla en estos sujetos. Se usaron modelos de imputación como lo reportó Weissglas-Volkov et al. en donde evaluamos la relación entre la ancestría amerindia y cada uno de los valores de diferentes parámetros bioquímicos o clínicos [262]. Sin embargo, los coeficientes de determinación obtenidos fueron muy bajos ($R^2 < 0.05$), aun cuando se evaluaron modelos saturados que incluyeron diversas covariables, concluyendo que ningún modelo fue suficiente para predecir la ancestría amerindia. Debido a la limitante que representó la falta de datos de ancestría, inicialmente, solo se tomó en cuenta a los sujetos que contaron con la ancestría individual, en los cuales se evaluó la asociación entre cada SNP y la DT2 a través de dos modelos. El primer modelo genético se ajustó por edad, sexo e IMC, mientras que el segundo modelo se ajustó por las mismas 3 covariables y también con la variable de ancestría amerindia.

En la primera parte del estudio, estos análisis identificaron un grupo de nueve SNPs donde los valores de la razón de momios (ORs) o el valor de P no cambiaron drásticamente debido a la ancestría amerindia cuando se compararon los modelos con el ajuste o sin el ajuste de esta variable (un valor mayor del 10% se tomó como un cambio drástico). Para estos nueve SNPs, la ancestría amerindia no afectó su asociación con DT2, por lo cual, en los modelos finales se tomó en cuenta a toda la población de estudio (2017 sujetos) y se ajustaron por edad, sexo e IMC. Para el resto de SNPs (12) donde la ancestría amerindia afectó en más del 10% el efecto del riesgo o bien cambió drásticamente el valor P , los modelos finales de asociación genética se llevaron a cabo exclusivamente en la población que contó con los datos de ancestría (1372 sujetos) y se ajustaron por edad, sexo, IMC y ancestría amerindia. En la segunda parte del estudio las variantes rs9282541 del gen *ABCA1* y la variante rs17373080 del gen *LXR- β* , el efecto del riesgo (OR) y/o el valor de P se vieron afectados drásticamente por lo que se tomó en cuenta a la población con el dato de ancestría (1372 sujetos).

La asociación entre los SNPs y los rasgos cuantitativos se llevó a cabo a través de modelos de regresión condicional en el grupo de controles. Para las variantes genéticas rs13266634, rs10811661, rs7754840, y rs12779790, los modelos fueron ajustados por edad, sexo e IMC en toda la población de estudio. Por su parte, rs7903146, rs7923837, rs4402960, rs2237892, y rs17373080 el modelo se ajustó por ancestría amerindia, además de las otras 3 covariables. Adicionalmente, se realizaron análisis de asociación genética cuando la población de estudio se estratificó de acuerdo al *status* de obesidad (Obesos y no obesos) y a la edad de inicio de la DT2 (inicio temprano e inicio tardío). La prueba de Woolf fue usada para evaluar la heterogeneidad entre los ORs en los análisis de estratificación, así como entre los ORs obtenidos en este estudio y los reportados en poblaciones de origen europeo [263]. Para evaluar el efecto combinado de las variantes estudiadas, calculamos 3 *scores* de genotipo, contando el número de alelos de riesgo: el primero fue construido con los 21 SNPs analizados, el segundo fue obtenido con 17 SNPs que se replicaron consistentemente en los europeos (excluyendo las variantes genéticas en *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL* y *RALGPS2*), y el tercero se obtuvo a partir de los 17 SNPs, pero con la exclusión de los 8 que se asociaron con DT2 en nuestro estudio (11 SNPs). El efecto combinado de las variantes genéticas estudiadas se evaluó a través de modelos de regresión logística ajustados por edad, sexo, IMC y ancestría amerindia.

VII. RESULTADOS

Las diferencias de las características clínicas, antropométricas y bioquímicas entre los casos y controles se describen en la tabla 2. Los pacientes diabéticos presentaron valores mayores en el IMC, circunferencia de cintura, presión sistólica y diastólica, glucosa, triglicéridos y HOMA-IR. Adicionalmente, en la tabla 2 se muestran valores menores de colesterol total, HDL-c, LDL-c, HOMA-β y HOMA-S con respecto al grupo control. En cuanto a la estratificación de la población de estudio por edad de diagnóstico, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los sujetos diabéticos (casos) de inicio temprano quienes tienen menor circunferencia de cintura, y de las presiones sistólica y diastólica, con respecto a los casos de inicio tardío.

Tabla 2. Características generales de la población de estudio y de la estratificación por edad de inicio de la DT2.

	Sujetos Controles	Pacientes con DT2		
		Casos totales	Inicio temprano	Inicio tardío
Individuos (n)	990	1027	510	517
Hombres (%)	39.60	35.74	38.04	33.46
Edad (años)	53(49-62)	53(45-62) *	45(38-52) †	60(54-66)
Edad de diagnóstico (años)	-	46(37-52)	37(31-42)†	52(49-59)
IMC (kg/m ²)	27.5(25.3-30.5)	28.7(26-32) *	28.7(25.7-32.1)	28.7(26.4-31.7)
Circunferencia de cintura (cm)	92.9(86.5-101)	100(92-108.2) *	98(90-108)†	101(93-108.5)
Presión sistólica (mmHg)	120(110-131)	130(120-140) *	122(112-135)†	130(120-145)
Presión diastólica (mmHg)	80(70-88)	80(75-90) *	80(73-90)†	83(76-90)
Glucosa (mg/dL)	88.5(82-95)	221(147.5-315.5) *	224(150-316)	220(145-312)
Colesterol total (mg/dL)	213(189-241)	203(175-237) *	202(173-237)	205(177-238)
Triglicéridos (mg/dL)	164(119-237)	233(157-373) *	231(154-370)	233.5(161-375)
Colesterol HDL (mg/dL)	44(37-51.5)	38(32-45) *	38(31-44)	38(32-45)
Colesterol LDL (mg/dL)	133(113-156.5)	111(86-138) *	110(86-139)	112(86-138)
HOMA-β (%)	109(84.6-140)	46.9(21.1-83.3) *	39.4(20.2-83.9)	48.3(22-82.6)
HOMA-S (%)	86.8(59.3-123)	60.1(40.8-91.5) *	56.1(37.9-91.1)	62.1(42.7-91.6)
HOMA-IR	1.15(0.81-1.69)	1.66(1.09-2.45) *	1.78(1.10-2.64)	1.61(1.09-3.29)

Se muestran los valores de las medianas (percentiles 25-75) de las características clínicas y metabólicas de la población de estudio. * Diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) en las comparaciones entre los sujetos controles y todos los pacientes diabéticos. † Diferencias significativas ($P<0.05$) en las comparaciones entre los diabéticos de inicio temprano (diagnosticados antes de los 45 años) y los de inicio tardío (diagnosticados a la edad de 45 años o mayor).

Por su parte en la tabla 3, se muestra la estratificación realizada por el estado de obesidad, donde se pueden observar en el subgrupo de no obesos las diferencias significativas entre los casos y controles en la edad, IMC, circunferencia de cintura, presiones sistólica y diastólica, glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL-c, LDL-c, HOMA-β, HOMA-S y HOMA-IR. Estas mismas diferencias se observaron en el subgrupo de obesos exceptuando las concentraciones plasmáticas de colesterol total. Además (tabla 3), se muestran las diferencias significativas cuando se compararon entre los casos no obesos y casos obesos, en este último grupo se observa menor número de hombres, menor edad y HOMA-IR; mientras que se observó valores mayores para IMC, circunferencia de cintura, presiones diastólica y sistólica, triglicéridos, HOMA-β y HOMA-IR (Tabla 3).

Tabla 3. Características generales de la población de estudio mediante la estratificación por la obesidad.

	No obesos		Obesos	
	Controles	Casos	Controles	Casos
Individuos (n)	692	643	298	384
Hombres (%)	42.1%	42.1%	33.9%*	25.0%†
Edad (años)	54(49-63)*	55(46-63)	52(48-59)*	51(42-59.5)†
Edad de diagnóstico (años)	-	46(36-53)	-	45(38-52)
IMC (kg/m ²)	26.2(24.5-27.7)*	26.8(24.7-28.4)	32.6(31.1-34.5)*	32.9(31.4-36.1)†
Circunferencia de cintura (cm)	89.4(84-94)*	94.1(88-101)	103(97-110)*	109(103.5-116.5)†
Presión sistólica (mmHg)	120(110-130)*	129(119-140)	126(118-140)*	130(120-145.5)†
Presión diastólica (mmHg)	80(70-84)*	80(70-90)	82(76.5-90)*	86(80-90.5)†
Glucosa (mg/dL)	87(82-93)*	226(148-318)	92(85-97)*	213.5(147-306)
Colesterol total (mg/dL)	213(189-241)*	198(174-238)	210(187-241.5)	209.5(178-236.5)
Triglicéridos (mg/dL)	153(112-226)*	224(152-351)	183(138.5-257.5)*	246(167-390)†
Colesterol HDL (mg/dL)	44(38-53)*	39(32-45)	41(35-49)*	37.5(30-44)
Colesterol LDL (mg/dL)	134(114-159)*	111(85-138)	129(111-151)*	112.5(87-139)
HOMA-β (%)	103(80.0-129)*	38.4(19.4-66.7)	126(101-166)*	61(27.3-109)†
HOMA-S (%)	96.7(70.5-133)*	75.5(52.8-123)	62.45(44.6-92.7)*	44.7(34.1-64.1)†
HOMA-IR	1.03(0.75-1.42)*	1.33(0.81-1.89)	1.60(1.08-2.25)*	2.24(1.56-2.93)†

Se muestran los valores de las medianas (percentiles 25-75) de las características clínicas y metabólicas de la población de estudio mediante la estratificación del estado de obesidad. * Diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) en las comparaciones entre controles y casos. † Diferencias significativas ($P<0.05$) en las comparaciones entre casos no obesos y casos obesos.

7.1 EVALUACIÓN DE VARIANTES COMUNES DESCRITAS EN OTRAS POBLACIONES.

En esta primera parte de este estudio investigamos el papel de las variantes genéticas comunes asociadas con DT2, las cuales fueron descritas y replicadas en otras poblaciones entre los años 2007 y 2008.

7.1.1 Distribución de las frecuencias alélicas de los SNPs evaluados.

En esta parte del estudio se evaluaron 24 variantes genéticas cerca o dentro de los siguientes 21 genes (tabla 4): *KCNJ11* (rs5219), *PPARG* (rs1801282), *TCF7L2* (rs7903146), *SLC30A8* (rs13266634), *HHEX/KIF1/IDE* (rs1111875 y rs7923837), *CDKN2A/2B* (rs10811661), *CDKAL1* (rs7754840 y rs10484634), *IGF2BP2* (rs1470579 y rs4402960), *ARHGEF11* (rs945508), *JAZF1* (rs864745), *CDC123/CAMK1D* (rs12779790), *FTO* (rs8050136), *THADA* (rs7578597), *TSPAN8* (rs7961581), *KCNQ1* (rs2237892), *ADAMTS9* (rs4607103), *NOTCH2* (rs10923931), *NXPH1* (rs757705), *RORA* (rs7164773), *UBQLNL* (rs979752), y *RALGPS2* (rs2773080). Todas estas variantes genéticas mostraron una proporción de genotipificación mayor al 95% y no se observaron genotipos discordantes, sin embargo, solo 21 SNPs fueron usados para los análisis de asociación. Por lo que tres SNPs no fueron tomados en cuenta debido a que las variantes rs10484634 (*CDKAL1*) y rs7578597 (*THADA*) tuvieron una frecuencia del alelo de riesgo menor a 0.05, y el SNP rs1470579 (*IGF2BP2*) no alcanzó el equilibrio de Hardy-Weinberg en los sujetos control. Afortunadamente, esta última variante (rs1470579) se encontró en LD con la variante rs1470579 del mismo gen ($r^2=0.89$). En el caso del gen *HHEX* las variantes rs1111875 y rs7923837 no estuvieron en LD ($r^2=0.099$). En la tabla 4 se muestran las frecuencias de los alelos de riesgo de las 24 variantes genéticas evaluadas en los casos y controles, además de los subgrupos de acuerdo a la estratificación hecha por edad de diagnóstico de la DT2 y por estado de obesidad. Adicionalmente, se observan las frecuencias de los alelos de riesgo reportadas en la población europea y las diferencias significativas ($P<0.05$) con respecto a las encontradas en este estudio.

7.1.2 Análisis de asociación al rasgo de DT2 y el efecto de la estratificación de la población.

En esta población de estudio fue posible tener disponible la información de los marcadores de ancestría en 1372 de los 2017 sujetos de estudio. Con esta información la ancestría amerindia se estimó tanto en los sujetos diabéticos (58.9%) como en los sujetos controles (51.1%) observándose diferencias significativas mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($P<0.01$). Debido a que no se contó con la información de la ancestría en todos los sujetos de estudio, los análisis de asociación iniciales se llevaron a cabo en los 1372 sujetos. Para estos 1372 sujetos, se realizaron dos modelos de regresión logística. Para el primer modelo se ajustó adicionalmente por la ancestría amerindia, edad, sexo e IMC mientras que para el segundo modelo se ajustó por edad, sexo e IMC, pero no se ajustó por la ancestría amerindia, como se describe en material y métodos. Se compararon los resultados de estos dos modelos por cada uno de las variantes genéticas y se logró identificar 12 SNPs en donde la razón de momios o el valor de P nominal se afectaron drásticamente (un cambio de más del 10%) debido al ajuste de la ancestría amerindia (tabla 5). Debido a esto, nosotros reportamos las asociaciones de estas variantes genéticas con DT2 en la muestra que contenía solo los datos de ancestría (1372 sujetos). Por su parte, los restantes 9 SNPs no resultaron afectados por el ajuste de la ancestría, por lo cual para estas variantes tomamos en cuenta a la población total (2017 sujetos) para los análisis de asociación y sin ajustar el modelo por la ancestría amerindia.

Tabla 4. Distribución de la frecuencia de los alelos de riesgo de los 21 SNPs estudiados en la población Mexicana con sus grupos estratificados, y la comparación con los europeos.

Gen más cercano	Cro	SNP	RA	Frecuencia del Alelo de Riesgo									
				Controles	Casos totales	Inicio temprano	Inicio tardío	No obesos		Obesos		Europeos*	
								Controles	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos
<i>KCNJ11</i>	11	rs5219	T	0.373	0.396	0.399	0.393	0.374	0.408	0.371	0.375	0.464†	0.489‡
<i>PPARG</i>	3	rs1801282	C	0.868	0.877	0.876	0.877	0.866	0.875	0.872	0.879	0.823	0.848
<i>TCF7L2</i>	10	rs7903146	T	0.163	0.172	0.180	0.163	0.170	0.171	0.149	0.172	0.181	0.227‡
<i>SLC30A8</i>	8	rs13266634	C	0.729	0.770	0.788	0.752	0.726	0.769	0.736	0.770	0.609†	0.649‡
<i>HHEX</i>	10	rs1111875	C	0.623	0.626	0.626	0.626	0.620	0.621	0.628	0.635	0.522†	0.546‡
		rs7923837	G	0.455	0.485	0.458	0.512	0.452	0.500	0.464	0.461	0.597†	0.622‡
<i>CDKN2A/2B</i>	9	rs10811661	T	0.877	0.911	0.913	0.909	0.880	0.912	0.871	0.909	0.850†	0.872‡
<i>CDKAL1</i>	6	rs7754840	C	0.285	0.313	0.326	0.300	0.275	0.326	0.307	0.293	0.360†	0.387‡
		rs10484634	T	0.974	0.980	0.978	0.980	0.979	0.980	0.964	0.980	-	-
<i>IGF2BP2</i>	3	rs4402960	T	0.191	0.213	0.199	0.227	0.197	0.213	0.177	0.213	0.304†	0.341‡
		rs1470579	C	0.190	0.213	0.203	0.222	0.192	0.213	0.185	0.213	0.30	0.32
<i>ARHGEF11</i>	1	rs945508	A	0.252	0.233	0.225	0.241	0.259	0.217	0.236	0.260	0.460†	-
<i>JAZF1</i>	7	rs864745	T	0.660	0.679	0.692	0.666	0.661	0.687	0.660	0.666	0.501†	-
<i>CDC123/ CAMK1D</i>	10	rs12779790	G	0.161	0.197	0.213	0.182	0.161	0.202	0.161	0.188	0.183	-
<i>FTO</i>	16	rs8050136	A	0.200	0.194	0.192	0.197	0.190	0.182	0.223	0.217	0.381†	0.406‡
<i>TSPAN8/ LGR5</i>	12	rs7961581	C	0.125	0.132	0.132	0.132	0.133	0.139	0.108	0.120	0.269†	-
<i>THADA</i>	2	rs7578597	T	0.959	0.964	0.971	0.957	0.958	0.963	0.961	0.965	0.90	-
<i>KCNQ1</i>	11	rs2237892	C	0.663	0.720	0.723	0.717	0.669	0.721	0.650	0.719	0.930†	-
<i>ADAMTS9</i>	3	rs4607103	C	0.697	0.710	0.720	0.701	0.688	0.706	0.715	0.718	0.761†	-
<i>NOTCH2</i>	1	rs10923931	T	0.078	0.081	0.083	0.079	0.081	0.079	0.073	0.084	0.106†	-
<i>NXPH1</i>	7	rs757705	G	0.654	0.684	0.694	0.674	0.658	0.689	0.643	0.674	-	-
<i>RORA</i>	15	rs7164773	T	0.625	0.641	0.642	0.639	0.627	0.647	0.621	0.630	-	-
<i>UBQLNL</i>	11	rs979752	C	0.854	0.850	0.853	0.847	0.848	0.855	0.869	0.840	-	-
<i>RALGPS2</i>	1	rs2773080	A	0.197	0.193	0.181	0.205	0.199	0.196	0.194	0.188	-	-

Cro= Cromosoma, AR= Alelo de riesgo que se definió de acuerdo a los estudios previos realizados en otras poblaciones. En negritas se encuentran los SNPs que no fueron considerados en los análisis de asociación debido a que rs10484634 y rs7578597 tuvieron una frecuencia del AR<0.05 y rs1470579 no estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control. * Frecuencias del AR reportados en las poblaciones de origen europeo. † Diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de las frecuencias del AR entre los controles de este estudio y los controles reportados en europeos. ‡ Diferencias estadísticamente significativas entre los casos de este estudio y los casos reportados en europeos.

Tabla 5. Análisis de asociación con DT2 en la población mexicana y el efecto confusor de la ancestría amerindia.

Gen mas cercano	SNP	AR	868 casos and 504 controles ajustados por ancestría		868 casos and 504 controles sin la corrección de la ancestría		1027 casos and 990 controles sin la corrección de la ancestría	
			OR(95%CI)*	P	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P
<i>KCNJ11</i>	rs5219	T	1.16 (0.97-1.37)	0.099	1.17 (0.98-1.38)	0.076	1.10(0.96-1.26)	0.154
<i>PPARG</i>	rs1801282	C	1.19(0.92-1.55)	0.180	1.08(0.84-1.39)	0.524	1.10(0.90-1.34)	0.342
<i>TCF7L2</i>	rs7903146	T	1.21(0.97-1.51)	0.087	1.04(0.84-1.28)	0.735	-	-
<i>SLC30A8</i>	rs13266634	C	1.21 (1.01-1.46)	0.040	1.22 (1.02-1.46)	0.034	1.22(1.05-1.41)	0.009
<i>HHEX</i>	rs1111875	C	0.95 (0.80-1.12)	0.554	0.93 (0.79-1.10)	0.384	1.01(0.89-1.16)	0.859
	rs7923837	G	1.21 (1.02-1.44)	0.025	1.10 (0.94-1.30)	0.238	-	-
<i>CDKN2A/2B</i>	rs10811661	T	1.47 (1.14-1.89)	0.003	1.59 (1.24-2.04)	<0.001	1.42(1.15-1.75)	0.001
<i>CDKAL1</i>	rs7754840	C	1.16 (0.97-1.38)	0.104	1.14 (0.96-1.35)	0.148	1.13(0.98-1.30)	0.081
<i>IGF2BP2</i>	rs4402960	T	1.24 (1.01-1.53)	0.042	1.12 (0.92-1.37)	0.265	-	-
<i>ARHGEF11</i>	rs945508	A	1.05 (0.87-1.28)	0.604	0.91 (0.76-1.09)	0.319	-	-
<i>JAZF1</i>	rs864745	T	1.11 (0.93-1.32)	0.253	1.24 (1.04-1.47)	0.015	-	-
<i>CDC123/CAMK1D</i>	rs12779790	G	1.26 (1.02-1.58)	0.036	1.25 (1.01-1.55)	0.042	1.24(1.05-1.47)	0.013
<i>FTO</i>	rs8050136	A	1.03(0.84-1.26)	0.762	0.90(0.74-1.09)	0.278	-	-
<i>TSPAN/LGR5</i>	rs7961581	C	1.15 (0.90-1.47)	0.252	0.93 (0.73-1.17)	0.516	-	-
<i>KCNQ1</i>	rs2237892	C	1.36(1.13-1.64)	0.001	1.18(0.99-1.42)	0.062	-	-
<i>ADAMTS9</i>	rs4607103	C	1.01 (0.84-1.20)	0.952	1.03 (0.87-1.23)	0.726	1.05(0.91-1.20)	0.521
<i>NOTCH2</i>	rs10923931	T	1.05 (0.78-1.42)	0.752	0.99 (0.73-1.33)	0.931	1.04(0.82-1.32)	0.731
<i>NXPH1</i>	rs757705	G	1.17 (0.98-1.39)	0.080	1.25 (1.05-1.48)	0.010	-	-
<i>RORA</i>	rs7164773	T	0.95 (0.80-1.38)	0.600	1.08 (0.91-1.28)	0.357	-	-
<i>UBQLNL</i>	rs979752	C	0.88 (0.70-1.11)	0.290	1.04 (0.84-1.30)	0.700	-	-
<i>RALGPS2</i>	rs2773080	A	1.03 (0.84-1.28)	0.760	0.90 (0.74-1.10)	0.315	-	-

OR= Razón de momios, AR= Alelo de riesgo, IMC= Índice de masa corporal, P = Valores nominales de P. Todos los análisis se llevaron a cabo bajo un modelo genético aditivo, y los modelos de regresión logística se ajustaron por edad, sexo e IMC. *Los modelos de regresión logística también fueron ajustados por la ancestría amerindia. En negrita se observan las asociaciones significativas de las variantes genéticas con DT2.

Como se observa en la tabla 5 encontramos asociaciones entre DT2 y las variantes rs7923837 de *HHEX* (OR=1.21, $P=0.025$), rs4402960 de *IGF2BP2* (OR=1.24, $P=0.042$) y rs2237892 de *KCNQ1* (OR=1.36, $P=0.001$) con el ajuste de la ancestría amerindia. Por otro lado, cuando la ancestría no afectó los análisis, se tomó en cuenta a toda la población evidenciando las asociaciones entre DT2 y las variantes rs13266634 de *SLC30A8* (OR=1.22, $P=0.009$), rs10811661 de *CDKN2A/2B* (OR=1.42, $P=0.001$) y rs12779790 de *CDC123/CAMK1D* (OR=1.24, $P=0.013$). Los 15 SNPs restantes de los genes *KCNJ11* (rs5219), *PPARG* (rs1801282), *TCF7L2* (rs7903146), *HHEX/KIF1/IDE* (rs1111875), *CDKAL1* (rs7754840), *ARHGEF11* (rs945508), *JAZF1* (rs864745), *FTO* (rs8050136), *TSPAN8* (rs7961581), *ADAMTS9* (rs4607103), *NOTCH2* (rs10923931), *NXPH1* (rs757705), *RORA* (rs7164773), *UBQLNL* (rs979752), y *RALGPS2* (rs2773080) no se asociaron con DT2 en la población mexicana.

Tabla 6. Análisis de asociación con DT2 en la población mestiza mexicana de acuerdo a la edad de inicio de la DT2.

Gen mas cercano	SNP	Inicio temprano		Inicio tardío		Prueba Woolf
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	
<i>KCNJ11</i>	rs5219*	1.12(0.93-1.34)	0.233	1.13(0.96-1.34)	0.153	0.94
<i>PPARG</i>	rs1801282*	1.12(0.86-1.47)	0.394	1.07(0.83-1.37)	0.602	0.81
<i>TCF7L2</i>	rs7903146†	1.39(1.04-1.85)	0.024	1.13(0.86-1.48)	0.376	0.43
<i>SLC30A8</i>	rs13266634*	1.39(1.13-1.72)	0.002	1.18(0.98-1.42)	0.075	0.25
<i>HHEX</i>	rs1111875*	0.99(0.82-1.19)	0.913	1.02(0.87-1.21)	0.793	0.81
	rs7923837†	1.07(0.85-1.34)	0.567	1.22(0.99-1.50)	0.062	0.41
<i>CDKN2A/2B</i>	rs10811661*	1.46(1.10-1.95)	0.009	1.45(1.11-1.88)	0.006	0.97
<i>CDKAL1</i>	rs7754840*	1.11(0.92-1.34)	0.290	1.07(0.90-1.27)	0.435	0.78
<i>IGF2BP2</i>	rs4402960†	1.04(0.79-1.37)	0.768	1.35(1.05-1.74)	0.019	0.17
<i>ARHGEF11</i>	rs945508†	1.12(0.88-1.44)	0.354	1.00(0.79-1.28)	0.974	0.37
<i>JAZF1</i>	rs864745†	1.20(0.94-1.52)	0.143	1.03(0.83-1.29)	0.790	0.94
<i>CDC123/CAMK1D</i>	rs12779790*	1.33(1.05-1.68)	0.017	1.15(0.93-1.43)	0.194	0.37
<i>FTO</i>	rs8050136†	1.07(0.82-1.39)	0.642	0.95(0.74-1.23)	0.704	0.53
<i>TSPAN8/LGR5</i>	rs7961581†	1.00(0.72-1.39)	0.994	1.27(0.94-1.72)	0.116	0.48
<i>KCNQ1</i>	rs2237892†	1.27(0.99-1.62)	0.051	1.37(1.09-1.74)	0.008	0.43
<i>ADAMTS9</i>	rs4607103*	1.07(0.88-1.29)	0.516	1.02(0.86-1.22)	0.809	0.96
<i>NOTCH2</i>	rs10923931*	1.19(0.85-1.66)	0.303	0.99(0.73-1.33)	0.949	0.42
<i>NXPH1</i>	rs757705†	1.22(0.96-1.54)	0.106	1.17(0.94-1.45)	0.163	0.81
<i>RORA</i>	rs7164773†	0.98(0.78-1.24)	0.880	1.05(0.84-1.31)	0.674	0.77
<i>UBQLNL</i>	rs979752†	0.91(0.67-1.24)	0.568	0.94(0.71-1.24)	0.648	0.45
<i>RALGPS2</i>	rs2773080†	0.94(0.71-1.25)	0.680	1.04(0.80-1.34)	0.795	0.41

OR= Razón de momios, AR= Alelo de riesgo, IMC= Índice de masa corporal, P = Valores nominales de P. Las observaciones estadísticamente significativas se encuentran en negritas. * Todos los análisis se llevaron a cabo bajo un modelo genético aditivo, y los modelos de regresión logística se ajustaron por edad, sexo e IMC. † Los modelos de regresión logística también se ajustaron por la ancestría amerindia.

7.1.3 Análisis de Asociación con DT2 en subgrupos con distintos fenotipos.

En las tablas 6 y 7 se muestran los análisis de asociación cuando la población de estudio se estratificó en diferentes subgrupos de acuerdo a la edad de inicio de la DT2 (tabla 6) y por estado de obesidad (tabla 7). De forma interesante, la variante rs7903146 del gen *TCF7L2* se asoció solo con DT2 de inicio temprano (OR = 1.39, $P= 0.024$), mientras que la variante rs7754840 del gen *CDKAL1* se asoció con DT2 en el subgrupo de no obesos (OR = 1.25, $P = 0.009$), aun cuando ninguna de las dos variantes se asoció con DT2 en la población completa. Para los subgrupos con distintos fenotipos (edad de inicio y estado de obesidad) se realizaron pruebas de heterogeneidad a través de la prueba de Woolf. Para la edad de inicio de la DT2, la prueba de heterogeneidad realizada entre los subgrupos, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) (tabla 6). Por su parte entre los subgrupos de obesos y no obesos se logró evidenciar una diferencia significativa exclusivamente para la variante rs7754840 del gen *CDKAL1* ($P=0.04$) (tabla 7).

Tabla 7. Análisis de asociación con DT2 en la población mestiza mexicana de acuerdo al estado de obesidad.

Gen mas cercano	SNP	No obesos		Obesos		Prueba Woolf
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	
<i>KCNJ11</i>	rs5219*	1.14(0.97-1.34)	0.119	1.01(0.80-1.28)	0.923	0.43
<i>PPARG</i>	rs1801282*	1.12(0.88-1.43)	0.361	1.04(0.74-1.48)	0.811	0.98
<i>TCF7L2</i>	rs7903146†	1.30(0.99-1.70)	0.060	1.13(0.77-1.64)	0.539	0.36
<i>SLC30A8</i>	rs13266634*	1.23(1.02-1.48)	0.027	1.23(0.95-1.59)	0.110	0.76
<i>HHEX</i>	rs1111875*	1.00(0.85-1.18)	0.997	1.04(0.83-1.32)	0.715	0.81
	rs7923837†	1.37(1.11-1.70)	0.003	0.92(0.72-1.31)	0.850	0.16
<i>CDKN2A/2B</i>	rs10811661*	1.38(1.07-1.78)	0.013	1.49(1.03-2.14)	0.033	0.81
<i>CDKAL1</i>	rs7754840*	1.25(1.06-1.49)	0.009	0.90(0.71-1.15)	0.392	0.04
<i>IGF2BP2</i>	rs4402960†	1.23(0.95-1.58)	0.114	1.30(0.89-1.91)	0.188	0.59
<i>ARHGEF11</i>	rs945508†	0.95(0.75-1.21)	0.696	1.28(0.91-1.81)	0.154	0.06
<i>JAZF1</i>	rs864745†	1.13(0.91-1.41)	0.261	1.06(0.77-1.45)	0.724	0.55
<i>CDC123/ CAMK1D</i>	rs12779790*	1.29(1.05-1.59)	0.015	1.16(0.85-1.58)	0.351	0.67
<i>FTO</i>	rs8050136†	1.07(0.83-1.38)	0.625	0.95(0.68-1.34)	0.787	0.96
<i>TSPAN8/ LGR5</i>	rs7961581†	1.14(0.85-1.52)	0.393	1.23(0.77-1.96)	0.392	0.19
<i>KCNQ1</i>	rs2237892†	1.37(1.09-1.73)	0.007	1.39(1.01-1.91)	0.046	0.73
<i>ADAMTS9</i>	rs4607103*	1.08(0.91-1.28)	0.374	0.99(0.78-1.28)	0.977	0.62
<i>NOTCH2</i>	rs10923931*	1.00(0.75-1.33)	0.980	1.12(0.73-1.71)	0.616	0.62
<i>NXPH1</i>	rs757705†	1.20(0.97-1.49)	0.090	1.09(0.80-1.49)	0.571	0.53
<i>RORA</i>	rs7164773†	0.94(0.76-1.17)	0.584	0.97(0.72-1.31)	0.859	0.80
<i>UBQLNL</i>	rs979752†	0.91(0.69-1.21)	0.523	0.80(0.54-1.20)	0.287	0.34
<i>RALGPS2</i>	rs2773080†	1.18(0.91-1.52)	0.222	0.81(0.56-1.17)	0.254	0.27

OR= Razón de momios, AR= Alelo de riesgo, IMC= Índice de masa corporal, P = Valores nominales de P. Las observaciones significativas se encuentran en negritas. * Los análisis se llevaron a cabo bajo un modelo genético aditivo, y los modelos de regresión logística se ajustaron por edad, sexo e IMC. † Los modelos de regresión logística también se ajustaron por la ancestría amerindia.

Adicionalmente, como se muestra en las tablas 6 y 7, de los 6 SNPs asociados con DT2 en la población completa, solo 2 variantes en los genes *CDKN2A/2B* (rs10811661) y *KCNQ1* (rs2237892) se asociaron con DT2 en los 4 subgrupos evaluados. Por su parte, las variantes rs13266634 (*SLC30A8*) y rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*) se asociaron con DT2 en los subgrupos de inicio temprano y en el de no obesos. Interesantemente la variante rs7923837 (*HHEX*) se asoció solo en el grupo de no obesos, mientras que el SNP rs4402960 (*IGF2BP2*) se asoció exclusivamente en el subgrupo de inicio tardío.

7.1.4 Análisis de asociación con obesidad y con rasgos cuantitativos.

De la misma manera en la que se realizaron los análisis de asociación con DT2 y el papel confusor de la ancestría amerindia, este mismo análisis se realizó en la evaluación de los SNPs y su asociación con la obesidad. En este aspecto, el efecto confusor de la ancestría amerindia no se observó en ninguna de las variantes genéticas evaluadas, por lo que se tomó en cuenta a toda la población para su estudio (n=2017). La variante genética rs8050136 (*FTO*) fue la única que se asoció con obesidad (OR = 1.25, $P = 0.009$) por lo que el resto de los SNPs no participan en el riesgo a obesidad en la población mexicana.

Adicionalmente, en los sujetos controles, realizamos los análisis de asociación de los SNPs con los rasgos cuantitativos relacionados con la DT2, como concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, los HOMAs, entre otros. Los sujetos normoglucémicos, portadores del alelo de riesgo (CT+TT) de la variante rs7903146 (*TCF7L2*) tienen una disminución de 11.06 unidades del HOMA- β con respecto a quienes no lo contienen (CC). Los valores promedios de HOMA- β son de 109.6 (95% CI 104.1-115.2) y 121.8 (95% CI 116.9-126.6), respectivamente y con una significancia estadística de $P=0.015$. De igual forma, la variante rs8050136 (*FTO*) también se asoció significativamente con niveles bajos de HOMA- β ($P=0.014$), donde los portadores del alelo de riesgo (CA+AA) tuvieron valores de 121.6 (116.5-126.7) y los valores de quienes no lo portan (CC) fue de 109.8 (104.6-115.0). Para el resto de los rasgos cuantitativos relacionados con la DT2 y los demás SNPs, no se observaron diferencias significativas en los análisis de asociación.

7.1.5 Evaluación del Efecto Acumulado de los SNPs Estudiados.

Para evaluar el riesgo combinado que conforman el portar los alelos de riesgo de las variantes genéticas evaluadas se realizaron 3 puntajes de genotipo. Se determinó primero la puntuación del genotipo que incluyó todos los 21 SNPs (que van de 10 a 30 alelos de riesgo) evaluados en este estudio. La media (SD \pm) de la puntuación del genotipo fue 19.4 \pm 2.7 para los controles y 19.9 \pm 2,9 para los casos. Además, en un modelo de regresión logística ajustado por edad, sexo, IMC, y la ancestría amerindia, se obtuvo un OR de 1,09 (IC 95% 1.4 a 1.14) con una significancia estadística de $P<0.01$. Para el segundo puntaje de genotipo, se incluyeron 17 SNPs (que van del 7 al 24 alelos de riesgo) excluyendo las variantes de la población mexicano-americana (*NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL*, y *RALGPS2*), obteniéndose un OR de 1.11 (1.6 a 1.17, $P<0.01$). Finalmente, se realizó la tercera puntuación de genotipo (que van de 2 a 13 alelos de riesgo) donde se excluyeron de estos 17 SNPs las 8 variantes asociadas significativamente con DT2 (rs7903146 de *TCF7L2*, rs13266634 de *SLC30A8*, rs7923837 de *HHEX*, rs4402960 de *IGF2BP2*, rs10811661 de *CDKN2A/2B*, rs7754840 de *CDKAL1*, rs12779790 de *CDC123/CAMK1D* y rs2237892 de *KCNQ1*), donde no se obtuvo una significancia estadística ($P = 0.45$) y el OR obtenido fue de 1,03 (0,95 a 1.12), indicando que los 8 SNPs son determinantes en el riesgo acumulado.

Tabla 8. Comparación de los efectos entre los análisis de asociación reportados en europeos y los obtenidos en la población mexicana.

SNP	Gen mas Cercano	Población Mexicana		Reportado en Europeos	Prueba de Heterogeneidad	Poder Estadístico (%)
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)		
rs7903146	<i>TCF7L2</i>	1.39(1.04-1.85)	0.024	1.37(1.31-1.43)	0.92	96.81
rs13266634	<i>SLC30A8</i>	1.22(1.05-1.41)	0.009	1.12(1.07-1.16)	0.26	35.36
rs7923837	<i>HHEX</i>	1.21(1.02-1.44)	0.025	1.22(1.01-1.43)	0.95	88.23
rs10811661	<i>CDKN2A/2B</i>	1.42(1.15-1.75)	0.001	1.20(1.14-1.25)	0.12	45.76
rs7754840	<i>CDKAL1</i>	1.25(1.06-1.49)	0.009	1.12(1.08-1.16)	0.23	37.36
rs4402960	<i>IGF2BP2</i>	1.24 (1.01-1.53)	0.042	1.14(1.11-1.18)	0.44	38.13
rs12779790	<i>CDC123/CAMK1D</i>	1.24(1.05-1.47)	0.013	1.11(1.07-1.14)	0.21	23.42
rs2237892	<i>KCNQ1</i>	1.36(1.13-1.64)	0.001	1.42 (1.34–1.49)	0.62	99.92
				1.43(1.34-1.52)*	0.66	

OR= Razón de momios, P = Valores nominales de P. * Razón de Momios en población asiática. Se comparan las razones de momios entre las poblaciones europea y la mexicana. Se mide la heterogeneidad de ambos resultados mediante la prueba de Woolf y se muestra el poder estadístico de la asociación en la población mexicana.

Para aquellas variantes genéticas que mostraron asociación con DT2 en nuestra población de estudio, nosotros comparamos los efectos entre los reportados en europeos y los mexicanos mostrados en este estudio (Tabla 8). En el caso de la variante de *KCNQ1*, la comparación se hizo con la población asiática, donde inicialmente se reportó su asociación con DT2 [264]. Como se muestra en la tabla 8, mediante una prueba de heterogeneidad no observamos diferencias significativas en la variabilidad de los resultados entre estos estudios. Finalmente, se calculó el poder estadístico de nuestros análisis de asociación en las variantes genéticas que se asociaron con DT2 en este estudio, tomando en cuenta la prevalencia de diabetes en la población mexicana (14.42%), la frecuencia del alelo de riesgo encontrada en este estudio y la razón de momios reportada en los primeros estudios de la población europea y asiática (tabla 8).

7.2 BÚSQUEDA DIRIGIDA DE VARIANTES EN GENES RELACIONADOS A LA LIPOTOXICIDAD.

7.2.1 Secuenciación del Gen Candidato LXR-β

En esta segunda parte del estudio se secuenció parcialmente del gen candidato *LXR-β*, que implicó a los exones 1 a 6, el exón 9, y la región promotora del gen. Para los exones 1 a 3, 5 y 9 se secuenciaron en 10 sujetos normoglucémicos y en 10 pacientes diabéticos en los cuales no se encontró ninguna variante genética. Por su parte, el exón 4 fue secuenciado en los mismos 10 casos y 10 controles, y en un sujeto normoglucémico se encontró una variante nueva que no ha sido reportada, con un cambio de base (C/T) en forma heterocigota en la base 380 del cDNA, lo cual implica una variante no sinónima (Pro35Leu) (figura 9).

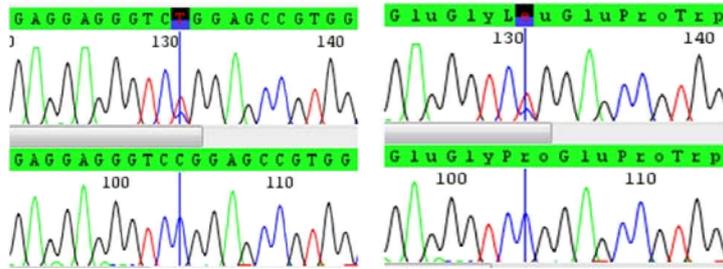


Figura 9. Electroferograma de la secuencia del exón 4 *LXR-β*. En la figura de la izquierda se observa parte de la secuencia del exón 4 del gen de *LXR-β* donde se logra observar la variante heterocigota (C/T) y homocigota (CC) encontradas en los sujetos secuenciados para el exón 4. Este cambio de base produce un cambio no sinónimo de Pro35Leu que se observa en la figura de la derecha

A través del programa bioinformático *Polyphen* se realizó un análisis de predicción del probable impacto de la sustitución de Prolina por Leucina en la posición 35 de la proteína codificada por el gen *LXR-β*. Este análisis predijo que la variante no sinónima Pro35Leu es benigna para la estructura y función del factor de transcripción *LXR-β*. El hecho de que esta nueva variante se prediga como benigna, es consistente con su hallazgo en un sujeto normoglucémico. Adicionalmente, se realizaron análisis de asociación genética preliminares de Pro35Leu con la DT2 y rasgos cuantitativos relacionados a esta enfermedad no encontrándose ninguna evidencia de asociación, por lo cual no se estudió en toda la población de estudio (tabla 9).

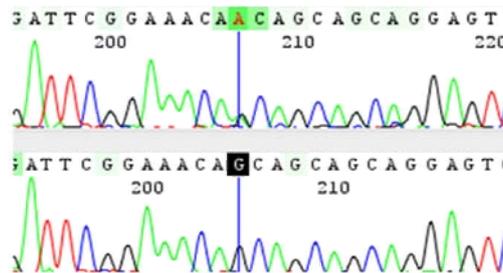


Figura 10. Electroferograma de la secuencia del exón 6 *LXR-β*. En esta figura se observa parte de la secuencia del exón 6 del gen *LXR-β* donde se observa la variante sinónima rs34296657 en forma heterocigota (G/A) y homocigota para G.

El exón 6 se secuenció en 26 sujetos normoglucémicos y en 17 pacientes diabéticos, en los cuales se logró determinar la existencia de la variante genética ya reportada rs34296657 (Figura 10). La frecuencia del alelo menor en los controles fue de 0.481, mientras que en los casos fue mayor (0.531), sin embargo, los análisis de asociación genética preliminares no evidenciaron ninguna relación de esta variante con la enfermedad o alguno de sus rasgos cuantitativos relacionados (tabla 9), además de que no existen reportes sobre esta variante, fueron las razones principales por las cuales no se estudió en toda la población.

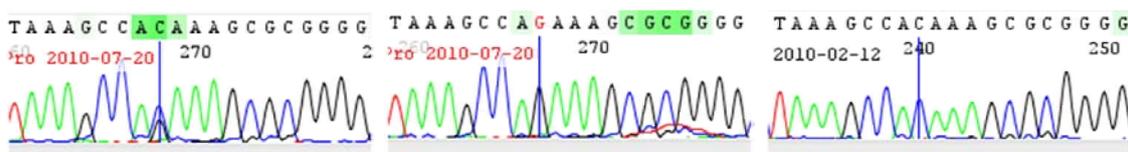


Figura 11. Electroferograma de la secuencia de la región promotora de *LXR-β*. En la figura se observa parte de la secuencia del promotor del gen *LXR-β* de 3 sujetos. Se muestra la variante promotora rs17373080 en sus 3 genotipos: homocigoto para C, homocigoto para G y heterocigoto (C/G).

Tabla 9. Análisis de secuenciación de la región promotora y codificante del gen *LXR-β*.

Gen	Región	Secuencias		Variante	Alelos	Alelo Menor	Frecuencia Alelo Menor		Asociación a TG	
		Controles	Casos				Controles	Casos	β	(P)
LXR-β	Exones 1-3, 5 y 9	10	10	Ninguna	-	-	-	-	-	-
	Exón 4	10	10	Pro35Leu	C/T	T	0.05	1.0	-37.05	0.794
	Exón 6	26	17	rs34296657	-A/G	A	0.481	0.531	68.06	0.075
	Promotor	53	56	rs17373080	C/G	G	0.472	0.455	-51.31	0.004

β = coeficiente beta. *P* = valores nominales de *P*. Modelos de regresión lineal ajustados por edad, sexo e IMC. Las asociaciones estadísticamente significativas se indican en negritas.

Finalmente, la región promotora fue secuenciada en 53 controles y 56 casos, evidenciando la presencia de la variante rs17373080 ya reportada (figura 11). La frecuencia del alelo menor (G) fue de 0.472 en el primer grupo y 0.455 en los diabéticos (tabla 9). Adicionalmente, se observó una asociación de esta variante con altas concentraciones plasmáticas de triglicéridos con gran significancia estadística ($P=0.004$) y por ello se decidió estudiarla en toda la población de estudio.

Tabla 10. Análisis de asociación de la variante rs17373080 del gen *LXR-β* con DT2.

Gen	SNP	Alelo de Riesgo	Grupo	Análisis con los sujetos que tienen el dato de Ancestría			
				Ajustado por 104 AIMS		Sin ajustar por Ancestría	
				OR(95%CI)	<i>P</i>	OR(95%CI)	<i>P</i>
LXR-β	rs17373080	C	Totales	1.19(0.99-1.44)	0.067	1.10(0.92-1.33)	0.298
			Tempranos	1.33(1.03-1.70)	0.027	1.24(0.97-1.59)	0.082
			Tardíos	1.12(0.87-1.43)	0.374	1.03(0.81-1.30)	0.839
			No obesos	1.27(1.00-1.61)	0.050	1.12(0.90-1.41)	0.318
			Obesos	1.05(0.76-1.45)	0.768	1.03(0.75-1.42)	0.847

OR= Razón de momios, *P* = Valores nominales de *P*. Todos los análisis se llevaron a cabo bajo un modelo genético aditivo, y los modelos de regresión logística se ajustaron por edad, sexo e IMC, y donde se indica por ancestría amerindia. En negrita se observan las asociaciones significativas de las variantes genéticas con DT2.

7.2.2 Análisis de Asociación de las Variantes de Interés de los Genes Candidato

Con el objetivo de evaluar el riesgo que confiere la variante rs17373080 del gen *LXR-β* identificada a través de secuenciación dirigida, se realizó la genotipificación de dicha variante en toda la población de estudio disponible (1602 sujetos). Al igual que las variantes evaluadas en la primera parte del estudio, se realizaron dos modelos de asociación donde se tomó en cuenta el ajuste por ancestría (primer modelo) y donde no se ajustó por esta variable (modelo 2). El ajuste por ancestría modificó drásticamente el valor de *P* por lo que el modelo de regresión logística con el ajuste de ancestría fue tomado en cuenta. En la tabla 10 se observa la que la variante rs17373080 no se asoció con DT2 en toda la población, sin embargo, cuando se estratificó la muestra se evidenció la asociación con DT2 en los subgrupos de diabéticos de inicio temprano (OR=1.33; $P=0.027$) y en los no obesos (OR=1.27; $P=0.050$).

Tabla 11. Análisis de asociación de la variante rs9282541 del gen *ABCA1* con DT2, obesidad y HDL.

Tabla 7.9. Análisis de asociación de la variante rs9282541 del gen *ABCA1* con DT2, obesidad y HDL.

Rasgo	Grupo	Ajustado por 104 AIMS		Sin ajustar por Ancestría		Población completa	
		OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P
DT2	Totales	0.96(0.74-1.26)	0.776	1.14(0.88-1.47)	0.326	-	-
	Tempranos	1.12(0.81-1.56)	0.493	1.31(0.95-1.80)	0.104	-	-
	Tardíos	0.88(0.63-1.24)	0.471	1.04(0.75-1.44)	0.801	-	-
	No obesos	1.00(0.71-1.42)	0.992	1.24(0.88-1.73)	0.214	-	-
	Obesos	0.90(0.59-1.37)	0.621	0.97(0.64-1.46)	0.868	-	-
Obesidad	Totales	1.52(1.18-1.97)	0.001	1.49(1.16-1.92)	0.002	1.30(1.05-1.61)	0.018
HDL-c	Totales	-2.24(-3.43, -0.44)	0.011	-2.21(-3.69, -0.74)	0.003	-2.35(-3.53, -1.18)	<0.001

OR= Razón de momios, P = Valores nominales de P. Todos los análisis se llevaron a cabo bajo un modelo genético aditivo, y los modelos de regresión logística se ajustaron por edad, sexo e IMC, y donde se indica por ancestría amerindia. En negrita se observan las asociaciones significativas de las variantes genéticas con DT2.

Adicionalmente decidimos analizar la asociación de la variante R230C (rs9282541) del gen *ABCA1* con DT2 debido a que no se ha replicado su asociación con rasgos metabólicos consistentemente. Inicialmente evaluamos el efecto de la ancestría en los análisis de asociación y como se observa en la tabla 11 la razón de momios cambió drásticamente los resultados de la asociación. La misma tabla nos muestra que en nuestra población de estudio la variante R230C no se asocia con DT2. Sin embargo, también evaluamos su participación en otros rasgos metabólicos y evidenciamos la asociación de R230C con obesidad (OR=1.52; $P=0.001$) y sobre todo logramos replicar la asociación con bajas concentraciones plasmáticas del colesterol HDL (-2.35; $P<0.001$) donde la ancestría no tuvo efecto en las asociaciones de estos rasgos.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 EVALUACIÓN DE VARIANTES COMUNES DESCRITAS EN OTRAS POBLACIONES

En la primera parte de este proyecto tuvimos como objetivo el conocer si en la población mestiza mexicana, las variantes genéticas comunes asociadas con DT2 y descritas en los primeros GWAS de poblaciones europeas, podrían ser replicadas en la población mestiza mexicana debido a que su composición étnica tiene un origen europeo y amerindio. Nosotros evaluamos la posible asociación con la DT2 en los mestizos mexicanos de 21 SNPs de riesgo para DT2, previamente identificadas en poblaciones europeas. Aunque en nuestra población de estudio, el componente europeo de los sujetos diabéticos es de alrededor del 40%, no todos los alelos que confieren riesgo a DT2 en los europeos, parecen estar asociados con esta enfermedad en los mestizos mexicanos, ya que nuestro estudio mostró la replicación de 8 de 21 SNPs estudiados. A pesar de ello, los alelos de riesgo de las variantes asociadas con DT2 en la población mestiza mexicana, y reportados en los estudios europeos son los mismos, y en la misma dirección en ambas poblaciones. Es importante mencionar que 6 variantes que se encuentran cerca o dentro de los genes *SLC30A8* (rs13266634), *HHEX* (rs7923837), *CDKN2A/2B* (rs10811661), *IGF2BP2* (rs4402960), *CDC123/CAMK1D* (rs12779790) y *KCNQ1* (rs2237892) se asociaron con DT2 en toda la población de estudio (tabla 5), mientras que las asociaciones encontradas para *TCF7L2* (rs7903146) y *CDKAL1* (rs7754840) fueron evidentes solo con la estratificación de la muestra por edad de inicio o el estado de obesidad, respectivamente (tablas 6 y 7).

Una limitante de este estudio fue la falta de los datos de ancestría para toda la población de estudio. Debido a ello, como se describe en material y métodos, se realizaron 2 modelos tomando en cuenta solo a los 1372 sujetos con los datos de ancestría. Este análisis evidenció que de las 8 variantes asociadas con DT2, un grupo de 4 SNPs (rs7903146 de *TCF7L2*, rs7923837 de *HHEX*, rs4402960 de *IGF2BP2*, y rs2237892 de *KCNQ1*) se afectaron drásticamente debido al ajuste por la ancestría amerindia, y un segundo grupo con los otros 4 SNPs restantes (rs13266634 de *SLC30A8*, rs10811661 de *CDKN2A/2B*, rs7754840 de *CDKAL1*, y rs12779790 de *CDC123/CAMK1D*) no se afectaron debido a esta variable (tabla 5). Para este último grupo, se tomó en cuenta a toda la población (2017 sujetos) para reportar los análisis de asociación con DT2 y con los rasgos cuantitativos relacionados con la DT2, mientras que para el primer grupo solo se tomó en cuenta a los 1372 sujetos con los datos de ancestría. Como se observa en la tabla 5, las 3 variantes rs13266634 (*SLC30A8*), rs10811661 (*CDKN2A/2B*) y rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*) tuvieron un mayor efecto en el riesgo a DT2 cuando se tomó en cuenta a toda la población gracias a un mayor tamaño de muestra. Estos resultados muestran la importancia de tomar en cuenta el efecto de la ancestría en estudios futuros sobre todo en las poblaciones mestizas, debido a la estratificación de la población.

Interesantemente, las asociaciones encontradas para *TCF7L2* y para *CDKAL1* solo fueron evidentes bajo la estratificación de la muestra por edad de inicio o el estado de obesidad. Se observó una asociación significativa para la variante rs7903146 (*TCF7L2*; $P = 0.024$) en el subgrupo con DT2 de inicio temprano, y a pesar del pequeño tamaño de muestra, es difícil que la asociación en *TCF7L2* sea artificial ya que ha sido ampliamente replicada en varias poblaciones incluyendo la mexicana [265-268]. Del mismo modo, en la

estratificación de la muestra por el estado de la obesidad, encontramos una asociación significativa entre la variante rs7754840 (*CDKAL1*, $P = 0.019$) y los diabéticos no obesos.

TCF7L2 es un factor de transcripción que es miembro de la vía de señalización Wnt y se expresa en diversos tejidos incluyendo los islotes de Langerhans [269]. Se ha descrito que el alelo de riesgo (T) de la variante rs7903146 (*TCF7L2*) se encuentra en el intron 3 del gen y se asocia con un daño en la GSIS y de otros secretagogos como GLP1 [270-273]. A este respecto, nosotros encontramos en los individuos normoglucémicos, una asociación entre rs7903146 (*TCF7L2*) y valores significativamente menores de HOMA- β encontrados en los portadores del alelo de riesgo de esta variante frente a los no portadores ($P = 0.02$), lo cual es consistente con estos estudios previos, y sugiere que el subgrupo de diabéticos de inicio temprano puede tener una mayor proporción de diabéticos con la función de células β reducida [271, 274, 275]. Paradójicamente, un estudio más reciente reveló que los portadores sanos del alelo de riesgo tienen una mayor expresión de *TCF7L2* en los islotes pancreáticos humanos [276]. A pesar del aumento en la expresión de este gen, otro estudio mostró una disminución en el contenido de insulina y su secreción en los portadores [277]. Los autores de este estudio concluyen que la síntesis y el procesamiento de la proinsulina son reguladas por *TCF7L2*.

Por su parte, *CDKAL1* codifica una proteína de 65 kD expresada en una gran variedad de tejidos, se ha asociado a una disminución en la función de la célula β , y es un homólogo de *CDK5RAP1*, un inhibidor de *CDK5*, el cual transduce señales de glucotoxicidad en estas células [166, 278]. Nuestros resultados mostraron la asociación entre la variante rs7754840 (*CDKAL1*) y la DT2 solo en el subgrupo de diabéticos no obesos. Aunque no pudimos demostrar valores significativamente más bajos de HOMA- β en portadores del alelo de riesgo de rs7754840 (*CDKAL1*) en comparación con los no portadores, estudios previos reportaron que otras dos variantes (rs7756992 y rs10946398) del gen *CDKAL1* están asociados con un defecto secretorio de insulina y con una alteración en la respuesta la insulina en las pruebas de tolerancia oral e intravenosa a la glucosa [162, 166, 279]. A pesar de que la variante evaluada en este estudio no se analizó en esos estudios, los tres SNPs (rs7754840, rs7756992 y rs10946398) se encuentran en el intrón 5, donde rs7756992 y rs7754840 están en LD en la población Europea ($r^2 = 0.73$) y en la población hispana ($r^2 = 1.0$) [180, 264]. Adicionalmente, se ha sugerido que la susceptibilidad genética puede ser modulada por el estado de obesidad, donde los autores describen que las variantes genéticas que modulan la acción de la insulina pueden tener un efecto mayor en la susceptibilidad de la DT2 en presencia de la obesidad, mientras que las variantes genéticas que actúan sobre la secreción de insulina pueden tener un mayor efecto sobre susceptibilidad de esta enfermedad en individuos no obesos [180]. Esta hipótesis es consistente con el resultado que encontramos para rs7754840 (*CDKAL1*), debido a que la asociación con DT2 la hallamos sólo en el subgrupo de diabéticos no obesos, lo que sugiere a la alteración en la secreción de insulina como un mecanismo importante en los pacientes diabéticos no obesos. Esto es reforzado por un reporte reciente que muestra que *CDKAL1* es una metiltiotransferasa requerida para la adecuada traducción de los codones de Lisina (AAA y AAG), necesaria para la traducción estimulada por glucosa de la proinsulina [280, 281].

Por otro lado en este estudio, las dos variantes rs10811661 (*CDKN2A/2B*) y rs2237892 (*KCNQ1*) mostraron los mayores efectos sobre el riesgo a DT2 en la población estudiada, con un riesgo de 1.36 ($P = 0,001$) y

1.42 ($P= 0.001$), respectivamente. Este resultado puede explicarse debido que ambas variantes mostraron un efecto de riesgo en todos los subgrupos obtenidos después de la estratificación de la muestra por edad de inicio de la DT2 o el estado de obesidad (tablas 6 y 7). Los genes *CDKN2A* y *CDKN2B* codifican para proteínas que son supresores de tumor que inhiben a CDK4 y CDK6 respectivamente, que son reguladores de la replicación de la célula β pancreática [282-284]. La variante que estudiamos (rs10811661) se encuentra a 125 kb *río arriba* de los genes *CDKN2A/2B* y logramos replicar la asociación con DT2 en toda la población de estudio así como en cada uno de los subgrupos de diabéticos. Esta variante se ha asociado con rasgos relacionados a DT2, tales como la disminución de la GSIS y de la función de las células β , en diferentes poblaciones [158, 159, 161, 167, 285, 286]. Además, se ha descrito que el mecanismo por el cual actúan estos genes es a través del control de la homeostasis de la glucosa en ayuno, mediante la vía PKA-CREB-PGC1 α [287].

KCNQ1 codifica para un canal de potasio que juega un papel clave en la fase de repolarización del potencial de acción de las células cardiacas, así como el transporte de sal y agua en tejidos epiteliales [288-290]. Además, la expresión de *KCNQ1* se encuentra ampliamente distribuida como en riñón, estómago, el páncreas exocrino, y en las células INS-1 [291, 292]. Inicialmente, los SNPs en *KCNQ1* se asociaron con DT2 en los primeros GWAS de poblaciones asiáticas, a pesar de que no se reportaron en los primeros estudios de origen europeo [174, 175]. En nuestro estudio, la asociación entre la variante rs2237892 (*KCNQ1*) y DT2, se observó en toda la población y en cada uno de los subgrupos, al igual que *CDKN2A/2B*, aunque hubo una mayor significancia de la asociación en los no obesos. Acorde con esto último, se ha reportado que el efecto de las variantes de *KCNQ1* involucra una reducción en la secreción de insulina observada en suecos y finlandeses, además de que en los chinos se asociaron con la primera y segunda fase de la secreción de la insulina en los sujetos controles [293, 294]. Adicionalmente, las variantes en *KCNQ1* se relacionaron con la reducción de la exocitosis de la insulina afectando el acoplamiento del gránulo de secreción [295]. Algunos reportes no lograron evidenciar la asociación de *KCNQ1* con DT2, sin embargo estudios de meta-análisis recientes han confirmado la asociación entre DT2 y los SNPs de este gen, lo cual respalda nuestro resultado a pesar tamaño de muestra relativamente pequeño en nuestro estudio [296-298]. Al no reportarse la asociación de *KCNQ1* con DT2 en los primeros estudios de origen europeo, y ser a través de los estudios en poblaciones asiáticas que se detectó dicha asociación, estos hallazgos enfatizan la importancia de realizar estudios en diversas poblaciones de diferentes grupos étnicos.

SLC30A8 codifica para una proteína (ZNT8) que es un transportador de zinc localizado en las membranas de las vesículas secretorias que transporta el zinc del citoplasma hacia las vesículas de secreción de insulina. Por ello esta proteína está involucrada en el almacenamiento, transporte y la secreción de insulina, además se expresa exclusivamente en los islotes de Langerhans y sobre todo en las células β pancreáticas [299-301]. Su función provee un mecanismo obvio por el cual, ZNT8, está involucrado en el riesgo a DT2. La desregulación de este gen, reduce el contenido de insulina y la GSIS, además su sobreexpresión tiene el efecto contrario [302]. En nuestro estudio logramos replicar la asociación entre DT2 y la variante rs13266634 (*SLC30A8*) y a diferencia de las variantes de los genes *CDKN2A/2B* y *KCNQ1* su asociación solo se observó en los subgrupos no obesos y con mayor efecto en los diabéticos de inicio temprano. En un estudio previo, realizado con pacientes diabéticos de inicio temprano, mostró un defecto secretorio severo

de insulina asociado a la pérdida de peso y el deterioro metabólico, comparados con el total de los pacientes con DT2 en la población mexicana, lo cual es consistente con la desregulación de *SLC30A8* [17].

HHEX es un represor transcripcional involucrado en el desarrollo ventral del páncreas controlando la proliferación celular endodérmica y la posición de las células que más tarde formarán el tejido pancreático, además de expresarse en el hígado y estar involucrado en su diferenciación. [303-306]. En nuestro estudio, sólo el SNP rs7923837 se asoció con DT2, ya que la variante rs1111875 en la misma región no se asoció con esta enfermedad, SIN EMBARGO, esto es consistente ya que ambas variantes genéticas no están en LD ($r^2=0.10$). Estos resultados sugieren la existencia de una región en LD estrecha en los mexicanos, donde rs7923837 puede estar más cerca de la variante funcional. Además, cuando estratificamos la muestra por el estado de obesidad, solo encontramos la asociación en los no obesos, que de acuerdo a Cauchi et al., el efecto de esta variante actúa sobre la secreción de la insulina, lo que es consistente con un estudio donde el *locus* de *HHEX* afecta la liberación de insulina estimulada por la glucosa [180, 307].

IGF2BP2 codifica para una proteína (IMP2) que se une a la región 5'UTR del RNAm de IGF-2 regulando la expresión de la proteína mediante la localización, estabilidad y traducción del RNA [308]. Existen 2 variantes genéticas dentro del intron 2 de este gen (rs4402960 y rs1470579) implicadas en el riesgo a DT2, lo cual hemos podido replicar en nuestro estudio puesto que la variante rs4402960 se asoció con DT2 en la población mexicana, la cual se observó principalmente en los pacientes diabéticos de inicio tardío. Aunque no analizamos la variante rs1470579 debido a que no estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles, si está en LD con la variante analizada rs4402960 ($r^2=0.89$). A pesar de no encontrar ninguna relación entre esta variante y algún rasgo fenotípico relacionado con la DT2, en otros estudios se ha asociado con una reducción en la función de la célula β , puesto que la primera fase de la secreción de la insulina se ve afectada [167, 177, 309, 310].

La variante rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*) que se asoció con DT2 se encuentra en un *locus* entre los genes *CDC123* y *CAMK1D* en el cromosoma 10 [164]. *CDC123* es regulado por la disponibilidad nutricional en levaduras y es esencial en el inicio de la traducción del RNAm y la síntesis de proteína [311]. *CAMK1D* es miembro de la familia de las cinasas dependientes de Calmodulina-Ca⁺ que transduce señales intracelulares de calcio que afectan diversos procesos celulares [312, 313]. En nuestro estudio la variante rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*) se asoció con DT2 en toda la población, sin embargo, su efecto se evidenció de manera más importante en los subgrupos de diabéticos de inicio temprano y en los no obesos, semejante a los resultados obtenidos para *SLC30A8*. Bajo la premisa de que las variantes que actúan sobre la secreción de la insulina tienen mayor efecto en los sujetos no obesos, esto es consistente con nuestro hallazgo y los estudios que han analizado la función de la célula β . Estos estudios previos evidenciaron una reducción en la función de esta célula, mediante la medición del HOMA- β y del índice insulinogénico [165, 201, 314]. Adicionalmente, un estudio reciente reveló que la variante rs11257655, cercana a la estudiada en nuestro estudio, afecta la actividad transcripcional alterando la unión de un complejo proteico que incluye a los factores de transcripción FOXA1 y FOXA2 [314].

En 2007 un GWAS identificó la asociación entre un grupo de SNPs en el cromosoma 16q12 y la DT2, sin embargo, después de ajustar por el IMC, la asociación se perdió, sugiriendo que dicha asociación estaba mediada a través de su efecto sobre el IMC [163]. Estos SNPs se encuentran en el intrón 1 de *FTO* que codifica para una desmetilasa de ácido nucleico dependiente de 2-oxoglutarato, involucrada en el metabolismo de ácidos grasos, reparación del DNA y modificaciones postraduccionales [315]. En nuestro trabajo, a pesar que la variante en *FTO* (rs8050136) no se asoció con DT2, fue la única variante que se asoció de forma independiente con la obesidad (OR 1.25, $P = 0.008$). Además mostramos que esta variante se asoció significativamente con HOMA- β ($P = 0.014$) en los sujetos normoglucémicos. Ambos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en la población mexicana de un reporte anterior que estudió específicamente este gen [316]. Sin embargo, el mecanismo por el cual, esta variante modula el IMC no se ha logrado dilucidar, aunque existen estudios en ratones *knock out* de *FTO* que reportaron una reducción en el tamaño y peso, además mostraron mayor sensibilidad a la insulina y aumentaron las concentraciones séricas de adrenalina [317]. Adicionalmente, el aumento en el peso en ratones, desregula a este gen en el hipotálamo, sugiriendo que *FTO* afecta el metabolismo y gasto energético [318]. Sin embargo, un estudio reciente mostró que las secuencias en el intrón 1 de *FTO* interactúan directamente con su promotor y con los promotores del gen *IRX3* en humanos y ratones [319]. Además, lograron evidenciar que las variantes genéticas del intrón 1 de *FTO* se asocian con la expresión de *IRX3* y no de *FTO* en cerebros humanos, sin embargo, no lograron demostrar una relación directa de la expresión de *IRX3* y la regulación de la masa y la composición corporal [319].

Por otro lado, nosotros estábamos interesados en comparar los riesgos que confieren los 8 SNPs que se asociaron con DT2 en nuestro estudio, diferían de aquellos riesgos reportados en las poblaciones europeas. Mediante una prueba de heterogeneidad se compararon los tamaños del riesgo de estas variantes entre mexicanos y europeos donde encontramos que no existían diferencias significativas. En el caso de *KCNQ1*, la comparación también se realizó con los asiáticos porque este SNP no se ha replicado ampliamente en los europeos [264]. Adicionalmente, se obtuvieron *scores* de genotipo que incluyeron 3 grupos diferentes con un número diferente de SNPs evaluados. El análisis de los 21 SNPs analizados en este estudio así como para el análisis de 17 SNPs que excluyeron los alelos de riesgo de las variantes de los genes *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL* y *RALGPS2* descritos en los México-americanos, tuvieron una asociación significativa [176]. Por el contrario, en el tercer modelo excluimos las ocho variantes asociadas en este estudio, en el cual no encontramos un valor de P significativa, este resultado es coherente de que la asociación se debe en su totalidad a las variantes que se asociaron nominalmente con DT2.

A pesar de que la prevalencia de la diabetes tipo 2 en México es una de las más altas en el mundo, antes de este trabajo existían muy pocos estudios que evaluaron una asociación entre la DT2 y las variantes de riesgo a la DT2 en la población mexicana [268, 320, 321]. En comparación con nuestro estudio, estos reportes previos, tuvieron un tamaño de muestra más pequeño, además no excluyeron a individuos con antecedentes familiares de DT2 en el grupo de sujetos control, excluyeron a individuos obesos, o bien, no analizaron los datos mediante la estratificación entre subgrupos de diabéticos. Estos factores pueden explicar la falta de asociación reportado anteriormente para rs7754840 (*CDKAL1*) y rs13266634 (*SLC30A8*) [320, 321].

En las poblaciones europeas, las variantes genéticas rs5219 (*KCNJ11*), rs1111875 (*HHEX*), rs8050136 (*FTO*), rs864745 (*JAZF1*), rs7961581 (*TSPAN/LGR5*), rs4607103 (*ADAMTS9*) y rs10923931 (*NOTCH2*), tienen valores de ORs por debajo de 1.2, y curiosamente no mostraron una asociación con DT2 en los mestizos mexicanos. Además, la frecuencia de los alelos de riesgo para *KCNJ11*, *ARHGEF11*, *TSPAN/LGR5*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, y *FTO* son significativamente menores en los mexicanos que en los europeos (tabla 4). Esta observación tiene que ser tomada en cuenta en futuros estudios de asociación, debido a que un tamaño de muestra más grande es necesario para detectar posibles efectos de riesgo de estos SNPs. Por lo tanto, la falta de asociación de las variantes en *KCNJ11* (rs5219), *PPARG* (rs1801282), *JAZF1* (rs864745), *FTO* (rs8050136), *TSPAN/LGR5* (rs7961581), *ADAMTS9* (rs4607103), *NOTCH2* (rs10923931), *NXPH1* (rs757705), *RORA* (rs7164773), *UBQLNL* (rs979752), y *RALGPS2* (rs2773080) podría deberse a que el tamaño de muestra en nuestro estudio sigue siendo insuficiente para detectar los SNPs con efectos más pequeños.

A pesar de que no logramos replicar la asociación de todos los SNPs evaluados con DT2, nuestros resultados subrayan la importancia de considerar la heterogeneidad fenotípica de la enfermedad, así como el componente de ancestría de la población mestiza mexicana en futuros estudios de asociación de casos y controles. Además, es posible que la falta de detección se deba a que la frecuencia de los alelos de riesgo de las variantes previamente asociadas con DT2 pueden ser muy bajas, o bien, tener un efecto muy modesto en la susceptibilidad en la DT2 en nuestra población.

Es posible también que exista una diversidad genética entre las poblaciones de diferente origen étnico como lo ha señalado la asociación de *KCNQ1* con DT2 en la población asiática y la asociación descrita recientemente entre la DT2 y variantes en *SLC16A11* y *HNF1A* en la población mexicana [174, 175, 211, 212]. Todos estos factores deben ser tomados en cuenta y por ello es necesario tener un tamaño de muestra mayor, contar con la información de ancestría y tener estrategias alternativas para ir describiendo el componente genético de la DT2 no sólo en los mestizos mexicanos, sino también en otras poblaciones mezcladas de ascendencia amerindia.

8.2 VARIANTES EN GENES RELACIONADOS A LA LIPOTOXICIDAD

En la segunda parte de este trabajo de tesis evaluamos a dos genes candidato relacionados a la lipotoxicidad mediada por el colesterol que fueron *LXR-β* y *ABCA1*. Para el primer gen (*LXR-β*), inicialmente realizamos un análisis de secuencia donde encontramos 3 variantes genéticas de interés. La primera de ellas, es una variante no sinónima Pro35Leu en el exón 4 que no ha sido reportada, una segunda variante ya reportada (rs34296657) en el exón 6, y finalmente encontramos una tercera variante en la región promotora del gen que también ya ha sido reportada (rs17373080). A pesar de que el análisis de secuenciación directa del gen candidato *LXR-β*, mostró una variante nueva que implica un cambio no sinónimo de Pro35Leu en el exón 4, ésta se predice como benigna en la función de la proteína por lo cual no se consideró su análisis en la población completa de estudio. Además, esta variante nueva se encuentra en un sujeto normoglucémico, por lo cual la predicción realizada por el programa *Polyphen* parece ser

consistente y reforzó la decisión de no tomarla en cuenta en los estudios posteriores. En el exón 6 se encontró una variante sinónima ya reportada (rs34296657), sin embargo, no existe ningún reporte de este SNP en la literatura científica. Adicionalmente, los análisis preliminares no arrojaron ningún dato sugerente de asociación, por lo que se tomó la decisión de no estudiarla en el resto de la población.

Finalmente, se decidió evaluar en toda la población de estudio a la variante encontrada en la región promotora (rs17373080), debido a que en la muestra de 109 sujetos secuenciados, encontramos una asociación con niveles de triglicéridos. Esta variante se encontró inicialmente en una submuestra de 53 sujetos en los años 2008 y 2009, durante el proceso de secuenciación del resto de los sujetos, se publicó un estudio que analizó las 2 isoformas de *LXR* (*LXR- α* y *LXR- β*) seleccionando un subgrupo de SNPs para cada gen. Este estudio reportó la asociación de 2 variantes de la región promotora (rs17373080 y rs35463555) de *LXR- β* con DT2 ($P = 0.047$ y $P = 0.026$, respectivamente). Sin embargo, estas asociaciones no se mantuvieron significativas después de la corrección por Bonferroni, debido a que los valores de P no son muy significativos. Esto puede deberse a que el tamaño de muestra de ese es relativamente pequeño, lo cual también puede darse en nuestro estudio y con un tamaño de muestra mayor podríamos evidenciar una asociación en toda la población de estudio y no solo en los subgrupos de diabéticos. Adicionalmente, se ha reportado que el alelo de riesgo (C) de rs17373080 tiene mayor actividad transcripcional basal y se encuentra en un sitio de unión funcional de los factores de transcripción NF1 [322]. En 2010, otro estudio publicó que esta variante (rs17373080) se asoció con DT2 y obesidad en una población de origen europeo [323]. Nuestros resultados preliminares y estas 2 publicaciones nos motivaron a realizar el análisis de la variante rs17373080 en toda la población de estudio. Los análisis de asociación de esta variante que realizamos, se vieron afectados por la presencia de la ancestría amerindia por lo que nuestro modelo de asociación tomó en cuenta el ajuste por esta variable. Aunque el valor de P fue marginal ($P = 0.067$), no fue suficiente para evidenciar la asociación con DT2 en toda la población de estudio, sin embargo, en la estratificación de la muestra, la variante se asoció con DT2 en el subgrupo de diabéticos de inicio temprano (OR = 1.33; $P = 0.027$), y marginalmente en los no obesos (OR = 1.27; $P = 0.050$). En el estudio de Solaas et al., consideró al alelo menor G para el estudio, el cual se reportó como protector contra el riesgo a DT2, lo cual es consistente con nuestro estudio. Además, este mismo trabajo se reportó que el alelo G se asoció con obesidad, lo cual es consistente con la asociación del alelo de riesgo C con DT2 en el subgrupo de no obesos en nuestro estudio [323]. Estos resultados pudieran parecer contradictorios, que el efecto del alelo G (no riesgo) de la variante rs17373080 protege contra la DT2, pero es de riesgo para la obesidad. Sin embargo, este efecto diferencial podría explicarse por una función de célula y/o tejido específico, vía el reclutamiento de diferentes cofactores que modifican el efecto de *LXR- β* en los diferentes tejidos [322, 323]. De acuerdo a los estudios previos se ha sugerido que esta variante puede ejercer su riesgo a DT2 debido a la alteración en la expresión del factor de transcripción de *LXR- β* , y que es consistente con lo reportado en un estudio donde la lipotoxicidad en la célula β se debe a la activación crónica de *LXR* y sugieren que nuestros resultados no son falsos positivos y tal vez con un tamaño de muestra mayor podríamos evidenciar la asociación con DT2 en toda la población de estudio [250].

En esta parte del estudio también analizamos la variante sinónima R230C (rs9282541) del gen *ABCA1* y no encontramos evidencia de asociación de R230C con DT2 (OR = 1.14; $P = 0.326$). Sin embargo,

evidenciamos la asociación con obesidad ($OR = 1.52$; $P = 0.018$) y replicamos la asociación con concentraciones bajas de HDL-colesterol (Coef $\beta = -2.21$; $P < 0.001$), lo cual ha sido reportado consistentemente en distintos estudios [232-236, 324]. La variante R230C del gen *ABCA1* fue reportada inicialmente en sujetos con hipoalfalipoproteinemia familiar de una población de Oji-Crees [231]. Posteriormente, se estudió en la población mexicana donde se asoció con concentraciones bajas de HDL-colesterol, SM, obesidad y con DT2 [232, 233]. Sin embargo, solo la asociación con concentraciones bajas de HDL se ha replicado consistentemente en estudios posteriores, lo cual es consistente en nuestro estudio. En los primeros estudios se reportó que la asociación con DT2 se observaba en el subgrupo de diabéticos de inicio temprano, pero en nuestro estudio no logramos evidenciar dicha asociación en este subgrupo. Estas diferencias son resultado de dos consideraciones importantes: 1) al subgrupo de marcadores de ancestría utilizados en ambos estudios, donde el set de 10 marcadores utilizado en el estudio de Villarreal et al, 2008, no había sido validado previamente para la corrección por estratificación poblacional en estudios de asociación de poblaciones mestizas. 2) la segunda diferencia importante es que la muestra de replicación utilizada en ese mismo estudio, no incluyó el ajuste por ancestría. El hecho de que la asociación detectada en nuestro estudio se viera afectada por la ancestría, pone en manifiesto la necesidad de dicho ajuste, utilizando además, marcadores de ancestría previamente validados para este propósito.

Aunque, la mayoría de los reportes que evalúan la variante R230C del gen *ABCA1* no toman en cuenta la ancestría, consideramos fundamental incluirla en todos los estudios de asociación, ya que en México más del 90% de la población es mezclada (mestizos) derivada de dos componentes ancestrales principales. El componente principal de ancestría proviene de los nativos americanos, mientras que el segundo proviene de los europeos. Un tercer componente ancestral corresponde al occidente de África, sin embargo este es menor al 5% en la mayoría de las regiones del país. Debido a eventos históricos, la mezcla de estas etnicidades es relativamente reciente, lo que explica, la estratificación genética de la población mestiza mexicana. Es por ello que se ha sugerido controlar la estratificación de la población como una variable confusora en los estudios de asociación que se realicen en estas poblaciones mezcladas [325].

IX. CONCLUSIONES

El presente proyecto de investigación mostró la asociación de nueve variantes genéticas asociadas con DT2 en la población mexicana. El mestizaje de la población mexicana se deriva de la mezcla relativamente reciente entre las poblaciones amerindias, de origen europeo y en menor medida de la africana. Esta estratificación de la población mexicana juega un papel determinante en los estudios de asociación genético como lo mostró este estudio. En base a esto, encontramos la asociación de 3 SNPs asociados con DT2 (*HHEX*, *IGF2BP2* y *KCNQ1*) donde la ancestría amerindia jugó un papel importante en los análisis de asociación. Por su parte, en otros tres SNPs (*SLC30A8*, *CDKN2A/2B 2A/2B* y *CDC123/CAMK1D*), la ancestría amerindia no tuvo un efecto grande en los análisis realizados. Adicionalmente, fue interesante encontrar asociación con DT2 solo en subgrupos de la población tanto en el subgrupo de diabéticos de inicio temprano (*TCF7L2*), como en el subgrupo de diabéticos no obesos (*CDKAL1*). Con relación a los genes relacionados con la lipotoxicidad, la variante genética de la región promotora del gen *LXR-β* se asoció con DT2 en los subgrupos de diabéticos de inicio temprano y en los no obesos. Estos datos nos muestran la gran heterogeneidad genética y fenotípica de esta enfermedad y que se deben tenerse en cuenta en estudios posteriores. Finalmente, los SNPs en los genes *FTO* y *ABCA1* fueron los únicos que se asociaron con obesidad, y este último (*ABCA1*), se asoció con bajas concentraciones plasmáticas de HDL, lo cual ha sido ampliamente reportado.

X. PERSPECTIVAS

Históricamente, la identificación de la Genética de la Diabetes Tipo 2 es relativamente reciente y la información obtenida ha sido escasa. Sin embargo, en los últimos años, dicha información ha aumentado exponencialmente, en gran medida debido a los GWAS. A pesar de ello, nos encontramos en el inicio del descubrimiento de las variantes genéticas asociadas con DT2 y con sus rasgos, debido en gran medida a la heterogeneidad de la fisiopatología de la enfermedad, y del componente genético. En nuestro país, que cuenta con una población mayormente mezclada (mestiza), la complejidad es aún mayor, puesto que se debe tomar en cuenta la ancestría en los estudios de asociación genética como lo mostró este trabajo de investigación. A pesar de que en la población mexicana se han realizado estudios de GWAS e incluso de secuenciación masiva (exoma), las variantes genéticas encontradas son pocas, siendo que nuestra población tiene mayor susceptibilidad de padecer la enfermedad. Es por estas razones, que es necesario el diseño de microarreglos de SNPs propios de la población de estudio, puesto que los microarreglos que actualmente se usan comercialmente, se diseñaron en base a la información genética de otras poblaciones, principalmente de origen europeo. Adicionalmente, es necesario que los estudios contengan cohortes más grandes y la realización de meta-análisis de varios estudios. Además, es necesario realizar diseños que tengan el objetivo de encontrar variantes raras y propias de cada población, pero que puedan tener mayor penetrancia. Esto permitiría encontrar variantes genéticas que expliquen en mayor medida la heredabilidad de la DT2. Por su parte, con esta información genética, se requerirá de grandes esfuerzos de todos los grupos de investigación a nivel mundial para poder comprender la participación de estas variantes genéticas en los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la fisiopatología de esta enfermedad. Con ello, la información genética podría tener un papel en la valoración predictiva de la enfermedad y también se podrían diseñar nuevos blancos terapéuticos, lo cual nos permitiría tener la posibilidad de tener un tratamiento más personalizado de la DT2.

XI. REFERENCIAS

1. Kahn, C.R., E.P. Joslin, and Ovid Technologies Inc., *Joslin's diabetes mellitus*, 2005, Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia. p. xiv, 1209 p.
2. Sanchez Rivero, G., *Historia de la Diabetes*. Gac Med Bol, 2007. **30**(2): p. 74-78.
3. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(1): p. 4-14.
4. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
5. World Health Organization. Office of Health Communications and Public Relations., *Diabetes*. WHO fact sheet 2006, Geneva: World Health Organization. 3 p.
6. Zhang, P., et al., *Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(3): p. 293-301.
7. [Mortality statistics in Mexico: deaths registered in the year 2000]. Salud Publica Mex, 2002. **44**(3): p. 266-82.
8. ENSA, *La Salud de los Adultos Tomo II*, in Instituto Nacional de Salud Publica 2000.
9. Villalpando, S., et al., *Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey*. Salud Publica Mex, 2010. **52 Suppl 1**: p. S19-26.
10. Gutiérrez, J., et al., *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: Resultados Nacionales*, I.N.d.S. Pública, Editor 2012, Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, México, 2012.
11. Frayling, T.M., et al., *Young-onset type 2 diabetes families are the major contributors to genetic loci in the Diabetes UK Warren 2 genome scan and identify putative novel loci on chromosomes 8q21, 21q22, and 22q11*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1857-63.
12. Rosenbloom, A.L., et al., *Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth*. Diabetes Care, 1999. **22**(2): p. 345-54.
13. Owen, K., et al., *Increased risk of diabetes in first-degree relatives of young-onset type 2 diabetic patients compared with relatives of those diagnosed later*. Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 636-7.
14. Pavkov, M.E., et al., *Effect of youth-onset type 2 diabetes mellitus on incidence of end-stage renal disease and mortality in young and middle-aged Pima Indians*. JAMA, 2006. **296**(4): p. 421-6.
15. O'Rahilly, S., et al., *Type II diabetes of early onset: a distinct clinical and genetic syndrome?* Br Med J (Clin Res Ed), 1987. **294**(6577): p. 923-8.
16. Garcia-Garcia, E., et al., *Early-onset type 2 diabetes in Mexico*. Isr Med Assoc J, 2002. **4**(6): p. 444-8.
17. Aguilar-Salinas, C.A., et al., *Prevalence and characteristics of early-onset type 2 diabetes in Mexico*. Am J Med, 2002. **113**(7): p. 569-74.
18. Lerman-Garber, I., et al., [Early-onset type 2 diabetes mellitus. The experience from a third level medical institution]. Gac Med Mex, 2010. **146**(3): p. 179-84.
19. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2013. **36 Suppl 1**: p. S67-74.
20. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haefen, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
21. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haefen, *Pathogenesis of type 2 diabetes*. Endocr Res, 2007. **32**(1-2): p. 19-37.
22. Huang, X.F. and P. Arvan, *Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20417-23.
23. Kemmler, W., et al., *On the biosynthesis, intracellular transport and mechanism of conversion of proinsulin to insulin and C-peptide*. Diabetes, 1972. **21**(2 Suppl): p. 572-81.
24. Schmitz, O., et al., *On high-frequency insulin oscillations*. Ageing Res Rev, 2008. **7**(4): p. 301-5.
25. Jitrapakdee, S., et al., *Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling*. Diabetologia, 2010. **53**(6): p. 1019-32.
26. Straub, S.G. and G.W. Sharp, *Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(3): p. C565-71.
27. Matschinsky, F.M., *Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes*. Diabetes, 1990. **39**(6): p. 647-52.
28. MacDonald, M.J., et al., *Pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase. Sites of pretranslational regulation by glucose of glucose-induced insulin release in pancreatic islets*. J Biol Chem, 1991. **266**(33): p. 22392-7.
29. Ashcroft, F.M., D.E. Harrison, and S.J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells*. Nature, 1984. **312**(5993): p. 446-8.
30. Harrison, L.C., et al., *Radioimmunoassay of the insulin receptor: a new probe of receptor structure and function*. Science, 1979. **203**(4380): p. 544-7.
31. Van Obberghen, E., et al., *Surfing the insulin signaling web*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(11): p. 966-77.
32. Kahn, C.R. and M.F. White, *The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action*. J Clin Invest, 1988. **82**(4): p. 1151-6.
33. Baron, V., et al., *Insulin binding to its receptor induces a conformational change in the receptor C-terminus*. Biochemistry, 1990. **29**(19): p. 4634-41.
34. Cohen, P., *The twentieth century struggle to decipher insulin signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(11): p. 867-73.
35. Choi, K. and Y.B. Kim, *Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes*. Korean J Intern Med, 2010. **25**(2): p. 119-29.

36. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
37. Sano, H., et al., *Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane*. Cell Metab, 2007. **5**(4): p. 293-303.
38. Lin, Y. and Z. Sun, *Current views on type 2 diabetes*. J Endocrinol, 2010. **204**(1): p. 1-11.
39. Bevan, P., *Insulin signalling*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 8): p. 1429-30.
40. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 193-205.
41. Grarup, N., T. Sparso, and T. Hansen, *Physiologic characterization of type 2 diabetes-related loci*. Curr Diab Rep, 2010. **10**(6): p. 485-97.
42. Dinneen, S., J. Gerich, and R. Rizza, *Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 707-13.
43. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. Cell, 2012. **148**(5): p. 852-71.
44. Zick, Y., *Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. 437-41.
45. White, M.F., *IRS proteins and the common path to diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(3): p. E413-22.
46. Zhande, R., et al., *Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(4): p. 1016-26.
47. Rui, L., et al., *SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42394-8.
48. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 847-53.
49. Boden, G. and G.I. Shulman, *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction*. Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 3**: p. 14-23.
50. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu*. Genes Dev, 2007. **21**(12): p. 1443-55.
51. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.
52. Yuan, M., et al., *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta*. Science, 2001. **293**(5535): p. 1673-7.
53. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
54. Nakamura, T., et al., *Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis*. Cell, 2010. **140**(3): p. 338-48.
55. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
56. Odegaard, J.I. and A. Chawla, *Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis*. Science, 2013. **339**(6116): p. 172-7.
57. Karin, M. and M. Delhase, *The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling*. Semin Immunol, 2000. **12**(1): p. 85-98.
58. Kelley, D.E., et al., *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2944-50.
59. Yu, C., et al., *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50230-6.
60. Itani, S.I., et al., *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I kappa B-alpha*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2005-11.
61. Koh, E.H., et al., *Intracellular fatty acid metabolism in skeletal muscle and insulin resistance*. Curr Diabetes Rev, 2005. **1**(3): p. 331-6.
62. Leem, J. and E.H. Koh, *Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 242984.
63. Samuel, V.T., et al., *Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32345-53.
64. Zhang, D., et al., *Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17075-80.
65. Morino, K., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction*. Diabetes, 2006. **55 Suppl 2**: p. S9-S15.
66. Scherer, P.E., *Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1537-45.
67. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
68. Tomas, E., et al., *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16309-13.
69. Griffin, M.E., et al., *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade*. Diabetes, 1999. **48**(6): p. 1270-4.
70. Rajala, M.W. and P.E. Scherer, *Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3765-73.
71. Deng, Y. and P.E. Scherer, *Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1212**: p. E1-E19.

72. Piya, M.K., P.G. McTernan, and S. Kumar, *Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin*. J Endocrinol, 2013. **216**(1): p. T1-T15.
73. Cawthorn, W.P. and J.K. Sethi, *TNF-alpha and adipocyte biology*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 117-31.
74. Senn, J.J., et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13740-6.
75. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling*. Sci STKE, 2003. **2003**(169): p. PE6.
76. Chawla, A., K.D. Nguyen, and Y.P. Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 738-49.
77. Steil, G.M., et al., *Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(5): p. E788-96.
78. Liu, Y.Q., T.L. Jetton, and J.L. Leahy, *beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39163-8.
79. Chang-Chen, K.J., R. Mullur, and E. Bernal-Mizrachi, *Beta-cell failure as a complication of diabetes*. Rev Endocr Metab Disord, 2008. **9**(4): p. 329-43.
80. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(1): p. 102-10.
81. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1802-12.
82. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocr Rev, 2008. **29**(1): p. 42-61.
83. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
84. Chevet, E., et al., *The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(1): p. 120-4.
85. Meusser, B., et al., *ERAD: the long road to destruction*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 766-72.
86. Back, S.H., et al., *Endoplasmic reticulum stress in the beta-cell pathogenesis of type 2 diabetes*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 618396.
87. Fonseca, S.G., et al., *Stress hypERactivation in the beta-cell*. Islets, 2010. **2**(1): p. 1-9.
88. Volchuk, A. and D. Ron, *The endoplasmic reticulum stress response in the pancreatic beta-cell*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12 Suppl 2**: p. 48-57.
89. Oyadomari, S., et al., *Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes*. J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 525-32.
90. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. Science, 2000. **287**(5453): p. 664-6.
91. Poitout, V., et al., *Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 289-98.
92. Kim, J.W. and K.H. Yoon, *Glucolipotoxicity in Pancreatic beta-Cells*. Diabetes Metab J, 2011. **35**(5): p. 444-50.
93. Jonas, J.C., et al., *Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2009. **11 Suppl 4**: p. 65-81.
94. Robertson, R.P., *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42351-4.
95. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction*. Endocr Rev, 2008 **29**(3): p. 351-66.
96. Li, N., F. Frigerio, and P. Maechler, *The sensitivity of pancreatic beta-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 930-4.
97. Paolisso, G., et al., *A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM*. Diabetologia, 1995. **38**(10): p. 1213-7.
98. Cnop, M., et al., *Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S97-107.
99. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 339-42.
100. Lupi, R., et al., *Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1437-42.
101. Opreacu, A.I., et al., *Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2927-37.
102. Cnop, M., et al., *An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 909-15.
103. van Raalte, D.H. and M. Diamant, *Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy?* Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S37-46.
104. El-Assaad, W., et al., *Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 4154-63.
105. Bardini, G., C.M. Rotella, and S. Giannini, *Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications*. Rev Diabet Stud, 2012. **9**(2-3): p. 82-93.
106. Mari, M., et al., *Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 185-98.
107. Fernandez, A., et al., *Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity*. J Neurosci, 2009. **29**(20): p. 6394-405.

108. Kim, D.C., et al., *Lipoic Acid prevents the changes of intracellular lipid partitioning by free Fatty Acid*. Gut Liver, 2013. 7(2): p. 221-7.
109. Boslem, E., et al., *Alteration of endoplasmic reticulum lipid rafts contributes to lipotoxicity in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2013. 288(37): p. 26569-82.
110. Hao, M., et al., *Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction*. Diabetes, 2007 56(9): p. 2328-38.
111. Brunham, L.R., et al., *Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment* Nat Med, 2007 13(3): p. 340-7.
112. Eriksson, J.G., *Epidemiology, genes and the environment: lessons learned from the Helsinki Birth Cohort Study*. J Intern Med, 2007. 261(5): p. 418-25.
113. Dubois, M., et al., *Non-esterified fatty acids are deleterious for human pancreatic islet function at physiological glucose concentration*. Diabetologia, 2004. 47(3): p. 463-9.
114. Ali, O., *Genetics of type 2 diabetes*. World J Diabetes, 2013. 4(4): p. 114-23.
115. Groop, L., et al., *Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects*. Diabetes, 1996. 45(11): p. 1585-93.
116. Weijnen, C.F., et al., *Risk of diabetes in siblings of index cases with Type 2 diabetes: implications for genetic studies*. Diabet Med, 2002. 19(1): p. 41-50.
117. Meigs, J.B., L.A. Cupples, and P.W. Wilson, *Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study*. Diabetes, 2000. 49(12): p. 2201-7.
118. Poulsen, P., et al., *Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study*. Diabetologia, 1999. 42(2): p. 139-45.
119. Klein, B.E., et al., *Parental history of diabetes in a population-based study*. Diabetes Care, 1996. 19(8): p. 827-30.
120. Pincus, G. and P. White, *On the Inheritance of Diabetes Mellitus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1933. 19(6): p. 631-5.
121. Zamora-Ginez, I., et al., *Risk factors for diabetes, but not for cardiovascular disease, are associated with family history of Type 2 diabetes in subjects from central Mexico*. Ann Hum Biol, 2012. 39(2): p. 102-7.
122. Newman, B., et al., *Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins*. Diabetologia, 1987. 30(10): p. 763-8.
123. Kaprio, J., et al., *Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland*. Diabetologia, 1992. 35(11): p. 1060-7.
124. Barnett, A.H., et al., *Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs*. Diabetologia, 1981. 20(2): p. 87-93.
125. Vaxillaire, M. and P. Froguel, *Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2008. 29(3): p. 254-64.
126. Tattersall, R.B., *Mild familial diabetes with dominant inheritance*. Q J Med, 1974. 43(170): p. 339-57.
127. Weedon, M.N. and T.M. Frayling, *Insights on pathogenesis of type 2 diabetes from MODY genetics*. Curr Diab Rep, 2007. 7(2): p. 131-8.
128. Hanis, C.L., et al., *A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2*. Nat Genet, 1996. 13(2): p. 161-6.
129. Horikawa, Y., et al., *Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet, 2000. 26(2): p. 163-75.
130. Song, Y., et al., *Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies*. Am J Hum Genet, 2004. 74(2): p. 208-22.
131. Bodhini, D., et al., *Association of calpain 10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Southern Indians*. Metabolism, 2011. 60(5): p. 681-8.
132. Ezzidi, I., et al., *Variants within the calpain-10 gene and relationships with type 2 diabetes (T2DM) and T2DM-related traits among Tunisian Arabs*. Diabetes Metab, 2010. 36(5): p. 357-62.
133. Duggirala, R., et al., *Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans*. Am J Hum Genet, 1999. 64(4): p. 1127-40.
134. Grant, S.F., et al., *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2006. 38(3): p. 320-3.
135. Tong, Y., et al., *Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis*. BMC Med Genet, 2009. 10: p. 15.
136. Deeb, S.S., et al., *A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity*. Nat Genet, 1998. 20(3): p. 284-7.
137. Hara, K., et al., *The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 271(1): p. 212-6.
138. Hani, E.H., et al., *Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K+ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians*. Diabetologia, 1998. 41(12): p. 1511-5.
139. Gloyn, A.L., et al., *Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003 52(2): p. 568-72.
140. Nielsen, E.M., et al., *The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. 52(2): p. 573-7.
141. Florez, J.C., et al., *Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region*. Diabetes, 2004 53(5): p. 1360-8.
142. Cano, A., et al., *Identification of novel mutations in WFS1 and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome*. Am J Med Genet A, 2007. 143A(14): p. 1605-12.

143. Tranebjaerg, L., T. Barrett, and N.D. Rendtorff, *WFS1-Related Disorders*, in *GeneReviews*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
144. d'Annunzio, G., et al., *Wolfram syndrome (diabetes insipidus, diabetes, optic atrophy, and deafness): clinical and genetic study*. *Diabetes Care*, 2008. **31**(9): p. 1743-5.
145. Sandhu, M.S., et al., *Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2007. **39**(8): p. 951-3.
146. Franks, P.W., et al., *Replication of the association between variants in WFS1 and risk of type 2 diabetes in European populations*. *Diabetologia*, 2008. **51**(3): p. 458-63.
147. Florez, J.C., et al., *Testing of diabetes-associated WFS1 polymorphisms in the Diabetes Prevention Program*. *Diabetologia*, 2008. **51**(3): p. 451-7.
148. Mita, M., et al., *Association study of the effect of WFS1 polymorphisms on risk of type 2 diabetes in Japanese population*. *Kobe J Med Sci*, 2008. **54**(4): p. E192-9.
149. Fu, M., et al., *Evidence that Rho guanine nucleotide exchange factor 11 (ARHGEF11) on 1q21 is a type 2 diabetes susceptibility gene in the Old Order Amish*. *Diabetes*, 2007. **56**(5): p. 1363-8.
150. Ma, L., et al., *Variants in ARHGEF11, a candidate gene for the linkage to type 2 diabetes on chromosome 1q, are nominally associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Pima Indians*. *Diabetes*, 2007. **56**(5): p. 1454-9.
151. Bottcher, Y., et al., *R1467H variant in the rho guanine nucleotide exchange factor 11 (ARHGEF11) is associated with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in German Caucasians*. *J Hum Genet*, 2008. **53**(4): p. 365-7.
152. Jin, Q.S., et al., *R1467H Variants of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 11 (ARHGEF11) are Associated with Type 2 Diabetes Mellitus in Koreans*. *Korean Diabetes J*, 2010. **34**(6): p. 368-73.
153. Liu, J., et al., *Association of ARHGEF11 R1467H polymorphism with risk for type 2 diabetes mellitus and insulin resistance in Chinese population*. *Mol Biol Rep*, 2011. **38**(4): p. 2499-505.
154. Reich, D.E., et al., *Linkage disequilibrium in the human genome*. *Nature*, 2001. **411**(6834): p. 199-204.
155. McCarthy, M.I., et al., *Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(5): p. 356-69.
156. Brunetti, A., E. Chieffari, and D. Foti, *Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus*. *World J Diabetes*, 2014. **5**(2): p. 128-140.
157. Yaghootkar, H. and T.M. Frayling, *Recent progress in the use of genetics to understand links between type 2 diabetes and related metabolic traits*. *Genome Biol*, 2013. **14**(3): p. 203.
158. Saxena, R., et al., *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. *Science*, 2007. **316**(5829): p. 1331-6.
159. Scott, L.J., et al., *A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants*. *Science*, 2007. **316**(5829): p. 1341-5.
160. Sladek, R., et al., *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. *Nature*, 2007. **445**(7130): p. 881-5.
161. Zeggini, E., et al., *Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes*. *Science*, 2007. **316**(5829): p. 1336-41.
162. Steinthorsdottir, V., et al., *A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2007. **39**(6): p. 770-5.
163. Frayling, T.M., 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**(5826): p. 889-94.
164. Zeggini, E., et al., *Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2008. **40**(5): p. 638-45.
165. Grarup, N., et al., *Association testing of novel type 2 diabetes risk alleles in the JAZF1, CDC123/CAMK1D, TSPAN8, THADA, ADAMTS9, and NOTCH2 loci with insulin release, insulin sensitivity, and obesity in a population-based sample of 4,516 glucose-tolerant middle-aged Danes*. *Diabetes*, 2008. **57**(9): p. 2534-40.
166. Pascoe, L., et al., *Common variants of the novel type 2 diabetes genes CDKAL1 and HHEX/IDE are associated with decreased pancreatic beta-cell function*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 3101-4.
167. Grarup, N., et al., *Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 3105-11.
168. Horikoshi, M., et al., *Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population*. *Diabetologia*, 2007. **50**(12): p. 2461-6.
169. Furukawa, Y., et al., *Polymorphisms in the IDE-KIF11-HHEX gene locus are reproducibly associated with type 2 diabetes in a Japanese population*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(1): p. 310-4.
170. Cauchi, S., et al., *Analysis of novel risk loci for type 2 diabetes in a general French population: the D.E.S.I.R. study*. *J Mol Med*, 2008. **86**(3): p. 341-8.
171. Omori, S., et al., *Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population*. *Diabetes*, 2008. **57**(3): p. 791-5.
172. Perry, J.R. and T.M. Frayling, *New gene variants alter type 2 diabetes risk predominantly through reduced beta-cell function*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008. **11**(4): p. 371-7.
173. Wu, Y., et al., *Common variants in CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, SLC30A8, and HHEX/IDE genes are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in a Chinese Han population*. *Diabetes*, 2008. **57**(10): p. 2834-42.
174. Yasuda, K., et al., *Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus*. *Nat Genet*, 2008. **40**(9): p. 1092-7.
175. Unoki, H., et al., *SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations*. *Nat Genet*, 2008. **40**(9): p. 1098-102.

176. Hayes, M.G., et al., *Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through genome-wide association studies*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 3033-44.
177. Palmer, N.D., et al., *Quantitative trait analysis of type 2 diabetes susceptibility loci identified from whole genome association studies in the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study*. *Diabetes*, 2008. **57**(4): p. 1093-100.
178. Staiger, H., et al., *Polymorphisms within novel risk loci for type 2 diabetes determine beta-cell function*. *PLoS ONE*, 2007. **2**(9): p. e832.
179. Scuteri, A., et al., *Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(7): p. e115.
180. Cauchi, S., et al., *The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies*. *BMC Med Genet*, 2008. **9**: p. 45.
181. Rung, J., et al., *Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia*. *Nat Genet*, 2009. **41**(10): p. 1110-5.
182. Shu, X.O., et al., *Identification of new genetic risk variants for type 2 diabetes*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(9): p. e1001127.
183. Tsai, F.J., et al., *A genome-wide association study identifies susceptibility variants for type 2 diabetes in Han Chinese*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(2): p. e1000847.
184. Yamauchi, T., et al., *A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B*. *Nat Genet*, 2010. **42**(10): p. 864-8.
185. Kong, A., et al., *Parental origin of sequence variants associated with complex diseases*. *Nature*, 2009. **462**(7275): p. 868-74.
186. Bouatia-Naji, N., et al., *A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels*. *Science*, 2008. **320**(5879): p. 1085-8.
187. Prokopenko, I., et al., *Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels*. *Nat Genet*, 2009. **41**(1): p. 77-81.
188. Bouatia-Naji, N., et al., *A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk*. *Nat Genet*, 2009. **41**(1): p. 89-94.
189. Chen, W.M., et al., *Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(7): p. 2620-8.
190. Weedon, M.N., et al., *A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses*. *Am J Hum Genet*, 2006. **79**(6): p. 991-1001.
191. Dupuis, J., et al., *New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk*. *Nat Genet*, 2010. **42**(2): p. 105-16.
192. Saxena, R., et al., *Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge*. *Nat Genet*, 2010. **42**(2): p. 142-8.
193. Voight, B.F., et al., *Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis*. *Nat Genet*, 2010. **42**(7): p. 579-89.
194. Sim, X., et al., *Transferability of type 2 diabetes implicated loci in multi-ethnic cohorts from Southeast Asia*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(4): p. e1001363.
195. Kooner, J.S., et al., *Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci*. *Nat Genet*, 2011. **43**(10): p. 984-9.
196. Saxena, R., et al., *Large-Scale Gene-Centric Meta-Analysis across 39 Studies Identifies Type 2 Diabetes Loci*. *Am J Hum Genet*, 2012. **90**(3): p. 410-425.
197. Manning, A.K., et al., *A genome-wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycemic traits and insulin resistance*. *Nat Genet*, 2012. **44**(6): p. 659-69.
198. Scott, R.A., et al., *Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways*. *Nat Genet*, 2012. **44**(9): p. 991-1005.
199. Imamura, M., et al., *A single-nucleotide polymorphism in ANK1 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese populations*. *Hum Mol Genet*, 2012. **21**(13): p. 3042-9.
200. Cho, Y.S., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians*. *Nat Genet*, 2012. **44**(1): p. 67-72.
201. Morris, A.P., et al., *Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2012. **44**(9): p. 981-90.
202. Gamboa-Melendez, M.A., et al., *Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population*. *Diabetes*, 2012. **61**(12): p. 3314-21.
203. Albrechtsen, A., et al., *Exome sequencing-driven discovery of coding polymorphisms associated with common metabolic phenotypes*. *Diabetologia*, 2013. **56**(2): p. 298-310.
204. Tabassum, R., et al., *Genome-wide association study for type 2 diabetes in Indians identifies a new susceptibility locus at 2q21*. *Diabetes*, 2013. **62**(3): p. 977-86.
205. Saxena, R., et al., *Genome-wide association study identifies a novel locus contributing to type 2 diabetes susceptibility in Sikhs of Punjabi origin from India*. *Diabetes*, 2013. **62**(5): p. 1746-55.
206. Li, H., et al., *A genome-wide association study identifies GRK5 and RASGRP1 as type 2 diabetes loci in Chinese Hans*. *Diabetes*, 2013. **62**(1): p. 291-8.
207. Huyghe, J.R., et al., *Exome array analysis identifies new loci and low-frequency variants influencing insulin processing and secretion*. *Nat Genet*, 2013. **45**(2): p. 197-201.
208. Steinthorsdottir, V., et al., *Identification of low-frequency and rare sequence variants associated with elevated or reduced risk of type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2014. **46**(3): p. 294-8.
209. Mahajan, A., et al., *Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility*. *Nat Genet*, 2014. **46**(3): p. 234-44.

210. Hara, K., et al., *Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(1): p. 239-46.
211. Williams, A.L., et al., *Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico*. Nature, 2014. **506**(7486): p. 97-101.
212. Estrada, K., et al., *Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population*. JAMA, 2014. **311**(22): p. 2305-14.
213. Semenkovich, C.F., *Insulin resistance and atherosclerosis* J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1813-22.
214. Weir, G.C. and S. Bonner-Weir, *Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S16-21.
215. Flamez, D., et al., *Critical role for cataplerosis via citrate in glucose-regulated insulin release*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2018-24.
216. Kakuma, T., et al., *Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8536-41.
217. Zhao, C. and K. Dahlman-Wright, *Liver X receptor in cholesterol metabolism*. J Endocrinol, 2010. **204**(3): p. 233-40.
218. Fielding, C.J. and P.E. Fielding, *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*. J Lipid Res, 1995. **36**(2): p. 211-28.
219. Brewer, H.B., Jr., et al., *Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004 **24**(10): p. 1755-60.
220. Wu, J.D. and J.M. Bailey, *Lipid metabolism in cultured cells: studies on lipoprotein-catalyzed reverse cholesterol transport in normal and homozygous familial hypercholesterolemic skin fibroblasts*. Arch Biochem Biophys, 1980. **202**(2): p. 467-73.
221. Fredrickson, D.S., *The Inheritance of High Density Lipoprotein Deficiency (Tangier Disease)*. J Clin Invest, 1964. **43**: p. 228-36.
222. Hoffman, H.N. and D.S. Fredrickson, *Tangier disease (familial high density lipoprotein deficiency). Clinical and genetic features in two adults*. Am J Med, 1965. **39**(4): p. 582-93.
223. Bodzioch, M., et al., *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 347-51.
224. Brooks-Wilson, A., et al., *Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 336-45.
225. Lawn, R.M., et al., *The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway*. J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. R25-31.
226. Remaley, A.T., et al., *Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12685-90.
227. Rust, S., et al., *Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 352-5.
228. Brousseau, M.E., et al., *Cellular cholesterol efflux in heterozygotes for tangier disease is markedly reduced and correlates with high density lipoprotein cholesterol concentration and particle size*. J Lipid Res, 2000. **41**(7): p. 1125-35.
229. Brousseau, M.E., et al., *Novel mutations in the gene encoding ATP-binding cassette 1 in four tangier disease kindreds*. J Lipid Res, 2000. **41**(3): p. 433-41.
230. Brunham, L.R., R.R. Singaraja, and M.R. Hayden, *Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis*. Annu Rev Nutr, 2006. **26**: p. 105-29.
231. Wang, J., et al., *Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(8): p. 1983-9.
232. Villarreal-Molina, M.T., et al., *Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population*. Diabetes, 2008. **57**(2): p. 509-13.
233. Villarreal-Molina, M.T., et al., *The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities* Diabetes, 2007 **56**(7): p. 1881-7.
234. Aguilar-Salinas, C.A., et al., *The non-synonymous Arg230Cys variant (R230C) of the ATP-binding cassette transporter A1 is associated with low HDL cholesterol concentrations in Mexican adults: a population based nation wide study*. Atherosclerosis, 2011. **216**(1): p. 146-50.
235. Flores-Dorantes, T., et al., *Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(17-18): p. 1214-7.
236. Acuna-Alonzo, V., et al., *A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(14): p. 2877-85.
237. Hunemeier, T., et al., *Evolutionary responses to a constructed niche: ancient Mesoamericans as a model of gene-culture coevolution*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38862.
238. Guevara-Cruz, M., et al., *Increase in HDL-C concentration by a dietary portfolio with soy protein and soluble fiber is associated with the presence of the ABCA1R230C variant in hyperlipidemic Mexican subjects*. Mol Genet Metab, 2010. **101**(2-3): p. 268-72.
239. Guevara-Cruz, M., et al., *A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome*. J Nutr, 2012. **142**(1): p. 64-9.
240. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
241. Repa, J.J. and D.J. Mangelsdorf, *The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 459-81.

242. Willy, P.J., et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1033-45.
243. Steffensen, K.R. and J.A. Gustafsson, *Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR)* Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S36-42.
244. Zelcer, N. and P. Tontonoz, *Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling*. Journal of Clinical investigation, 2006. **116**(3): p. 607-614.
245. Cha, J.Y. and J.J. Repa, *The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR* J Biol Chem, 2007 **282**(1): p. 743-51.
246. Laffitte, B.A., et al., *Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5419-24.
247. Kase, E.T., et al., *Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1108-15.
248. Dalen, K.T., et al., *Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48283-91.
249. Efanov, A.M., et al., *Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2004 **53 Suppl 3**: p. S75-8.
250. Choe, S.S., et al., *Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells* Diabetes, 2007 **56**(6): p. 1534-43.
251. Chawla, A., et al., *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 161-71.
252. Peet, D.J., et al., *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Cell, 1998. **93**(5): p. 693-704.
253. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9774-9.
254. Cummins, C.L. and D.J. Mangelsdorf, *Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland*. Biochem Soc Trans, 2006 **34**(Pt 6): p. 1110-3.
255. Alberti, S., et al., *Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 565-73.
256. Gerin, I., et al., *LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function* J Biol Chem, 2005 **280**(24): p. 23024-31.
257. Zitzer, H., et al., *Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels*. Endocrinology, 2006. **147**(8): p. 3898-905.
258. American Diabetes Association., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2007 **30 Suppl 1**: p. S42-7.
259. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. Clin Chem, 1972. **18**(6): p. 499-502.
260. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
261. Levy, J.C., D.R. Matthews, and M.P. Hermans, *Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program*. Diabetes Care, 1998. **21**(12): p. 2191-2.
262. Weissglas-Volkov, D., et al., *The N342S MYLIP polymorphism is associated with high total cholesterol and increased LDL receptor degradation in humans*. J Clin Invest, 2011. **121**(8): p. 3062-71.
263. Selvin, S., *Statistical analysis of epidemiologic data*. 3rd ed2004, Oxford ; New York: Oxford University Press. xiv, 492 p.
264. Imamura, M. and S. Maeda, *Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]*. Endocr J, 2011. **58**(9): p. 723-39.
265. Horikoshi, M., et al., *A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population*. Diabetologia, 2007. **50**(4): p. 747-51.
266. Scott, L.J., et al., *Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2649-53.
267. Groves, C.J., et al., *Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2640-4.
268. Parra, E.J., et al., *Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City*. Clin Genet, 2007. **71**(4): p. 359-66.
269. Osmark, P., et al., *Unique splicing pattern of the TCF7L2 gene in human pancreatic islets*. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 850-4.
270. Saxena, R., et al., *Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2890-5.
271. Lyssenko, V., et al., *Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2155-63.
272. Shu, L., et al., *Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(13): p. 2388-99.
273. Shu, L., et al., *Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets*. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 645-53.
274. Florez, J.C., *The new type 2 diabetes gene TCF7L2*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(4): p. 391-6.
275. Florez, J.C., et al., *TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 241-50.

276. Le Bacquer, O., et al., *TCF7L2 rs7903146 impairs islet function and morphology in non-diabetic individuals*. Diabetologia, 2012. **55**(10): p. 2677-81.
277. Zhou, Y., et al., *TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(24): p. 6419-31.
278. Ubeda, M., J.M. Rukstalis, and J.F. Habener, *Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 28858-64.
279. Stancakova, A., et al., *Single-nucleotide polymorphism rs7754840 of CDKAL1 is associated with impaired insulin secretion in nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects and in a large sample of men with normal glucose tolerance*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(5): p. 1924-30.
280. Wei, F.Y., et al., *Deficit of tRNA(Lys) modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3598-608.
281. Wei, F.Y. and K. Tomizawa, *Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes [Review]*. Endocr J, 2011. **58**(10): p. 819-25.
282. Rane, S.G., et al., *Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 44-52.
283. Kamb, A., et al., *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science, 1994. **264**(5157): p. 436-40.
284. Moritani, M., et al., *Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF-beta1*. Mol Cell Endocrinol, 2005 **229**(1-2): p. 175-84.
285. Bonnefond, A., P. Froguel, and M. Vaxillaire, *The emerging genetics of type 2 diabetes*. Trends Mol Med, 2010. **16**(9): p. 407-16.
286. Omori, S., et al., *Replication study for the association of new meta-analysis-derived risk loci with susceptibility to type 2 diabetes in 6,244 Japanese individuals*. Diabetologia, 2009. **52**(8): p. 1554-60.
287. Bantubungi, K., et al., *Cdkn2a/p16Ink4a Regulates Fasting-Induced Hepatic Gluconeogenesis Through the PKA-CREB-PGC1alpha Pathway*. Diabetes, 2014. **63**(10): p. 3199-209.
288. Barhanin, J., et al., *K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current*. Nature, 1996. **384**(6604): p. 78-80.
289. Wang, Q., et al., *Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias*. Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 17-23.
290. Neyroud, N., et al., *A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(2): p. 186-9.
291. Demolombe, S., et al., *Differential expression of KvLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(2): p. C359-72.
292. Ullrich, S., et al., *Effects of I(Ks) channel inhibitors in insulin-secreting INS-1 cells*. Pflugers Arch, 2005. **451**(3): p. 428-36.
293. Jonsson, A., et al., *A variant in the KCNQ1 gene predicts future type 2 diabetes and mediates impaired insulin secretion*. Diabetes, 2009. **58**(10): p. 2409-13.
294. Hu, C., et al., *Variations in KCNQ1 are associated with type 2 diabetes and beta cell function in a Chinese population*. Diabetologia, 2009. **52**(7): p. 1322-5.
295. Rosengren, A.H., et al., *Reduced insulin exocytosis in human pancreatic beta-cells with gene variants linked to type 2 diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(7): p. 1726-33.
296. Wang, J., et al., *Association of KCNQ1 and KLF14 polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus: A global meta-analysis*. Hum Immunol, 2014. **75**(4): p. 342-7.
297. Wang, H., et al., *Common variants in KCNQ1 confer increased risk of type 2 diabetes and contribute to the diabetic epidemic in East Asians: a replication and meta-analysis*. Ann Hum Genet, 2013. **77**(5): p. 380-91.
298. Liu, J., et al., *Meta-analysis of the effect of KCNQ1 gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(5): p. 3557-67.
299. Chimienti, F., et al., *Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules*. Diabetes, 2004 **53**(9): p. 2330-7.
300. Chimienti, F., A. Favier, and M. Seve, *ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter*. Biometals, 2005. **18**(4): p. 313-7.
301. Lefebvre, B., et al., *Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets*. J Endocrinol, 2012. **214**(2): p. 225-32.
302. Fu, Y., et al., *Down-regulation of ZnT8 expression in INS-1 rat pancreatic beta cells reduces insulin content and glucose-inducible insulin secretion*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5679.
303. Bort, R., et al., *Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas*. Development, 2004 **131**(4): p. 797-806.
304. Tanaka, T., et al., *cDNA cloning and expression of rat homeobox gene, Hex, and functional characterization of the protein*. Biochem J, 1999. **339** (Pt 1): p. 111-7.
305. McLin, V.A., S.A. Rankin, and A.M. Zorn, *Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development*. Development, 2007. **134**(12): p. 2207-17.
306. Hunter, M.P., et al., *The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis*. Dev Biol, 2007. **308**(2): p. 355-67.
307. Staiger, H., et al., *A candidate type 2 diabetes polymorphism near the HHEX locus affects acute glucose-stimulated insulin release in European populations: results from the EUGENE2 study*. Diabetes, 2008. **57**(2): p. 514-7.
308. Nielsen, J., et al., *A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1262-70.

309. Lyssenko, V., et al., *Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. **359**(21): p. 2220-32.
310. Groenewoud, M.J., et al., *Variants of CDKAL1 and IGF2BP2 affect first-phase insulin secretion during hyperglycaemic clamps*. Diabetologia, 2008. **51**(9): p. 1659-63.
311. Bieganski, P., et al., *Cdc123 and checkpoint forkhead associated with RING proteins control the cell cycle by controlling eIF2gamma abundance*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44656-66.
312. Sakagami, H., et al., *Prominent expression and activity-dependent nuclear translocation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Idelta in hippocampal neurons*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(11): p. 2697-707.
313. Verploegen, S., et al., *Identification and characterization of CKLiK, a novel granulocyte Ca⁺⁺/calmodulin-dependent kinase*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3215-23.
314. Fogarty, M.P., et al., *Identification of a Regulatory Variant That Binds FOXA1 and FOXA2 at the CDC123/CAMK1D Type 2 Diabetes GWAS Locus*. PLoS Genet, 2014. **10**(9): p. e1004633.
315. Gerken, T., et al., *The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase*. Science, 2007. **318**(5855): p. 1469-72.
316. Villalobos-Comparan, M., et al., *The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(10): p. 2296-301.
317. Fischer, J., et al., *Inactivation of the Fto gene protects from obesity*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 894-8.
318. Olszewski, P.K., et al., *Hypothalamic FTO is associated with the regulation of energy intake not feeding reward*. BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 129.
319. Smemo, S., et al., *Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 371-5.
320. Cruz, M., et al., *Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City*. Diabetes Metab Res Rev, 2010. **26**(4): p. 261-70.
321. Gutierrez-Vidal, R., et al., *LOC387761 Polymorphism Is Associated with Type 2 Diabetes in the Mexican Population*. Genet Test Mol Biomarkers, 2011. **15**(1-2): p. 79-83.
322. Dahlman, I., et al., *Functional and genetic analysis in type 2 diabetes of liver X receptor alleles--a cohort study*. BMC Med Genet, 2009. **10**: p. 27.
323. Solaas, K., et al., *Suggestive evidence of associations between liver X receptor beta polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and obesity in three cohort studies: HUNT2 (Norway), MONICA (France) and HELENA (Europe)*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 144.
324. Aguilar-Salinas, C.A., et al., *Hypoalphalipoproteinemia in populations of Native American ancestry: an opportunity to assess the interaction of genes and the environment*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 92-7.
325. Martinez-Marignac, V.L., et al., *Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors*. Hum Genet, 2007. **120**(6): p. 807-19.

ANEXOS

INVESTIGACIÓN GENÓMICA EN DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN MEXICANA

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre: _____ Fecha: _____ Registro: _____
 Dirección: _____ Teléfono: _____ Edad: _____ Sexo: _____
 Ocupación: _____ Fecha nacimiento: _____ Edad dx DT2: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

Diabetes:	SI NO	Tipo:	DM1 DM2 MODY	HTA:	SI NO	Cardiopatía Isquémica:	SI NO
Enfermedad Vascular Cerebral:	SI NO				Pancreatitis:	SI NO	

ANTECEDENTES PERSONALES

Tabaquismo:	SI NO	Alcoholismo:	SI NO	HTA:	SI NO	Tx:	SI NO
IECA	β-bloqueador	Ca-antagonista	Diurético	α-bloqueador		ATI	
Tx hormonal:	SI NO	Tipo		Pancreatitis:	SI NO	Tipo:	
Cardiopatía Isquémica:	SI NO	Tx: _____				Bypass coronario:	SI NO
Cx carotídea:	SI NO	EVC:	SI NO	EVP:	SI NO	Cirugías:	SI NO
HiperCT	HiperTG	Hipoлипoproteinemia		Dislip.mixta		Disβlipoprotei	
Transplante renal:		SI NO	Hipotiroidismo:		SI NO	Tx:	
Colestasis:	SI NO	Tx:		Colagenopatía:	SI NO	Cirrosis:	SI NO
Nefropatía:	SI NO	Tipo:			Grado:		
Retinopatía:	SI NO	Neuropatía:	SI NO	Acantosis:	SI NO	Xantomas:	SI NO
Enfermedades autoinmunes:			SI NO	Cuál:			

Glucemia promedio durante el último año:
 Tratamiento actual de la DT2 (fármaco y dosis):
 Hospitalizaciones previas relacionadas a la diabetes:
 Infecciones previas (severidad, localización, fecha):

Se encuentra en descontrol metabólico: NO SI

Causas atribuibles:

Falta de adherencia al tratamiento farmacológico	SI NO
Falta de adherencia al programa de alimentación	SI NO
Problemas familiares o personales	SI NO
Otras causas (describir): _____	

Hipertensión arterial: SI NO	Edad al dx: _____
	Tratamiento (fecha, dosis): _____
	TA promedio en los últimos meses: _____

Albuminuria o microalbuminuria: SI NO	Edad al dx: _____
	Tratamiento (fecha, dosis): _____
	Creatinina >2mg/dL: SI NO Fecha: _____

Dislipidemia:

Alguna vez se le han medido las concentraciones de:

Colesterol	SI	NO	Fecha:
Triglicéridos	SI	NO	Fecha:
Colesterol HDL	SI	NO	Fecha:

Recibe algún tratamiento hipolipomiente: SI NO Cuál: _____

Obesidad: SI NO	Peso máximo: _____	Edad a la que lo presentó: _____
Evolución peso último año:	Ha recibido tx para perder peso: SI NO Cuál: _____	

Evaluación de la actividad física

Práctica algún ejercicio: SI NO	Cuál: _____		
Duración:	Veces/sem:	Horario:	
Medio transporte habitual:	Hrs que ve TV:		
Ocupación:	Mins que camina/día:		

Exploración física:

Peso:	Talla:	C.Cintura:	C.Cadera:
TA Sistólica:	TA diastólica:	FC:94	

Otros fármacos que recibe en el momento actual:

Fármaco:	Dosis:	Indicación:
----------	--------	-------------

Laboratorios al diagnóstico:

Gluc:	Col-T:	TG:	LDL:
HDL:	ApoB:	LipoA:	

Anormalidades en el examen general de orina:

Microalbuminuria:

Anormalidades en el electrocardiograma:

TSH:

Evaluación oftalmológica (fecha, resultados):

Lugar de origen:

Paciente:	Madre:	Padre:	
Abuelo paterno:	Abuela paterna:	Abuelo materno:	Abuela materna:

Datos socioeconómicos:

Ingreso mensual:	Tipo de vivienda: propia, rentada, compartida	Gastos por pago de servicios	
Gastos en alimentación:	Modo de transporte habitual:	No. de dependientes:	Escolaridad:

Hoja de consentimiento informado del paciente

Evaluación de polimorfismos de riesgo para la diabetes tipo 2 en pacientes mexicanos.

INTRODUCCIÓN: La siguiente información describe el protocolo y su papel como participante. El investigador contestará cualquier pregunta sobre ésta forma o el estudio.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: El propósito del estudio es estudiar los defectos genéticos asociados a la diabetes tipo 2.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR: Usted ha sido invitado a participar en el estudio debido a que ha sido recientemente diagnosticado con diabetes tipo 2. Su participación sólo requiere de la toma de una muestra de sangre (40 mL) y del llenado de un cuestionario para evaluar su historia médica.

MOLESTIAS POR SU PARTICIPACIÓN: Se obtendrá una muestra de sangre. La cantidad total de sangre obtenida no implica riesgos para su salud. El estudio no modificará su tratamiento.

BENEFICIO PARA LOS PARTICIPANTES: Los resultados aportarán información nueva e importante sobre las causas genéticas para el desarrollo de la diabetes tipo 2 en pacientes mexicanos. El participante no obtendrá un beneficio directo. Los exámenes genéticos no tendrán costo para usted. Dada la duración del estudio, si en el futuro surgieran nuevos datos que pudieran beneficiarlo, los investigadores haremos lo posible por comunicárselo.

CONFIDENCIALIDAD: Los datos obtenidos de su persona son absolutamente confidenciales, no pueden ser utilizados con otro fin. Usted será informado de cualquier hallazgo obtenido en esta investigación. El DNA obtenido será empleado para el estudio de genes que potencialmente participan en diabetes y en la génesis de las complicaciones crónicas de esta. La información derivada del estudio no será incorporada a su expediente clínico.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este estudio. Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. En caso de que decidiera retirarme, la atención que recibo como paciente no se verá afectada. Recibiré, si así lo solicito, los resultados de mi participación. Debo informar, tan pronto como sea posible, a los investigadores, de cualquier cambio importante que ocurra en mi estado de salud o cambio de domicilio. Las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio.

He comprendido el contenido de esta carta de consentimiento, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar en este estudio:

Firma del paciente y fecha

Firma del investigador y fecha

Firma del testigo 1, parentesco y fecha

Firma del testigo 2, parentesco y fecha

Contribution of Common Genetic Variation to the Risk of Type 2 Diabetes in the Mexican Mestizo Population

Marco Alberto Gamboa-Meléndez,¹ Alicia Huerta-Chagoya,¹ Hortensia Moreno-Macías,^{1,2} Paola Vázquez-Cárdenas,¹ María Luisa Ordóñez-Sánchez,¹ Rosario Rodríguez-Guillén,¹ Laura Riba,¹ Maribel Rodríguez-Torres,¹ María Teresa Guerra-García,¹ Luz Elizabeth Guillén-Pineda,³ Shweta Choudhry,⁴ Laura del Bosque-Plata,⁵ Samuel Canizales-Quinteros,¹ Gustavo Pérez-Ortiz,¹ Fernando Escobedo-Aguirre,⁶ Adalberto Parra,⁷ Israel Lerman-Garber,³ Carlos Alberto Aguilar-Salinas,³ and María Teresa Tusié-Luna¹

Several studies have identified nearly 40 different type 2 diabetes susceptibility loci, mainly in European populations, but few of them have been evaluated in the Mexican population. The aim of this study was to examine the extent to which 24 common genetic variants previously associated with type 2 diabetes are associated in Mexican Mestizos. Twenty-four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in or near genes (*KCNJ11*, *PPARG*, *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/2B*, *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *ARHGEF11*, *JAZF1*, *CDC123/CAMK1D*, *FTO*, *TSPAN8/LGR5*, *KCNQ1*, *THADA*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL*, and *RALGPS2*) were genotyped in Mexican Mestizos. A case-control association study comprising 1,027 type 2 diabetic individuals and 990 control individuals was conducted. To account for population stratification, a panel of 104 ancestry-informative markers was analyzed. Association to type 2 diabetes was found for rs13266634 (*SLC30A8*), rs7923837 (*HHEX*), rs10811661 (*CDKN2A/2B*), rs4402960 (*IGF2BP2*), rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*), and rs2237892 (*KCNQ1*). In addition, rs7754840 (*CDKAL1*) was associated in the nonobese type 2 diabetic subgroup, and for rs7903146 (*TCF7L2*), association was observed for early-onset type 2 diabetes. Lack of association for the rest of the variants may have resulted from insufficient power to detect smaller allele effects. *Diabetes* 61:3314–3321, 2012

The prevalence of type 2 diabetes is rapidly increasing worldwide (1). For the Mexican population aged older than 20 years, type 2 diabetes prevalence increased from 7.5% in 2000 to 14.4% in 2006 ($\sim 7.3 \times 10^6$ individuals) (2,3). Furthermore, the proportion of patients diagnosed before age 40 years also showed a steady increase, with 21.5% of patients diagnosed before age 45, imposing a significant public health burden due to substantial disability and premature death. Several studies in the Mexican population have established polygenic early-onset type 2 diabetes as a clinically and metabolically distinct entity from late-onset type 2 diabetes (4,5).

Various genome-wide association studies (GWASs) have identified close to 40 type 2 diabetes susceptibility loci mainly in European populations, including *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX/KIF1/IDE*, *EXT2*, *CDKN2A/CDKN2B*, *IGF2BP2*, *CDKAL1*, *FTO* (6–9), and more recently *JAZF1*, *CDC123/CAMK1D*, *THADA*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, *TSPAN8* (10), *KCNQ1* (11,12), *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL*, and *RALGPS2* (13). Moreover, the *PPARG* and *KCNJ11* genes, initially associated with type 2 diabetes through candidate genes studies, were confirmed through European GWASs (7–9). The transcription factor-7-like 2 (*TCF7L2*), extensively associated with type 2 diabetes in various populations, has also been found associated in Mexican Mestizos (14–18).

Although associations of many common variants to type 2 diabetes have been replicated in several European and some Asian populations (19–21), there are still few studies in Mexican Mestizos, where lack of association may be due to limited sample size (18,22). The Mexican Mestizo population resulted from a recent admixture of European, Amerindian, and African populations, having estimated average proportions of ~ 50 , ~ 45 , and $\sim 5\%$, respectively (23). Therefore, in addition to susceptibility variants that may derive exclusively from Amerindian ancestry (24), genetic variants that are common in Europeans are likely to be part of the genetic architecture of type 2 diabetes in Mexicans.

To assess the contribution of previously identified type 2 diabetes risk alleles in Mexican Mestizos, we analyzed 24 SNPs in or near 21 genes and evaluated their role in type 2 diabetes susceptibility in our population. Most of the examined gene variants correspond to those identified through the analysis of candidate genes and the “first-generation” GWAS type 2 diabetes risk alleles reported and further replicated in other populations. In addition, gene variants identified in Mexican Americans and Pima

From the ¹Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; the ²División de Ciencias Sociales y Humanidades, Departamento de Economía, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico; the ³Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; the ⁴Department of Urology and Institute for Human Genetics, University of California, San Francisco, San Francisco, California; the ⁵Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico; the ⁶Unidad Materno Fetal, Hospital 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, Mexico City, Mexico; and the ⁷Departamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinoza de los Reyes, Mexico City, Mexico.

Corresponding authors: María Teresa Tusié-Luna, mttusié@gmail.com, and Carlos Alberto Aguilar-Salinas, caguilarsalinas@yahoo.com.

Received 25 April 2011 and accepted 6 June 2012.

DOI: 10.2337/db11-0550

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db11-0550/-/DC1>.

M.A.G.-M. and A.H.-C. contributed equally to this work.

© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

Indians were included for analysis in the study due to the substantial Amerindian genetic component of our population.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Subjects. This study was approved by the ethics committees of all participating institutions. All individuals gave informed consent before they were included in the study. Only unrelated Mexican individuals whose parents and grandparents were self-identified as Mexican Mestizos were included.

Diagnosis of type 2 diabetes was based on American Diabetes Association criteria such as fasting plasma glucose values >125 mg/dL, current treatment with a hypoglycemic agent, or casual glucose values ≥ 200 mg/dL. Included were 1,027 type 2 diabetic individuals: 529 (216 men and 313 women) recruited at the Department of Endocrinology and Lipid Metabolism of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMSNZ) and three other reference clinics in Mexico City, and 498 additional type 2 diabetic individuals (151 men and 347 women) identified from the 2000 National Health Survey (a nation-wide population-based probabilistic survey). Of the latter, 160 (32%) were previously unaware of their condition at the time of the survey (25). From the total type 2 diabetic individuals, 643 were nonobese (BMI <30 kg/m²), and 384 were obese (BMI ≥ 30 kg/m²; Supplementary Table 1). Early- or late-onset of diabetes was defined using age 45 years as a cutoff, as described in different genetic studies for type 2 diabetes (24,26). Individuals with early-onset type 2 diabetes did not require insulin at least during the first 2 years after diagnosis and had no family history of maturity-onset diabetes of the young. In addition, to reduce the possibility of including control individuals who might develop type 2 diabetes later in life, the control group also included 990 (392 men and 598 women; 692 nonobese and 298 obese) healthy, normoglycemic individuals (glucose ≤ 100 mg/dL), aged 45 years or older, with no first-degree relatives or grandparents with type 2 diabetes (Table 1).

Biochemical measurements. The Endocrinology and Lipid Metabolism Department of INCMSNZ performed all biochemical laboratory measurements with commercially available standardized methods. This laboratory is certified by the External Comparative Evaluation of Laboratories Program of the College of American Pathologists. Blood samples were obtained after a 9- to 12-h fast. Glucose was measured using the glucose oxidase method, and serum total cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C), and triglycerides were measured using a Synchron autoanalyzer (Beckman Co). LDL-C was calculated as described by Friedwald (1972) (27).

SNP selection and genotyping. The studied gene variants correspond to those identified through the analysis of candidate genes and most of the "first-generation" GWAS type 2 diabetes reported and further replicated in other populations (6–11). In addition, gene variants identified in Mexican Americans and Pima Indians were included for analysis because Mexican Mestizos have a high Amerindian genetic component (13,28).

Genomic DNA was extracted from total blood samples using a commercial kit (QIAamp 96 DNA Blood kit, Qiagen). A total of 24 SNPs previously associated with type 2 diabetes risk in other populations were genotyped in all individuals: rs5219 (*KCNJ11*), rs1801282 (*PPARG*), rs7903146 (*TCF7L2*), rs1111875 and rs7923837 (*HHEX/KIF1/IDE*), rs13266634 (*SLC30A8*), rs10811661 (*CDKN2A/2B*), rs7754840 and rs10484634 (*CDKALI*), rs945508 (*ARHGFB1*), rs864745 (*JAZF1*), rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*), rs8050136 (*FTO*), rs7578597 (*THADA*), rs2237892 (*KCNQ1*), rs4607103 (*ADAMTS9*), rs10923931 (*NOTCH2*), rs1470579 and rs4402960 (*IGF2BP2*), rs7961581 (*TSPAN8*), rs757705 (*NXPH1*), rs7164773 (*RORA*), rs979752 (*UBQLNL*), and rs2773080 (*RALGPS2*).

Genotyping was performed using KASPAR assays (Kbioscience, U.K.). A randomly selected subset of samples was tested in duplicate to confirm genotyping results. In addition, 104 ancestry informative markers (AIMs) were genotyped to account for population stratification in 1,372 individuals (Supplementary Table 4). AIMs were genotyped at the Biomedical Genomics Center, University of Minnesota. Four multiplex PCR assays containing 28, 27, 26, and 26 markers, respectively, were performed, followed by single-base primer extensions using iPLEX enzyme and buffers (Sequenom, San Diego, CA). Primer extension products were measured with the MassARRAY Compact System (Sequenom) and analyzed by mass spectra using TYPER software (Sequenom) to generate genotype calls.

Statistical analysis. Median and the 25th and 75th percentiles of baseline characteristics were calculated and compared using the Kruskal-Wallis test. Also, χ^2 tests were used to compare genotype frequencies between groups and to determine Hardy-Weinberg equilibrium. Pairwise linkage disequilibrium (LD) between SNPs was calculated using R 2.7.1 software.

Individual ancestry was estimated using data from evenly distributed AIMs using STRUCTURE 2.2 software (29,30). Means and correlations among the three vectors of ancestry (Native American, European, and African) were

assessed. Because total ancestry marker information was available in a subset of 1,372 subjects, we first imputed the missing Native American ancestry values for the rest of the study sample ($n = 645$). Briefly, we used a two-step imputation model, as reported by Weissglas-Volkov et al. (31), in which we assessed the relationship between Amerindian ancestry and glucose value through a linear regression. However, although the coefficient ($\beta = 96.27$) for this model was statistically significant ($P < 0.001$), the determination coefficient was very low ($R^2 = 0.023$). Even when we tested for other clinical or biochemical parameters and used saturated models, including several covariates, the proportion of variability accounted for the statistical model did not exceed 25%; thus, we decided the model was not accurate enough to predict ancestry.

As an alternative, the association between each SNP and type 2 diabetes was assessed through two logistic models exclusively on those subjects genotyped for ancestry. The first model was adjusted for age, sex, and BMI. The second model was also adjusted for Native American ancestry. These analyses led us to identify a group of nine SNPs for which the odds ratio (ORs) or the P value did not change drastically due to the effect of ancestry when comparing the ancestry adjusted versus nonadjusted association analyses (a threshold of less than 10% variation for ORs was set). For these nine SNPs, ancestry was not a covariate in the final models, so the whole set of 2,017 subjects was included.

For the 12 SNPs, where the risk effect changed more than 10% or the P value changed drastically, only the subjects with ancestry information were included, and the final models were adjusted for this variable. Associations between genotypes and type 2 diabetes were tested under an additive disease model. A stratified association analysis was also conducted according to obesity status and age of onset (defining age 45 years as a cutoff). A Woolf test was used to assess the heterogeneity between ORs in the stratified analysis as well as between Mexican and European ancestry (32).

Because the prior probability of association is highly based on studies in Europeans and further replicated in other populations, it is unlikely to detect effects due to statistical fluctuation only. Therefore, correction by multiple comparisons was not applied, and an association was considered statistically significant if at a nominal P value ≤ 0.05 .

The association between SNPs with quantitative outcomes was done through a stratified linear regression analysis conditional to type 2 diabetic status. For SNPs rs13266634, rs10811661, rs7754840, and rs12779790, models were adjusted for age, sex, and BMI in the entire case-control sample. For rs7903146, rs7923837, rs4402960, and rs2237892, the model was also adjusted for ancestry. In all cases, risk alleles are those previously reported as associated with type 2 diabetes in other populations (8,10,11,13,28).

To assess the combined effect of the studied loci, we calculated three genotype scores, counting the number of risk alleles: the first was constructed with the 21 SNPs analyzed, the second was obtained with the 17 variants that consistently replicated in Europeans (excluding *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL* and *RALGPS2* gene variants), and the third was obtained by excluding from these 17 the 8 gene variants showing significant association to type 2 diabetes in our sample. The combined effect of the studied loci on type 2 diabetes was assessed through a logistic model adjusted for age, sex, BMI, and ancestry.

Calculations were performed using STATA/SE 10.0 software (StataCorp LP, College Station, TX).

RESULTS

Differences in clinical, anthropometric, and biochemical measurements between case and control individuals are described in Table 1. Overall, individuals with type 2 diabetes had significantly higher BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, glucose and triglyceride levels, and lower total cholesterol, HDL-C, and LDL-C levels. Waist circumference and systolic and diastolic blood pressure also showed statistically significant differences between the subgroups with early- and late-onset type 2 diabetes. Insulin treatment was given to 12.6% of patients, but no statistical differences were observed between early- and late-onset groups. In contrast, significant differences were observed for age, sex, and systolic and diastolic blood pressure between obese and nonobese type 2 diabetic patients (Supplementary Table 1).

Type 2 diabetes association analyses and the effect of population stratification. To investigate the role of different type 2 diabetes allelic variants, we studied 24 SNPs in or near 21 genes, most of which had been replicated in other populations (20,33,34). Although all tested SNPs

TABLE 1
General characteristics of the studied sample and stratification by age of onset

	Control subjects	Type 2 diabetic patients		
		Total case subjects	Early-onset	Late-onset
N	990	1,027	510	517
Males (%)	39.60	35.74	38.04	33.46
Age (years)	53 (49–62)	53 (45–62)*	45 (38–52)†	60 (54–66)
Age at diagnosis (years)	—	46 (37–52)	37 (31–42)†	52 (49–59)
BMI (kg/m ²)	27.5 (25.3–30.5)	28.7 (26–32)*	28.7 (25.7–32.1)	28.7 (26.4–31.7)
Waist circumference (cm)	92.9 (86.5–101)	100 (92–108.2)*	98 (90–108)†	101 (93–108.5)
Blood pressure (mmHg)				
Systolic	120 (110–131)	130 (120–140)*	122 (112–135)†	130 (120–145)
Diastolic	80 (70–88)	80 (75–90)*	80 (73–90)†	83 (76–90)
Glucose (mg/dL)	88.5 (82–95)	221 (147.5–315.5)*	224 (150–316)	220 (145–312)
Cholesterol (mg/dL)				
Total	213 (189–241)	203 (175–237)*	202 (173–237)	205 (177–238)
HDL-C	44 (37–51.5)	38 (32–45)*	38 (31–44)	38 (32–45)
LDL-C	133 (113–156.5)	111 (86–138)*	110 (86–139)	112 (86–138)
Triglycerides (mg/dL)	164 (119–237)	233 (157–373)*	231 (154–370)	233.5 (161–375)

Median (25th–75th percentiles) values of baseline characteristics are shown. **P* < 0.05 comparisons between overall type 2 diabetic patients and controls subjects. †*P* < 0.05 comparisons between early-onset and late-onset type 2 diabetes: early-onset subjects diagnosed before age 45 years; late-onset subjects diagnosed at age 45 years or older.

showed genotyping call rates above 95%, only 21 of the variants in or near 20 genes were used for the analysis: SNPs rs10484634 (*CDKALI*) and rs75785597 (*THADA*) had a minor allele frequency lower than 0.05, and SNP rs1470579 (*IGF2BP2*) did not reach Hardy-Weinberg equilibrium in control individuals (Supplementary Table 5). However, variant rs4402960 (*IGF2BP2*) in LD with rs1470579 in the total sample was included in the analysis (*r*² = 0.89).

In this sample, mean Native American ancestry was 58.9% for type 2 diabetic subjects and 51.1% in control

individuals (Kruskal-Wallis test *P* < 0.01). Because ancestry marker information was available only in a subset of 1,372 subjects, Table 2 shows the association analysis for the case-control individuals with or without ancestry adjustment. Through this analysis we identified 12 of 21 SNPs where the ORs or the *P* value was drastically affected by ancestry. For all reported associations we considered the case-control sample that had AIMS data. However, for three of the studied variants, not drastically affected by ancestry, stronger *P* values were obtained when the

TABLE 2
Association analyses with type 2 diabetes in Mexican Mestizos and the confounder effect of ancestry

Nearest gene	SNP	Risk allele	868 case and 504 control subjects adjusted for ancestry		868 case and 504 control subjects without ancestry correction		1,027 case and 990 control subjects without ancestry	
			OR (95% CI)*	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>
<i>KCNJ11</i>	rs5219	T	1.16 (0.97–1.37)	0.099	1.17 (0.98–1.38)	0.076	1.10 (0.96–1.26)	0.154
<i>PPARG</i>	rs1801282	C	1.19 (0.92–1.55)	0.180	1.08 (0.84–1.39)	0.524	1.10 (0.90–1.34)	0.342
<i>TCF7L2</i>	rs7903146	T	1.21 (0.97–1.51)	0.087	1.04 (0.84–1.28)	0.735	—	—
<i>SLC30A8</i>	rs13266634	C	1.21 (1.01–1.46)	0.040	1.22 (1.02–1.46)	0.034	1.22 (1.05–1.41)	0.009
<i>HHEX</i>	rs1111875	C	0.95 (0.80–1.12)	0.554	0.93 (0.79–1.10)	0.384	1.01 (0.89–1.16)	0.859
	rs7923837	G	1.21 (1.02–1.44)	0.025	1.10 (0.94–1.30)	0.238	—	—
<i>CDKN2A/2B</i>	rs10811661	T	1.47 (1.14–1.89)	0.003	1.59 (1.24–2.04)	<0.001	1.42 (1.15–1.75)	0.001
<i>CDKALI</i>	rs7754840	C	1.16 (0.97–1.38)	0.104	1.14 (0.96–1.35)	0.148	1.13 (0.98–1.30)	0.081
<i>IGF2BP2</i>	rs4402960	T	1.24 (1.01–1.53)	0.042	1.12 (0.92–1.37)	0.265	—	—
<i>ARHGEF11</i>	rs945508	A	1.05 (0.87–1.28)	0.604	0.91 (0.76–1.09)	0.319	—	—
<i>JAZF1</i>	rs864745	T	1.11 (0.93–1.32)	0.253	1.24 (1.04–1.47)	0.015	—	—
<i>CDC123/CAMK1D</i>	rs12779790	G	1.26 (1.02–1.58)	0.036	1.25 (1.01–1.55)	0.042	1.24 (1.05–1.47)	0.013
<i>FTO</i>	rs8050136	A	1.03 (0.84–1.26)	0.762	0.90 (0.74–1.09)	0.278	—	—
<i>TSPAN/LGR5</i>	rs7961581	C	1.15 (0.90–1.47)	0.252	0.93 (0.73–1.17)	0.516	—	—
<i>KCNQ1</i>	rs2237892	C	1.36 (1.13–1.64)	0.001	1.18 (0.99–1.42)	0.062	—	—
<i>ADAMTS9</i>	rs4607103	C	1.01 (0.84–1.20)	0.952	1.03 (0.87–1.23)	0.726	1.05 (0.91–1.20)	0.521
<i>NOTCH2</i>	rs10923931	T	1.05 (0.78–1.42)	0.752	0.99 (0.73–1.33)	0.931	1.04 (0.82–1.32)	0.731
<i>NXPH1</i>	rs757705	G	1.17 (0.98–1.39)	0.080	1.25 (1.05–1.48)	0.010	—	—
<i>RORA</i>	rs7164773	T	0.95 (0.80–1.38)	0.600	1.08 (0.91–1.28)	0.357	—	—
<i>UBQLNL</i>	rs979752	C	0.88 (0.70–1.11)	0.290	1.04 (0.84–1.30)	0.700	—	—
<i>RALGPS2</i>	rs2773080	A	1.03 (0.84–1.28)	0.760	0.90 (0.74–1.10)	0.315	—	—

Risk allele is defined as previously reported associated to type 2 diabetes risk in other populations. *P* values are nominal *P* values. Statistically significant observations are bold-faced. All analyses were based on additive models, and logistic models were adjusted for age, sex, and BMI. *Logistic models were also adjusted for ancestry.

total sample was included for the association analysis: rs13266634 (*SLC30A8*; OR 1.22, $P = 0.009$), rs10811661 (*CDKN2A/2B*; OR 1.42, $P = 0.001$), and rs12779790 (*CDC123/CAMK1D*; OR 1.24, $P = 0.013$; Table 2).

It is important to mention that although the ancestry correction included more case than control individuals (868 vs. 504), selection of subjects for AIMS analysis was random, and ethnicity could not be obvious before the AIMS genotyping. Furthermore, when comparing genotype frequencies from case or control individuals with or without AIMS information, we did not find significant differences, except for rs10811661 (*CDKN2A/2B*) and rs864745 (*JAZF1*) in type 2 diabetic individuals and for rs7961581 (*TSPAN/LGR5*) in control individuals. Thus, potential selection bias is unlikely.

In contrast, the allelic variants of genes *KCNJ11* (rs5219), *PPARG* (rs1801282), *HHEX* (rs1111875), *ARHGEF11* (rs945508), *JAZF1* (rs864745), *FTO* (rs8050136), *TSPAN/LGR5* (rs7961581), *ADAMTS9* (rs4607103), *NOTCH2* (rs10923931), *NXPH1* (rs757705), *RORA* (rs7164773), *UBQLNL* (rs979752), and *RALGPS2* (rs2773080) failed to show association in the studied sample. In addition, variants rs1111875 and rs7923837 (*HHEX*) were not in LD in our sample ($r^2 = 0.099$).

Supplementary Table 2 summarizes the comparisons of the risk alleles frequencies between Mexican and European populations.

Differential contributions of type 2 diabetes alleles in distinct phenotypic subgroups. Table 3 reports the association analysis when the sample was stratified by age of onset or obesity status. Despite a reduced sample size, rs7903146 (*TCF7L2*) was associated with early-onset type 2 diabetes (OR 1.39, $P = 0.024$). However, a test of heterogeneity failed to demonstrate a significant difference between subgroups with early- and late-onset type 2 diabetes. In addition, when stratifying by obesity, rs7754840 (*CDKAL1*) showed a significant association in the non-obese type 2 diabetic subgroup (1.25 [95% CI 1.06–1.49], $P = 0.009$) and heterogeneity was significant ($P = 0.04$).

We also explored the association of SNPs with type 2 diabetes-related quantitative traits, including insulin levels and homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) and HOMA- β . An association was detected for rs7903146 (*TCF7L2*) in normoglycemic subjects where risk allele carriers (CT+TT) showed significantly lower HOMA- β values than noncarriers (CC; OR 109.6 [95% CI 104.1–115.2] vs. 121.8 [116.9–126.6], respectively; $P = 0.015$). Interestingly, rs8050136 (*FTO*) was associated with HOMA- β in normoglycemic subjects. Risk allele carriers (CA+AA) showed significantly lower HOMA- β values than noncarriers (CC; 109.8 [104.6–115] vs. 121.6 [116.5–126.7], respectively $P = 0.014$). No other significant differences were observed according to genotype for HOMA- β , HOMA-IR, or glucose or insulin levels. In addition, only rs8050136 (*FTO*) showed an association to obesity in the total sample (1.25 [1.06–1.47], $P = 0.008$).

Assessment of cumulative effect of studied loci. We first determined the genotype score including the 21 SNPs (ranging from 10 to 30 risk alleles). The mean (\pm SD) genotype score was 19.4 ± 2.7 for control individuals and 19.9 ± 2.9 for case subjects. Also, in a logistic model adjusted for age, sex, BMI, and ancestry, the obtained OR of 1.09 (95% CI 1.04–1.14) was statistically significant ($P < 0.01$). For the second genotype score, which included 17 SNPs (ranging from 7 to 24 risk alleles, and excluding variants from the Mexican-American population), we

obtained an OR of 1.11 (1.06–1.17; $P < 0.01$). Finally, the third genotype score (ranging from 2 to 13 risk alleles) was performed excluding from these 17 the 8 associated variants with nominal significance, and an OR of 1.03 (0.95–1.12; $P = 0.45$) was obtained.

DISCUSSION

Because of its ethnic composition, common type 2 diabetes susceptibility variants of European and Amerindian origin are expected to contribute to some degree to the genetic susceptibility of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population. In this report, we analyzed whether 21 type 2 diabetes risk variants, most of which were previously identified and replicated in different European and Asian populations, were associated with type 2 diabetes in Mexican Mestizos. Although the European component of our type 2 diabetic case subjects is close to 40%, not all the alleles conferring type 2 diabetes risk in Europeans seem to be associated with type 2 diabetes in Mexican Mestizos. Given that all ORs identified are consistent with those seen in studies of Europeans, providing all detected associations involved the same risk allele and were in the same direction, we showed significant replication for 8 of 21 studied loci.

Interestingly, from the identified associated variants, rs2237892 (*KCNQ1*) and rs10811661 (*CDKN2A/2B*) showed the strongest effects on type 2 diabetes risk in the studied sample, with ORs of 1.36 ($P = 0.001$) and 1.42 ($P = 0.001$), respectively. *KCNQ1* (initially found associated to type 2 diabetes in Asians) was not associated in Mexican Americans or Mexicans in two separate GWA studies, and only a marginal association to this locus was found through a meta-analysis merging data from these two populations (35). The association we found for rs10811661 near the *CDKN2A/2B* gene region is consistent with the fact that this locus has shown replication for type 2 diabetes and related traits such as decreased glucose-stimulated insulin secretion and decreased β -cell function across populations (7–9,20,34,36). In addition, in a meta-analysis that included Mexican Americans, Mexican Mestizos, and Europeans, SNP rs1333051 (in LD with rs10811661 [$r^2 = 0.75$] in Europeans), showed the strongest association to type 2 diabetes (35). More recently, this locus was also found associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients (37).

Also of interest is that the associations found for *TCF7L2* and to *CDKAL1* were evident upon stratification of the sample by age of onset or obesity status. That these associations are artificial is unlikely, because the *TCF7L2* and *CDKAL1* loci have been extensively associated with type 2 diabetes in several populations (14–16,21,37), and despite the size of the sample, a significant association was detected for rs7903146 (*TCF7L2*; $P = 0.024$) in the group with early-onset type 2 diabetes. Similarly, upon stratification of the sample by obesity status, a significant association was detected for the rs7754840 variant (*CDKAL1*; $P = 0.019$).

It is therefore possible that the observed associations may be the result of a differential role of the *TCF7L2* and *CDKAL1* gene variants on insulin secretion in these two type 2 diabetic subgroups. For instance, the association found for rs7903146 (*TCF7L2*) in the early-onset type 2 diabetic subgroup may reflect a larger proportion of type 2 diabetic subjects with reduced β -cell function, and we were able to find significantly lower HOMA- β values for

TABLE 3
Association analyses with type 2 diabetes in Mexican Mestizos according to age of onset and obesity status

Nearest gene	SNP	Early-onset		Late-onset		Het test	Nonobese		Obese		Het test
		OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>		OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	
<i>KCNJ11</i>	rs5219*	1.12 (0.93–1.34)	0.233	1.13 (0.96–1.34)	0.153	0.94	1.14 (0.97–1.34)	0.119	1.01 (0.80–1.28)	0.923	0.43
<i>PPARG</i>	Rs1801282*	1.12 (0.86–1.47)	0.394	1.07 (0.83–1.37)	0.602	0.81	1.12 (0.88–1.43)	0.361	1.04 (0.74–1.48)	0.811	0.98
<i>TCF7L2</i>	Rs7903146†	1.39 (1.04–1.85)	0.024	1.13 (0.86–1.48)	0.376	0.43	1.30 (0.99–1.70)	0.060	1.13 (0.77–1.64)	0.539	0.36
<i>SLC30A8</i>	Rs13266634*	1.39 (1.13–1.72)	0.002	1.18 (0.98–1.42)	0.075	0.25	1.23 (1.02–1.48)	0.027	1.23 (0.95–1.59)	0.110	0.76
<i>HHEX</i>	Rs1111875*	0.99 (0.82–1.19)	0.913	1.02 (0.87–1.21)	0.793	0.81	1.00 (0.85–1.18)	0.997	1.04 (0.83–1.32)	0.715	0.81
	Rs7923837†	1.07 (0.85–1.34)	0.567	1.22 (0.99–1.50)	0.062	0.41	1.37 (1.11–1.70)	0.003	0.92 (0.72–1.31)	0.850	0.16
<i>CDKN2A/2B</i>	Rs10811661*	1.46 (1.10–1.95)	0.009	1.45 (1.11–1.88)	0.006	0.97	1.38 (1.07–1.78)	0.013	1.49 (1.03–2.14)	0.033	0.81
<i>CDKAL1</i>	Rs7754840*	1.11 (0.92–1.34)	0.290	1.07 (0.90–1.27)	0.435	0.78	1.25 (1.06–1.49)	0.009	0.90 (0.71–1.15)	0.392	0.04
<i>IGF2BP2</i>	Rs4402960†	1.04 (0.79–1.37)	0.768	1.35 (1.05–1.74)	0.019	0.17	1.23 (0.95–1.58)	0.114	1.30 (0.89–1.91)	0.188	0.59
<i>ARHGEF11</i>	rs945508†	1.12 (0.88–1.44)	0.354	1.00 (0.79–1.28)	0.974	0.37	0.95 (0.75–1.21)	0.696	1.28 (0.91–1.81)	0.154	0.06
<i>JAZF1</i>	rs864745†	1.20 (0.94–1.52)	0.143	1.03 (0.83–1.29)	0.790	0.94	1.13 (0.91–1.41)	0.261	1.06 (0.77–1.45)	0.724	0.55
<i>CDC123/CAMK1D</i>	rs12779790*	1.33 (1.05–1.68)	0.017	1.15 (0.93–1.43)	0.194	0.37	1.29 (1.05–1.59)	0.015	1.16 (0.85–1.58)	0.351	0.67
<i>FTO</i>	rs8050136†	1.07 (0.82–1.39)	0.642	0.95 (0.74–1.23)	0.704	0.53	1.07 (0.83–1.38)	0.625	0.95 (0.68–1.34)	0.787	0.96
<i>TSPAN8/LGR5</i>	rs7961581†	1.00 (0.72–1.39)	0.994	1.27 (0.94–1.72)	0.116	0.48	1.14 (0.85–1.52)	0.393	1.23 (0.77–1.96)	0.392	0.19
<i>KCNQ1</i>	rs2237892†	1.27 (0.99–1.62)	0.051	1.37 (1.09–1.74)	0.008	0.43	1.37 (1.09–1.73)	0.007	1.39 (1.01–1.91)	0.046	0.73
<i>ADAMTS9</i>	rs4607103*	1.07 (0.88–1.29)	0.516	1.02 (0.86–1.22)	0.809	0.96	1.08 (0.91–1.28)	0.374	0.99 (0.78–1.28)	0.977	0.62
<i>NOTCH2</i>	rs10923931*	1.19 (0.85–1.66)	0.303	0.99 (0.73–1.33)	0.949	0.42	1.00 (0.75–1.33)	0.980	1.12 (0.73–1.71)	0.616	0.62
<i>NXPH1</i>	rs757705†	1.22 (0.96–1.54)	0.106	1.17 (0.94–1.45)	0.163	0.81	1.20 (0.97–1.49)	0.090	1.09 (0.80–1.49)	0.571	0.53
<i>RORA</i>	rs7164773†	0.98 (0.78–1.24)	0.880	1.05 (0.84–1.31)	0.674	0.77	0.94 (0.76–1.17)	0.584	0.97 (0.72–1.31)	0.859	0.80
<i>UBQLNL</i>	rs979752†	0.91 (0.67–1.24)	0.568	0.94 (0.71–1.24)	0.648	0.45	0.91 (0.69–1.21)	0.523	0.80 (0.54–1.20)	0.287	0.34
<i>RALGPS2</i>	rs2773080†	0.94 (0.71–1.25)	0.680	1.04 (0.80–1.34)	0.795	0.41	1.18 (0.91–1.52)	0.222	0.81 (0.56–1.17)	0.254	0.27

Het test, heterogeneity (Wolf) test. *P* values are nominal *P* values. Statistically significant observations are bold-faced. *All analyses were based on an additive model, and logistic models were adjusted for age, sex, and BMI. †Logistic models were also adjusted for ancestry.

rs7903146 risk allele carriers versus noncarriers in normoglycemic individuals ($P = 0.02$), as previously reported (39–41). In addition, although we were unable to demonstrate significantly lower HOMA- β values in rs7754840 (*CDKALI*) risk allele carriers versus noncarriers, there are previous reports where SNPs rs7756992 and rs10946398 in the *CDKALI* gene are associated with an insulin secretory defect and impaired insulin response in oral and intravenous glucose tolerance tests (38,42,43).

The three rs7754840, rs7756992, and rs10946398 variants are all within intron 5, and rs7756992 and rs7754840 are in LD in European ($r^2 = 0.73$) and Hispanic populations ($r^2 = 1.0$) (44,45). Moreover, accounting for the excess of men in the nonobese group, we also tested for a potential sex-specific association; however, similar ORs and nominal P values were observed for both sexes.

Modulation of type 2 diabetes risk by obesity has been reported for other susceptibility gene variants. Cauchi et al. (44) reported that genetic variants modulating insulin action may have an increased effect on type 2 diabetes susceptibility in the presence of obesity, whereas genetic variants acting on insulin secretion may have a greater effect on type 2 diabetes susceptibility in nonobese individuals. In this regard, the association found for rs7754840 (*CDKALI*) in nonobese type 2 diabetic patients in our study supports impaired insulin secretion as an important mechanism underlying type 2 diabetes in the nonobese type 2 diabetic subgroup.

A potential constraint of the current study is the lack of AIMS data for all of the subjects. However the P values for the reported associated variants (rs13266634, rs7923837, rs10811661, rs4402960, rs12779790, and rs2237892) were significant when the analysis was performed exclusively in individuals with AIMS data. Furthermore, an even stronger effect was observed for three of these variants (rs13266634, rs10811661, and rs12779790) by the inclusion of the entire sample set. A special case is that of variants rs864745 (*JAZF1*) and rs757705 (*NXPH1*): when individuals with AIMS data were used in the analyses without considering ancestry as a variable, a significant P value was obtained. However, these values were rendered nonsignificant when corrected by ancestry. Consequently, these two variants were reported as not associated with type 2 diabetes in our sample.

For those loci that showed replication to type 2 diabetes in our population, we compared the effect sizes between Mexicans and Europeans. In the case of *KCNQ1*, the comparison was also made with Asians because this locus has not been extensively replicated in Europeans (45). The ORs obtained for the *KCNQ1* variant were not significantly different from those reported for Europeans or Asians (Supplementary Table 3). Similar OR and P values were obtained for the multilocus genotype score for the analysis with all 21 analyzed gene variants as well as for the analysis excluding the *NXPH1*, *RORA*, *UBQLNL*, and *RALGPS2* type 2 diabetes risk alleles described in Mexican Americans. In contrast, a nonsignificant P value was obtained when excluding the eight associated variants from the analysis, which would be consistent with the association being driven entirely by the nominally significant variants.

Variants rs5219 (*KCNJ11*), rs1111875 (*HHEX*), rs8050136 (*FTO*), rs864745 (*JAZF1*), rs7961581 (*TSPAN/LGR5*), rs4607103 (*ADAMTS9*), and rs10923931 (*NOTCH2*), with reported OR values below 1.2 in European populations, failed to show an association with type 2 diabetes in

Mexican Mestizos. In this regard, risk alleles frequencies for *KCNJ11*, *ARHGEF11*, *TSPAN/LGR5*, *ADAMTS9*, *NOTCH2*, and *FTO* are significantly lower in Mexicans than in Europeans (Supplementary Table 2). This observation has to be taken into account in future association studies, because a much larger sample would be required to detect potential risk effects of these loci.

Even though the prevalence of type 2 diabetes in Mexico is one of the highest worldwide, very few studies have reported an association of type 2 diabetes risk variants in the Mexican population (17,18,22,46). Previous reports studied smaller samples, did not exclude individuals with a family history of type 2 diabetes from the control group, and some excluded obese individuals or did not analyze the data stratifying by type 2 diabetic subgroups. These factors may explain the lack of association previously reported for rs7754840 (*CDKALI*) (18) and rs13266634 (*SLC30A8*) (22). The current study included a larger sample size; however, the lack of association of variants *KCNJ11* (rs5219), *PPARG* (rs1801282), *JAZF1* (rs864745), *FTO* (rs8050136), *TSPAN/LGR5* (rs7961581), *ADAMTS9* (rs4607103), *NOTCH2* (rs10923931), *NXPH1* (rs757705), *RORA* (rs7164773), *UBQLNL* (rs979752), and *RALGPS2* (rs2773080) may result from still insufficient power to detect smaller allele effects. However, it is interesting that *FTO* (rs8050136) was found independently associated with obesity (OR 1.25, $P = 0.008$). We also showed that this variant was significantly associated with HOMA- β in normoglycemic subjects ($P = 0.014$). Both findings are consistent with previous results obtained in Mexican population (47).

Also of interest is that of the two *HHEX/KIF1/IDE* SNPs tested, only rs7923837 was associated with type 2 diabetes in our study, suggesting a narrow LD region in Mexicans, where rs7923837 may be closer to the functional variant(s).

Overall, our results underscore the importance of considering the phenotypic heterogeneity of the disease as well as the admixed component of the Mexican Mestizo population in future case-control association studies, because some of the previously type 2 diabetes risk alleles may be relatively uncommon or may have a modest effect on type 2 diabetes susceptibility. Therefore, high-density genome-wide association studies in this admixed population, as well as in larger cohorts, are still needed to dissect the type 2 diabetes genetic component not only in Mexican Mestizos but also in other admixed populations of Amerindian descent.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico IN227007-2 and IT214711-3, the Fondo Sectorial de Investigación en Salud 14495, and National Institutes of Health Grant 5K12 DK-083021 to S.C., A.H.-C., M.A.G.-M., P.V.-C., and M.T.G.-G. received support through graduate fellowships provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

M.A.G.-M. and A.H.-C. acquired, analyzed, and interpreted the data, performed statistical analysis, and drafted the manuscript. H.M.-M. analyzed and interpreted the data, performed statistical analysis, and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. P.V.-C. analyzed and interpreted the data and performed statistical analysis. M.L.O.-S. and M.R.-T. contributed to sample preparation and quality control and acquired the data.

R.R.-G. contributed to sample preparation and quality control. L.R. recruited participants; contributed to clinical characterization of samples, sample preparation and quality control, biochemical profiles, and database handling; handled funding and supervision; drafted the manuscript, and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. M.T.G.-G. analyzed and interpreted the data. L.E.G.-P. contributed to biochemical profiles and database handling. S.C. conceived and designed the research, performed statistical analysis, drafted the manuscript, and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. L.d.B.-P. conceived and designed the research and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. S.C.-Q. recruited participants and contributed to clinical characterization of samples. G.P.-O. contributed to sample preparation and quality control and acquired the data. F.E.-A. and A.P. recruited participants, contributed to clinical characterization of samples, and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. I.L.-G. recruited participants, contributed to clinical characterization of samples, analyzed and interpreted the data, and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. C.A.A.-S. conceived and designed the research, recruited participants, contributed to clinical characterization of samples, handled funding and supervision, and made critical revision of the manuscript for important intellectual content. M.T.T.-L. conceived and designed the research, analyzed and interpreted the data, handled funding and supervision, and drafted the manuscript. M.T.T.-L. and C.A.A.-S. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

The authors thank Salvador Ramírez Jiménez and Angélica Flores Álvarez, from the Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, for providing technical assistance; Dr. Kenneth B. Beckman, from the Biomedical Genomics Center, University of Minnesota, for the genotyping of AIMS; and the Instituto Nacional de Salud Pública and all participants in this study from the Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 National Survey and all other institutions.

REFERENCES

- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4–14
- Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, et al. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Publica Mex* 2010;52(Suppl. 1):S19–S26
- Olaiz-Fernández G, Rojas R, Aguilar-Salinas CA, Rauda J, Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Publica Mex* 2007;49:1–7
- Jiménez-Corona A, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, Aguilar-Salinas CA. Early-onset type 2 diabetes in a Mexican survey: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex* 2010;52(Suppl. 1):S27–S35
- Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, et al. Prevalence and characteristics of early-onset type 2 diabetes in Mexico. *Am J Med* 2002;113:569–574
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007;445:881–885
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al; Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of BioMedical Research. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007;316:1331–1336
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;316:1341–1345
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, et al; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007;316:1336–1341
- Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, et al; Wellcome Trust Case Control Consortium. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 2008;40:638–645
- Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, et al. Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2008;40:1092–1097
- Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, et al. SNPs in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet* 2008;40:1098–1102
- Hayes MG, Pluzhnikov A, Miyake K, et al. Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through genome-wide association studies. *Diabetes* 2007;56:3033–3044
- Groves CJ, Zeggini E, Minton J, et al. Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms *TCF7L2* as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes* 2006;55:2640–2644
- Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, et al. Association of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* 2006;55:2649–2653
- Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 2007;50:747–751
- Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, et al. Association of *TCF7L2* polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet* 2007;71:359–366
- Cruz M, Valladares-Salgado A, Garcia-Mena J, et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:261–270
- Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann N Y Acad Sci* 2010;1212:59–77
- Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M. The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends Mol Med* 2010;16:407–416
- Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, et al. Association of *CDKAL1*, *IGF2BP2*, *CDKN2A/B*, *HHEX*, *SLC30A8*, and *KCNJ11* with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetes* 2008;57:791–795
- Gutiérrez-Vidal R, Rodríguez-Trejo A, Canizales-Quinteros S, et al. *LOC387761* polymorphism is associated with type 2 diabetes in the Mexican population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15:79–83
- Price AL, Patterson N, Yu F, et al. A genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet* 2007;80:1024–1036
- Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, et al; Metabolic Study Group. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes* 2008;57:509–513
- Encuesta Nacional de Salud 2000. *La Salud de los Adultos Tomo II*. Cuernavaca, Morelos, México, Instituto Nacional de Salud Pública, 2000
- Frayling TM, Wiltshire S, Hitman GA, et al. Young-onset type 2 diabetes families are the major contributors to genetic loci in the Diabetes UK Warren 2 genome scan and identify putative novel loci on chromosomes 8q21, 21q22, and 22q11. *Diabetes* 2003;52:1857–1863
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502
- Ma L, Hanson RL, Que LN, et al; International Type 2 Diabetes 1q Consortium. Variants in *ARHGEF11*, a candidate gene for the linkage to type 2 diabetes on chromosome 1q, are nominally associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 2007;56:1454–1459
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000;155:945–959
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 2003;164:1567–1587
- Weissglas-Volkov D, Calkin AC, Tusie-Luna T, et al. The N342S *MYLIP* polymorphism is associated with high total cholesterol and increased LDL receptor degradation in humans. *J Clin Invest* 2011;121:3062–3071
- Selvin S. *Statistical Analysis of Epidemiologic Data*. Oxford, New York, Oxford University Press, 2004

33. Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, et al. Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. *Diabetes* 2009;58:493–498
34. Omori S, Tanaka Y, Horikoshi M, et al. Replication study for the association of new meta-analysis-derived risk loci with susceptibility to type 2 diabetes in 6,244 Japanese individuals. *Diabetologia* 2009;52:1554–1560
35. Parra EJ, Below JE, Krihika S, et al. Genome-wide association study of type 2 diabetes in a sample from Mexico City and a meta-analysis of a Mexican-American sample from Starr County, Texas. *Diabetologia* 2011;54:2038–2046.
36. Grarup N, Rose CS, Andersson EA, et al. Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies. *Diabetes* 2007;56:3105–3111
37. Qi L, Parast L, Cai T, et al. Genetic susceptibility to coronary heart disease in type 2 diabetes: 3 independent studies. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2675–2682
38. Stancáková A, Pihlajamäki J, Kuusisto J, et al.; EUGENE2 Consortium. Single-nucleotide polymorphism rs7754840 of CDKAL1 is associated with impaired insulin secretion in nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects and in a large sample of men with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1924–1930
39. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, et al.; Diabetes Prevention Program Research Group. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 2006;355:241–250
40. Florez JC. The new type 2 diabetes gene TCF7L2. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:391–396
41. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2007;117:2155–2163
42. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007;39:770–775
43. Pascoe L, Tura A, Patel SK, et al.; RISC Consortium; U.K. Type 2 Diabetes Genetics Consortium. Common variants of the novel type 2 diabetes genes CDKAL1 and HHEX/IDE are associated with decreased pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 2007;56:3101–3104
44. Cauchi S, Nead KT, Choquet H, et al. The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies. *BMC Med Genet* 2008;9:45
45. Imamura M, Maeda S. Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]. *Endocr J* 2011;58:723–739
46. del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna MT, et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Mol Genet Metab* 2004;81:122–126
47. Villalobos-Comparán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, et al. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2296–2301

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1. General characteristics of Type 2 diabetes subjects by obesity status

	NON-OBESE		OBESE	
	Controls	Cases	Controls	Cases
Individuals (n)	692	643	298	384
Male (%)	42.1%	42.1%	33.9%	25% *†
Age (years)	54(49-63)	55(46-63) *	52(48-59)	51(42-59.5) *†
Age at diagnosis (years)	-	46(36-53)	-	45(38-52)
BMI (kg/m ²)	26.2(24.5-27.7)	26.8(24.7-28.4) *	32.6(31.1-34.5)	32.9(31.4-36.1) *†
Waist circumference (cm)	89.4(84-94)	94.1(88-101) *	103(97-110)	109(103.5-116.5) *†
Systolic Blood Pressure (mmHg)	120(110-130)	129(119-140) *	126(118-140)	130(120-145.5) *†
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	80(70-84)	80(70-90) *	82(76.5-90)	86(80-90.5) *†
Glucose (mg/dL)	87(82-93)	226(148-318) *	92(85-97)	213.5(147-306) *
Total Cholesterol (mg/dL)	213(189-241)	198(174-238) *	210(187-241.5)	209.5(178-236.5) *
Triglycerides (mg/dL)	153(112-226)	224(152-351) *	183(138.5-257.5)	246(167-390) *†
HDL (mg/dL)	44(38-53)	39(32-45) *	41(35-49)	37.5(30-44) *
LDL (mg/dL)	134(114-159)	111(85-138) *	129(111-151)	112.5(87-139) *

Median and percentiles 25 and 75 of baseline characteristics are shown. Statistically significant observations are bold- faced. * $P < 0.05$ comparisons between type 2 diabetes cases and controls.

† $P < 0.05$ comparisons between non obese and obese type 2 diabetes cases.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 2. Allele frequency distribution of 21 SNPs studied in Mexican Mestizos population and the comparison with Europeans

Nearest Gene	Chr	SNP	RA	Risk Allele frequency									
				Controls	Total Cases	Early Onset	Late Onset	Non obese		Obese		European*	
								Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases
<i>KCNJ11</i>	11	rs5219	T	0.373	0.396	0.399	0.393	0.374	0.408	0.371	0.375	0.464†	0.489‡
<i>PPARG</i>	3	rs1801282	C	0.868	0.877	0.876	0.877	0.866	0.875	0.872	0.879	0.823	0.848
<i>TCF7L2</i>	10	rs7903146	T	0.163	0.172	0.180	0.163	0.170	0.171	0.149	0.172	0.181	0.227‡
<i>SLC30A8</i>	8	rs13266634	C	0.729	0.770	0.788	0.752	0.726	0.769	0.736	0.770	0.609†	0.649‡
<i>HHEX</i>	10	rs1111875	C	0.623	0.626	0.626	0.626	0.620	0.621	0.628	0.635	0.522†	0.546‡
		rs7923837	G	0.455	0.485	0.458	0.512	0.452	0.500	0.464	0.461	0.597†	0.622‡
<i>CDKN2A/2B</i>	9	rs10811661	T	0.877	0.911	0.913	0.909	0.880	0.912	0.871	0.909	0.850†	0.872‡
<i>CDKAL1</i>	6	rs7754840	C	0.285	0.313	0.326	0.300	0.275	0.326	0.307	0.293	0.360†	0.387‡
<i>IGF2BP2</i>	3	rs4402960	T	0.191	0.213	0.199	0.227	0.197	0.213	0.177	0.213	0.304†	0.341‡
<i>ARHGEF11</i>	1	rs945508	A	0.252	0.233	0.225	0.241	0.259	0.217	0.236	0.260	0.460†	-
<i>JAZF1</i>	7	rs864745	T	0.660	0.679	0.692	0.666	0.661	0.687	0.660	0.666	0.501†	-
<i>CDC123/ CAMK1D</i>	10	rs12779790	G	0.161	0.197	0.213	0.182	0.161	0.202	0.161	0.188	0.183	-
<i>FTO</i>	16	rs8050136	A	0.200	0.194	0.192	0.197	0.190	0.182	0.223	0.217	0.381†	0.406‡
<i>TSPAN8/ LGR5</i>	12	rs7961581	C	0.125	0.132	0.132	0.132	0.133	0.139	0.108	0.120	0.269†	-
<i>KCNQ1</i>	11	rs2237892	C	0.663	0.720	0.723	0.717	0.669	0.721	0.650	0.719	0.930†	-
<i>ADAMTS9</i>	3	rs4607103	C	0.697	0.710	0.720	0.701	0.688	0.706	0.715	0.718	0.761†	-
<i>NOTCH2</i>	1	rs10923931	T	0.078	0.081	0.083	0.079	0.081	0.079	0.073	0.084	0.106†	-
<i>NXPH1</i>	7	rs757705	G	0.654	0.684	0.694	0.674	0.658	0.689	0.643	0.674	-	-
<i>RORA</i>	15	rs7164773	T	0.625	0.641	0.642	0.639	0.627	0.647	0.621	0.630	-	-
<i>UBQLNL</i>	11	rs979752	C	0.854	0.850	0.853	0.847	0.848	0.855	0.869	0.840	-	-
<i>RALGPS2</i>	1	rs2773080	A	0.197	0.193	0.181	0.205	0.199	0.196	0.194	0.188	-	-

Chr, Chromosome; RA, Risk Allele; defined as previously reported associated to T2D risk in other populations. * Risk allele frequencies reported in European population. † P<0.05 comparisons of risk allele frequencies between Mexican controls and European controls. ‡ Statistically significant differences between Mexican-Mestizo and European population type 2 diabetes cases.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 3. Comparison of the effect sizes in Mexicans vs. European populations.

SNP	Nearest Gene	Mexican Mestizos		Reported in Europeans	Heterogeneity Test
		OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	
rs7903146	<i>TCF7L2</i>	1.39(1.04-1.85)	0.024	1.37(1.31-1.43)	0.92
rs13266634	<i>SLC30A8</i>	1.22(1.05-1.41)	0.009	1.12(1.07-1.16)	0.26
rs7923837	<i>HHEX</i>	1.21(1.02-1.44)	0.025	1.22(1.01-1.43)	0.95
rs10811661	<i>CDKN2A/2B</i>	1.42(1.15-1.75)	0.001	1.20(1.14-1.25)	0.12
rs7754840	<i>CDKAL1</i>	1.25(1.06-1.49)	0.009	1.12(1.08-1.16)	0.23
rs4402960	<i>IGF2BP2</i>	1.24 (1.01-1.53)	0.042	1.14(1.11-1.18)	0.44
rs12779790	<i>CDC123/CAMK1D</i>	1.24(1.05-1.47)	0.013	1.11(1.07-1.14)	0.21
rs2237892	<i>KCNQ1</i>	1.36(1.13-1.64)	0.001	1.42 (1.34–1.49) 1.43(1.34-1.52)*	0.62 0.66

Odds ratios in Mexican and European populations are shown. * Odds ratio reported in Asians.

Supplementary Table 4. Ancestry Informative Markers (AIMs) used in the study.

dbSNP RS ID Number	Chromosome	Physical Location	Delta_Af_Eu	Delta_Af_NA	Delta_Eu_NA
rs2817611	1	11322709	0.675	0.689	0.014
rs6684063	1	30201812	0.611	0.056	0.667
rs1934393	1	48578535	0.620	0.078	0.542
rs3768176	1	56937923	0.044	0.739	0.695
rs3828121	1	81844793	0.131	0.700	0.569
rs3806218	1	144518860	0.608	0.763	0.155
rs2592888	1	156802365	0.674	0.912	0.238
rs4657449	1	162652658	0.012	0.650	0.662
rs7535375	1	232954308	0.603	0.689	0.086
rs1073319	2	29414989	0.107	0.750	0.643
rs1470524	2	45104050	0.563	0.311	0.252
rs842634	2	61065756	0.234	0.739	0.505
rs10515919	2	75515133	0.020	0.694	0.714
rs4852696	2	83126181	0.655	0.450	0.205
rs3860446	2	104110751	0.615	0.028	0.643
rs1036543	2	133886983	0.726	0.017	0.743
rs2711070	2	159705078	0.325	0.828	0.502
rs868179	2	177752041	0.627	0.700	0.073
rs10497705	2	190694557	0.120	0.749	0.629
rs1517634	2	224386024	0.000	0.833	0.833
rs10498255	2	231814769	0.560	0.717	0.157
rs304051	3	4553306	0.202	0.750	0.548
rs1498991	3	20875097	0.032	0.694	0.726
rs9310888	3	29261727	0.592	0.667	0.075

SUPPLEMENTARY DATA

rs10510791	3	57251433	0.484	0.839	0.354
rs1395771	3	97784481	0.632	0.090	0.543
rs1919550	3	122685074	0.004	0.806	0.810
rs2035573	3	132534415	0.317	0.839	0.521
rs1984473	3	157132197	0.575	0.911	0.336
rs6804094	3	188378883	0.318	0.839	0.521
rs1398829	4	21774158	0.754	0.778	0.024
rs719776	4	33583840	0.774	0.750	0.024
rs10517518	4	61798796	0.087	0.811	0.724
rs9307613	4	130816225	0.681	0.740	0.058
rs10519979	4	150212578	0.285	0.800	0.515
rs10520440	4	181494895	0.214	0.833	0.619
rs257748	5	15872353	0.425	0.161	0.586
rs1353251	5	35902708	0.175	0.706	0.531
rs9292118	5	55916081	0.657	0.790	0.133
rs6883095	5	79975120	0.313	0.828	0.514
rs153898	5	94262695	0.655	0.050	0.705
rs1990745	5	103458138	0.119	0.767	0.648
rs10515535	5	143544652	0.714	0.867	0.152
rs1477277	5	180784684	0.655	0.700	0.045
rs6911727	6	9061397	0.337	0.861	0.524
rs10484578	6	35293174	0.569	0.878	0.308
rs993314	6	73434170	0.733	0.200	0.533
rs9320808	6	121635172	0.766	0.106	0.871
rs6569792	6	132675321	0.567	0.689	0.121
rs9295316	6	158476352	0.068	0.837	0.769
rs10486576	7	27861415	0.044	0.744	0.700
rs10248051	7	50861102	0.750	0.117	0.633
rs10214949	7	78660644	0.564	0.685	0.121
rs10488172	7	132751390	0.187	0.772	0.586
rs802524	7	145343383	0.651	0.689	0.038
rs9325872	8	20490544	0.623	0.056	0.679
rs7463344	8	33921195	0.639	0.639	0.000
rs4130405	8	99377358	0.190	0.800	0.610
rs1898280	8	116031043	0.651	0.056	0.595
rs4733652	8	129801116	0.155	0.817	0.662
rs2840290	9	16723957	0.593	0.039	0.632
rs4013967	9	72354189	0.596	0.941	0.345
rs10491654	9	97519365	0.214	0.400	0.614
rs10508349	10	8302970	0.044	0.711	0.755
rs2785279	10	33713882	0.562	0.757	0.195
rs4934436	10	90447897	0.242	0.272	0.514
rs1397618	10	120497262	0.658	0.706	0.048
rs2595456	11	6849072	0.218	0.306	0.524
rs948360	11	65882085	0.724	0.750	0.026
rs10501474	11	80126955	0.587	0.744	0.157
rs567992	11	105800114	0.155	0.667	0.512
rs879780	11	129545756	0.619	0.667	0.048

SUPPLEMENTARY DATA

rs4625554	12	4286565	0.131	0.700	0.569
rs4762106	12	64304740	0.710	0.139	0.571
rs10506816	12	78427325	0.861	0.761	0.100
rs249847	12	97370184	0.408	0.911	0.503
rs4076700	12	115795273	0.627	0.694	0.067
rs4034627	12	126750571	0.734	0.748	0.014
rs2585901	13	19218271	0.089	0.698	0.787
rs10507688	13	61204229	0.167	0.733	0.567
rs5000507	13	79886955	0.574	0.861	0.288
rs10492585	13	103084177	0.840	0.900	0.060
rs9323178	14	21103774	0.276	0.790	0.514
rs1451928	14	46330779	0.004	0.661	0.657
rs2296274	14	59907219	0.632	0.849	0.217
rs10131076	14	78764426	0.623	0.694	0.071
rs9302185	15	52670920	0.685	0.842	0.157
rs10520678	15	86667051	0.578	0.846	0.268
rs30125	16	14321100	0.590	0.539	0.051
rs1004704	16	48315382	0.187	0.839	0.652
rs10500505	16	64718164	0.159	0.744	0.586
rs4130513	16	78238277	0.639	0.530	0.109
rs10491097	17	19523240	0.592	0.078	0.514
rs1990743	17	64494057	0.005	0.572	0.567
rs2253624	17	70329204	0.824	0.824	0.000
rs1013459	18	11690534	0.667	0.733	0.067
rs2042762	18	33529609	0.000	0.733	0.733
rs12953952	18	65886896	0.788	0.828	0.040
rs888861	19	40073692	0.738	0.900	0.162
rs708915	20	8395667	0.635	0.002	0.633
rs2208139	20	38594383	0.167	0.800	0.633
rs354747	20	59598070	0.560	0.683	0.124
rs2829454	21	25194942	0.218	0.878	0.660
rs138022	22	38856075	0.571	0.800	0.229

Delta_Af_Eu - Difference in allele frequency between Africans and Europeans; Delta_Af_NA - Difference in allele frequency between Africans and Native Americans; Delta_Eu_NA - Difference in allele frequency between Europeans and Native Americans

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 5. Allele frequency distribution of the 3 SNPs not considered in the association analysis.

Nearest Gene	Chr	SNP	RA	Risk Allele frequency									
				Controls	Total Cases	Early Onset	Late Onset	Non obese		Obese		European*	
								Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases
<i>CDKAL1</i>	6	rs10484634†	T	0.974	0.980	0.978	0.980	0.979	0.980	0.964	0.980	-	-
<i>IGF2BP2</i>	3	rs1470579‡	C	0.190	0.213	0.203	0.222	0.192	0.213	0.185	0.213	0.30	0.32
<i>THADA</i>	2	rs7578597†	T	0.959	0.964	0.971	0.957	0.958	0.963	0.961	0.965	0.90	-

Chr, Chromosome; RA, Risk Allele; defined as previously reported associated to T2D risk in other populations. * Risk allele frequencies reported in European population. †SNPs with a minor allele frequency < 0.05. ‡SNP is not in Hardy–Weinberg equilibrium in control group ($p=0.002$).