



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CONTRIBUCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS COMUNES A LA
OBESIDAD Y SUS COMPLICACIONES EN POBLACIÓN MEXICANA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Paola Viridiana León Mimila

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Facultad de Química, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha Menjivar Iraheta

Facultad de Química, UNAM.

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

Instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición, "Salvador Zubiran".

Ciudad de México, mayo, 2017.



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.

PMDCB/868/2016...2a

Paola Viridiana León Mimila
Alumna del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de junio del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Contribución de variantes genéticas comunes a la obesidad y sus complicaciones en población mexicana**", dirigida por el Dr. Samuel Canizales Quinteros.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. José Pedraza Chaverri
VOCAL	Dr. Juan Miranda Ríos
VOCAL	Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau
VOCAL	Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
SECRETARIO	Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de junio de 2016
Coordinador Académico


DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo
SFA*lgg

contacto:mdcbq@posgrado.unam.mx tel. 56237006

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Samuel Canizales Quinteros en la Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Este trabajo fue realizado con el financiamiento de los proyectos: CONACYT-SALUD 2009-01-113861, FOSISS-CONACyT 2012-1-182801 y PAPIIT(DGAPA) UNAM-IA202413.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el desarrollo del doctorado (CVU. 330321) y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) del Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo económico para asistir al XXIII Congreso Latinoamericano para el Estudio del Hígado (ALEH), en el año 2014 en Cancún, Q. Roo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.	1
ÍNDICE DE TABLAS.	2
ABREVIATURAS.	3
RESUMEN.	4
ABSTRACT.	6
1. INTRODUCCIÓN.	8
1.1. Obesidad.	9
1.1.1. Definición.	9
1.1.2. Diagnóstico.	9
1.1.3. Prevalencia.	11
1.1.4. Mecanismos fisiológicos implicados en el desarrollo de obesidad.	12
1.1.4.1. Papel del sistema nervioso central en la regulación del peso corporal.	12
1.1.5. Complicaciones metabólicas.	16
1.1.5.1. Obesidad y resistencia a la insulina.	18
1.1.5.2. Obesidad y síndrome metabólico.	18
1.1.5.3. Obesidad e hígado graso no alcohólico.	19
1.1.6. Factores de riesgo para el desarrollo de obesidad.	21
1.2. FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE OBESIDAD.	23
1.2.1. Obesidad poligénica.	24
1.2.1.1. Estudios de asociación del genoma completo (GWAS) para obesidad.	24
1.2.1.2. Variantes estructurales asociadas a la obesidad (CNVs).	30
1.2.1.3. Estudios genéticos para la obesidad realizados en población mexicana.	34
2. JUSTIFICACIÓN.	35
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.	35

4. HIPÓTESIS.	36
5. OBJETIVOS.	37
5.1. Objetivo general.	37
5.2. Objetivos específicos.	37
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
7. METODOLOGÍA.	40
7.1. Selección de variantes.	40
7.2. Poblaciones de estudio.	41
7.3. Evaluación de los participantes.	43
7.4. Análisis genéticos.	44
7.5. Determinaciones adicionales relacionadas con la CNV de <i>AMY1A</i> .	47
7.6. Determinaciones adicionales relacionadas con el estudio de HGNA.	48
7.7. Análisis estadísticos.	49
8. RESULTADOS.	51
8.1. Asociación de SNPs identificados a través de GWAs con la obesidad y rasgos metabólicos relacionados.	51
8.2. Asociación de CNVs con riesgo de obesidad.	56
8.3. Efecto de las variantes de riesgo para obesidad sobre el HGNA y el riesgo de EHNA.	63
9. DISCUSIÓN.	75
10. CONCLUSIONES.	96
11. PERSPECTIVAS.	97
12. REFERENCIAS.	98
13. ANEXOS.	113
14. PUBLICACIONES.	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la ingesta calórica y el gasto energético.	15
Figura 2. Relación de la obesidad con el desarrollo de HGNA.	21
Figura 3. Efecto del número de alelos de riesgo sobre el percentil del IMC y el IMC en la cohorte de niños y adultos.	55
Figura 4. Distribución del número de copias de <i>AMY1A</i> en la cohorte infantil.	59
Figura 5. Asociación del número de copias de la región de <i>AMY1A</i> con riesgo de obesidad.	59
Figura 6. Diferencias de los valores normalizados de la abundancia de la especie <i>Prevotella stercorea</i> comparando el tercil más bajo vs. el tercil más alto de número de copias de <i>AMY1A</i> .	61
Figura 7. Valores de media de número copias de la región <i>AMY1A</i> en diferentes regiones geográficas estratificadas en alto (barras moradas) y bajo (barras verdes) consumo de carbohidratos.	63
Figura 8. Efecto del número de alelos de riesgo sobre el contenido de triglicéridos hepáticos.	72
Figura 9. Asociación del SRG estratificado por terciles con riesgo de EHNA.	74
Figura 10. Posible mecanismo para la relación del número de copias de <i>AMY1A</i> -microbiota intestinal-obesidad.	87
Figura 11. Mecanismo hipotético de acumulación de grasa hepática asociado con los polimorfismos de los genes <i>SH2B1</i> , <i>GCKR</i> , <i>PPP1R3B</i> , <i>PNPLA3</i> y <i>LYPLAL1</i> .	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación internacional del bajo peso, sobrepeso y obesidad de acuerdo al IMC.	11
Tabla 2. Criterios diagnósticos para el síndrome metabólico.	19
Tabla 3. Principales variantes y genes asociados a la obesidad y rasgos relacionados identificados por GWAS.	28
Tabla 4. Principales CNVs asociadas a la obesidad.	33
Tabla 5. Asociación de 18 SNPs candidatos con riesgo de obesidad en la población mexicana.	52
Tabla 6. Asociación de 10 SNPs candidatos con los parámetros antropométricos asociados a la obesidad.	54
Tabla 7. Efecto del número de copias de 5 regiones de CNVs con riesgo de obesidad en la cohorte de niños.	57
Tabla 8. Efecto del número de copias de 5 regiones de CNVs con riesgo de obesidad en la cohorte de adultos.	58
Tabla 9. Características clínicas y bioquímicas de la cohorte de sujetos con obesidad clase II/III.	65
Tabla 10. Efecto de los SNPs sobre el grado de esteatosis y riesgo de EHNA.	66
Tabla 11. Efecto de SNPs en los genes <i>PNPLA3</i> , <i>GCKR</i> , <i>LYPLAL1</i> y <i>PPP1R3B</i> sobre el contenido de lípidos hepáticos.	68
Tabla 12. Asociación de SNPs en los genes <i>PNPLA3</i> , <i>GCKR</i> , <i>LYPLAL1</i> y <i>PPP1R3B</i> con parámetros metabólicos.	70
Tabla 13. Asociación de SRG con rasgos asociados al HGNA.	73

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribunocleico.
AMY1A	Gen de la amilasa alfa 1 (salival).
BCDIN3	Gen de la enzima de caping metilfosfato.
BDNF	Gen del factor neurotrófico derivado del cerebro.
CDC	Centro para el control de enfermedades de Estados Unidos.
CNVs	Variaciones en número de copias, por sus siglas en inglés.
DT2	Diabetes tipo 2.
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica.
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición.
ETV5	Gen de la variante Ets.
FTO	Gen asociado a obesidad y masa grasa.
GCKR	Gen del receptor de glucocinasa.
GNPDA2	Gen de la glucosamina 6 fosfato deaminasa 2.
GPRC5B	Gen del receptor acoplado a proteínas G, familia C, grupo 5.
GWAS	Escaneos del genoma completo.
HGNA	Hígado graso no alcohólico.
HOMA-IR	Modelo homeostático de resistencia a la insulina.
HPRT	Gen de hipoxantina fosforibosil transferasa.
ICC	Índice cintura cadera.
IMC	Índice de masa corporal.
KCTD15	Gen de canal de potasio que contiene el dominio de tetramerización 15.
LEP	Gen de la leptina.
LYPLAL1	Gen de la lipofosfolipasa 1.
MAF	Gen de la proteína MAF.
MC4R	Gen del receptor 4 de melanocortina.
MTCH2	Gen de la proteína homóloga del acarreador mitocondrial 2.
NCAN	Gen de neurocan.
NEGR1	Gen regulador del crecimiento neuronal.
NPC1	Gen de la proteína de enfermedad Niemann-Pick tipo C1.
OMS	Organización mundial de la salud.
PNPLA3	Gen de patatina similar al dominio de la fosfolipasa que contiene la proteína 3.
POMC	Gen de la proopiomelanocortina.
PPP1R3B	Gen de la proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora 3.
PTER	Gen de la proteína relacionada a fosfodiesterasa.
SEC16B	Gen del homólogo B de la proteína SEC16.
SH2B1	Gen de la proteína adaptadora 1 SH2B.
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés.
SRG	Score de riesgo genético.
TMEM18	Gen de la proteína transmembranal 18.

RESUMEN

La población mexicana presenta una prevalencia particularmente alta de obesidad y complicaciones metabólicas. Los estudios de asociación realizados a nivel genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han identificado variantes genéticas, tanto polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) como variantes en número de copias (CNVs, por sus siglas en inglés) en más de 100 *loci* asociados con la obesidad, principalmente en la población adulta de origen europeo. Sin embargo, la contribución de estos *loci* en la población mexicana, no se ha evaluado de manera exhaustiva. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la asociación de 18 SNPs y 5 CNVs con la obesidad y sus complicaciones metabólicas, particularmente el hígado graso no alcohólico (HGNA). El estudio se realizó en tres etapas. La primera comprendió el análisis de 18 SNPs en una muestra de 1,156 adultos mexicanos (473 delgados y 683 sujetos con obesidad). Además, los SNPs asociados con la obesidad, se probaron con parámetros metabólicos relacionados con la adiposidad, en 3 grupos poblacionales: 1,218 niños, 945 adultos y 543 indígenas seris, nahuas, totonacas y zapotecos. La segunda etapa consistió en analizar 5 CNVs en 920 niños y 921 adultos. Finalmente, la tercera etapa comprendió el análisis de 13 variantes de riesgo para la obesidad y 5 SNPs candidatos para el HGNA en un grupo de 130 sujetos con obesidad clase II/III. En la primera etapa 7/18 SNPs se asociaron significativamente ($P \leq 0.05$) con un mayor riesgo de obesidad (rs9939609/*FTO*, rs6548238/*TMEM18*, rs7566605/*INSIG2*, rs7138803/*FAIM2-BCDIN3*, rs6265/*BDNF*, rs17782313/*MC4R* y rs7498665/*SH2B1*). Además, 5 de estos SNPs también se asociaron con un mayor IMC y CC en la población infantil y adulta ($P \leq 0.05$), explicando cerca del 5% de la variabilidad del IMC. En contraste, en la muestra de población indígena sólo el SNP rs9939609/*FTO* se asoció significativamente con el IMC ($P = 0.045$). El análisis de CNVs presentó únicamente asociación de la CNV 1p31.1/*AMY1A* con un mayor riesgo de obesidad en niños y adultos ($P \leq 0.05$). Además, el número de copias de esta CNV también se asoció con una mayor abundancia de la especie *Prevotella stercorea* de la microbiota intestinal ($P \leq 0.05$). Por otra parte, la CNV 11q11 se asoció con la

obesidad sólo en niños, en tanto la CNV 16p12.3 se asoció solo en adultos ($P \leq 0.05$). Finalmente, el análisis de estos SNPs con el HGNA únicamente presentó la asociación del SNP rs7498665 en el gen *SH2B1* ($P=0.050$), previamente asociado con la obesidad en este estudio. Además, 4 de las 5 variantes evaluadas específicamente para el HGNA (rs738409/*PNPLA3*, rs4240624/*PPP1R3B*, rs780094/*GCKR* y rs12137855/*LYPLAL1*) presentaron asociación significativa con un mayor contenido de triglicéridos (TG) hepáticos ($P \leq 0.05$). En conclusión, los hallazgos de este estudio sugieren que 7 SNPs y 3 CNVs asociadas con la obesidad en población de origen europeo, también confieren riesgo para este fenotipo en niños y/o adultos mexicanos. Sin embargo, en conjunto explican menos del 5% de la varianza del IMC en estas poblaciones. Por ello, se requieren estudios genómicos adicionales para identificar la heredabilidad faltante. De manera interesante, la mayoría de las variantes de riesgo para la obesidad no tienen un efecto sobre el HGNA, sugiriendo que los genes asociados con la obesidad no están directamente implicados en la acumulación de TG hepáticos.

ABSTRACT

The Mexican population has a very high prevalence of obesity and metabolic related complications. Genome wide association studies (GWAS) have identified genetic variants, both single nucleotide polymorphism (SNPs) and copy number variants (CNVs) in more than obesity-associated 100 *loci*, mostly in European adults. However, the contribution of these *loci* in the Mexican population has not been thoroughly assessed. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the association of 18 SNPs and 5 CNVs with obesity and its metabolic complications, particularly non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). This study was conducted in three stages; the first comprised the analysis of 18 SNPs in a sample of 1,156 Mexican adults (473 lean and 683 obese). Afterwards, SNPs associated with obesity were tested for associations with adiposity-related metabolic parameters in 3 population groups: 1,218 children, 945 adults and 543 seris, nahuas, totonac and zapotec indigenous. The second stage consisted in the analysis of 5 CNVs in 920 children and 921 adults. Finally, the third stage included the analysis of 13 risk variants for obesity and 5 candidate SNPs for NAFLD in a group of 130 class II/III obesity subjects. In the first stage 7/18 SNPs were found to be significantly associated with an increased obesity risk (rs9939609/*FTO*, rs6548238/*TMEM18*, rs7566605/*INSIG2*, rs7138803/*FAIM2-BCDIN3*, rs6265/*BDNF*, rs17782313/*MC4R* and rs7498665/*SH2B1*; $P \leq 0.05$). In addition, 5 of these SNPs were associated with a higher BMI and WC in children and adults ($P \leq 0.05$), accounting for about 5% of BMI variability. Moreover, in the Indigenous population only the rs9939609 (*FTO* gene) was significantly associated with BMI ($P = 0.045$). The CNV analyses showed that only 1p31.1/*AMY1A* CNV was associated with an increased obesity risk in both children and adults ($P \leq 0.05$). Moreover, the copy number of this CNV was also associated with greater abundance of the *Prevotella stercorea* specie in the intestinal microbiota ($P \leq 0.05$). On the other hand, 11q11 CNV was associated with obesity only in children, while 16p12.3 CNV was associated in adults ($P \leq 0.05$). Finally, the analysis of obesity-related SNPs with NAFLD only showed association of the rs7498665 SNP in the *SH2B1* gene ($P = 0.050$), previously associated with obesity in this study. Four

of 5 variants evaluated particularly for NAFLD (rs738409/*PNPLA3*, rs4240624/*PPP1R3B*, rs780094/*GCKR* y rs12137855/*LYPLAL1*) showed a significant association with higher hepatic TG content ($P \leq 0.05$). In conclusion, our findings suggest 7 SNPs and 3 CNVs previously associated with obesity in European populations were also associated with this phenotype in Mexican children and/or adults. However, altogether the variants account for less than 5% of BMI variance in these populations. Therefore, additional genomic studies to identify missing heritability are necessary. Interestingly, most obesity risk variants have no effect on NAFLD, suggesting that obesity-associated genes are not directly implicated in the accumulation of hepatic TG.

1. INTRODUCCIÓN

En décadas recientes, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad se ha incrementado alrededor del mundo y hoy en día se reconoce como un grave problema de salud pública tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. México es uno de los países con las prevalencias del sobrepeso y la obesidad más altas en el mundo. En este sentido, se ha argumentado que la obesidad representa una pandemia, la cual a nivel sociedad, puede ser responsable de serias consecuencias médicas, psicológicas, sociales y económicas, incluyendo el incremento en las tasas poblacionales de comorbilidades aunado a la disminución en la calidad y esperanza de vida, lo cual a su vez se traduce en mayores costos de los sistemas de salud. En tanto a nivel individual, la obesidad se asocia fuertemente con una multitud de problemas clínicos como son la presencia de diabetes tipo 2 (DT2), dislipidemia, hipertensión y alteraciones cardiovasculares, entre otras.

Por otra parte, el incremento precipitado en la prevalencia de la obesidad, coincide con la abundancia de alimentos con alta densidad energética, así como con menores niveles de actividad física y un estilo de vida sedentario (“ambiente obesogénico”), lo cual demuestra la sustancial contribución de los factores ambientales al desarrollo de la obesidad. No obstante, una proporción considerable de la población se ha mantenido en un peso corporal adecuado a pesar de vivir en un ambiente obesogénico, sugiriendo que la medida en que las personas o las poblaciones responden a las influencias ambientales puede estar determinada por factores innatos, tales como el componente genético. A este respecto tanto la obesidad como el índice de masa corporal (IMC) tienen una heredabilidad particularmente alta, la cual varía entre un 40 a un 80% y recientemente, estudios de escaneos del genoma completo realizados en poblaciones de origen caucásico han identificado nuevas variantes genéticas asociadas con el IMC y al riesgo de obesidad. Además, en estudios recientes de mapeo de mezcla étnica se ha demostrado que la obesidad presenta una alta correlación con el porcentaje de ancestría derivada de grupos étnicos con alta prevalencia de obesidad como es la población mexicana.

1.1. OBESIDAD.

1.1.1. Definición.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como la acumulación anormal o excesiva de grasa, suficiente para incrementar el riesgo de morbilidad o mortalidad (OMS, 2015). La obesidad es el resultado de un balance energético positivo, en el cual la ingesta calórica supera el gasto energético de manera crónica, lo que resulta en el almacenamiento excesivo de energía, principalmente en forma de triglicéridos en los adipocitos blancos (O`Rahilly, 2009).

1.1.2. Diagnóstico.

El IMC es la medida que más comúnmente se utiliza a nivel poblacional para establecer el diagnóstico clínico de la obesidad debido a que es una manera accesible y sencilla de evaluar la cantidad de grasa corporal. El IMC se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso en kg}}{(\text{Talla en m})^2}$$

En individuos adultos, de acuerdo con la clasificación internacional propuesta por la OMS, la obesidad se define clínicamente con un IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (OMS, 2015) (Tabla 1). Respecto a la población infantil, actualmente no existe un consenso acerca de la clasificación internacional para el IMC, debido a que las variaciones en el IMC a edades tempranas dependen de la edad, el sexo y el estado de desarrollo puberal, por tanto, para valorar la adiposidad en niños de 2 años o más, se utilizan las tablas percentilares del IMC para la edad y el sexo del Centro para el Control y prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés) y de acuerdo con los percentiles el diagnóstico de obesidad en niños se establece con un percentil para el IMC ≥ 95 (Barlow *et al.*, 2007) (Tabla 1).

En la población adulta, el IMC es el indicador que más ampliamente se utiliza para la detección del exceso de adiposidad y el riesgo cardiometabólico debido a que de manera general presenta una alta correlación con el porcentaje de grasa corporal (Deurenberg *et al.*, 1991). Sin embargo, este representa una medición indirecta para valorar la adiposidad, entre las limitantes que presenta es que puede sobre o subestimar la adiposidad debido a que no considera el porcentaje de grasa corporal *per se*, el tipo de grasa, su localización o la presencia de alteraciones metabólicas (Paniagua *et al.*, 2016). Por lo cual, en la práctica clínica además de la determinación del IMC, existen otras mediciones para estimar la cantidad y la distribución de grasa corporal como son la determinación de la circunferencia de la cintura, la relación cintura/cadera y la relación talla/cintura, las cuales son indicadores de obesidad central (la obesidad central se caracteriza principalmente por el exceso de depósitos de grasa en el área abdominal y dentro de la cavidad peritoneal y una menor expansión del tejido adiposo periférico). Estas mediciones correlacionan mejor con la cantidad de tejido adiposo visceral y se ha sugerido que son mejores predictores de riesgo cardiometabólico en niños y en adultos (Savva *et al.*, 2000; Ashwell *et al.*, 1996), ya que en diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que la grasa corporal abdominal presenta una alta correlación con niveles elevados de glucosa en ayuno, una reducida sensibilidad a la insulina y un perfil de lípidos alterado (Despres y Lemieux, 2006). Actualmente el III panel de expertos para la detección, evaluación y tratamiento de colesterol sanguíneo elevado en adultos de EUA (2002) y la Federación Internacional de Diabetes establecen que la obesidad central o abdominal se puede definir con una CC >90 cm. en hombres ó >80 cm. en mujeres, de origen latino.

Además de las mediciones señaladas, existen técnicas más sensibles para estimar la composición y distribución corporal como son la medición de pliegues cutáneos, la bioimpedancia eléctrica, así como técnicas de imagen (ultrasonido, tomografía computarizada y resonancia magnética). El punto de corte establecido considerando el porcentaje de grasa corporal para el diagnóstico de sobrepeso es de 20.1-24.9% en hombres y 30.1-34.9% en mujeres, y para establecer diagnóstico de obesidad es

≥25% en hombres y ≥35% en mujeres (Gallagher *et al.*, 2000). No obstante, aun cuando estas técnicas son más sensibles y permiten una clasificación más acertada de acuerdo con el grado de adiposidad, su aplicabilidad en la práctica clínica aún es limitada debido a que son poco prácticas y de costos elevados (Blundell *et al.*, 2014).

Tabla 1. Clasificación internacional del bajo peso, sobrepeso y obesidad de acuerdo al IMC.

Estatus nutricional	Adultos	Niños
	IMC - OMS	Percentil IMC – CDC
Bajo peso	<18.5	<5
Rango normal	18.5-24.9	5 - <85
Sobrepeso	25 - 29.9	85 - <95
Obesidad	≥30	≥95
Clase I	30 - 34.9	
Clase II	35 - 39.9	
Clase III (Severa)	≥40	≥99

Fuente: Organización Mundial de la Salud, clasificación 2016. Centro para el control de enfermedades de Estados Unidos.

1.1.3. Prevalencia.

Recientemente, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad se ha incrementado sustancialmente, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, alrededor del mundo y de acuerdo con datos de la OMS se ha descrito a la obesidad como una “epidemia mundial”; considerando que en el año 2014, más de 1.9 mil millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso y de estos, más de 600 millones presentaron algún grado de obesidad, lo cual

corresponde al 39% y 13% de la población adulta mundial, respectivamente (OMS, 2015). Por otra parte, se estimó que la prevalencia mundial del sobrepeso y la obesidad en la población infantil fue de 6.7%, lo que corresponde a 43 millones de niños. Además, se espera que esta tendencia continúe incrementando hasta alcanzar una prevalencia mundial del 9.1% para el año 2020 (de Onis *et al.*, 2010).

Así mismo, en las últimas tres décadas, México ha experimentado un rápido y constante incremento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad tanto en la población infantil como en la población adulta y actualmente es uno de los países con las prevalencias más altas en el mundo. De tal manera que entre el año 1999 y 2016, la prevalencia general del sobrepeso y la obesidad en niños de 5 a 11 años de edad incrementó de 26.9 a 33.3% y en adultos de 61.8 a 72.5% (0.4 y 0.6 puntos porcentuales por año, respectivamente) de acuerdo con los datos publicados en la Encuesta Nacional de Nutrición (ENN) 1999, Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012 y ENSANUT 2016 (Gutiérrez *et al.*, 2012; Hernández-Avila *et al.*, 2016). A este respecto, proyecciones hechas para el año 2050 han calculado que si las tendencias en el incremento de la prevalencia del sobrepeso y la obesidad se mantienen, hasta un 90% de la población adulta mexicana podría presentar sobrepeso u obesidad (Rtveladze *et al.*, 2014).

1.1.4. Mecanismos fisiológicos implicados en el desarrollo de obesidad.

1.1.4.1. Papel del sistema nervioso central en la regulación del peso corporal.

Los humanos, al igual que otros mamíferos, son capaces de regular su peso corporal durante largos períodos de tiempo a pesar de la variación diaria en el número de calorías consumidas y en el gasto energético. Fundamentalmente, los factores que influyen en los cambios en el peso corporal pueden interrumpir el equilibrio entre la ingesta y el gasto energético, ya sea a través de la regulación de la utilización de sustratos (grasas, proteínas, carbohidratos) y/o la utilización de nutrientes (almacenamiento del exceso de calorías) a lo largo del tiempo (van der

Klaauw y Farooqi, 2015). Por tanto, el peso corporal está regulado por un complejo sistema, el cual refleja la importancia biológica del suministro de nutrientes y el balance energético. Por su parte, la homeostasis energética es un proceso altamente regulado que resulta de la integración de múltiples señales periféricas en el sistema nervioso central. Específicamente, el núcleo arcuato del hipotálamo es el encargado de recibir las señales neuronales, endócrinas (como la leptina), hormonales (como la insulina) y nutricionales (como la grelina, la colecistocinina y el péptido YY) derivadas de los tejidos periféricos (adipocito, páncreas y sistema gastrointestinal, respectivamente), además de coordinar el sistema de regulación neuroendócrino de la homeostasis energética. Su efecto está mediado por una secuencia específica de neurotransmisores que comprende 3 ejes principales. *El primer eje* consiste de señales aferentes al sistema nervioso central. Los núcleos arcuato y ventromedial, los cuales contienen neuronas de primer orden con receptores hormonales, son los encargados de recibir las señales periféricas relacionadas con la adiposidad (leptina), metabolismo (insulina), apetito (grelina) y saciedad (péptido YY). *El segundo eje* consiste de neuronas de segundo orden, las cuales transfieren las señales hormonales al núcleo paraventricular y al área hipotalámica lateral. Este eje consta de dos señales principales: las señales anorexigénicas o supresoras del apetito (mediadas por la hormona estimulante de α -melanocitos- MSH- α y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina-CART), las cuales suprimen la ingesta y se ha observado que su actividad se incrementa bajo condiciones de balance positivo de energía (alimentación) y las señales orexigénicas o estimuladoras del apetito (mediadas por el neuropéptido Y-NPY y la proteína relacionada con agouti-AGRP), las cuales son estimuladoras de la ingesta incrementando su actividad neuronal se bajo condiciones de pérdida de peso y ayuno. Las neuronas NPY/AGPR tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de las células proopiomelanocortina-POMC/CART mediado por el ácido gamma-aminobutírico. Tanto el núcleo paraventricular como el área hipotalámica lateral integran esas señales a través de los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R, por sus siglas en inglés), lo que permite regular la ingesta calórica y el gasto energético. *El tercer eje* consiste de señales eferentes enviadas a través de el

sistema nervioso autónomo, este eje se integra por el sistema nervioso simpático, el cual promueve el gasto energético y el nervio vago, el cual promueve el almacenamiento de energía. Finalmente, se genera un ciclo de retroalimentación entre el sistema nervioso y los órganos periféricos (tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, músculo y tejido adiposo) para alimentar el ciclo (van Vliet-Ostapchouk *et al.*, 2009) (Figura 1).

De manera interesante, recientemente se ha observado que el hipotálamo también es capaz de integrar señales de vías hedónicas de recompensa en el sistema corticolímbico asociadas con la palatabilidad de los alimentos (percepción visual, olfativa y del gusto). Tales vías pueden invalidar el sistema homeostático e incrementar el deseo del consumo de alimentos con alta densidad energética a pesar de la saciedad fisiológica y en consecuencia, aumentar las reservas energéticas. Se ha documentado que varios sistemas de neurotransmisores en el cerebro incluyendo mecanismos dopaminérgicos, opioinérgicos y cannabinoides desempeñan un papel relevante en el sistema de la vía de recompensas y pueden mediar el impulso del deseo de ingerir una mayor cantidad de alimentos (Guyenet y Schwartz, 2012).

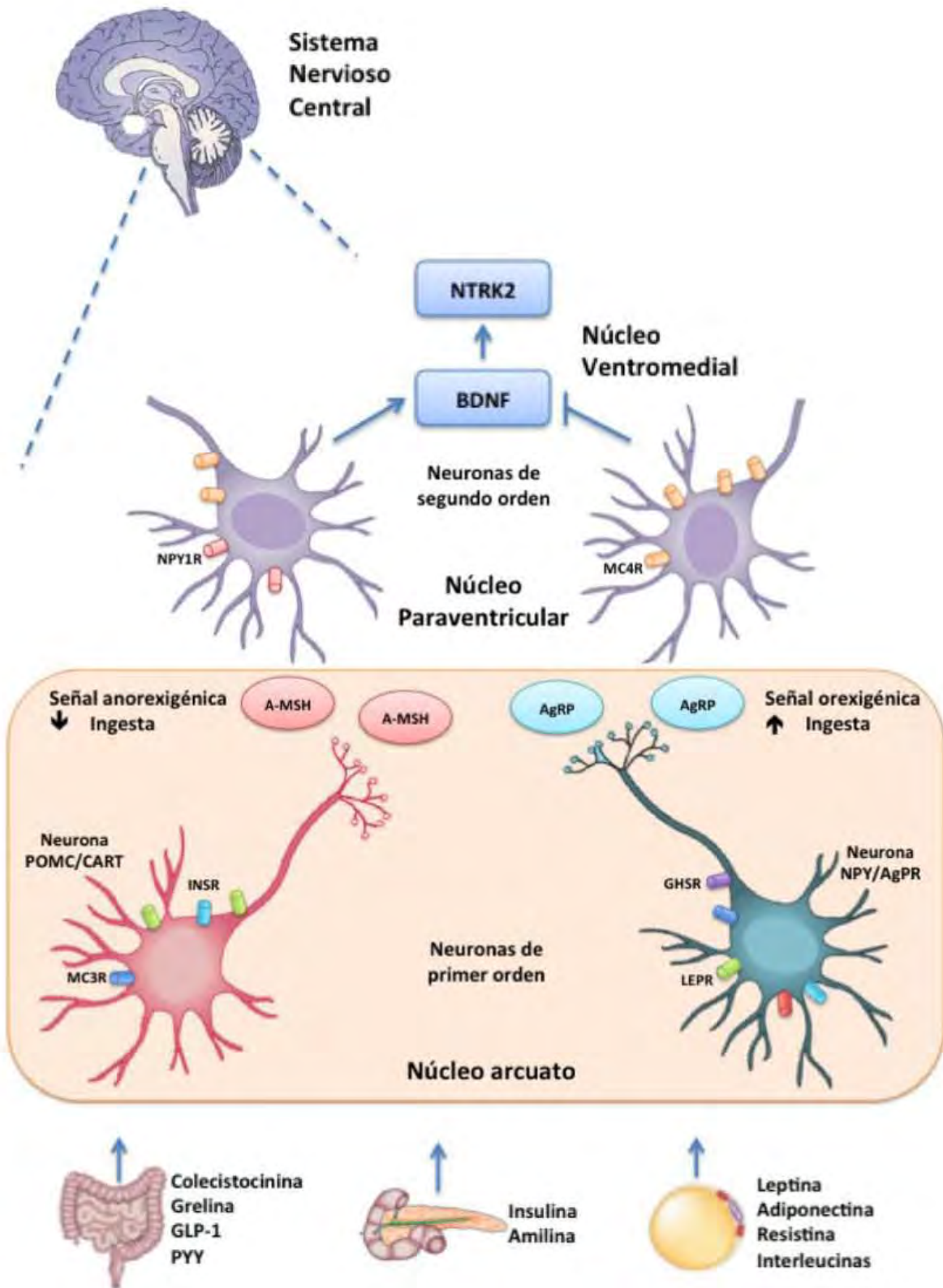


Figura 1. Regulación de la ingesta calórica y el gasto energético. Interacción de las señales hormonales periféricas con los sensores neuronales que regulan la ingesta

energética y el peso corporal. Hormonas como la leptina, secretada por el tejido adiposo se unen a su receptor en el hipotálamo, lo que causa la supresión de las señales orexigénicas como el NPY y la AgPR. Así como la estimulación de señales anorexigénicas como la POMC en el núcleo arcuato, el cual presenta modificaciones pos-traduccionales para la producción péptidos tales como la hormona estimulante de melanocitos alfa y beta. Esta hormona se une a el MC3R y a el MC4R en el núcleo paraventricular e induce su actividad. Posteriormente, el incremento en la actividad de el MC3R y de el MC4R resulta en la disminución de la ingesta y el incremento en el gasto energético. La actividad de el MC4R también estimula la liberación de el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) el cual puede unirse al receptor neurotrópico (NTRK2, por sus siglas en inglés) y regular la ingesta de alimentos y el gasto energético.

1.1.5. Complicaciones Metabólicas.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el sobrepeso y la obesidad son los principales factores de riesgo para el desarrollo de alteraciones metabólicas incluyendo hipertensión, dislipidemias, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso no alcohólico, enfermedad arterial coronaria y algunos tipos de cáncer (Haslam y James, 2005), las cuales constituyen las principales causas de morbilidad y mortalidad en México (INEGI, 2016). A este respecto, se ha descrito que aproximadamente un 75% de los individuos con obesidad pueden presentar al menos una alteración metabólica; de tal modo que las personas con obesidad clase III tienen una razón de momios (RM) de 4.8 de presentar hipertensión, 5.1 de presentar DT2, 2.2 de presentar dislipidemias y 2.0 de presentar síndrome metabólico en comparación con individuos con un peso normal (Haslam y James, 2005), lo que sugiere que el aumento del IMC reduce drásticamente las probabilidades de ser un individuo metabólicamente sano. Así mismo, la OMS publicó que el 44% de los casos mundiales de DT2, el 23% de los casos mundiales de cardiopatía isquémica y del 7–41% de los casos mundiales de determinados tipos de cáncer son atribuibles al sobrepeso y la obesidad (OMS, 2012).

Asimismo, las personas con obesidad también tienen un riesgo incrementado de mortalidad, considerando que cada año mueren 3.4 millones de personas a causa de la obesidad y un acortamiento de la esperanza de vida, ya que el presentar obesidad representa una reducción de hasta un 4% de años de vida y hasta un 8% de años de vida si se realiza un ajuste por discapacidad (Lim *et al.*, 2010). En este sentido, en un trabajo reciente de colaboración de estudios prospectivos el cual se basa en datos de más de 66,000 muertes, se estimó que la supervivencia óptima se logra en un IMC de 22.5-25 kg/m² con reducciones en la expectativa de vida de 3 y de 10 años en individuos con obesidad clase II y con obesidad clase III, respectivamente (*Prospective studies collaboration*, 2009). Del mismo modo, está bien documentado que la presencia del sobrepeso y la obesidad durante la infancia es el principal predictor del desarrollo del sobrepeso y la obesidad en la edad adulta, y a su vez, la presencia de obesidad también se asocia con el desarrollo de alteraciones metabólicas de inicio temprano, las cuales condicionan a la presencia de enfermedad cardiovascular prematura y un riesgo incrementado de mortalidad en la edad adulta (Freedman *et al.*, 2005).

Por otra parte, la relación fisiológica entre la obesidad y el desarrollo de complicaciones metabólicas puede fundamentarse al menos en parte en la función que desempeña el tejido adiposo en la homeostasis metabólica. En la obesidad, el agrandamiento del tejido adiposo (hipertrofia) resulta en la infiltración de macrófagos y el desequilibrio entre la secreción de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias, lo cual conduce a la inflamación, alteración en la sensibilidad a la insulina y en el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo. A su vez, la hipertrofia del tejido adiposo también puede afectar otros tejidos incluyendo el hígado, musculo esquelético y el corazón por medio del incremento en la liberación de ácidos grasos libres y citocinas proinflamatorias (Jung y Choi, 2014).

1.1.5.1. Obesidad y resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina es una condición asociada con la disminución en la captación y la oxidación de la glucosa celular a pesar de la existencia de altas concentraciones de glucosa e insulina circulantes (Hollenbeck y Reaven, 1987). La resistencia a la insulina se define como la disminución en la capacidad de los tejidos para responder en forma adecuada a la acción de la insulina (Kahn, 1978). La obesidad central es considerada el principal factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina, ya que se puede presentar en más del 41% de pacientes con obesidad. Esta relación se fundamenta en el hecho de que el tejido adiposo es un tejido sensible a la acción de la insulina. En este tejido la insulina estimula el almacenamiento de los triglicéridos a través de múltiples mecanismos, incluyendo la promoción de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, el incremento en la captación de glucosa y de los ácidos grasos derivados de las lipoproteínas circulantes así como de la lipogénesis en los adipocitos maduros y la inhibición de la lipólisis. En la obesidad, la inflamación crónica del tejido adiposo condiciona un incremento en la infiltración de macrófagos y la expresión de citocinas proinflamatorias que ingresan en el flujo sanguíneo para causar inflamación sistémica, lo cual se asocia con hiperinsulinemia y resistencia a la insulina sistémica (Ye *et al.*, 2013).

1.1.5.2. Obesidad y síndrome metabólico.

El síndrome metabólico se define como un conjunto de factores de riesgo cardiovascular caracterizado por la presencia de obesidad central, hiperglucemia, dislipidemia y presión sanguínea elevada (Tabla 2). Se ha descrito que la probabilidad de desarrollar síndrome metabólico se incrementa en función del aumento en la adiposidad; de tal forma que riesgo para desarrollar síndrome metabólico es 5.2 veces más alto en sujetos con sobrepeso, 25.2 veces más alto para sujetos con obesidad y 67.7 veces más alto para sujetos con obesidad clase III, comparado con sujetos con un peso normal (Kaur *et al.*, 2014).

Tabla 2. Criterios diagnósticos para Síndrome Metabólico.

Característica clínica	ATPIII 3 de los siguientes	IDF
Obesidad	Cintura ≥ 102 cm en hombres ≥ 88 cm en mujeres.	Cintura ≥ 90 cm en hombres ≥ 80 en mujeres* Más dos de los siguientes:
Dislipidemia	TG ≥150 mg/dl HDL < 40 mg/dl en hombres < 50 mg/dl en mujeres	TG ≥150 mg/dl** HDL < 40 mg/dl en hombres < 50 mg/dl en mujeres**
Presión arterial	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg**
Glucemia	Glucemia en ayunas > 110 mg/dl	Glucemia en ayunas > 100 mg/dl**
Resistencia a la insulina	no	no

* Si el IMC es >30 kg/m², se puede asumir obesidad central y no es necesaria la medición de la circunferencia de cintura. **tratamiento farmacológico específico para esa alteración metabólica.

1.1.5.3. Obesidad e hígado graso no alcohólico (HGNA).

Actualmente, se considera al HGNA como la enfermedad hepática crónica más común en el mundo (Bellentani y Marino, 2009) y se define como la

acumulación de grasa, principalmente de triglicéridos en los hepatocitos superior al 5% del peso del hígado en ausencia de una ingesta excesiva de alcohol (<20 g/día para mujeres y <20 g/día para hombres) y/u otra causa secundaria de daño al hígado (por ejemplo, hepatitis viral, hemocromatosis, entre otras). El HGNA incluye un espectro de alteraciones hepáticas que va desde la presencia de esteatosis simple (acumulación de triglicéridos en los hepatocitos), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA, esteatosis hepática acompañada de un proceso inflamatorio), fibrosis, cirrosis e incluso el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Farrell y Larter, 2006). La incidencia de esta alteración se ha incrementado recientemente en paralelo al incremento en la incidencia de obesidad. En este sentido, los estudios epidemiológicos indican que la prevalencia de HGNA en la población general es de 10-25% y se incrementa a un 60-70% en personas con obesidad y hasta un 95% en personas con obesidad mórbida (Dixon *et al.*, 2001). La esteatosis hepática generalmente ocurre cuando el influjo de lípidos en el hígado, derivados ya sea del incremento en la entrada o la síntesis *de novo* de ácidos grasos, excede la capacidad del aclaramiento de los mismos a través de la oxidación o la salida de triglicéridos. El incremento en el influjo de ácidos grasos libres (AGL) al hígado es el resultado principalmente del aumento en la lipólisis en los adipocitos hipertróficos. En el hígado, la entrada de AGL produce además la reducción en el aclaramiento de la insulina hepática y a su vez el incremento en los niveles de insulina circulante, la producción de glucosa, la síntesis de triglicéridos y la alteración en la supresión de la salida hepática de glucosa por parte de la insulina. Además, la hipertrofia del tejido adiposo también promueve un aumento en la infiltración de macrófagos y en la secreción de quimocinas, citocinas y adipocitocinas proinflamatorias, asociadas con el desarrollo de resistencia a la insulina (Figura 2) (Jung y Choi, 2014).

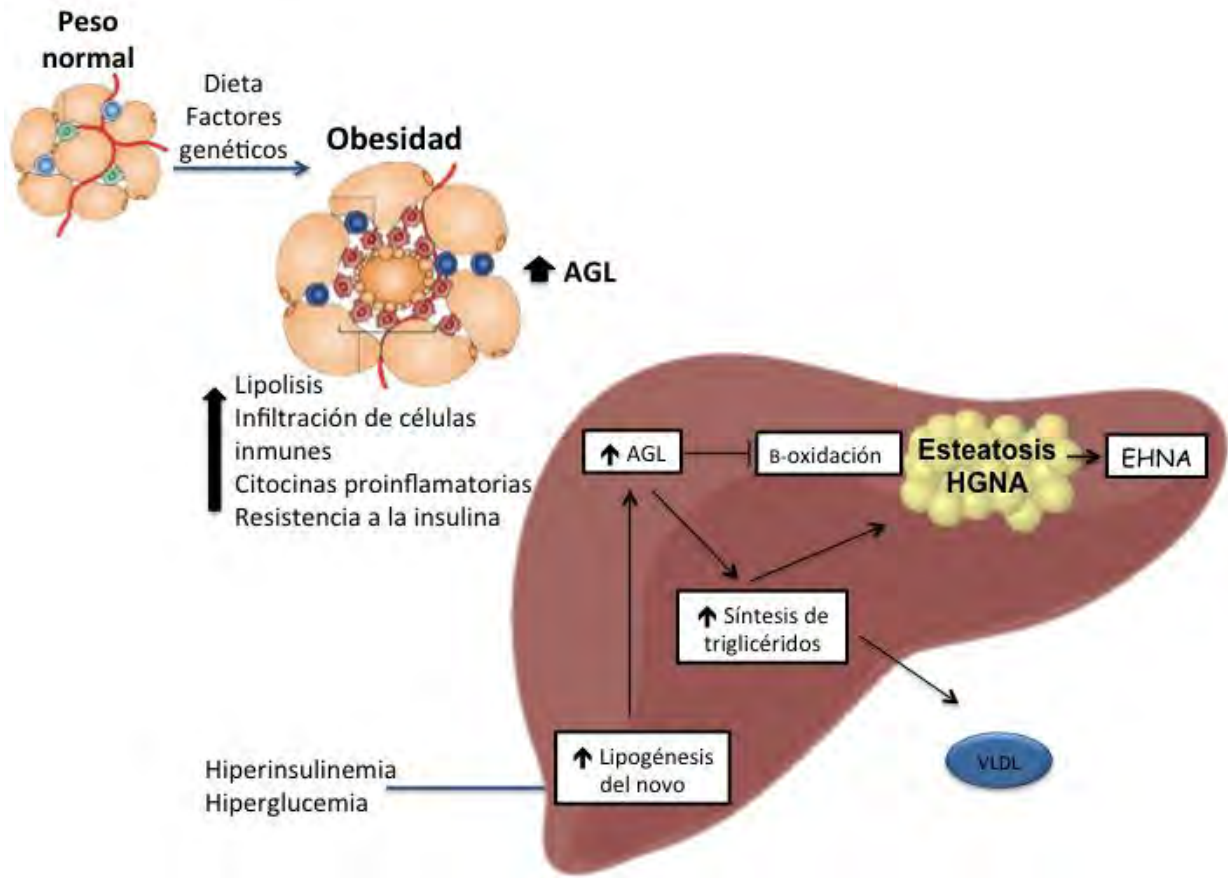


Figura 2. Relación de la obesidad con el desarrollo de HGNA. En la obesidad, el incremento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia) resulta en la disfunción de los mismos, lo cual conduce a un incremento en la lipólisis, aumento en la secreción de adipocitocinas y en consecuencia un incremento en el flujo de ácidos grasos libres (AGL) hacia los tejidos periféricos, como el hígado. Este incremento en la entrada de AGL al hígado aunado a el estado de hiperglucemia e hiperinsulinemia característico de la obesidad conducen a un aumento de la lipogénesis del novo, la síntesis de triglicéridos y la inhibición de la beta oxidación condicionando la acumulación excesiva de lípidos y el desarrollo de esteatosis hepática.

1.1.6. Factores de riesgo para el desarrollo de obesidad.

La obesidad es una alteración compleja causada por la interrelación entre factores de riesgo genéticos y no genéticos. Respecto a estos últimos, la creciente

prevalencia de la obesidad en todo el mundo, la relación inversa entre la obesidad y la clase socioeconómica y la tendencia hacia el aumento en la prevalencia de obesidad en los países en desarrollo asociada con la urbanización, proporcionan evidencia clara de las influencias ambientales en el aumento de peso corporal. Específicamente, la adopción de un estilo de vida relativamente sedentario, debido a la reducción en la actividad física junto con el aumento en la ingesta de calorías y los cambios en la composición de la dieta, representa una transición nutricional que, según la OMS, es uno de los principales factores explicativos para la mala salud en todo el mundo (van der Klaauw y Farooqi, 2015). Sin embargo, se ha establecido que la obesidad es una alteración metabólica compleja y multifactorial que si bien tiene un claro componente ambiental –ambiente “obesogénico”- requiere de la interacción o la influencia de una base genética para su expresión fenotípica. Es decir, existe una relación sinérgica entre genes y ambiente; en presencia de cierta predisposición genética a la obesidad, la severidad de esta alteración está ampliamente determinada por las condiciones ambientales y del estilo de vida (Loos y Bouchard, 2003). La evidencia de esta interacción surgió de estudios epidemiológicos de migración, en los cuales se comparó el riesgo para desarrollar una enfermedad entre poblaciones genéticamente relacionadas que tienen diferentes estilos de vida. Probablemente el mejor ejemplo, es la comparación del riesgo de presentar obesidad y DT2 entre los Indios Pima que viven en el ambiente obesogénico de Arizona (donde el 69% presentan obesidad y el 55% tienen DT2) y aquellos que viven en el ambiente restrictivo de la Sierra Madre de México (donde únicamente el 13% presentan obesidad y el 6% tienen DT2). En contraste, los sujetos caucásicos Americanos quienes viven en un ambiente obesogénico similar a los Indios Pima residentes de Arizona pero tienen un componente genético diferente son mucho menos susceptibles a desarrollar obesidad (32%) o DT2 (8%) (Ravussin *et al.*, 1994), lo que sugiere que, la respuesta a diferentes estilos de vida y condiciones ambientales está fuertemente influenciado por la predisposición genética.

1.2. FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE OBESIDAD.

En cualquier ambiente, ya sea abundante o deficiente de energía, hay una considerable variación interindividual en la ganancia de peso corporal, lo que sugiere que la adiposidad está influenciada por interacciones complejas entre factores genéticos, del desarrollo, del comportamiento y las influencias ambientales. A este respecto, las estimaciones de la contribución genética a la modulación del peso corporal se originaron a partir de estudios de genética clásica realizados en familias, gemelos y gemelos en adopción, los cuales demostraron que la heredabilidad - la cual es definida como la fracción de la varianza fenotípica total de un rasgo cuantitativo atribuible a factores genéticos en un ambiente específico - para el IMC y la obesidad oscila en un rango del 40 al 80%. De hecho, se ha establecido que las medidas de adiposidad se encuentran entre los rasgos humanos más heredables (Maes *et al.*, 1997). Sin embargo, los estimados de heredabilidad pueden variar en función de diversos factores como son la edad, el origen étnico y el diseño de estudio (estudios en familias o gemelos) (Elks *et al.*, 2012). De tal manera que en diversos estudios se ha determinado que el rango de concordancia para el IMC entre pares de gemelos monocigóticos es más del doble que entre pares de gemelos dicigóticos (0.68 vs. 0.28). Así mismo, en estudios de adopción se ha demostrado que el IMC de los individuos adoptados presenta una correlación más alta con el IMC de los padres biológicos que con el de los padres adoptivos, resaltando la importancia de los factores genéticos sobre el ambiente familiar compartido (van der Klaauw y Farooqi, 2015).

Esta alta heredabilidad de los fenotipos relacionados con la obesidad subraya la considerable contribución de los factores genéticos, sin embargo, no indica el número de genes o la forma en que esos genes interactúan con los factores ambientales. A este respecto, la "hipótesis del gen ahorrador" sugiere que albergamos variantes genéticas que favorecen la utilización eficiente de alimentos y el almacenamiento de reservas grasas para sobrevivir a períodos de hambruna y que, ante la relativamente fácil disponibilidad de alimentos que existe en la

actualidad, estos genes y/o variantes representan una desventaja. Sin embargo, una hipótesis alterna podría ser que la obesidad se selecciono contra el riesgo a la depredación. Esta hipótesis sugiere que las mutaciones aleatorias y la deriva génica, en lugar de la selección dirigida, han influido en los cambios de la distribución de la masa grasa de la población, lo cual coincide con el hecho de que, en las sociedades occidentales, la mayor parte de las personas no presentan obesidad (Speakman *et al.*, 2007).

1.2.1. Obesidad poligénica.

La obesidad poligénica o común, la cual representa el 95% de los casos de obesidad, es el resultado de la acción de una gran cantidad de variantes genéticas que interactúan con los factores ambientales para determinar la presencia del fenotipo. Por tanto, cada uno de los genes y/o variantes genéticas sólo ejercen un efecto discreto sobre la presencia del fenotipo y en consecuencia, la identificación de los mismos resulta complicada. Existen tres estrategias principales para identificar nuevas variantes genéticas asociadas a la obesidad. Estas estrategias se basan en la hipótesis de que variantes genéticas comunes en las poblaciones están asociadas a las enfermedades comunes e incluyen: estudios de genes candidatos, estudios de ligamiento del genoma completo y estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés), siendo esta última la estrategia más exitosa y eficiente para la identificación de nuevas variantes genéticas asociadas a la obesidad (van der Klaauw y Farooqi, 2015).

1.2.1.1. Estudios de GWAS para obesidad.

Los estudios de GWAS se originaron a partir de 3 sucesos relevantes en el campo de la genética humana: 1) la secuenciación del genoma humano, 2) la generación de un mapa de haplotipos (proyecto internacional de HapMap) y 3) el desarrollo de plataformas de genotipificación de alto rendimiento. Estos estudios se basan en una estrategia libre de hipótesis que busca identificar nuevos *loci* que

incrementen el entendimiento de la biología y fisiopatología que subyace la susceptibilidad al desarrollo de la obesidad. Esta estrategia consiste en probar exhaustivamente asociaciones genotipo/fenotipo a través de millones de marcadores genéticos distribuidos en el genoma completo utilizando grandes cohortes poblacionales y a la fecha representa la forma más eficiente de identificar variantes genéticas comunes (con una frecuencia del alelo menor > 1%) asociadas con rasgos complejos. A este respecto, existen tres oleadas o etapas de estudios de GWAs bien definidas, las cuales han dado lugar a una serie de descubrimientos en el campo de la genética de la obesidad (van der Klaauw y Farooqi, 2015).

El primer *locus* asociado a la obesidad por la estrategia de GWAs incluyó el SNP rs756605 localizado en la región promotora del gen inducido por insulina 2 (*INSIG2*). Esta variante se asoció significativamente con un mayor riesgo de obesidad en población europea y su asociación se validó en cuatro cohortes independientes incluyendo individuos caucásicos, afroamericanos y niños. Sin embargo, estudios subsecuentes han arrojado resultados inconsistentes por lo que su asociación con la obesidad aún no está bien establecida (Herbert *et al.*, 2006; Dina *et al.*, 2007) (Tabla 3). Posteriormente, en el año 2007, la primera oleada de estudios de GWAs, incluyó tres estudios independientes cada uno confirmando al gen asociado a la obesidad y masa grasa (*FTO*) como el primer *locus* asociado con obesidad común en diversas cohortes poblacionales. El primero de estos estudios se diseñó para identificar variantes asociadas con DT2 (Frayling *et al.*, 2007). En este estudio el SNP rs9939609, localizado en el primer intrón del gen *FTO* se asoció significativamente con mayor riesgo de DT2 y mayor IMC. Sin embargo, la asociación con DT2 no permaneció significativa después de ajustar por IMC, sugiriendo que la asociación con DT2 se encontraba condicionada por el IMC (Frayling *et al.*, 2007). Posteriormente, dos estudios subsecuentes identificaron otros polimorfismos en la región intrónica del gen *FTO* asociados con obesidad severa de inicio temprano (Dina *et al.*, 2007), y con un mayor peso corporal e índice cintura/cadera en niños y adultos, respectivamente (Scuteri *et al.*, 2007) (Tabla 3).

En la segunda oleada de descubrimientos de estudios de GWAs, los estudios individuales se combinaron a través de esfuerzos colaborativos con el objetivo de incrementar el tamaño de la muestra de estudio y por consiguiente el poder estadístico para identificar un mayor número de variantes. El primer meta-análisis lo realizó el consorcio de Investigación Genómica para Rasgos Antropométricos (GIANT, por sus siglas en inglés), el cual es una iniciativa de colaboración internacional conformada por grupos de investigación de Europa y de los Estados Unidos de América enfocados en la investigación de rasgos antropométricos. Este trabajo incluyó datos de 7 estudios independientes de asociación de GWAS para el IMC y comprendió un total de 16,876 sujetos caucásicos. Sin embargo, a pesar de cuadruplicar el tamaño de muestra respecto a los estudios previos, únicamente se confirmó la asociación con la obesidad de polimorfismos del gen *FTO* y se identificó una nueva variante (rs17782313), localizada 200 kb río abajo del gen receptor de melanocortina 4 (*MC4R*), asociada con un mayor riesgo de obesidad en niños y adultos (Loos *et al.*, 2008) (Tabla 3).

Posteriormente, en la tercera oleada de descubrimientos de estudios de GWAS, este mismo Consorcio (GIANT), incluyó datos de 59,082 individuos pertenecientes a 29 estudios independientes. En este estudio además de confirmar la participación de los genes *FTO* y *MC4R*, se identificaron 6 *loci* nuevos asociados significativamente con el IMC, los cuales se ubicaban cercanos a o en los genes *TMEM18*, *GNPDA2*, *SH2B1*, *MTCH2*, *KCTD15* y *NEGR1* (Willer *et al.*, 2009) (Tabla 3). De manera interesante, otro metaanálisis dirigido por el consorcio deCODE Genetics, en el cual se combinaron datos de 5 estudios de GWAs para el IMC y el peso corporal de 34,416 individuos originarios de Islandia en la etapa de descubrimiento y 5,586 individuos de origen danés en la etapa de réplica, también confirmaron las asociaciones de los *loci* cercanos o en los genes *FTO*, *MC4R*, *NEGR1*, *TMEM18*, *SH2B1* y *KCTD15*. Además, este estudio identificó 4 *loci* nuevos asociados significativamente con el IMC cercanos a los genes *ETV5*, *BDNF* y *SEC16B* y *BCDIN3/FAIM2* (Thorleifsson *et al.*, 2009) (Tabla 3).

Por otra parte y a diferencia de los estudios realizados por el consorcio GIANT y deCODE, que se enfocaron en el IMC como rasgo principal, un estudio realizado en 1,380 casos con obesidad severa de inicio temprano en adultos y 1,416 controles de origen caucásico confirmó las asociaciones de los genes *FTO* y *MC4R* con la obesidad e identificó 3 *loci* nuevos asociados en los genes *NPC1*, *MAF* y *PTER*. (Meyre *et al.*, 2009) (Tabla 3).

La identificación de nuevos genes asociados a la obesidad a través de los estudios de GWAS ha sido muy relevante ya que ha permitido incrementar el conocimiento sobre los procesos celulares y las rutas bioquímicas implicadas en el desarrollo de esta patología, resaltando el papel de la disfunción del sistema nervioso central y la regulación de la ingesta y el metabolismo energético en la génesis de la obesidad (genes *FTO*, *MC4R*, *BDNF*, *NEGR1*). Así mismo, evidenciaron la participación de genes asociados con la acción de la insulina (*INSIG2*, *SH2B1*), procesamiento del RNA (*FTO*, *KCTD15*, *ETV5*, *SEC16B*, *BCDIN3*, *MAF*), metabolismo energético (*MTCH2*, *GNPDA2*), biología del metabolismo de lípidos y/o adipogénesis (*FTO*, *INSIG2*, *ETV5*, *NPC1*) (Tabla 3). Sin embargo, para la mayoría de los *loci* identificados, incluyendo el gen *FTO*, el mecanismo fisiopatológico y la ruta biológica que los relaciona con la regulación del peso corporal no se han descrito completamente. Además, cabe señalar que muchos de estos *loci* se encuentran en regiones reguladoras y/o en otras regiones no codificantes, por lo cual se ha sugerido que pueden desempeñar funciones importantes en la regulación de la expresión de genes, aunque no necesariamente para el gen al cual se han relacionado (Locke *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que variantes en el gen *FTO* las cuales se han asociado consistentemente con obesidad en múltiples estudios de GWAS, residen en elementos enhancer o potenciadores que regulan la expresión de los genes *IRX3* e *IRX5*, los cuales parecen influenciar procesos de adipogénesis, termogénesis y almacenamiento de lípidos (Claussnitzer *et al.*, 2015).

Tabla 3. Principales variantes y genes asociados a la obesidad y rasgos relacionados identificados por GWAS.

Gen	SNP	Locus	Nombre del gen	Función	Expresión	Referencia	RM, IC 95%
INSIG2	rs7566605	2q14	Gen inducido por insulina 2.	Regulador de la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol por SREBP.	Ubicuo	Herbert <i>et al.</i> , 2006.	
FTO	rs9939609 rs1121980 rs6499640 rs8050136	16q12	Gen asociado a obesidad y masa grasa.	demetilasa de DNA y RNA	Tejido Cerebral	Frayling <i>et al.</i> , 2007 Scuteri <i>et al.</i> , 2007 Dina <i>et al.</i> , 2007	1.31 (1.23-1.39)
MC4R	rs17782313 rs12970134	18q21	Receptor de melanocortina 4.	Receptor específico para el heptapéptido común a la hormona adenocorticotropica y α , β y γ -MSH; Tiene una función central en la homeostasis energética y el crecimiento somático.	Cerebro, placenta y tejido intestinal	Loos, <i>et al.</i> , 2008	1.12 (1.08-1.16)
TMEM18	rs7561317 rs6548238	2p25	Proteína transmembranal 18.	Factor de transcripción involucrado en la migración de células madre neuronales.	Cerebro y núcleo	Willer <i>et al.</i> , 2009. Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009.	1.20 (1.13-1.27) 1.19 (1.10-1.26)
GNPDA2	rs10938397	4p12	Glucosamina 6 fosfato deaminasa 2.	Enzima que cataliza la conversión reversible de D-glucosamina 6P a D-glucosa 6P y amonio	Ubicuo	Willer <i>et al.</i> , 2009.	1.12 (1.07-1.17)
SH2B1	rs7498665	16p11	Dominio Src, homólogo 2 que contiene una proteína adaptadora 1.	Media la activación de varias cinasas y puede funcionar en la señalización de citosinas y factores de crecimiento.	Ubicuo	Willer <i>et al.</i> , 2009. Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009.	1.11 (1.06-1.17)
MTCH2	rs10838738	11p11	Acarreador mitocondrial 2.	Proteína de la membrana mitocondrial involucrada en apoptosis.	Ubicuo. Tejido adiposo	Willer <i>et al.</i> , 2009.	1.03 (0.98-1.08)
KCTD15	rs29941 rs11084753	19q13	Dominio de tetramerización del canal de potasio 15.	Durante el desarrollo embrionario interfiere con la formación de la cresta neural. Inhibe la actividad transcripcional de AP2 por interacción con su dominio de activación.	Pituitaria	Willer <i>et al.</i> , 2009. Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009.	1.10 (1.04-1.15) 1.04 (0.98-1.10)
NEGR1	rs2568958 Rs2815752	1p31	Regulador de crecimiento neuronal 1.	Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas con funciones en	Tejido Cerebral	Willer <i>et al.</i> , 2009. Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009.	1.07 (1.02-1.12)

				adhesión celular, crecimiento neuronal en el desarrollo cerebral.			
ETV5	rs7647305	3q27	Ets variante 5.	Factor transcripcional que promueve la adipogénesis			Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009. 1.11 (1.05-1.17)
BDNF	rs925946 rs6265	11p4	Factor neurotrópico derivado del cerebro.	Factor de crecimiento del nervio. Regulación de la ingesta y el gasto energético (Vía leptina-melanocortina)	Cerebro		Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009. 1.11 (1.05-1.16)
SEC16B	rs10913469	1q25	SEC16 homólogo B, factor de transporte del retículo endoplásmico.	Organización del retículo endoplásmico y transporte de proteínas.	Ubicuo		Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009. 1.11 (1.05-1.18)
NCR3	rs2844479	6p21					Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009.
BCDIN3	rs7138803	12q13	Enzima de capping metilfosfato.	Regulación de la transcripción.	Ubicuo		Thorleifsson <i>et al.</i> , 2009. 1.14 (1.09-1.19)
FAIM2			Molécula inhibitoria de Fas apoptotica 2.	No descrita	Ubicuo		
MAF	rs1424233	16q23	Oncogen homólogo de fibrosarcoma musculoaponeurotico.	Factor de transcripción involucrado en la diferenciación de células madre mesenquimales a el linaje de osteoblastos o adipocitos	Ubicuo		Meyre <i>et al.</i> , 2009.
NPC1	rs1805081	18q11	Enfermedad de Niemann Pick, tipo C1.	Proteína reguladora del transporte de ácidos grasos y colesterol de endosomas/lisosomas a otros compartimentos celulares.			Meyre <i>et al.</i> , 2009.
PTER	rs10508503	10p13	Gen relacionado a fosfotriesterasa.	No descrita			Meyre <i>et al.</i> , 2009.

1.2.1.2. Variantes estructurales asociadas al IMC (CNVs).

A pesar del esfuerzo sustancial realizado en la última década para la identificación de nuevos *loci* asociados a la obesidad, una gran proporción de la heredabilidad de este rasgo aún no se ha determinado. En este sentido, por medio de modelos lineales mixtos se ha demostrado que los SNPs comunes pueden explicar hasta el 17% de la variación fenotípica total del IMC (Locke *et al.*, 2015). Por ello se ha sugerido que la proporción de heredabilidad faltante podría ser explicada al menos en parte, por otros tipos de variantes de DNA, ya sea de baja frecuencia, variantes estructurales como las variaciones en número de copias (CNVs, por sus siglas en inglés), efectos epistáticos y/o efectos epigenéticos (Maher, 2008).

De hecho, ahora se sabe que las CNVs son una forma frecuente de variación genética común y representan el 1% de la variabilidad genética total en humanos. Las CNVs (eliminaciones o duplicaciones), se definen como fragmentos genómicos de 1 kb o varias megabases que pueden incluir uno o varios genes, las cuales están presentes en un número variable de copias respecto a un genoma diploide de referencia (Stankiewicz y Lupski, 2010). Las CNVs en general son estables y pueden ser heredadas, sin embargo, en ocasiones también se generan de manera espontánea durante la meiosis. Los principales mecanismos moleculares responsables de la ocurrencia de CNVs en el genoma son: recombinación homóloga no alélica, unión de extremos no homólogos, retrotransposición, atascamiento de la horquilla de replicación y desplazamiento del templado (template switching) (Freeman *et al.*, 2006).

La importancia de las CNVs radica en que pueden afectar de manera directa la expresión de los genes. Los mecanismos más comunes por los cuales una CNV puede asociarse con un fenotipo incluyen la dosis génica, la alteración estructural y los efectos de posición. Dadas esas observaciones, se ha predicho que las CNVs podrían representar un porcentaje significativo de la variación en el riesgo de

enfermedades complejas, ya que pueden explicar hasta 18% de la variación heredable de la expresión génica (Conrad *et al.*, 2010).

La primera evidencia de que las alteraciones en número de copias pueden influenciar el fenotipo surge de enfermedades esporádicas o “desórdenes genómicos”, los cuales son enfermedades causadas por rearrreglos genómicos que afectan a genes sensibles de dosis. Sin embargo, recientemente se han descrito un número considerable de CNVs que modifican la susceptibilidad a enfermedades complejas, entre ellas desórdenes neurológicos, enfermedades cardiovasculares, infecciosas, autoinmunes, metabólicas, cáncer, entre otras (Lupski, 1998).

A la fecha los estudios para la identificación de variantes de número de copias asociadas a obesidad son escasos debido a la complejidad en su evaluación (Tabla 4). El primer estudio que identificó una CNV asociada a la obesidad fue a través de un meta-análisis realizado por el consorcio GIANT en el año 2009, el cual además de identificar 6 SNPs identificó una eliminación a 45 kb río arriba del gen *NEGR1* asociada significativamente con mayor IMC (Willer *et al.*, 2009). Posteriormente, Speliotes *et al.* (2010) describieron una eliminación de 21 kb en la región 16p12.3 asociada al IMC, esta CNV se localiza aproximadamente a 50 kb río arriba del gen *GPCR5*, el cual es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (Speliotes *et al.*, 2010). En un tercer estudio se identificó una CNV asociada con el IMC en población de origen chino localizada en la región 10q11.2, la cual contiene 5 genes incluyendo al gen *PPYR1*, siendo este el candidato funcional más plausible debido a que participa en la ruta leptina/melanocortina involucrada en la regulación de la ingesta y gasto energético (Sha *et al.*, 2009). Posteriormente, en un estudio de GWAs para obesidad severa de inicio temprano se describió la asociación de la región cromosómica 11q11 con obesidad. Esta región contiene 3 genes de receptores olfatorios (*OR4P4*, *OR4S2* y *OR4C6*) (Jarick *et al.*, 2011).

Sin embargo, en un estudio más reciente cuyo objetivo fue identificar variantes con un efecto potencial de dosis génica (gene-centric), se encontró la región

cromosómica 1p21.1 fuertemente asociada con el IMC y el porcentaje de grasa (Falchi *et al.*, 2014). Este *locus* incluye a los genes de la amilasa salival y la amilasa pancreática (*AMY1A* y *AMY2B*, respectivamente), siendo el número menor de copias del gen *AMY1A*, el que se asoció significativamente con un mayor riesgo de obesidad (RM=7.67; IC 95%=3.92–14.99; P=2.52x10⁻⁹), incluso constituyendo el gen con el efecto más importante descrito sobre la modulación del IMC. Además, este estudio sugirió una relación entre la CNV de *AMY1A* y la dieta, específicamente el metabolismo de los hidratos de carbono para aumentar el riesgo de obesidad, considerando que la amilasa salival es la enzima responsable de catalizar el primer paso en la digestión de los carbohidratos dietarios, específicamente, la hidrólisis de los almidones en la cavidad oral (Mandel *et al.*, 2010). De manera interesante, se ha descrito que el número de copias de este gen es 3 veces mayor en humanos en comparación con el chimpancé, sugiriendo que los humanos se favorecieron en dosis génica debido al concomitante incremento en el consumo de hidratos de carbono. Por tanto, se ha sugerido que el número de copias de esta CNV (1-20 copias) evolucionó en función de la presión selectiva en respuesta al consumo dietario de hidratos de carbono. En este sentido, Perri y colaboradores (2007) demostraron que las poblaciones con un consumo elevado de almidones presentan un mayor número de copias del gen *AMY1A*, en comparación con poblaciones que han mantenido una forma de vida ancestral previa al establecimiento de la agricultura (Perry *et al.*, 2007). Actualmente se desconoce el mecanismo por medio del cual el número de copias de *AMY1A* se asocia con un mayor riesgo de obesidad, sin embargo un estudio reciente realizado en más de 100 cepas diferentes de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y sacarosa, demostró que el locus de *Amy1* se asoció significativamente con un aumento en el peso corporal y con el enriquecimiento de *enterobacterias* en el intestino (Parks *et al.*, 2013), las cuales se han asociado a su vez con un mayor riesgo de obesidad en diversos estudios, sugiriendo que la asociación de *AMY1A* con la obesidad podría ser el resultado de la modulación de la microbiota intestinal, no obstante este dato no se ha corroborado en humanos. Por lo tanto, es crucial determinar de forma robusta si el número de copias de *AMY1A* tiene un impacto sobre la homeostasis energética.

Tabla 4. Principales CNVs asociadas a obesidad.

CNV	Locus	Tipo de CNV	Gen	Nombre del gen candidato	Función	Patrón de expresión	Referencia
1p31.1	72,541-72,584	Eliminación 43 kb río arriba del gen	NEGR1	Regulador de crecimiento neuronal 1.	Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas con funciones en adhesión celular, crecimiento neuronal en el desarrollo cerebral.	Tejido Cerebral	Willer <i>et al.</i> , 2009.
10q11.22	46,363,383-46,557,002	Eliminación	SYT15, GPRIN2, NPY4R, LOC728643	Receptor de neuropéptido Y, miembro 4.		Tejido Cerebral	Bao-Yong <i>et al.</i> , 2009.
11q11	55,130,596-55,210,165	Eliminación 80 kb	OR4P4, OR4S2, OR4C6	Receptores olfatorios (familia 4).	Receptores olfatorios que interactúan con moléculas odorantes para iniciar la respuesta neuronal de percepción olfatoria.	Sistema olfatorio	Jarick <i>et al.</i> , 2011.
16p12.3	19,853,151-19,874,863	Eliminación 21-kb. ~50 kb río arriba del gen	GPRC5b	Receptor acoplado a proteínas G, clase C, grupo 5, miembro B.	Miembro de la familia tipo 3 de receptores acoplados a proteínas G involucrado en la modulación de la secreción a insulina.	Ubicua	Speliotes <i>et al.</i> , 2010; Yang <i>et al.</i> , 2013.
1p21.1	104,198,366-104,292,504	Duplicación multialélica	AMYA1	Amilasa alpha 1A (salival).	Enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces alpha-1,4 en oligosacáridos y polisacáridos	Glándula Salival	Falchi <i>et al.</i> , 2014.

1.2.1.3. Estudios genéticos para obesidad realizados en población mexicana.

A pesar de la alta prevalencia de obesidad reportada para la población mexicana, a la fecha son escasos los estudios que han evaluado la participación de variantes genéticas comunes en el desarrollo de obesidad en esta población. El primer estudio que evaluó la participación de variantes candidatas con riesgo de obesidad se realizó en el año 2007 y confirmó la asociación de la variante Pro12Ala del gen *PPARG* (gen de receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas), con un mayor IMC y mayor riesgo de obesidad en una cohorte de población adulta mexicana y en dos grupos de población indígena (Canizales-Quinteros *et al.*, 2007). Posteriormente, un estudio realizado con el objetivo de identificar variantes asociadas con la modulación de los niveles de colesterol HDL, identificó la variante R230C del gen *ABCA1* (gen del transportador de colesterol dependiente de la unión a ATP miembro 1) asociada con un mayor riesgo de obesidad y síndrome metabólico en una cohorte de población adulta mexicana (Villarreal-Molina *et al.*, 2007). En el año 2008, se confirmó la asociación de variantes del gen *FTO* (identificado por medio de estudios de GWAs) con la obesidad, particularmente con obesidad clase III en un estudio de casos y controles de población mexicana (Villalobos-Comparan *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que la población mexicana presenta una predisposición elevada para el desarrollo de obesidad, mostrando una de las prevalencias más altas del sobrepeso y la obesidad en el mundo, tanto en la población infantil como en la población adulta. Aún cuando la obesidad es una enfermedad compleja con una heredabilidad de hasta 70%, poco se sabe acerca de la participación del componente genético de riesgo para la obesidad en el desarrollo de obesidad y sus complicaciones metabólicas en la población infantil y adulta mexicana. Por tanto, resulta de interés identificar las variantes de susceptibilidad para la obesidad y rasgos metabólicos relacionados, lo que permitirá generar conocimientos sobre el componente genético asociado a la obesidad en una de las poblaciones con de las prevalencias más altas, como es la mexicana.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de la alta prevalencia de obesidad y sus comorbilidades en la población mexicana, así como la alta heredabilidad calculada para esta alteración (de hasta un 70%), a la fecha son pocos los estudios que han evaluado variantes genéticas de riesgo para la obesidad en la población mexicana. Recientemente, los estudios de GWAs realizados en poblaciones europeas identificaron un número importante de variantes genéticas asociadas con la obesidad y/o con la modulación del IMC. Sin embargo, se sabe que la participación de los genes o variantes en el desarrollo de diversas enfermedades varía entre poblaciones. Por ello, en este estudio se evaluó la asociación de 18 SNPs (previamente identificados en GWAs para obesidad) con el riesgo de presentar obesidad en población mexicana. Por otra parte, existe evidencia de que los efectos de algunas variantes genéticas pueden cambiar en las diferentes etapas de la vida. Por ello, considerando que las variantes genéticas asociadas a la obesidad por GWAs, se identificaron en sujetos adultos, es necesario determinar su participación en la modulación del peso corporal desde

etapas tempranas de la vida. Por lo cual, en este estudio se evaluó la participación de las variantes genéticas de riesgo para obesidad en una muestra tanto de población adulta como infantil. Del mismo modo, considerando que la heredabilidad estimada para el IMC y/o la obesidad (de hasta 70%), no puede ser completamente explicada por los SNPs, y que se ha propuesto que las CNVs pueden contribuir de manera importante en la genética de la obesidad, en este estudio también se evaluó la asociación de 5 CNVs con el riesgo de obesidad en población infantil y adulta mexicana.

Además, tomando en cuenta que la obesidad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones metabólicas, es importante determinar si las variantes genéticas asociadas con el riesgo de obesidad, también se asocian con parámetros metabólicos, incluyendo el HGNA. Adicionalmente y con la finalidad de tener un mayor conocimiento del componente genético asociado al HGNA, también se evaluaron 5 variantes genéticas previamente asociadas con la progresión del HGNA en población de origen caucásico.

4. HIPÓTESIS

Las variantes genéticas comunes (18 SNPs y 5 CNVs) identificadas a través de análisis del genoma completo se asocian con la obesidad y sus complicaciones metabólicas, incluyendo el hígado graso no alcohólico en población mexicana.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Evaluar la asociación de 18 SNPs y 5 CNVs previamente identificadas por GWAs con la obesidad y sus complicaciones metabólicas en población infantil y adulta mexicana.

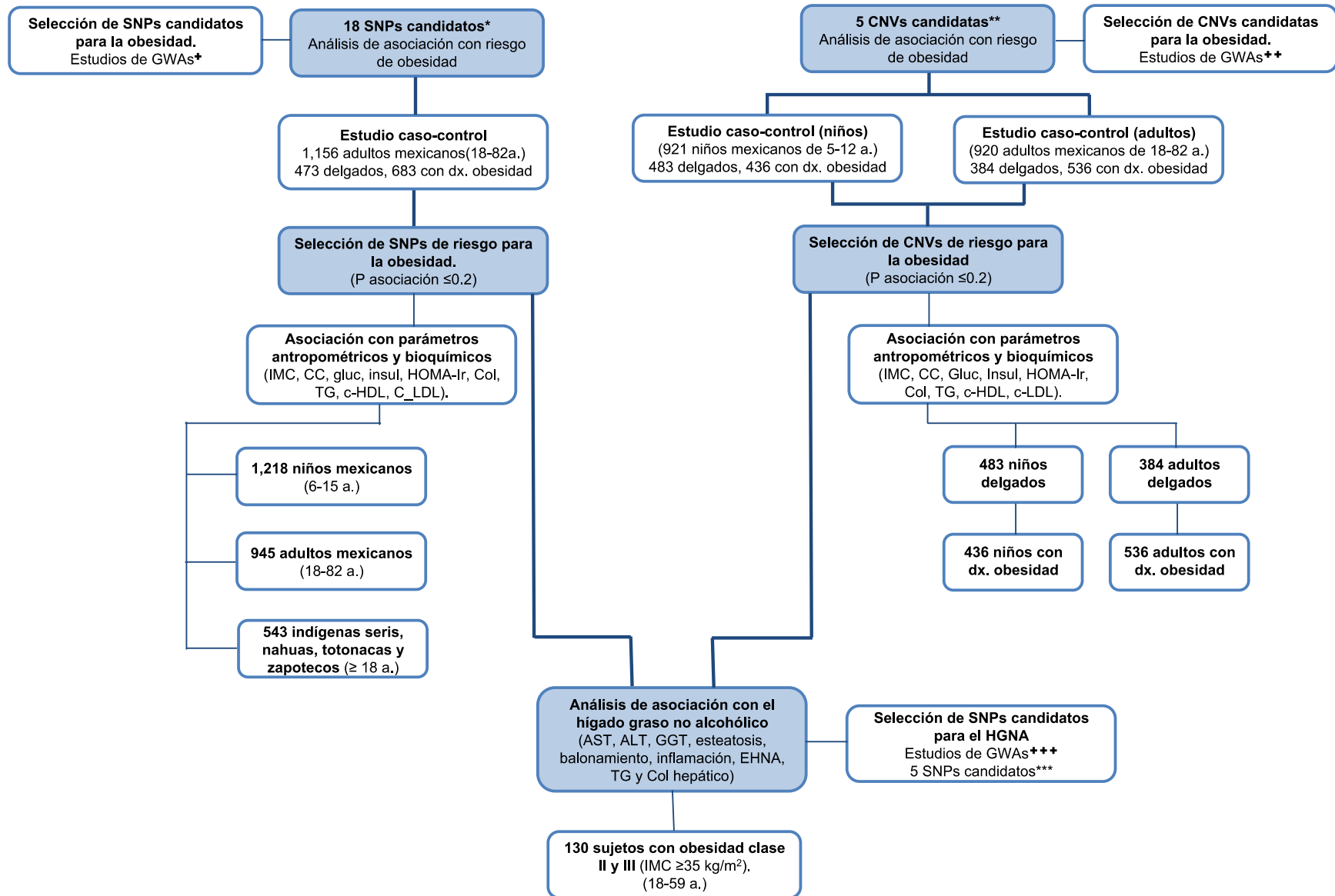
5.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar la asociación de los SNPs rs7566605 (*INSIG2*), rs9939609 (*FTO*), rs17782313 (*MC4R*), rs6548238 (*TMEM18*), rs7138803 (*FAIM2/BCDIN3*), rs6265 (*BDNF*), rs7498665 (*SH2B1*), rs10938397 (*GNPDA2*), rs2815752 (*NEGR1*), rs29941 (*KCTD15*), rs10913469 (*SEC16B/RASAL2*), rs1805081 (*NPC1*), rs7647305 (*SFRS10/ETV5*), rs1424233 (*MAF*), rs4712652 (*PRL*), rs10838738 (*MTCH2*) y rs10508503 (*PTER*) con la obesidad, a través de un estudio de casos y controles de población adulta mexicana.
2. Replicar las asociaciones de los SNPs asociados con la obesidad en el estudio de casos y controles, en una muestra independiente de población infantil y adulta; así como en muestra de indígenas seris, nahuas, totonacas y zapotecos.
3. Evaluar la asociación de los SNPs con parámetros bioquímicos (incluyendo glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL) en las distintas poblaciones de estudio.
4. Evaluar la asociación de las CNVs 1p21.1 (*AMY1A*), 1p31.1 (*NEGR1*), 10q11.22 (*NPYR4*), 11q11(*OR4S2*) y 16p12.3(*GPRC5b*) con la obesidad, mediante un estudio de casos y controles de población infantil y adulta.

5. Analizar la correlación entre el número de copias de las CNVs y los niveles de expresión en tejido adiposo de los genes comprendidos en los *loci* de las CNVs de estudio.
6. Evaluar la correlación de la CNV 1p21.1 (*AMY1A*) con el perfil de microbiota intestinal y con el consumo de macronutrientes.
7. Evaluar la asociación de los SNPs y CNVs que resulten asociadas con la obesidad, con el desarrollo de hígado graso no alcohólico en sujetos con obesidad clase II y III.
8. Evaluar la asociación de SNPs adicionales ubicados en genes candidatos para el HGNA rs738409 (*PNPLA3*), rs2228603 (*NCAN*), rs4240624 (*PPP1R3B*), rs780094 (*GCKR*) y rs12137855 (*LYPLAL1*), con el desarrollo de HGNA en sujetos con obesidad clase II y III.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se desarrollo en 3 etapas experimentales. A manera de resumen, en la primera etapa se evaluó la asociación con la obesidad de 18 variantes de SNPs; en la segunda etapa se evaluó la asociación con la obesidad de 5 variantes de CNVs y en la tercera etapa se evaluó la asociación de las variantes de riesgo para la obesidad con el HGNA. A continuación se muestra el diagrama del diseño experimental incluyendo las 3 etapas mencionadas.



7. METODOLOGÍA

7.1. Selección de variantes.

a. SNPs candidatos para obesidad.

Se seleccionaron los polimorfismos identificados en las 3 primeras etapas de estudios de GWAs para obesidad o IMC, con una frecuencia alélica reportada en la población México-Americana superior al 5% (Hapmap). Se incluyeron los siguientes SNPs: rs7566605 (*INSIG2*), rs9939609 (*FTO*), rs17782313 (*MC4R*), rs6548238 (*TMEM18*), rs7138803 (*FAIM2/BCDIN3*), rs6265 (*BDNF*), rs7498665 (*SH2B1*), rs10938397 (*GNPDA2*), rs2815752 (*NEGR1*), rs29941 (*KCTD15*), rs10913469 (*SEC16B/RASAL2*), rs1805081 (*NPC1*), rs7647305 (*SFRS10/ETV5*), rs1424233 (*MAF*), rs4712652 (*PRL*), rs10838738 (*MTCH2*) y rs10508503 (*PTER*).

b. CNVs candidatas para obesidad.

Se seleccionaron CNVs comunes asociadas con riesgo de obesidad, identificadas a través de estudios de GWAs o estrategias de expresión génica. Las CNVs seleccionadas corresponden a las regiones cromosómicas 1p21.1 (*AMY1A*), 1p31.1 (*NEGR1*), 10q11.2 (*NPYR4*), 11q11 (*OLR*) y 16p11.2 (*GPRC5B*).

c. SNPs candidatos para HGNA.

Las variantes que presentaron asociación significativa con riesgo de obesidad en el estudio caso-control se seleccionaron para su análisis con las principales características bioquímicas e histológicas del HGNA. Adicionalmente se analizaron 5 SNPs asociados con esteatosis hepática por estudios de GWAs. Se analizaron adicionalmente los siguientes SNPs: rs738409 (*PNPLA3*), rs12137855 (*LYPLAL1*), rs780094 y rs1260326 (*GCKR*), rs2228603 (*NCAN*) y rs4240624 (*PPP1R3B*).

7.2. Poblaciones de estudio.

a. Estudio de casos y controles para el análisis de SNPs.

Se incluyeron 1,156 sujetos mexicanos, no emparentados con un rango de edad entre 18 y 82 años, comprendiendo 683 casos (441 sujetos con obesidad clase I/II y 242 sujetos con obesidad clase III) y 473 controles delgados con una edad mayor a 30 años. Los participantes del estudio se captaron en sus sitios de trabajo en diversas instituciones de salud y educativas de la Ciudad de México (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)). La mayor parte de los individuos con obesidad clase III fueron pacientes del Hospital General “Rubén Leñero”. No se incluyeron individuos con diagnóstico de enfermedades crónicas que comprometen el peso corporal (cáncer, HIV o desórdenes de la tiroides).

b. Estudio poblacional para el análisis de SNPs.

- Población infantil.

Esta población incluyó 1,218 niños mexicanos con edades entre 6 y 15 años, no emparentados residentes de la Ciudad de México. De ellos, 653 se captaron durante las convivencias de verano de la Secretaría de Salud y 565 se captaron en una escuela secundaria pública de la Ciudad de México.

- Población adulta.

Esta población incluyó 945 adultos mexicanos no relacionados, de 18-82 años captados en diversas instituciones de la Secretaría de Salud previamente descritas, 441 de los cuales se incluyeron en el estudio de casos y controles.

- Población adulta indígena.

Se incluyeron 543 individuos no relacionados mayores de 18 años, pertenecientes a 4 grupos indígenas de comunidades rurales de México: 77 seris de Sonora, 271 nahuas y 112 totonacas de Puebla y 83 zapotecos de Oaxaca. Todos los individuos participantes, como sus padres y abuelos se reconocieron a sí mismos como indígenas, nacieron y viven en sus comunidades de origen y hablan su lengua nativa.

c. Estudio casos y controles para el análisis de CNVs.

- Caso-control niños.

La cohorte de población infantil incluyó 921 niños (5-12 años), seleccionados del estudio de Convivencia Infantil, previamente descrito. Del total de niños incluidos, 485 fueron controles (percentil de IMC ≥ 15 y ≤ 85) y 436 casos con obesidad (percentil del IMC ≥ 95).

- Caso-control adultos.

La cohorte adulta incluyó 920 adultos (18-82 años), seleccionados de la cohorte de población adulta previamente descrita. Del total de sujetos adultos, 384 fueron controles delgados (IMC ≥ 18.5 y < 25 kg/m²) y 536 casos con obesidad (IMC ≥ 30 kg/m²).

d. Estudio de sujetos con obesidad mórbida para HGNA.

Se incluyeron 130 individuos mexicanos, con un rango de edad de 18 a 59 años y diagnóstico de obesidad clase II/III (IMC ≥ 35 kg/m²) sometidos a cirugía bariátrica captados de manera consecutiva en la clínica de obesidad del Hospital General Rubén Leñero en la Ciudad de México. No se incluyeron pacientes con historia clínica de hepatitis viral, evidencia de enfermedad hepática crónica o consumo de alcohol mayor a 20 g/día.

A todos los participantes se les aplicó un cuestionario de antecedentes heredofamiliares. Adicionalmente, a la población infantil, se aplicaron cuestionarios

de consumo de alimentos, en cuyo caso se contestaron por los padres o tutores. Todos los participantes adultos firmaron una carta de consentimiento informado. Para el caso de los niños, se obtuvo el asentimiento por parte de los participantes y los padres o tutores firmaron la carta de consentimiento informado. Para los grupos indígenas, además de la carta de consentimiento, se contó con la aprobación de las autoridades locales. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y se aprobó por el Comité de Ética del INCMN “Salvador Zubirán” y del INMEGEN.

7.3. Evaluación de los participantes.

a. Determinación de parámetros antropométricos.

La evaluación antropométrica incluyó mediciones de talla, peso, circunferencia de cintura y cadera. Todos los sujetos se midieron con el mismo equipo utilizando técnicas de posicionamiento estándar (Lohman *et al.*, 1998). El IMC se calculó dividiendo el peso corporal entre la talla elevada al cuadrado (kg/m^2). Para la población infantil, el percentil del IMC se calculó utilizando las tablas de referencia específicas para la edad y el sexo recomendadas por la CDC, USA (Kuczmarski *et al.*, 2002). El estatus nutricional de los adultos se determinó utilizando como referencia la clasificación establecida por la OMS (adultos delgados $\text{IMC} \geq 18.5$ y $\leq 24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ y adultos con obesidad $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$), y en niños utilizando puntos de corte específicos para el percentil del IMC (niños delgados percentil del IMC ≥ 15 y ≤ 85 y niños con obesidad percentil del IMC ≥ 95). Para la cohorte infantil, se realizó la medición de la composición corporal por medio de impedancia bioeléctrica tetrapolar (BIA 101, RJL Systems, Clinton Township, MI, EUA).

b. Determinación de parámetros bioquímicos.

Las determinaciones bioquímicas se realizaron a partir una muestra de sangre periférica, posterior a un ayuno de 8-12 horas. Los niveles plasmáticos de lípidos

(colesterol total y triglicéridos) se midieron a través de métodos enzimáticos (Boehringer-Mannheim). Los niveles plasmáticos de lipoproteínas unidas a colesterol de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) se midieron usando ácido fosfotungstico y Mg^{2+} y los niveles plasmáticos de lipoproteínas unidas a colesterol de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) se calcularon utilizando la fórmula de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972). La glucosa sérica se midió utilizando el método de la glucosa oxidasa y los niveles plasmáticos de insulina se midieron por radioinmunoanálisis. La actividad de las transaminasas en suero; aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT) se determinaron utilizando estuches comerciales y métodos estandarizados (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). Los niveles de leptina y adiponectina sérica se determinaron utilizando estuches comerciales de ELISA (Linco St. Louis, MO, EUA). Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del IMCMNSZ. Se calculó el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) de acuerdo con la fórmula descrita por Matthews *et al.* (1985). El diagnóstico de diabetes se estableció considerando un valor de glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dl, diagnóstico previo o bien por el uso de hipoglucemiantes. En adultos el diagnóstico de síndrome metabólico se estableció utilizando los criterios recomendado por el III panel de expertos para la detección, evaluación y tratamiento de colesterol sanguíneo elevado en adultos de EUA (ATP III NECP, 2002) y en los niños, el síndrome metabólico se definió con base a los criterios establecidos por de Ferranti *et al.* (2004).

7.4. Análisis genéticos.

a. Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 200 μ l de sangre total, utilizando el estuche comercial QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza

del DNA extraído se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) y la integridad se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, las diluciones para la realización de PCR tiempo real se ajustaron a la misma concentración (10 ng/μl) para todas las muestras.

b. Genotipificación de SNPs (ensayos de discriminación alélica).

La genotipificación de los SNPs se realizó utilizando ensayos tipo Taqman prediseñados (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) en un termociclador tiempo real LightCycler 480 (Roche Applied Science, Pleasanton, CA, EUA) por medio de ensayos de discriminación alélica.

c. Genotipificación de marcadores informativos de ancestría.

Considerando que la población mexicana es el resultado de la mezcla entre la población europea, nativa americana y en menor proporción africana (Price *et al.*, 2007), se genotificarán adicionalmente marcadores informativos de ancestría con el fin de determinar si las asociaciones encontradas podrían ser confundidas por estratificación poblacional. Se seleccionó un panel de 10 marcadores informativos de ancestría (AIMs, por sus siglas en inglés) (rs4884, rs2695, rs17203, rs2862, rs3340, rs722098, rs203096, rs223830, rs281478 y rs1800498), por presentar las mayores diferencias de frecuencias alélicas entre las poblaciones parentales nativa americana y europea ($\delta > 0.44$) (Bonilla *et al.*, 2004; Choudhry *et al.*, 2007). Estos 10 AIMs se genotipificaron por la metodología KasPar (Kbiosciences, Hoddesdon, Hertfordshire, Reino Unido). La tasa de genotipificación por este método fue del 95%. No se observaron genotipos discordantes entre la genotipificación realizada con el método Kaspar y sondas Taqman en un 10% de las muestras analizadas. Para la cohorte de sujetos con obesidad mórbida se seleccionó un panel de 95 AIMs distribuidos a lo largo del genoma (Kosoy *et al.*, 2009), los cuales distinguen entre tres poblaciones parentales (nativa americana, europea y africana). Estos marcadores se

genotipificaron mediante la plataforma de microarreglos Golden Gate BeadArray (Illumina, San Diego, CA, EUA).

d. Ensayos de cuantificación de número de copias por PCR tiempo real.

La cuantificación de número de copias se realizó por medio de ensayos TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) dúplex, utilizando como control interno al gen de la ribonucleasa P (RNAsaP) (2 copias). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Además, se incluyeron 2 muestras control con número de copias determinadas por secuenciación para las regiones blanco en cada una de las placas analizadas. Específicamente para la CNV de la región de AMY1A, la cual es polimórfica (1-20 copias), se utilizaron 4 muestras controles de número de copias conocidas, obtenidas del repositorio del Coriell Institute for Medical Research previamente caracterizadas, cuantificadas y validadas por Carpenter *et al.* (2015) (NA11930, 2 copias; NA10852, 6 copias; NA11993, 10 copias y NA18972, 18 copias).

e. Ensayos de cuantificación del número de copias por PCR digital.

Se corroboró y validó la cuantificación de número de copias de la región de AMY1A por ser una CNV polimórfica por medio de ensayos de PCR digital. La técnica de PCR digital utilizada consistió en diluir el templado y distribuirlo en 20,000 reacciones individuales de PCR definidas por micelas, por tanto, la cantidad de templado total es estimado por la relación del número de micelas con una amplificación positiva con respecto al número total de micelas analizadas, lo que permite cuantificar el número exacto del DNA blanco en la reacción. Se utilizaron los mismos ensayos TaqMan de la PCRq (Life Technologies, Pleasanton, CA, EUA). Los datos generados se analizaron utilizando el programa QuantaSoft v1.3.1.0, el cual aplica un factor de corrección de Poisson para considerar las micelas con posibilidad de tener más de una molécula blanco con un IC 95% para cada micela.

f. Ensayos de expresión génica.

Se evaluó la expresión de los genes que mapean las CNV asociadas con riesgo de obesidad en 55 muestras de tejido adiposo de sujetos con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica. La extracción de RNA se realizó utilizando el estuche comercial Tissue Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la transcripción reversa de RNA a cDNA a partir de 500 ng de RNA total. Se diseñaron oligonucleótidos de los genes de interés para la población humana con base en las sondas Taqman correspondientes de la Universal Probe Library (Roche Applied Science, Pleasanton, CA, EUA). Se utilizaron como referencia para normalización a los genes HPRT y β -actina. La cuantificación se realizó por PCR-TR utilizando el termociclador LightCycler 480 v2.0 (Roche Applied Science, Pleasanton, CA, EUA) .

7.5. Determinaciones adicionales relacionadas con la CNV de *AMY1A*.

a. Evaluación de la microbiota intestinal en población infantil.

La extracción de DNA de las muestras de materia fecal se realizó utilizando el estuche QIAmp Fast DNA Stool mini kit (Qiagen, Germantown, MD, EUA) y se purificó utilizando el estuche Agentcourt AMPure XP (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) siguiendo las instrucciones de manufactura. Se realizó la secuenciación de la región hipervariable V4 del gen RNA ribosomal 16S utilizando los siguientes pares de oligos: 515-F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806-R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) con una estrategia de doble índice en la plataforma Illumina Miseq. Los filtros de calidad de las lecturas y los análisis de las secuencias se realizaron mediante el software estadístico QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) versión 14.0 (Caporaso *et al.*, 2010). Las distancias filogenéticas se calcularon mediante el método UniFrac (Lozoupe y Knight, 2005). Para asignar

OTUs (Operational Taxonomic Unit) se utilizó como criterio una similitud mínima del 97% de las secuencias utilizando como referencia la base de datos de Greengenes.

b. Evaluación del consumo dietario en población infantil.

La evaluación dietética se realizó utilizando un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos previamente validado para la población mexicana por el Instituto Nacional de Salud Pública (Hernández-Ávila *et al.*, 1998). Adicionalmente, se aplicó un recordatorio de 24 horas, el cual se verificó y evaluó por un especialista en nutrición. La conversión de gramos a equivalentes se realizó utilizando el sistema mexicano de alimentos equivalentes (Perez-Lizaur *et al.*, 2008). La ingesta de macro y micronutrientes dietarios se estimó utilizando los programas SNUT v2.0 y Food Processor® (versión 10.12.0, 2012, ESHA Research) y expresada como gramos y porcentaje de energía total.

7.6. Determinaciones adicionales relacionadas con el estudio de HGNA.

a. Histología hepática.

Se obtuvieron biopsias de tejido hepático al momento de la cirugía. El tejido se fijó utilizando formaldehído al 10% y embebido en parafina, teñido con hematoxilina-eosina y evaluado por un patólogo experimentado. La evaluación histológica se realizó de acuerdo con el sistema de puntuación de Kleiner (Kleiner *et al.*, 2005). La esteatosis se puntuó de 0 a 3, la inflamación de 0 a 3 y el balonamiento hepatocelular de 0 a 2. La suma de esas características se estimó para la determinación del *score* de NAS (*Score* de Actividad de HGNA, por sus siglas en inglés). Basándose en el *score* los participantes se clasificaron en sujetos no-EHNA (NAS <5 o sujetos con histología hepática normal, esteatosis simple y posible EHNA) o EHNA (NAS ≥5).

b. Determinaciones del contenido de triglicéridos y colesterol hepático.

Los lípidos totales se extrajeron de acuerdo con el método de Folch (Folch *et al.*, 1957) como se describe a continuación; el tejido hepático (50 mg) se homogenizó en una solución salina (0.9%), posteriormente los lípidos se extrajeron y homogenizaron en una solución cloroformo/metanol 2:1 (vol/vol). La fase orgánica se secó en una atmósfera de nitrógeno y los lípidos se resuspendieron en isopropanol y tritón X-100 al 10%. Las concentraciones de triglicéridos y colesterol total se determinaron por espectrofotometría (Beckman DU 640, Beckman Instruments, Fullerton, CA, EUA) utilizando estuches colorimétricos comerciales (Diagnostic Systems, Holzheim, Alemania) y se normalizaron con las concentraciones de proteína total.

7.7. Análisis estadísticos.

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg, utilizando la siguiente página: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Los porcentajes de ancestría se estimaron mediante el programa ADMIXMAP (Hoggart *et al.* 2003), considerando dos poblaciones parentales (nativa americana y europea) o el método de máxima probabilidad implementado en el programa ADMIXTURE (Alexander *et al.*, 2009) considerando tres poblaciones parentales (nativa americana, europea y africana). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) v16.0 (Chicago, IL, EUA). Las diferencias entre los grupos se determinaron por medio de pruebas de T-student para variables con distribución normal o U de Mann-Whitney para variables que no presentaron una distribución normal. Se utilizó un modelo lineal general para comparar los valores de rasgos cuantitativos entre los grupos ajustando por edad y sexo cuando fue necesario. Para evaluar las asociaciones de las variantes genéticas con el riesgo de obesidad o EHNA se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo y porcentaje de ancestría. Para evaluar las asociaciones de

las variantes genéticas con rasgos antropométricos y bioquímicos se realizaron análisis de regresión lineal ajustados por sexo, edad, IMC y porcentaje de ancestría. Todos los análisis de asociación se realizaron utilizando modelos genéticos aditivo, dominante y recesivo considerando el más significativo. Para evaluar el efecto combinado de los alelos de riesgo sobre las variables analizadas, se calculó un *score* genético de riesgo (SGR) sumando el número de alelos de riesgo de cada SNP para cada individuo. También se calculó un SGR “ponderado” multiplicando el número de alelos de riesgo de cada polimorfismo por el efecto estimado (valor beta) obtenido de los análisis de asociación individuales. Para evaluar el grado de varianza explicada se realizaron coeficientes parciales de correlación (r^2). El valor predictivo del SRG para la EHNA se valoró por medio de la construcción de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic, por sus siglas en inglés) en un modelo de regresión logística.

8. RESULTADOS

8.1. Asociación de SNPs identificados a través de GWAs con la obesidad y rasgos metabólicos relacionados.

a. Asociación con obesidad.

En la primera etapa del estudio se evaluó la asociación de 18 variantes genéticas (SNPs) con el riesgo de obesidad en población adulta mexicana. De los 18 SNPs analizados, 5 (~30%) se asociaron significativamente ($P \leq 0.05$) con mayor riesgo de obesidad, el mayor efecto se observó para el SNP rs7138803 cercano a los genes *FAIM2/BCDIN3* (RM=1.88 IC 95% 1.05-3.37; $P=0.034$). No obstante, el valor de asociación más significativo se observó para el SNP rs9939609 del gen *FTO* (RM =1.42 IC 95% 1.15-1.76; $P=0.001$), seguido por los SNPs rs6548238 del gen *TMEM18*, el SNP rs7566605 del gen *INSIG2* y el SNP rs6265 del gen *BDNF* (RM=1.57, $P=0.003$, RM=1.33, $P=0.006$ y RM=1.33, $P=0.044$) Estas asociaciones permanecieron significativas aún después de incluir ajustes por mezcla étnica (Tabla 5).

Posteriormente, al realizar un análisis estratificado por el grado de obesidad (obesidad clase I/II y obesidad clase III), el SNP rs7498665 del gen *SH2B1* se asoció significativamente con riesgo de obesidad clase I y clase II ($P \leq 0.05$) y los SNPs cercanos o en los genes *BDNF* y *MC4R* se asociaron particularmente con la obesidad clase III ($P \leq 0.05$) (Tabla 5). Del mismo modo, se observó que a pesar de que el SNP rs9939609 del gen *FTO* se asoció significativamente con riesgo de obesidad, el valor de asociación fue más significativo con la obesidad clase III ($P=1.8 \times 10^{-5}$).

Tabla 5. Asociación de 18 SNPs candidatos con riesgo de obesidad en la población mexicana.

Gen	Chr	SNP	A Ref	AR	Delgados Vs. Sujetos con obesidad			Delgados Vs. sujetos con obesidad II/III			Delgados Vs. Sujetos con obesidad III			P-Het
					RM (IC 95%)	^a P	^b P	RM (IC 95%)	^a P	^b P	RM (IC 95%)	^a P	^b P	
<i>FTO</i>	16	rs9939609	A	A	1.42 (1.15-1.76)	0.001	0.003	1.19 (0.93-1.52)	0.174	0.146	1.88 (1.44-2.45)	3.4x10⁻⁶	1.8x10⁻⁵	0.031
<i>TMEM18</i>	2	rs6548238	C	C	1.57 (1.17-2.12)	0.003	0.001	1.74 (1.23-2.46)	0.002	0.004	1.29 (0.87-1.91)	0.200	0.028	0.260
<i>INSIG2</i>	2	rs7566605	C	G	1.33 (1.08-1.63)	0.006	0.006	1.38 (1.10-1.74)	0.005	0.006	1.23 (0.92-1.63)	0.161	0.114	0.511
<i>FAIM2/BCDIN3</i>	12	rs7138803	A	A	1.88 (1.05-3.37)	0.034	0.039	1.93 (1.03-3.61)	0.040	0.024	1.76 (0.84-3.65)	0.132	0.266	0.850
<i>BDNF</i>	11	rs6265	G	G	1.33 (1.01-1.74)	0.044	0.043	1.21 (0.89-1.63)	0.222	0.231	1.59 (1.09-2.32)	0.017	0.014	0.269
<i>SH2B1</i>	16	rs7498665	G	G	1.12 (0.94-1.33)	0.195	0.175	1.21 (1.00-1.46)	0.047	0.050	0.97 (0.78-1.22)	0.799	0.955	0.230
<i>GNPDA2</i>	4	rs10938397	G	G	1.13 (0.95-1.36)	0.117	0.183	1.18 (0.97-1.44)	0.097	0.070	1.05 (0.82-1.33)	0.709	0.946	0.443
<i>MC4R</i>	18	rs17782313	C	C	1.24 (0.89-1.72)	0.198	0.206	0.98 (0.68-1.42)	0.923	0.880	1.85 (1.23-2.80)	0.003	0.012	0.050
<i>KCTD15</i>	19	rs29941	C	C	1.13 (0.92-1.38)	0.237	0.163	1.14 (0.92-1.42)	0.234	0.052	1.13 (0.88-1.46)	0.342	0.828	0.958
<i>SEC16B/RASAL2</i>	1	rs10913469	C	C	1.10 (0.88-1.36)	0.410	0.413	1.24 (0.98-1.56)	0.072	0.111	0.79 (0.57-1.09)	0.151	0.276	0.070
<i>NEGR1</i>	1	rs2815752	T	T	1.08 (0.88-1.31)	0.468	0.451	1.08 (0.86-1.34)	0.506	0.621	1.10 (0.84-1.43)	0.495	0.342	0.923
<i>NPC1</i>	18	rs1805081	A	G	1.07 (0.85-1.35)	0.585	0.567	1.15 (0.90-1.48)	0.269	0.228	0.87 (0.64-1.18)	0.396	0.338	0.130
<i>SFRF10/ETV5</i>	3	rs7647305	C	C	1.08 (0.81-1.44)	0.601	0.607	1.19 (0.87-1.64)	0.283	0.304	0.92 (0.64-1.32)	0.646	0.729	0.293
<i>MAF</i>	16	rs1424233	A	A	1.04 (0.83-1.32)	0.714	0.700	1.07 (0.84-1.37)	0.567	0.516	0.92 (0.67-1.26)	0.603	0.559	0.446
<i>PRL</i>	6	rs4712652	A	A	1.02 (0.82-1.26)	0.891	0.958	1.10 (0.87-1.39)	0.424	0.704	0.86 (0.64-1.15)	0.310	0.554	0.195
<i>MTCH2</i>	11	rs10838738	G	G	1.03 (0.83-1.28)	0.764	0.958	1.06 (0.84-1.33)	0.651	0.651	1.00 (0.76-1.32)	0.991	0.971	0.782
<i>PTER</i>	10	rs10508503	C	T	1.03 (0.55-1.93)	0.919	0.918	1.17 (0.61-2.26)	0.630	0.605	0.77 (0.30-1.94)	0.572	0.613	0.960

Abreviaturas: Chr, cromosoma; IC, intervalo de confianza; RM, razón de momios; P-Het, valor de P de heterogeneidad. Los SNPs se ordenaron considerando el valor de P de asociación con riesgo de obesidad. Las asociaciones estadísticamente significativas se encuentran en negritas. ^aP, datos ajustados por edad y sexo; ^bP, datos ajustados por edad, sexo y ancestría. Todos los valores de P se obtuvieron utilizando un modelo genético aditivo excepto para los SNPs cercanos a los genes *BCDIN3/FAIM2* y *BDNF* para los cuales se utilizó un modelo recesivo.

b. Asociación con parámetros antropométricos y bioquímicos.

Posteriormente, se seleccionaron un total de 10 SNPs que presentaron al menos asociación nominal con riesgo de obesidad ($P \leq 0.2$) en el estudio caso-control, con la finalidad de evaluar su asociación con variables antropométricas y bioquímicas relacionadas con la adiposidad, en tres cohortes poblacionales incluyendo: niños, adultos y adultos pertenecientes a 4 grupos indígenas. De los 10 SNPs analizados, 4 se asociaron significativamente ($P < 0.05$) con un mayor IMC en la cohorte de adultos (ceranos o en los genes *FAIM2/BCDIN3*, *TMEM18*, *INSIG2* y *KCT15*). En contraste, sólo 2 se asociaron significativamente ($P < 0.05$) con un mayor percentil de IMC en la cohorte de niños (ceranos o en los genes *FAIM2/BCDIN3* y *GNPDA2*) (Tabla 6). Posteriormente, se realizó un análisis combinando las cohortes de población mexicana (niños y adultos) con la finalidad de incrementar el poder estadístico y la probabilidad de observar asociaciones con los parámetros analizados. Se observó que 5 de los 10 SNPs demostraron asociaciones significativas ($P < 0.05$) con un mayor IMC y circunferencia de cintura (CC) (ceranos o en los genes *FAIM2/BCDIN3*, *TMEM18*, *INSIG2*, *GNPDA2* y *SEC16B/RASAL2*) en el análisis combinado (Tabla 6). Es importante resaltar que 3 de estos 5 SNPs, también presentaron los valores más altos de asociación con la obesidad en el estudio de asociación caso-control. Así mismo, a pesar de que no se observaron asociaciones significativas de los SNPs restantes con un mayor IMC, los alelos de riesgo y las tendencias de asociación son similares a lo observado en el estudio caso-control.

Por otra parte, es interesante que en el análisis realizado en la cohorte de población indígena, de las 10 variantes analizadas, sólo el SNP rs9939609 del gen *FTO* se asoció significativamente con un mayor IMC ($P = 0.045$).

Tabla 6. Asociación de 10 SNPs candidatos con los parámetros antropométricos asociados a la obesidad.

Rasgo	Gen	SNP	Chr	AR	Fx AR	Adultos (n=945)		Niños (n=1218)			Todos (n=2163)		P-Het
						B (ES)	P	Fx AR	B (ES)	P	B (ES)	P	
IMC	<i>FAIM2/BCDIN3</i>	rs7138803	12	A	20.8	0.51 (0.15)	0.001	21.2	0.33 (0.13)	0.008	0.40 (0.09)	3.5x10⁻⁵	0.388
	<i>TMEM18</i>	rs6548238	2	C	92.5	0.25 (0.09)	0.005	91.1	0.09 (0.07)	0.149	0.15 (0.05)	0.004	0.166
	<i>INSIG2</i>	rs7566605	2	G	76.6	0.15 (0.06)	0.007	73.4	0.03 (0.05)	0.475	0.08 (0.04)	0.024	0.095
	<i>KCTD15</i>	rs29941	19	C	62.6	0.11 (0.05)	0.020	55.2	0.02 (0.04)	0.658	0.054 (0.03)	0.072	0.121
	<i>GNPDA2</i>	rs10938397	4	G	35.6	0.08 (0.05)	0.106	35.2	0.09 (0.04)	0.021	0.09 (0.03)	0.005	0.810
	<i>SH2B1</i>	rs7498665	16	G	49.9	0.06 (0.05)	0.181	50.3	-0.03 (0.04)	0.447	0.01 (0.03)	0.787	0.127
	<i>SEC16B/RASAL2</i>	rs10913469	1	C	20.4	0.07 (0.06)	0.21	20.5	0.06 (0.05)	0.243	0.06 (0.04)	0.090	0.861
	<i>FTO</i>	rs9939609	16	A	19.4	0.05 (0.06)	0.392	18.1	0.08 (0.05)	0.125	0.07 (0.04)	0.085	0.757
	<i>MC4R</i>	rs17782313	18	C	7.3	-0.04 (0.09)	0.69	8.2	-0.04 (0.07)	0.607	-0.04 (0.06)	0.515	0.993
	<i>BDNF</i>	rs6265	11	G	86.4	0.03 (0.08)	0.684	84.6	0.02 (0.06)	0.728	0.03 (0.05)	0.598	0.917
CC	<i>FAIM2/BCDIN3</i>	rs7138803	12	A	20.8	0.62 (0.15)	3.3x10⁻⁵	21.2	0.28 (0.12)	0.024	0.42 (0.09)	1.1x10⁻⁵	0.082
	<i>TMEM18</i>	rs6548238	2	C	92.5	0.31 (0.09)	3.4x10⁻⁴	91.1	0.08 (0.07)	0.200	0.17 (0.05)	0.001	0.038
	<i>INSIG2</i>	rs7566605	2	G	76.6	0.15 (0.05)	0.007	73.4	0.04 (0.04)	0.321	0.08 (0.03)	0.014	0.143
	<i>KCTD15</i>	rs29941	19	C	62.6	0.08 (0.05)	0.074	55.2	0.03 (0.04)	0.449	0.05 (0.03)	0.082	0.365
	<i>GNPDA2</i>	rs10938397	4	G	35.6	0.11 (0.05)	0.021	35.2	0.04 (0.04)	0.304	0.07 (0.03)	0.023	0.274
	<i>SH2B1</i>	rs7498665	16	G	49.9	0.07 (0.04)	0.106	50.3	-0.05 (0.04)	0.229	0.01 (0.03)	0.903	0.042
	<i>SEC16B/RASAL2</i>	rs10913469	1	C	20.4	0.09 (0.05)	0.099	20.5	0.06 (0.05)	0.193	0.07 (0.03)	0.038	0.698
	<i>FTO</i>	rs9939609	16	A	19.4	0.05 (0.06)	0.394	18.1	0.04 (0.05)	0.354	0.05 (0.04)	0.209	0.936
	<i>MC4R</i>	rs17782313	18	C	7.3	0.03 (0.09)	0.770	8.2	-0.03 (0.07)	0.698	-0.01 (0.05)	0.908	0.639
	<i>BDNF</i>	rs6265	11	G	86.4	-0.03 (0.07)	0.692	84.6	0.04 (0.06)	0.450	0.02 (0.05)	0.741	0.437

Fx AR, frecuencia del alelo de riesgo; ES, error estándar; P-Het, P-heterogeneidad; IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura. Los valores de B se presentan como tamaño de efecto por copia de alelo excepto para los genes *BCDIN3/FAIM2* y *BDNF* analizados bajo un modelo recesivo, donde el tamaño del efecto se describe para dos copias. Los valores de P se ajustaron por sexo y edad. Las asociaciones estadísticamente significativas se marcan en negritas.

c. Construcción de un score genético de riesgo para obesidad.

Con base en las asociaciones observadas en el estudio de cohortes y con la finalidad de evaluar tanto el efecto acumulado, así como la variabilidad explicada por los 10 SNPs sobre el percentil de IMC o el IMC en la cohorte de población infantil y adulta, respectivamente, se construyó un *score* de riesgo genético (SRG) sumando el número de alelos de riesgo para cada individuo. El SRG se asoció significativamente con el percentil del IMC ($P \leq 0.01$); sin embargo, éste explica sólo el 2.1% de la variación del percentil del IMC en la cohorte infantil, además, la diferencia de los valores de medias del percentil del IMC entre sujetos con 13 (69.72 ± 27.09) y 18 (81.60 ± 20.79) alelos de riesgo representa un incremento de 11.88 unidades del percentil del IMC ($P = 0.006$). Consistente con las observaciones para la cohorte infantil, la asociación del SRG con el IMC en la población adulta también fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.01$) y explicó 3.3% de la variabilidad del IMC. No obstante, la diferencia de los valores de medias del IMC entre sujetos con 10 (25.74 ± 3.82) y 16 alelos de riesgo (30.17 ± 5.50) representa un incremento de 4.43 kg/m^2 unidades del IMC ($P = 0.002$) (Figura 3).

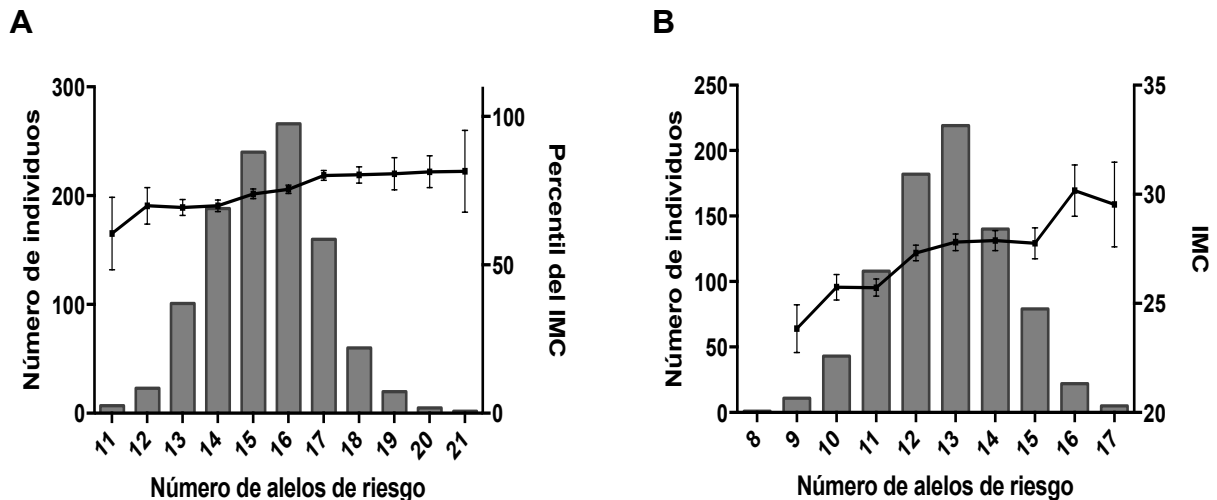


Figura 3. Efecto del número de alelos de riesgo sobre el percentil del IMC y el IMC en la cohorte de niños (A) y adultos (B), respectivamente. Se observó un incremento significativo y gradual en las medias del IMC en función del número de alelos de riesgo ($P \leq 0.01$, ajustado por edad, sexo y ancestría).

8.2. Asociación de CNVs con riesgo de obesidad.

Considerando que en conjunto los SNPs no explicaron en gran medida la heredabilidad de la obesidad y/o el IMC en nuestra población (<5%), se evaluó la asociación de 5 variantes de número de copias (CNVs) con el riesgo de obesidad en población infantil y adulta. La CNV que presentó el mayor rango de variabilidad en cuanto al número de copias es la región del gen *AMY1A* (1p21.1) con un rango de 1 a 19 copias, seguida por la región de los genes de receptores olfatorios *OR4P4* (11q11) la cual presentó un rango de 0 a 7 copias (Tablas 7 y 8). De las regiones restantes (1p31.1, 10q11.22 y 16p12.3), el número máximo de copias observado en nuestra población fue de 4 y sólo las CNVs que mapean tanto al gen del receptor de polipéptido pancreático como a los genes de receptores olfatorios (10q11.22 y 11q11, respectivamente) presentaron la eliminación en forma homocigota.

a. Asociación con obesidad en la cohorte infantil.

De las 5 regiones de CNVs analizadas en la población infantil, sólo la eliminación de la CNV que mapea a los genes de los receptores olfatorios *OR4P4/OR4S2/OR4C6* (11q11) presentó una asociación limítrofe con riesgo de obesidad (RM=0.774; IC 95%= 0.634-0.945 $P=0.047$); la eliminación en forma homocigota o heterocigota fue más frecuente en el grupo de niños delgados al compararlos con el grupo de niños con obesidad. Además, para la CNV del gen *AMY1A*, se observó una tendencia de asociación con un mayor riesgo de obesidad al comparar el grupo de niños con menos de 6 copias vs. el grupo de niños con 6 o más copias de *AMY1A* ($P=0.064$; RM= 1.323(0.984-1.780) (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del número de copias de 5 regiones de CNVs con riesgo de obesidad en la cohorte de niños (n=921).

<i>Locus</i>	<i>Gen</i>	Rango de número de copias	Clasificación	Niños Delgados (n,%)	Niños con obesidad (n,%)	RM (IC 95%)	Valor de P
1p21.1	<i>AMY1A</i>	2-19	Menos de 6 copias	116 (23.9)	128 (29.4)	1.323 (0.984-1.780)	0.064
			6 copias o más	369 (76.1)	308 (70.6)		
1p31.1	<i>NEGR1</i>	1-4	Eliminación	25 (5.2)	23 (5.3)	1.078 (0.425-3.622)	0.867
			2 o más copias	460 (94.8)	413 (94.7)		
10q11.22	<i>NPY4R</i>	1-4	Eliminación	21 (4.3)	19 (4.4)	1.064 (0.411-2.758)	0.898
			2 o más copias	464 (95.7)	417 (95.6)		
11q11	<i>OR4P4</i>	0-8	Eliminación	199 (41.0)	151 (34.6)	0.774 (0.634-0.945)	0.047
			2 o más copias	286 (59.0)	285 (65.4)		
16p12.3	<i>GPRC5B</i>	1-4	Eliminación	11 (2.3)	13 (2.9)	1.307 (0.472-3.622)	0.606
			2 o más copias	474 (97.7)	423 (97.1)		

Abreviaturas: *AMY1A*, Amilasa alpha 1A; *NEGR1*, regulador de crecimiento neuronal 1; *NPY4R*, receptor de neuropéptido Y 4; *OR4P4*, familia del receptor olfatorio 4, subfamilia P, miembro 4; G receptor acoplado a proteínas G, clase C, grupo 5, miembro B.

b. Asociación con obesidad en la cohorte de adultos.

Por otra parte, para la población adulta se observó que sólo la eliminación (de 1 o 2 copias) de la región que mapea al gen *NPY4R* (10q11.22) se asoció significativamente con mayor riesgo de obesidad con una RM de 1.290 ($P=0.046$; IC95% 1.062-1.569). De manera interesante y similar a lo observado en la población infantil, se encontró una tendencia de asociación del menor número de copias de *AMY1A* (menos de 6 copias) con mayor riesgo de obesidad ($P=0.064$; RM=1.323 IC95% 0.984-1.780) (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del número de copias de 5 regiones de CNVs con riesgo de obesidad en la cohorte de adultos (n=920).

<i>Locus</i>	<i>Gen</i>	Rango de número de copias	Clasificación	Adultos Delgados (n,%)	Adultos con obesidad (n,%)	RM (IC 95%)	Valor de P
1p21.1	<i>AMY1A</i>	2-19	Menos de 6 copias	94 (24.5)	165 (30.8)	1.521 (0.928-2.495)	0.096
			6 copias o más	290 (75.5)	371 (69.2)		
1p31.1	<i>NEGR1</i>	1-4	Eliminación	25 (6.5)	33 (6.2)	0.936 (0.877-1.266)	0.923
			2 o más copias	359 (93.5)	503 (93.8)		
10q11.22	<i>NPY4R</i>	1-4	Eliminación	16 (4.2)	36 (6.7)	1.290 (1.062-1.569)	0.046
			2 o más copias	368 (95.8)	500 (93.3)		
11q11	<i>OR4P4</i>	0-8	Eliminación	124 (32.3)	186 (34.7)	1.054 (0.877-1.266)	0.537
			2 o más copias	260 (67.7)	350 (65.3)		
16p12.3	<i>GPRC5B</i>	1-4	Eliminación	12 (3.1)	15 (2.8)	0.920 (0.580-1.301)	0.906
			2 o más copias	372 (96.9)	521 (97.2)		

Abreviaturas: *AMY1A*, Amilasa alpha 1A; *NEGR1*, regulador de crecimiento neuronal 1; *PPYR1*, receptor de neuropéptido Y 4; *OR4P4*, familia del receptor olfatorio 4, subfamilia P, miembro 4; G receptor acoplado a proteínas G, clase C, grupo 5, miembro B.

c. Asociación con obesidad de la CNV de *AMY1A*.

Dada la tendencia de asociación con riesgo de obesidad de la CNV del gen *AMY1A* observada tanto en la población infantil como en la población adulta, y considerando que en la distribución de número de copias de *AMY1A*, las diferencias más evidentes de las frecuencias, entre los casos y controles se observaron entre el grupo de sujetos con ≤ 4 copias vs. el grupo con ≥ 10 copias (Figura 4), decidimos realizar un análisis comparando aquellos individuos con ≤ 4 copias vs con ≥ 10 copias, encontrando que el presentar ≤ 4 copias de esta CNV se asoció significativamente con un mayor riesgo de obesidad (RM=1.530; IC=1.030-2.273 $P=0.035$;) en el análisis caso-control de la población infantil (Figura 5). Resultados similares se observaron en el análisis de la población adulta ($P=0.040$; RM=1.536; IC=1.019-2.313).

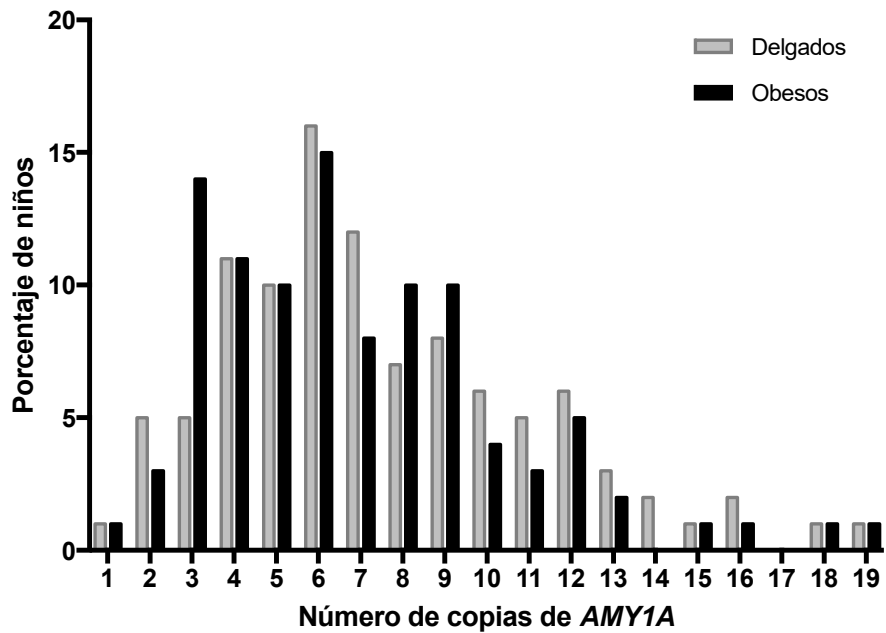


Figura 4. Distribución del número de copias de *AMY1A* en la cohorte infantil (n=921) entre niños con obesidad (436) y niños delgados (n=485). Las barras azules representan a los controles (delgados) y las barras rojas representan los casos (sujetos con obesidad).

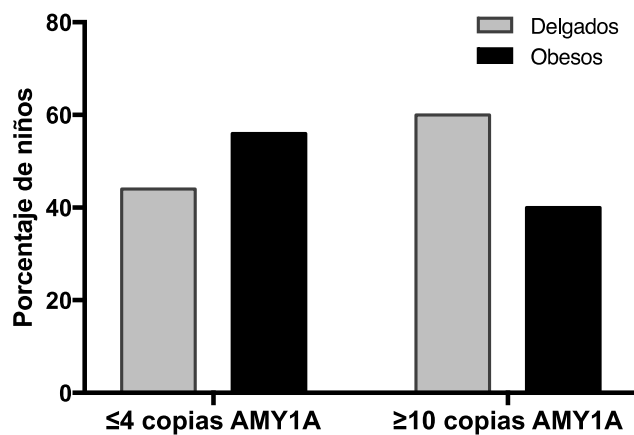


Figura 5. Asociación del número de copias de la región de *AMY1A* con riesgo de obesidad. Se observó una frecuencia significativamente mayor de sujetos con obesidad (barras rojas) en el grupo de menos de 4 copias de *AMY1A* en comparación con el grupo de más de 10 copias ($P=0.037$, ajustada por edad y sexo).

d. Asociación de las variantes de número de copias con la expresión de sus genes correspondientes ubicados en la CNV.

Para determinar si las CNVs asociadas con riesgo de obesidad también se asocian con cambios en la expresión del gen o genes ubicados en cada *loci*, se realizaron ensayos de cuantificación de la expresión génica en tejido adiposo de 55 sujetos con obesidad clase II o III. No se identificó expresión de los genes *OR4P4* y *PPYR1* en el tejido adiposo de las muestras analizadas. Por otra parte, la expresión del gen *AMY1A* fue alta en tejido adiposo, similar a la expresión del gen de leptina cuantificado en las mismas muestras. Además, de manera interesante se observó una correlación positiva, aunque no significativa entre el número de copias y la expresión del gen *AMY1A* ($R=0.143$, $P=0.323$). No obstante, se observó una correlación negativa entre la expresión del gen *AMY1A* y el IMC ($R=-0.184$, $P=0.097$), la circunferencia de cintura ($R=-0.374$, $P=0.060$) y la circunferencia de cadera ($R=-0.329$, $P=0.016$).

e. Asociación de la CNV de *AMY1A* con la microbiota intestinal.

A la fecha se desconoce el mecanismo por el cual el menor número de copias de *AMY1A* condiciona a un mayor riesgo de obesidad. Sin embargo, un estudio reciente realizado en un modelo murino reveló asociación del *locus* de amilasa con el incremento de peso corporal y con la abundancia de *Enterobacterias* intestinales (Parks *et al.* 2013). Con base en estos hallazgos, se ha sugerido que un probable mecanismo a través del cual la CNV de amilasa se asocia con riesgo de obesidad podría ser a través de la modulación de la microbiota intestinal. Sin embargo, esto no se ha evaluado en humanos. Por ello, en este estudio se evaluó la relación del número de copias del gen *AMY1A* con la abundancia de los géneros y especies pertenecientes a las familias bacterianas *Enterobacteriaceae* y *Prevotellaceae* en un subgrupo de 130 sujetos de la población infantil. No se observaron correlaciones significativas entre el número de copias de *AMY1A* a nivel de *familia* o *género*. Sin

embargo, a nivel de especie se observó una tendencia de correlación entre el número de copias de *AMY1A* y la abundancia relativa de la especie *paraprevotella* ($R=0.143$ $P=0.104$;). Por tanto, dadas las asociaciones observadas de un bajo número de copias de *AMY1A* con un mayor riesgo de obesidad, se realizó un análisis estratificando en bajo (≤ 4 copias) y alto (≥ 10 copias) número de copias de *AMY1A*. De manera interesante, se observó que aquellos niños en el tercil más alto de número de copias de *AMY1A*, tienen una proporción significativamente más alta de las especies *paraprevotella* y *Prevotella stercorea* comparado con aquellos niños en el tercil más bajo de número de copias ($P=0.018$ y $P=0.010$, respectivamente) (Figura 6).

Dado que la amilasa es una enzima involucrada en la hidrólisis de carbohidratos, se buscó determinar si existe una relación entre el número de copias de *AMY1A* y el consumo de carbohidratos, para lo cual se realizó un análisis de correlación del número de copias de *AMY1A* con el consumo de hidratos de carbono en la dieta en este mismo grupo de niños y sólo se observó una tendencia de correlación positiva ($R^2=0.228$ $P=0.188$;).

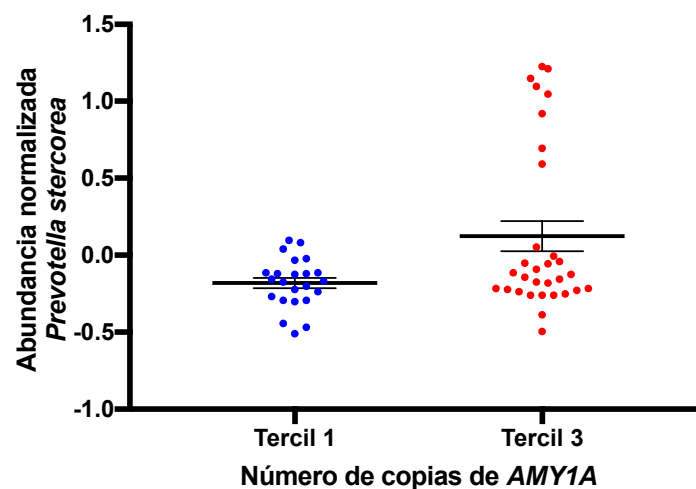


Figura 6. Diferencias de los valores normalizados de la abundancia de la especie *Prevotella stercorea* comparando el tercil más bajo vs el tercil más alto de número de copias de *AMY1A*. Se observó que la media de la especie *Prevotella stercorea* fue

significativamente más alta en los sujetos con más de 10 copias (T3) comparados con los sujetos con menos de 4 copias (T1) de la región AMY1A. (* $P < 0.05$).

Respecto al *locus* de amilasa, Perry *et al.* (2007), demostraron que el número de copias de *AMY1A* presenta variación entre grupos de diferentes regiones geográficas, encontrando que, poblaciones con una dieta con un alto contenido de almidones tienen un mayor número de copias de *AMY1A*, lo que sugiere un efecto de selección positiva. Considerando lo anterior, se evaluó el número de copias de *AMY1A* en un grupo de población indígena mexicana originaria del centro del país (30 nahuas de Puebla) ($n=120$) y se comparó con la media obtenida para la población de adultos y niños analizados previamente. Se observó que los valores de medias de la CNV de *AMY1A* son similares entre el grupo de población mexicana y los grupos indígenas analizados (7.04 vs 7.49; $P=0.218$) (Figura 7).

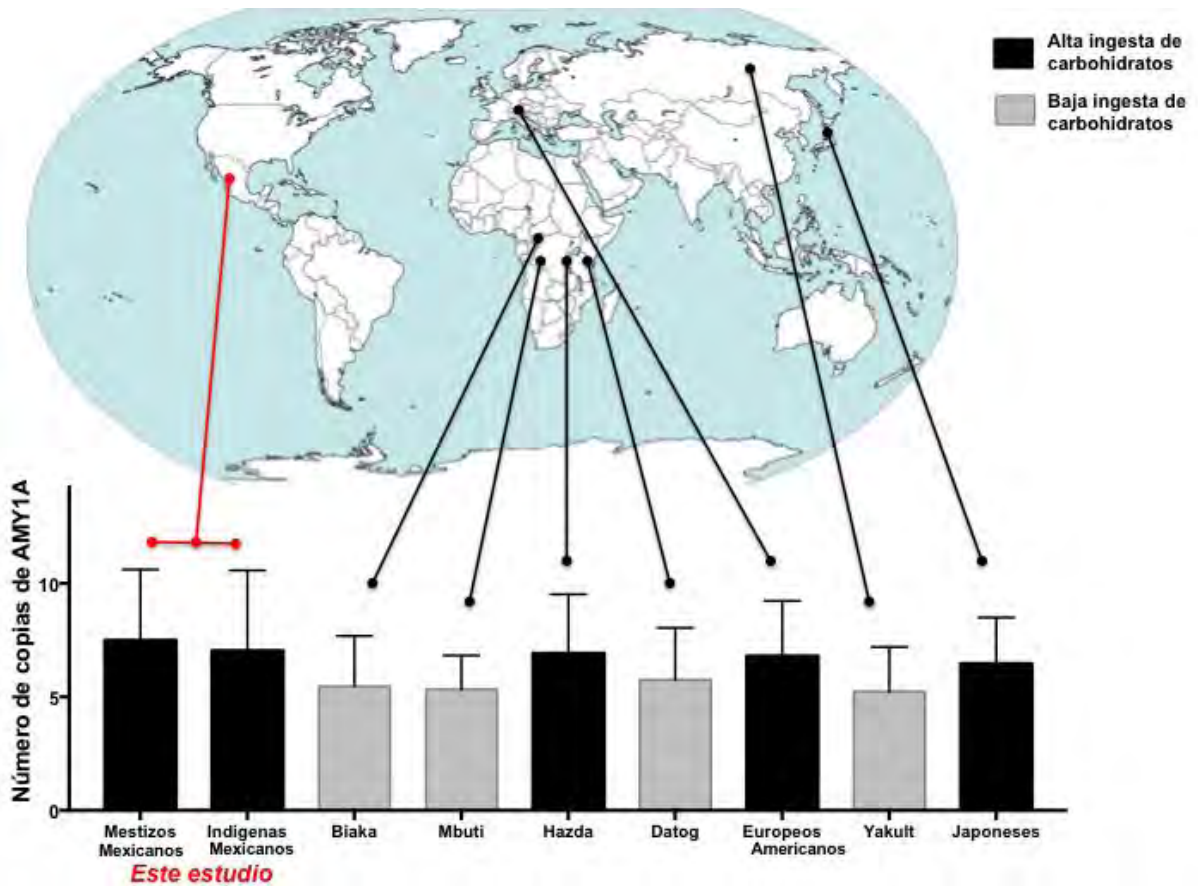


Figura 7. Valores de media de número copias de la región *AMY1A* en diferentes regiones geográficas estratificadas en alto (barras moradas) y bajo (barras verdes) consumo de carbohidratos. Se observa que las medias para la población mexicana e indígena mexicana son similares a las medias descritas para regiones con alto consumo de carbohidratos reportadas en el estudio realizado por Perry y cols, (2007) (Modificada de Perry y cols, 2007).

8.3. Efecto de variantes candidatas para obesidad sobre el HGNA y el riesgo de EHNA.

Por último, con el objetivo de determinar el componente genético compartido entre la obesidad y el HGNA, se evaluó la asociación de los 10 SNPs y las 3 CNVs previamente asociadas con la obesidad en este estudio, en una cohorte de 130 sujetos con obesidad mórbida. Además, considerando que estudios recientes de

escaneos del genoma completo identificaron 5 variantes cercanas a los genes *PNPLA3*, *NCAN*, *GCKR*, *LYPLAL1* y *PPP1R3B* asociadas con el HGNA en población caucásica, también se buscó determinar la relevancia de esas variantes sobre las características histológicas del daño hepático en sujetos con obesidad mórbida.

a. Características antropométricas y bioquímicas de la población de estudio.

Esta etapa del estudio incluyó un total de 130 pacientes con obesidad severa, la mayoría con diagnóstico de obesidad clase III, con una media del IMC de 44.34 ± 5.52 kg/m². La media de edad es de 36.97 ± 9.22 , siendo en su mayoría mujeres 66.92%. De los 130 individuos, 53 (40.8%) se diagnosticaron con base en la evaluación histológica como EHNA (esteatohepatitis) y los 77 restantes se definieron como no-EHNA (incluyendo a 15 individuos sin esteatosis (11.5%), 27 con esteatosis simple (20.8%) y 35 fueron indefinidos o posible EHNA (26.9%).

Los valores de medias de los principales parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo de la glucosa (glucosa, insulina, HOMA-Ir) y lípidos (triglicéridos) se encontraron significativamente más altos en los sujetos con EHNA en comparación con no-EHNA, al igual que la frecuencia de DT2 ($P \leq 0.05$) (Tabla 9). De manera interesante, los niveles de adiponectina y HDL-c fueron significativamente más bajos en individuos con EHNA. Como era esperado, el contenido de triglicéridos hepáticos fue significativamente mayor en biopsias hepáticas de sujetos con EHNA comparados con sujetos no-EHNA (2.50 vs. 0.71 mg/mg proteína, $P = 6.3 \times 10^{-8}$). De manera interesante, el contenido de colesterol hepático también fue más alto en individuos con EHNA comparado con el grupo no-EHNA (0.12 vs. 0.08 mg/mg proteína, $P = 0.010$) (Tabla 9).

Tabla 9. Características clínicas y bioquímicas de la cohorte de sujetos con obesidad clase II/III (n=130).

Característica	Todos los participantes	no-EHNA	EHNA	Valor P
	(n=130)	(n=77)	(n=53)	
Sexo (H %)	33.08	25.97	43.40	0.038
Edad (años)	36.97±9.22	37.25±9.55	36.57±8.81	0.680
IMC (kg/m ²)	44.34±5.52	44.12±5.72	44.67±5.26	0.797
Bioquímicos				
Glucosa en ayuno (mg/dL)	99.36 (27.85)	96.33 (19.75)	105.00 (38.08)	0.001
Insulina en ayuno (µIU/mL)	14.90 (14.63)	12.65 (10.23)	19.10 (28.55)	0.005
HOMA-IR	3.41 (4.57)	3.11 (2.43)	4.88 (10.13)	0.001
DT2 (%)	43 (33.1)	18 (23.4)	25 (47.2)	0.005
Colesterol Total (mg/dL)	173.15±36.86	177.39±35.66	166.98±38.04	0.124
Triglicéridos (mg/dL)	135.67 (80.60)	126.00 (75.25)	143.00 (90.25)	0.006
Colesterol - HDL (mg/dL)	34.53±10.35	36.88±10.62	31.12±8.98	0.006
ALT (IU/L)	29.20 (23.50)	24.67 (21.71)	34.00 (24.33)	0.035
AST (IU/L)	30.75 (30.27)	28.83 (24.50)	34.00 (43.40)	0.070
GGT (IU/L)	18.00 (18.25)	16.00 (18.48)	20.50 (18.75)	0.263
Leptina (ng/mL)	34.41±23.22	31.95±23.25	37.98±22.94	0.061
Adiponectina (µg/mL)	7.10±2.88	7.92±3.14	5.87±1.89	0.001
Lípidos hepáticos				
Contenido de TGH (mg/mg proteína)	1.050 (2.092)	0.710 (0.839)	2.500 (2.970)	6.3x10⁻⁸
Contenido de CH (mg/mg protein)	0.100±0.074	0.084±0.049	0.121±0.096	0.010
Histología hepática				
Grado de esteatosis (0-3)	1.73±1.03	1.09±0.76	2.66±0.52	3.1x10⁻²⁵
Balonamiento hepatocelular (0-2)	0.96±0.79	0.52±0.60	1.60±0.57	1.1x10⁻¹⁸
Inflamación lobular (0-3)	1.10±0.90	0.73±0.77	1.64±0.79	1.1x10⁻⁰⁹
Score NAS (0-8)	3.79±2.06	2.34±1.15	5.91±0.93	1.1x10⁻³⁶

Los datos se presentan como medias ± desviaciones estándar, medianas (rango intercuartil) o n (%).

Valores de P- comparación entre sujetos No-EHNA Vs. sujetos con EHNA. IMC, índice de masa corporal; HDL, lipoproteína de alta densidad; HOMA-IR, modelo homeostático de resistencia a la insulina; T2D, Diabetes tipo 2; ALT, alanino transaminasa; AST, aspartato transaminasa; GGT, gama glutamil transpeptidasa; HTG, triglicéridos hepáticos; HTC, colesterol hepático total.

b. Asociación con parámetros histológicos del HGNA.

De los 10 SNPs y las 3 CNVs de riesgo para obesidad, sólo el SNP del gen *SH2B1* se asoció significativamente con un mayor grado de esteatosis hepática ($P=0.050$) (Tabla 10). En contraste, el análisis de asociación de los 5 SNPs de riesgo para estatois, con el espectro histológico del HGNA reveló que el alelo “G” del SNP rs738409 del gen *PNPLA3* se asoció significativamente con un mayor grado de esteatosis ($P=0.011$) después de ajustar por confusores como género, edad, IMC y ancestría (Tabla 10). De manera similar, se observaron tendencias de asociación de los SNPs de los genes *LYPLAL1* y *GCKR* con un mayor grado de esteatosis ($P=0.105$ y 0.134 , respectivamente). En contraste, ninguno de los SNPs analizados presentó asociación significativa con el grado de balonamiento o inflamación. Por otra parte, es importante señalar que a pesar de que ninguno de los SNPs se asoció significativamente con riesgo de EHNA, de manera interesante, se observó que el genotipo “GG” del SNP de *PNPLA3* fue más frecuente en el grupo de sujetos con EHNA comparado con el grupo no-EHNA, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P=0.209$) (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de los SNPs sobre el grado de esteatosis y riesgo de EHNA.

Gen/SNP	Grado de esteatosis				Valor P	Estatus de EHNA		Valor P
	0	1	2	3		No EHNA	EHNA	
<i>PNPLA3</i> rs738409								
CC	7 (46.6)	15 (33.3)	7 (23.3)	5 (12.5)		24 (31.2)	10 (18.9)	
CG	4 (26.7)	22 (48.9)	18 (60)	19 (47.5)		35 (45.4)	28 (52.8)	
GG	4 (26.7)	8 (17.8)	5 (16.7)	16 (40)		18 (23.4)	15 (28.3)	
					0.011			0.209
<i>GCKR</i> rs1260326								
CC	7 (46.7)	18 (40)	12 (40)	15 (37.5)		32 (41.5)	20 (37.7)	
CT	5 (33.3)	21 (46.7)	14 (46.7)	23 (57.5)		34 (44.2)	29 (54.7)	
TT	3 (20)	6 (13.3)	4 (13.3)	2 (5)		11 (14.3)	4 (7.6)	

					0.134		0.314
LYPLAL1 rs12137855							
CC	10 (66.7)	32 (71.1)	22 (73.3)	35 (87.5)	56 (72.7)	43 (81.1)	
CT	5 (33.3)	10 (22.2)	8 (26.7)	3 (7.5)	18 (23.4)	8 (15.1)	
TT	0 (0)	3 (6.7)	0 (0)	2 (5)	3 (3.9)	2 (3.8)	
					0.105		0.391
PPP1R3B rs4240624							
AA	8 (53.3)	23 (51.1)	18 (60)	25 (62.5)	42 (54.5)	32 (60.4)	
AG	7 (46.7)	19 (42.2)	9 (30)	11 (27.5)	31 (40.3)	15(28.3)	
GG	0 (0)	3 (6.7)	3 (10)	4 (10)	4 (5.2)	6 (11.3)	
					0.288		0.219
SH2B1 rs7498665							
AA	10 (66.7)	18 (40.0)	12 (40.0)	10 (25.0)	34 (44.1)	16 (30.2)	
AG	5 (33.3)	21 (46.7)	10 (33.3)	22 (55.0)	31 (40.3)	27 (50.9)	
GG	0 (0.0)	6 (13.3)	8 (26.7)	8 (20.0)	12 (15.6)	10 (18.9)	
					0.050		0.475

Los datos se expresan como números absolutos y porcentajes de casos. Los valores de P se obtuvieron por medio de regresión logística utilizando un modelo genético aditivo (P_{adit}) donde el tamaño del efecto se describe por copia de alelo, excepto para *LYPLAL1* el cual fue analizado utilizando un modelo genético recesivo (P_{res}) donde el tamaño del efecto se describe por dos copias de alelo. Los valores de P se obtuvieron por regresión lineal múltiple o logística y se ajustaron por edad, sexo, IMC y ancestría.

c. Asociación con el contenido de lípidos hepáticos.

Posteriormente se evaluó el efecto de los SNPs sobre el contenido de lípidos hepáticos, observándose asociaciones consistentes con las previamente descritas para la esteatosis. De las variantes candidatas para la obesidad, sólo el SNP rs7498665 del gen *SH2B1* se asoció significativamente con un mayor contenido de triglicéridos hepáticos ($P=0.040$). Por otra parte, de las variantes candidatas para HGNA, se observó que por cada copia del alelo “G” del SNP del gen *PNPLA3*, el contenido de triglicéridos hepáticos incrementó alrededor de un 35% ($P=0.013$). Del mismo modo, el SNP del gen *LYPLAL1* se asoció significativamente con mayor

contenido de triglicéridos hepáticos y el alelo de riesgo del gen *PPP1R3B* exhibió una tendencia similar aunque la significancia estadística fue limítrofe ($P=0.086$, después de ajustar por género, edad, IMC y ancestría). Además, el SNP del gen *GCKR* se asoció significativamente con mayor contenido de triglicéridos hepáticos ($P=0.049$) y presentó una tendencia con mayor contenido de colesterol hepático ($P=0.068$) (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de SNPs en los genes *PNPLA3*, *GCKR*, *LYPLAL1* y *PPP1R3B* sobre el contenido de lípidos hepáticos.

Gen	SNP	AR	FAR	Contenido de TG Hep		Contenido de Col Hep	
				B (ES)	Valor P	B (ES)	Valor P
<i>PNPLA3</i>	rs738409	G	0.50	0.63 (0.22)	0.013	0.01 (0.01)	0.916
<i>GCKR</i>	rs1260326	C	0.64	0.45 (0.25)	0.049	0.03 (0.01)	0.068
<i>LYPLAL1</i>	rs12137855	C	0.86	0.77 (0.39)	0.039	0.03 (0.02)	0.180
<i>PPP1R3B</i>	rs4240624	G	0.25	0.47 (0.26)	0.086	0.02 (0.01)	0.197
<i>SH2B1</i>	rs7498665	G	0.39	0.70 (0.34)	0.040	0.02 (0.01)	0.127

Los valores B se presentan como tamaño de efecto por copia de alelo (modelo aditivo), excepto para *LYPLAL1*, donde el tamaño de efecto se describe para dos copias de alelo (modelo recesivo). Los valores de P se obtuvieron de una regresión lineal múltiple y se ajustaron por edad, sexo, IMC y porcentaje de ancestría. Los valores de triglicéridos se transformaron a logaritmo para su análisis. SNP, polimorfismo de un sólo nucleótido; AR, Alelo de riesgo; FAR, Frecuencia del alelo de riesgo; ES, Error estándar; TG Hep, Triglicéridos, Hepáticos; Col, Colesterol.

d. Asociación con los parámetros metabólicos.

Del mismo modo, dado que el HGNA se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico y usualmente se acompaña de alteraciones en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, también se evaluó la asociación de los SNPs con parámetros metabólicos y bioquímicos del metabolismo de la glucosa y

lipídeos. A pesar de que sólo se observaron asociaciones significativas del alelo “G” del SNP rs738409 del gen *PNPLA3* con niveles elevados de ALT y AST ($P < 0.05$), el alelo G del SNP rs4240624 del gen *PPP1R3B* y el alelo C de SNP rs12137855 del gen *LYPLAL1* también demostraron una tendencia de asociación con mayores niveles de ALT ($P = 0.114$ y $P = 0.149$, respectivamente). Además, el alelo “G” del SNP del gen *PNPLA3* también se asoció significativamente con mayores niveles de glucosa ($P = 0.029$). De manera interesante, el alelo C del SNP rs1260326 del gen *GCKR* se asoció significativamente con menores niveles de insulina y esta asociación permaneció significativa después de realizar un ajuste por el estatus de diabetes. Del mismo modo, la asociación de este alelo con el índice HOMA presentó significancia limítrofe y alcanzó significancia estadística después de ajustar por el estatus de diabetes (Tabla 12).

Tabla 12. Asociación de SNPs en los genes *PNPLA3*, *GCKR*, *LYPLAL1* y *PPP1R3B* con parámetros metabólicos.

Gen/SNP	<i>PNPLA3</i> /rs738409		<i>GCKR</i> /rs1260326		<i>LYPLAL1</i> /rs12137855		<i>PPP1R3B</i> /rs4240624		<i>SH2B1</i> /rs7498665	
	B (ES)	<i>P</i> _{add}	B (ES)	<i>P</i> _{add}	B (ES)	<i>P</i> _{add}	B (ES)	<i>P</i> _{add}	B (ES)	<i>P</i> _{add}
IMC (kg/m ²)	0.08(0.69)	0.991	-0.93(0.74)	0.111	-1.70(1.17)	0.071	-0.06(0.79)	0.941	-1.15 (0.83)	0.172
Colesterol (mg/dL)	1.13(4.54)	0.710	-6.28(4.88)	0.378	0.45(7.86)	0.948	3.15(5.18)	0.703	1.37 (5.05)	0.786
Triglicéridos (mg/dL) ^a	0.77(9.55)	0.931	11.12(10.28)	0.364	27.47(16.32)	0.181	6.75(10.89)	0.854	4.94 (12.55)	0.667
Col-HDL (mg/dL)	0.05(1.28)	0.921	-2.76(1.36)	0.061	-2.94(2.19)	0.227	-1.05(1.46)	0.551	-1.31 (1.47)	0.373
Glucosa (mg/dL) ^a	7.69(2.73)	0.026	3.42(3.03)	0.404	7.79(4.84)	0.058	1.39(3.23)	0.901	5.13 (3.65)	0.119
Insulina (μIU/mL) ^a	1.32(3.21)	0.785	-9.23(3.32)	0.048	7.19(5.87)	0.064	0.20(3.68)	0.733	-0.75 (3.52)	0.792
HOMA-IR ^a	0.78(0.92)	0.872	-2.21(0.97)	0.089	2.02(1.70)	0.039	0.25(1.06)	0.802	0.16 (1.54)	0.763
ALT (UI/L) ^a	12.78(3.99)	0.020	5.03(4.50)	0.957	10.37(7.16)	0.149	5.43(4.74)	0.114	10.99 (7.11)	0.127
AST (UI/L) ^a	17.44(4.79)	0.002	5.63(5.46)	0.751	10.29(8.71)	0.468	3.03(5.77)	0.682	4.57 (6.05)	0.453
GGT (UI/L) ^a	1.69(2.71)	0.898	1.68(2.92)	0.594	0.35(3.08)	0.335	4.39(3.78)	0.545	3.593 (3.765)	0.443

Los valores B se presentan como tamaño del efecto por copia de alelo (*P*_{add}), excepto para *LYPLAL1* el cual se analizó utilizando un modelo recesivo (*P*_{res}), donde el tamaño de efecto se describe para dos copias de alelos, error estándar (ES). Los valores P se obtuvieron por regresión lineal múltiple y se ajustaron por sexo, edad, IMC y ancestría. a variables transformadas a logaritmo para su análisis. Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; IMC, Índice de masa corporal; HDL-c, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR, Modelo homeostático de resistencia a la insulina; ALT, Alanino transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; GGT, Gama glutamil transpeptidasa.

e. Asociación de un score de riesgo genético para el HGNA.

Con la finalidad de evaluar el efecto acumulado de los SNPs analizados sobre el riesgo de EHNA, se construyó un *score* de riesgo genético incluyendo a los SNPs que presentaron una tendencia de asociación con el contenido de triglicéridos hepáticos, ubicados en los genes *PNPLA3*, *LYPLAL1*, *GCKR*, *PPP1R3B* y *SH2B1*. El rango de alelos de riesgo en la muestra fue de 2 a 8. Se observó un incremento significativo y gradual en el contenido de triglicéridos hepáticos en función del número de alelos de riesgo ($P=1.0 \times 10^{-4}$). De tal manera que, los individuos que portan 8 alelos de riesgo presentaron un mayor contenido de triglicéridos hepáticos, en comparación con los portadores de 2 alelos de riesgo (Figura 8). El análisis utilizando un *score* de riesgo genético ponderado arrojó resultados similares ($P=2.0 \times 10^{-4}$). Además, el *score* de riesgo genético también se asoció significativamente con mayor grado de esteatosis, mayor contenido de triglicéridos y colesterol hepático y mayores niveles sericos de AST y ALT ($P \leq 0.05$). De manera interesante, el *score* de riesgo genético explica 17.5% de la variabilidad del contenido de triglicéridos hepáticos, mientras que el SNP de *PNPLA3* explica 7.9% del contenido de triglicéridos hepáticos. Sin embargo, este *score* no se asoció con riesgo de EHNA, aunque la media fue mayor en sujetos con EHNA vs no-EHNA (4.7 ± 1.4 vs. 4.3 ± 1.2 ; $P=0.205$) (Tabla 13). Por otra parte, considerando que la magnitud del daño hepático puede estar influenciada por la adiposidad, se realizó un análisis adicional estratificado por terciles de IMC. Las asociaciones del SRG con el mayor contenido de triglicéridos hepáticos permaneció significativa en todos los terciles del IMC ($P < 0.05$) y aunque el SRG fue mayor en individuos con EHNA en todos los terciles de IMC, las asociaciones no alcanzaron significancia estadística. No obstante, al realizar un análisis estratificando el *score* de riesgo genético en terciles (T1=2–3 alelos de riesgo, $n=34$; T2=4–5 alelos de riesgo, $n=69$; y T3=6–7 alelos de riesgo, $n=27$) se observó que los sujetos ubicados en el 3er tercil presentan un riesgo significativamente mayor de desarrollar EHNA comparados con los sujetos en el 1er y 2do tercil (RM=2.55 IC 95%=1.09–6.01; $P=0.038$ ajustada por sexo, edad, IMC y ancestría) (Figura 9). Sin embargo, el modelo logístico

multivariado basado en el SRG no predijo el estatus de EHNA como lo demostró el área bajo la curva ROC (ABC 0.56; IC 95% 0.46–0.67; $P=0.219$). En contraste, el modelo construido con las variables clínicas (adiponectina, ALT, niveles de colesterol HDL y estatus de DT2) fueron predictores significativos de el estaus de EHNA ya que el área bajo la curva ROC fue de 0.739 (IC 95% 0.647–0.831; $P<0.001$). Finalmente, la integración del SRG al modelo construido con las variables clínicas no mejoró significativamente el estatus de discriminación de EHNA (AUC 0.744, IC 95% 0.653–0.835).

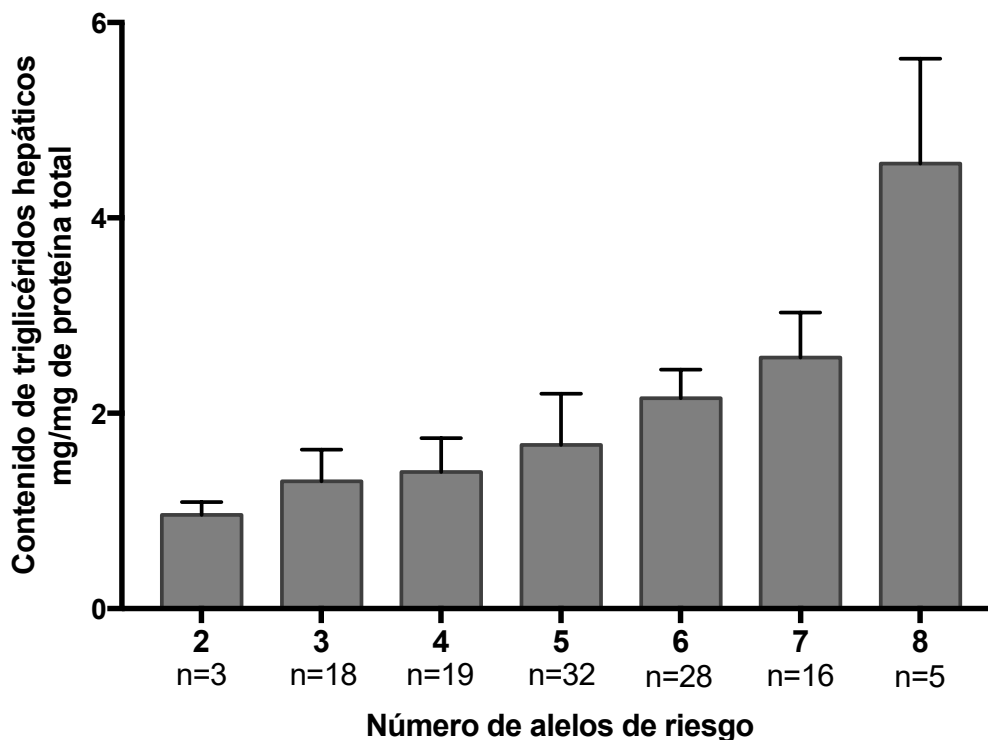


Figura 8. Efecto del número de alelos de riesgo sobre el contenido de triglicéridos hepáticos. Se observó un incremento significativo en las medias del contenido de triglicéridos hepáticos en función del número de alelos de riesgo ($P= 1.0 \times 10^{-4}$ ajustado por edad, sexo, IMC, diabetes tipo 2 y porcentaje ancestría).

Tabla 13. Asociación de SRG con rasgos asociados al HGNA.

Características Clínicas	B (ES) o RM (95%IC)	Valor P
Contenido de TG Hep ^a	0.489 (0.122)	1.0x10 ⁻⁴
Contenido de Col Hep	0.012 (0.006)	0.048
ALT (UI/L) ^a	8.221 (2.306)	0.002
AST (UI/L) ^a	8.953 (2.766)	0.014
Grado de esteatosis	0.145 (0.071)	0.029
EHNA	1.21 (0.89-1.64)	0.205

Los valores de P se obtuvieron utilizando de regresión lineal o logística múltiple y se ajustaron por edad, sexo, IMC, DT2 y ancestría. a las variables se transformaron a logaritmo para su análisis. Abreviaturas: ES, Error estándar; RM, Razón de momios; TG Hep, Triglicéridos hepáticos; Col Hep, Colesterol hepático; ALT, Alanino transaminasa; AST, Aspartato transaminasa; EHNA, Esteatohepatitis no alcohólica.

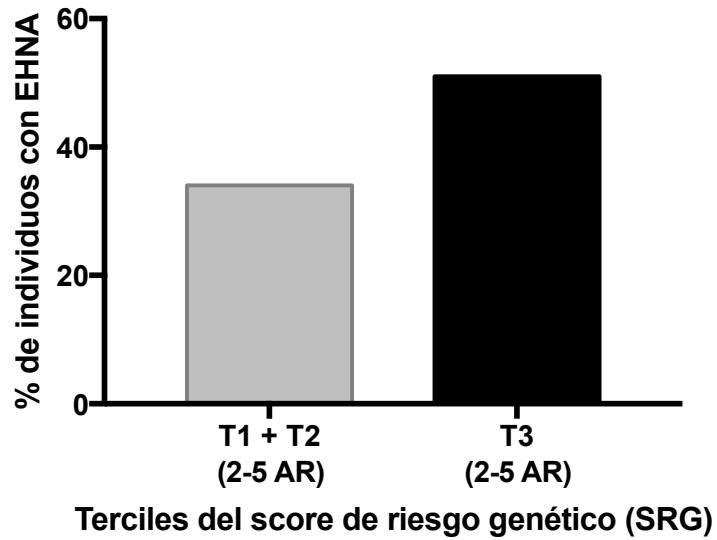


Figura 9. Asociación del SRG estratificado por terciles con riesgo de EHNA. El porcentaje de sujetos con EHNA fue significativamente mayor en el grupo de individuos del T3 de alelos de riesgo (AR) (6-7 AR), en comparación con el grupo de individuos del T1 o 2 de AR (≤ 5 AR) (RM= 2.55; IC=1.09-6.01; $P=0.038$, ajustado por edad, sexo, IMC, Diabetes Tipo 2 y ancestría).

9. DISCUSIÓN

Incidencia de obesidad en la población infantil y adulta mexicana.

La obesidad es un problema de salud pública y actualmente se considera una epidemia (Kelly *et al.*, 2008). De manera particular, en México la prevalencia de obesidad en adultos y niños se incrementó de manera significativa en las últimas tres décadas (Gutiérrez *et al.*, 2012). En este estudio se incluyeron 2 cohortes de población mexicana: infantil y adulta. La prevalencia combinada del sobrepeso y la obesidad en la cohorte de adultos fue de 65.1%, similar a lo estimado en la última encuesta nacional de salud y nutrición, la cual reporta una prevalencia del 72.5% (Hernández-Avila *et al.*, 2016). Respecto a la cohorte infantil, en este estudio la prevalencia combinada del sobrepeso y la obesidad fue de 47.6%, 14 puntos porcentuales por arriba de la prevalencia estimada en la ENSANUT 2016 para la población de 5-11 años residente de la Ciudad de México (33.2%) (Hernández-Avila *et al.*, 2016). Sin embargo, estos datos son consistentes con las prevalencias reportadas en otros estudios realizados en cohortes similares de población infantil mexicana obtenidas en distintos centros educativos y de salud de la Ciudad de México, las cuales van desde un 48 hasta un 50% (Perichart-Perea *et al.*, 2007; Del Río-Navarro *et al.*, 2008). Por otra parte, la población indígena analizada en este estudio presentó una prevalencia combinada del sobrepeso y la obesidad de 61.3%, similar a la observada en la población adulta (65.1%) y a la reportada en un estudio realizado en una muestra de 19,577 indígenas de México (59%) (Stoddard *et al.*, 2011). Estos datos son interesantes debido a que aún cuando se sugiere que la población indígena está expuesta a factores ambientales y de estilo de vida asociados a un menor riesgo de obesidad, la prevalencia de sobrepeso y obesidad es particularmente alta, sugiriendo una importante contribución genética al desarrollo de obesidad en la población mexicana. Por ello, en este estudio se evaluó la asociación de variantes genéticas con el riesgo para desarrollar obesidad en una muestra de población mexicana.

Contribución de SNPs comunes identificados a través de GWAs al riesgo de obesidad en la población mexicana.

Este es el primer estudio que valida un número importante de variantes genéticas asociadas con la obesidad por GWAs y examina el efecto conjunto de estas variantes sobre la obesidad en la población adulta e infantil mexicana. De los 18 SNPs analizados, 5 presentaron asociación significativa con mayor riesgo de obesidad (rs9939609/*FTO*, rs6548238/*TMEM18*, rs7566605/*INSIG2*, rs7138803/*FAIM2-BCDIN3* y rs6265/*BDNF*), esto sugiere que variantes comunes previamente asociadas a la obesidad en población de origen europeo, también confieren susceptibilidad a la obesidad en población mexicana. Es importante mencionar que los alelos de riesgo fueron los mismos en ambas poblaciones, excepto para la variante rs7566605 del gen *INSIG2* (Herbert *et al.*, 2006; Frayling *et al.*, 2007; Dina *et al.*, 2007; Loos *et al.*, 2008; Willer *et al.*, 2009; Thorleifsson *et al.*, 2009; Meyre *et al.*, 2009).

Asociación del gen FTO con la obesidad.

De manera particular, en este estudio el SNP rs9939609 del gen *FTO* presentó el valor de asociación con la obesidad más significativo. Cabe señalar que variantes cercanas al gen *FTO* muestran el mayor número de réplicas y las asociaciones más fuertes y significativas con el riesgo de obesidad en poblaciones de diferentes orígenes étnicos (Hotta *et al.*, 2009; Renstrom *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Rouskas *et al.*, 2012). De manera interesante, el análisis estratificado por el grado de obesidad presentó asociación significativa del SNP rs9939609/*FTO* únicamente con obesidad clase III. La asociación con obesidad clase III, ya había sido previamente reportada en distintas poblaciones, incluyendo la población mexicana (Villalobos-Comparan *et al.*, 2008; Dina *et al.*, 2007; Hotta *et al.*, 2008; Cotsapas *et al.*, 2009). Es interesante que a pesar de la fuerte asociación de la variante rs9939609/*FTO* con el riesgo de obesidad, no se observaron asociaciones significativas con el IMC en la población adulta, infantil o en el análisis combinado.

La falta de asociación puede atribuirse a: a) la asociación del SNP rs9939609/*FTO* observada particularmente con obesidad clase III y el número reducido de individuos con obesidad severa incluidos en las cohortes de niños y adultos b) la baja frecuencia del alelo de riesgo "A", observada en la cohorte de población mexicana (18.1-19.4%) comparada con la reportada para sujetos de origen europeo (41%) (Frayling *et al.*, 2007), lo cual disminuye el poder estadístico para detectar asociación con los parámetros cuantitativos relacionados con la adiposidad. Además, la falta de asociación del SNP rs9939609/*FTO* con el IMC en niños es consistente con un estudio longitudinal, en el cual se observa un comportamiento bifásico para esta variante, es decir, presenta un efecto débil en la etapa infantil y éste se acentúa en la edad adulta (Hardy *et al.*, 2010), lo cual sugiere que el efecto de la variante es dependiente de la edad y posiblemente del tiempo de exposición a un ambiente obesogénico (Andreasen *et al.*, 2008; Jacobsson *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2008; Sonestedt *et al.*, 2011). Por otra parte, en contraste a los estudios que sugieren que la variante rs9939609/*FTO* puede estar asociada con el riesgo de DT2, en este estudio no se observaron asociaciones con los parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa o lípidos. Esto coincide con estudios que han fallado en encontrar asociación con el riesgo de DT2 y que sugieren que el efecto de la variante sobre los rasgos metabólicos puede ser consecuencia del incremento en la adiposidad (Frayling *et al.*, 2007; Freathy *et al.*, 2008; Meyre *et al.*, 2012; Renstrom *et al.*, 2009; Robiou-du-Pont *et al.*, 2013; Thomsen *et al.*, 2012). El gen *FTO* codifica para una demetilasa de DNA, cuya función aún no se ha dilucidado completamente. No obstante, estudios en modelos murinos que sobreexpresan el gen, presentaron un incremento en el peso corporal y masa grasa (Church *et al.*, 2010), lo cual evidencia la importancia del gen *FTO* en la regulación del peso corporal, probablemente a través de la regulación del balance energético, dada su alta expresión en el sistema nervioso central (Fawcett y Barroso, 2010). Además, estudios funcionales más recientes, han demostrado que el gen *FTO* podría desempeñar una función en la adipogénesis. A este respecto, un estudio realizado en líneas celulares demostró que la presencia del SNP rs1421085/*FTO*, el cual se encuentra en alto desequilibrio de ligamiento con el SNP rs9939609 analizado en

este estudio ($r^2 > 0.85$), altera la unión del factor de transcripción ARID5B; lo cual resulta en la activación de genes que favorecen la diferenciación de adipocitos blancos vs. adipocitos pardos, por lo cual es posible que la presencia de la variante aumente el riesgo de obesidad a través del incremento en el almacenamiento de las reservas grasas y la disminución de la termogénesis (Claussnitzer *et al.*, 2015).

Asociación del gen TMEM18 con la obesidad.

El SNP rs6548238 cercano al gen *TMEM18* presentó el segundo valor más significativo de asociación con obesidad en este estudio. Esto coincide con los datos publicados en el metaanálisis más reciente de estudios de GWAs para el IMC, en donde *TMEM18* junto con *FTO* y *MC4R* presentaron las asociaciones más significativas con la obesidad (Locke *et al.*, 2015). De manera consistente, al realizar un análisis estratificado con los distintos grados de obesidad se encontró que el alelo de riesgo “C” del SNP rs6548238/*TMEM18* se asoció con todos los grados de obesidad. Además, este SNP se asoció con parámetros relacionados con la adiposidad en la población adulta, incluyendo un mayor IMC; cada copia del alelo de riesgo “C” incrementa 1.3 kg/m² del IMC. Estos hallazgos son consistentes con estudios que han presentado asociación de *TMEM18* con medidas de adiposidad (Almen *et al.*, 2010; Scherag *et al.*, 2010). A pesar de que este gen ha sido asociado con la obesidad infantil en poblaciones de origen europeo, en este estudio no se replicó tal asociación. (Almen *et al.*, 2010; Holzapfel *et al.*, 2010; Rask-Andersen *et al.*, 2011; Thorleifsson *et al.*, 2009; Willer *et al.*, 2009). En cuanto a la función del gen, *TMEM18* codifica para una proteína transmembranal con alta expresión en el hipotálamo, sugiriendo una función en la regulación de la ingesta y gasto energético (Almen *et al.*, 2010). No obstante, también se ha descrito una alta expresión en tejido adiposo, hígado y músculo esquelético en humanos. Específicamente, la variante rs6548238 se ubica en la región promotora, aproximadamente 30 kb río arriba del gen *TMEM18*. Análisis *in silico* predicen que el SNP rs6548238 afecta la unión al factor de transcripción FOXA1, el cual participa en la homeostasis de la glucosa (Ching-Ti *et al.*, 2014). Sin embargo, en este estudio al realizar un análisis con los

rasgos del metabolismo de la glucosa no se encontraron asociaciones significativas. Esto coincide con los datos descritos en estudios de población de origen europeo, donde las asociaciones con DT2 no persisten después de ajustar por el IMC (Renstrom *et al.*, 2009; Sandholt *et al.*, 2011).

Asociación del gen *INSIG2* con la obesidad.

Por otra parte, uno de los resultados más interesantes del estudio, es la asociación del SNP rs7566605 del gen *INSIG2* con la obesidad, ya que en trabajos previos se han presentado resultados inconsistentes (Dina *et al.*, 2007; Lyon *et al.*, 2007; Hotta *et al.*, 2008; Bressler *et al.*, 2009). En este estudio, se encontró asociación con un mayor IMC en la población infantil y adulta del alelo “G” y no el “C”, como se describió en el primer estudio de Herbert *et al* (2006). La asociación de un alelo distinto del mismo SNP con la obesidad, podría ser explicada por el desequilibrio de ligamiento (DL) con otras variantes ubicadas en este *locus*. El SNP rs7566605 está localizado 10 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *INSIG2* y su relevancia funcional es desconocida. El gen *INSIG2* codifica para una proteína implicada en la regulación de la adipogénesis y almacenamiento de lípidos, lo cual lo convierte en un gen candidato funcional no sólo para la obesidad, sino para la modulación de otros parámetros relacionados con el metabolismo de lípidos (Kaulfer *et al.*, 2015). No obstante, no se observaron asociaciones significativas con los niveles séricos de CT, TG o C-HDL, lo cual coincide con estudios que han fallado en encontrar asociación de la variante rs7566605/*INSIG2* con parámetros bioquímicos relacionados con la adiposidad (Talbert *et al.*, 2009; Liem *et al.*, 2010).

Asociación de la variante rs7138803 cercana a los genes *FAIM2/BCDIN3* con la obesidad.

La asociación de la variante rs7138803/*FAIM2/BCDIN3* con el riesgo de obesidad se ha replicado en poblaciones de diversos orígenes étnicos (Mei *et al.*,

2012; Xi *et al.*, 2011; Hotta *et al.*, 2009). En este estudio, el SNP rs7138803/*FAIM2/BCDIN3* presentó el riesgo de obesidad más alto; así como el mayor efecto sobre la variación del IMC, tanto en niños como en adultos. La presencia de dos copias del alelo de riesgo, representa un incremento 2.6 kg/m² en adultos y de 1.48 kg/m² en niños, sugiriendo un claro efecto obesogénico desde etapas tempranas de la vida, lo cual es consistente con estudios previos que reportan asociación de la variante con la modulación del IMC en la infancia (Mei *et al.*, 2012; Dorajoo *et al.*, 2012). La variante rs7138803 es intergénica, se localiza entre el gen *BCDIN3* y *FAIM2*, los cuales son altamente expresados en el hipotálamo; un área involucrada en la regulación del apetito y el gasto energético (Willer *et al.*, 2009; Thorleifsson *et al.*, 2009). Sin embargo, se requieren estudios que permitan dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales estos genes podrían estar participando en el desarrollo de la obesidad.

Asociación con el riesgo de obesidad clase III.

Además de los genes *FTO* y *TMEM18*, se identificaron variantes cercanas a los genes *MC4R* y *BDNF* asociadas particularmente con obesidad clase III. La asociación del SNP rs17782313/*MC4R* con obesidad severa en la población mexicana es consistente con diversos estudios realizados en poblaciones de origen europeo (Loos *et al.*, 2008; Willer *et al.*, 2009; Thorleifsson *et al.*, 2009; Meyre *et al.*, 2009). Además, mutaciones en el gen *MC4R* son la causa principal de obesidad monogénica (Farooqi *et al.*, 2008;). Este gen participa en la regulación del balance energético, específicamente en la vía leptina-melanocortina en el hipotálamo (Hinney *et al.*, 2013; Shen, *et al.*, 2017). Por ello, es posible especular que la asociación observada con la obesidad clase III en este estudio, podría explicarse por la presencia de variantes funcionales en alto DL con el SNP rs17782313, afectando la regulación del balance energético.

De igual manera, la variante rs6265/*BDNF* se asoció particularmente con obesidad clase III en este estudio. Los análisis *in silico* indican que la variante rs6265

condiciona un cambio de una metionina por una valina en la posición 66 de la proteína. Además, estudios *in vitro* demostraron que este cambio resulta en la disminución de la secreción de la proteína (Chen *et al.*, 2004). Por lo tanto, el SNP rs6265/*BDNF* podría incrementar el riesgo de obesidad a través de secreción disminuida de la proteína *BDNF*. Dado que el gen *BDNF* tiene una función clave en la homeostasis energética, como regulador secundario en la vía leptina-melanocortina, mutaciones en este gen tanto en roedores como en humanos, resultan en hiperfagia y obesidad severa (Xu *et al.*, 2003; Lyons *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2016; Gray *et al.*, 2006).

Ausencia de asociación de variantes de genes candidatos posicionales con la obesidad.

De los 18 SNPs analizados en este estudio, 11 no se asociaron con obesidad, aunque la dirección del efecto de los alelos de riesgo fue la misma que los trabajos originales (Willer *et al.*, 2009; Thorleifsson *et al.*, 2009; Meyre *et al.*, 2009). La falta de asociación podría deberse a que no se tiene el poder estadístico suficiente para detectar asociación con obesidad (poder estadístico de 6.3% a 72.7%). Además, los alelos de riesgo presentaron frecuencias menores en los mexicanos que en la población caucásica, lo que concuerda con las frecuencias más bajas observadas en una muestra de población indígena de México. Por tanto, estudios adicionales en poblaciones con un mayor número de participantes, son necesarios para confirmar estos resultados.

Asociación del gen *GNPDA2* con parámetros antropométricos relacionados a la obesidad en niños.

Los estudios de asociación genética con la obesidad infantil, aun son escasos (Warrington *et al.*, 2015; Chesi y Grant, 2015; Felix *et al.*, 2016). En este estudio, solo dos variantes genéticas presentaron asociación con el percentil del IMC en niños. De ellas, como ya se mencionó el SNP rs7138803 cercano a los genes

FAIM2/BCDIN3 presentó asociación con un mayor IMC tanto en niños como en adultos. En contraste la variante rs10938397 del gen *GNPDA2* presentó asociación con el IMC únicamente en niños. Este hallazgo es consistente con un metaanálisis que incluye más de 35,000 niños de origen europeo, que identificó 15 *loci* asociados con riesgo de obesidad infantil, entre ellos la variante rs10938397/*GNPDA2* (Felix *et al.*, 2016). Además, esta asociación con la obesidad también ha sido descrita previamente en niños mexicanos (Mejía-Benítez *et al.*, 2013), sugiriendo su relevancia para el desarrollo de la obesidad, particularmente en la infancia. El gen *GNPDA2* participa en la vía de señalización de la hexosamina y estudios funcionales en modelos murinos demostraron que los niveles de ARNm de *GNPDA2* se encuentran disminuidos en el hipotálamo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (Gutiérrez-Aguilar *et al.*, 2012). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual se asocia con la obesidad aún no ha sido esclarecido.

La heterogeneidad de las asociaciones entre la población infantil y adulta, podría deberse a: a) diferencias en los valores de heredabilidad descritos para el IMC/obesidad entre niños y adultos (Guo *et al.*, 2015), b) diferencias en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad entre la población infantil (47.6%) y adulta (65.7%), c) diferencias en las frecuencias de complicaciones metabólicas relacionadas con la adiposidad (por ejemplo, en los adultos la frecuencia de resistencia a la insulina fue de 31.3%, en tanto, en niños fue de 10%), d) el menor tiempo de exposición a un ambiente obesogénico en los niños en comparación con los adultos y e) un ambiente obesogénico potencializado en la actualidad, en comparación a décadas pasadas (Xiang-Rui *et al.*, 2014). En consistencia, existe cada vez más literatura que reporta diferencias en las asociaciones genéticas dependientes de la edad. Por ejemplo, Scherang *y cols.* reportaron asociación con obesidad del *locus* del gen *TNKS/MSRA* en niños y adolescentes, pero no en adultos (Scherang *et al.*, 2010).

Asociación de variantes de riesgo para la obesidad en una muestra de población indígena mexicana.

De las 10 variantes analizadas, únicamente el alelo de riesgo “A” del SNP rs9939609/*FTO* se asoció con el IMC en la muestra de población indígena; a pesar de su baja frecuencia (5.5%) en comparación con la población mexicana (19.4%) y europeos (41%). Este resultado es consistente con la asociación observada en un estudio realizado en población indígena pima (Rong *et al.*, 2009), lo cual denota la importancia de una variante identificada originalmente en población europea, para la obesidad en poblaciones nativas americanas. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que permitan identificar la contribución genética asociada a la obesidad en poblaciones indígenas de México, las cuales presentan una prevalencia alta de esta patología.

Efecto acumulado de variantes genética sobre la adiposidad.

El análisis integrando el efecto de cada una de las variantes genéticas que presentaron asociación con riesgo de obesidad de manera individual, se realizó mediante la construcción de un *score* de riesgo genético (SRG) (Fava *et al.*, 2013); lo que podría ser útil para identificar individuos con mayor susceptibilidad genética para desarrollar obesidad. En este estudio se demostró un efecto aditivo de las 10 variantes genéticas sobre medidas de adiposidad, como el IMC. No obstante, en conjunto los 10 SNPs analizados en este estudio no explican más del 5% de la variabilidad del percentil del IMC o del IMC, en la cohorte de población infantil y adulta. Estos cálculos son consistentes con lo descrito en estudios previos (Willer *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Xiang-Rui *et al.*, 2014; Martinez-Garcia *et al.*, 2013), y sugieren que la información genética disponible proveniente de los SNPs es insuficiente para la construcción de perfiles genéticos de riesgo para la obesidad. Por ello, aún se requiere identificar variantes comunes/frecuentes y variantes poco frecuentes/raras. Estas últimas con efectos mayores que ayuden a explicar la heredabilidad estimada para el IMC, la cual oscila entre un 40–70% (van der Klaauw

y Farooqi, 2015). Esta heredabilidad faltante que no es explicada por el análisis conjunto de SNPs, puede deberse al número limitado de variantes analizadas, a una contribución menor de cada una de ellas, así como a interacciones gen-gen o gen-ambiente (Stranger *et al.*, 2011), las cuales no fueron evaluadas en este estudio.

Asociación de variantes en número de copias (CNVs) con la obesidad.

Dado que en conjunto los SNPs analizados en este estudio no explican más del 5% de la variabilidad del IMC, y que el metaanálisis más reciente de estudios de GWAs para obesidad calculó que sólo un 20% de la variabilidad de este rasgo puede ser explicado por SNPs (Locke *et al.*, 2015), se ha sugerido que las CNVs pueden contribuir de manera importante a la heredabilidad de enfermedades complejas y rasgos comunes como la obesidad (Almal y Padh, 2012). Este trabajo representa el primer estudio que evalúa la participación de 5 variantes en número de copias [1p21.1 (*AMY1A*), 1p31.1 (*NEGR1*), 10q11.22 (*NPYR4*), 11q11(*OR4S2*) y 16p12.3(*GPRC5b*)] con riesgo de obesidad en población mexicana. El rango de número de copias para las 5 regiones analizadas es similar a lo descrito en estudios previos realizados en otras poblaciones (Willer *et al.*, 2009; Bao-Yong *et al.*, 2009; Jarick *et al.*, 2011; Speliotes *et al.*, 2010; Falchi *et al.*, 2014). Las CNVs también presentaron diferencias en los efectos sobre el riesgo de obesidad dependiente del grupo de estudio (niños y adultos), estas diferencias en los efectos pueden ser explicadas por los mismos factores previamente descritos para los SNPs.

Asociación de la CNV 1p21.1 (*AMY1A*) con la obesidad.

En este estudio sólo la CNV en el *locus* de *AMY1A* presentó asociación con obesidad en niños y adultos, lo cual resalta la importancia de esta CNV sobre la adiposidad desde etapas tempranas de la vida. Estos datos son consistentes con el estudio realizado por Falchi *et al.* (2014), así como con estudios previos realizados en niños italianos y mujeres finlandesas, en los cuales se reporta que un menor número de copias del gen *AMY1A* se asocia con un mayor riesgo de obesidad

(Viljakainen *et al.*, 2015; Marcovecchio *et al.*, 2016). Sin embargo, el efecto observado en este estudio es notablemente menor tanto en niños como en adultos (RM=1.53-1.54), comparado con el descrito en el estudio original por Falchi *et al.* (RM=7.67), quienes proponen que la CNV de *AMY1A* es la variante genética con el mayor efecto sobre la obesidad, aún en comparación con el efecto descrito para SNPs del gen *FTO* (Falchi *et al.*, 2014). No obstante, aunque la asociación de la CNV de *AMY1A* con el riesgo de obesidad en niños mexicanos, ya se había informado por Mejía-Benítez *et al.* (2015), quienes describen un efecto benéfico del mayor número de copias de *AMY1A* sobre el riesgo de obesidad (Mejía-Benítez *et al.*, 2015), más que una asociación de un número reducido de copias de *AMYA1* con un mayor riesgo de obesidad como se observa en este estudio, lo cual podría constituir una hipótesis distinta (Usher *et al.*, 2015).

El *locus* de *AMY1A* presentó una alta variación en número de copias y se ha sugerido que evolucionó en respuesta a presión selectiva, como consecuencia de la transición a una dieta rica en almidones, ya que poblaciones con alto consumo de hidratos de carbono presentan un mayor número de copias de *AMY1A* y mayor actividad de la enzima en comparación con aquellas con una dieta baja en hidratos de carbono, sugiriendo una ventaja metabólica selectiva para aquellos individuos con una dieta alta en almidones mejorando su digestión (Perry *et al.*, 2007). En este estudio se observó que el rango de número de copias de *AMY1A* en población mexicana e indígena mexicana es amplio (1-19), similar a lo descrito para poblaciones con una ingesta alta de hidratos de carbono, donde los almidones representan hasta el 50% del total de hidratos de carbono ingeridos en la dieta (Mandel *et al.*, 2010), lo cual sugiere que el mayor número de copias de *AMY1A*, y en consecuencia una mayor cantidad de amilasa salival (Mandel *et al.*, 2010), confieren una ventaja metabólica para los individuos que consumen una dieta con un contenido alto de hidratos de carbono, particularmente almidones, mediante una digestión más eficiente.

Asociación de la CNV del gen AMY1A con la microbiota intestinal.

El mecanismo por medio del cual el número de copias de *AMY1A* se asocia con riesgo de obesidad no ha sido descrito. Sin embargo, en un estudio reciente realizado en modelos murinos alimentados con dieta alta en grasa y sacarosa, se encontró que el *locus* de *AMY1A* se asocia con un mayor peso y una mayor proporción de *Enterobacterias* intestinales (Parks *et al.*, 2013). Estas bacterias se han asociado con la obesidad en humanos (Karlsson *et al.*, 2012), sugiriendo que la participación de *AMY1A* en la obesidad, podría estar mediada a través de la modulación de la microbiota intestinal (Falchi *et al.*, 2014). Sin embargo, en este estudio no se observaron correlaciones significativas entre el número de copias de *AMYA1* y la abundancia relativa de *Enterobacterias* intestinales. En contraste, se observó que los niños con un mayor número de copias de *AMY1A* tienen una mayor abundancia de la especie *Prevotella stercorea*. Los hallazgos de estudio permiten especular que el número elevado de copias de *AMY1A* incrementa la digestión de los hidratos de carbono (específicamente los almidones) y en consecuencia, la disponibilidad de sustratos requeridos para el enriquecimiento de *Prevotella* en el intestino (De Filippo *et al.*, 2010; Nakayama *et al.*, 2015). Esto coincide con estudios de enterotipos que reportan la selección de especies del género *Prevotella* por una dieta basada en carbohidratos (Wu *et al.*, 2011), dado que se ha documentado que las especies del género *Prevotella* contienen genes que codifican para enzimas degradadoras de carbohidratos (Acceto *et al.*, 2015). Además, estudios recientes han demostrado que el incremento de la abundancia de especies de *Prevotella*, protege contra el desarrollo de obesidad (Haro *et al.*, 2016). Con base en estos hallazgos, se podría especular que aquellos individuos con un mayor número de copias del gen *AMY1A* y con una mayor ingesta de hidratos de carbono (particularmente almidones), tendrían una mayor cantidad de sustratos necesarios para el enriquecimiento de algunos géneros bacterianos, como *Prevotella* (Figura 10). De ser así, éste podría ser un mecanismo protector contra la ganancia de peso corporal. Éste es el primer estudio que demuestra una probable relación entre la CNV de *AMY1A*, la modulación de la microbiota intestinal y la obesidad en humanos.

Sin embargo, estudios adicionales en modelos animales y en humanos son necesarios para confirmar estos hallazgos.

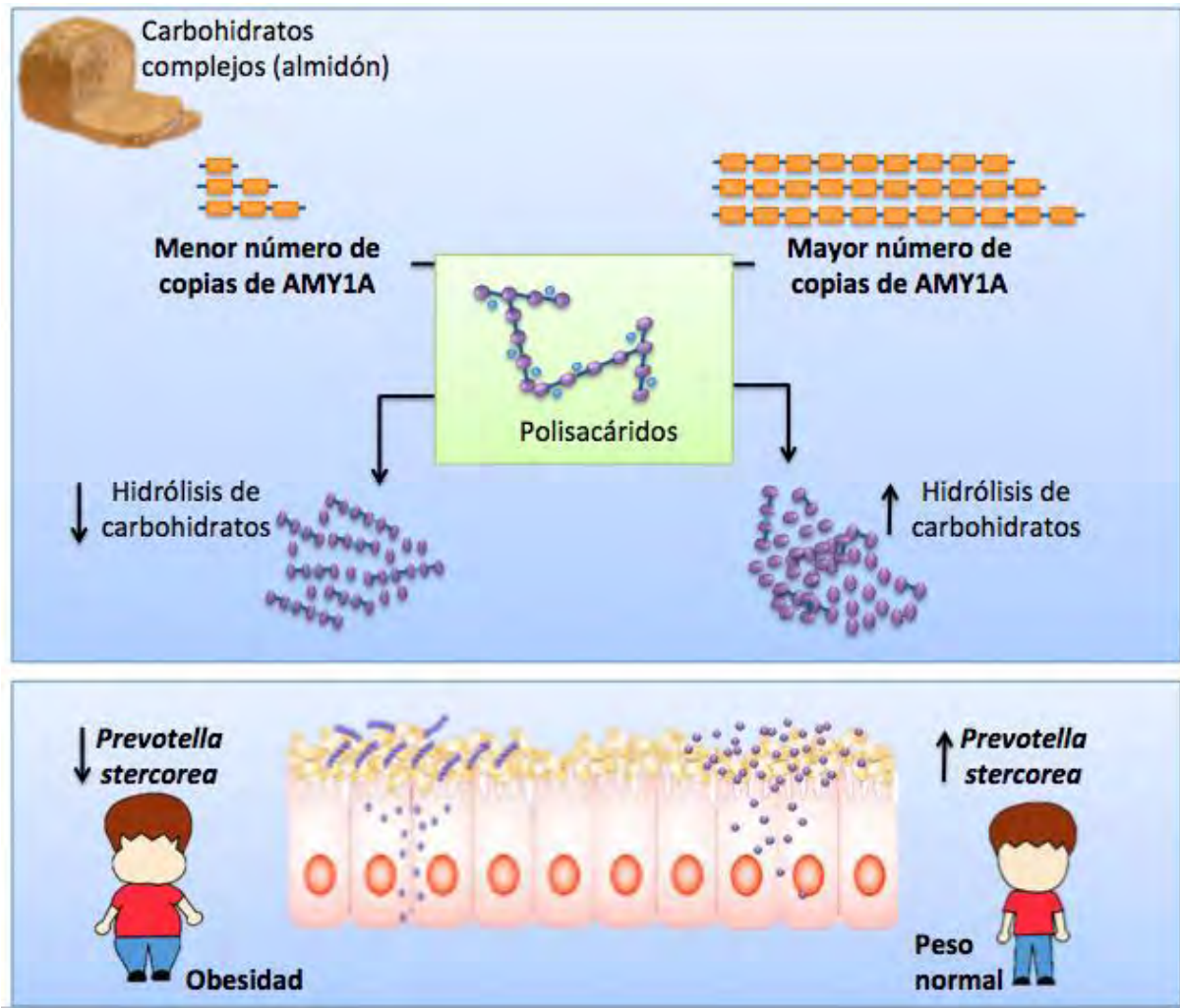


Figura 10. Posible mecanismo para la relación del número de copias de *AMY1A*-microbiota intestinal-obesidad. Los hallazgos encontrados en este estudio sugieren que un mayor número de copias de *AMY1A* (el cual se ha asociado con una mayor hidrólisis de carbohidratos), podría condicionar una mayor cantidad de sustratos para el enriquecimiento de géneros bacterianos como *Prevotella*, la cual a su vez se asocia con un menor peso corporal.

Asociación de la CNV de los genes OR4P4/OR4S2/OR4C6 con la obesidad.

En la población infantil, la CNV 11q11, que incluye a 3 genes de la familia 4 de receptores olfatorios (*OR4P4/OR4S2/OR4C6*) se asoció con el riesgo de obesidad. Esta asociación es consistente con un estudio previo realizado en niños chinos (Zhang *et al.*, 2015). Así como con diversos estudios que han presentado la asociación de polimorfismos en los genes de la familia de receptores olfatorios con la obesidad (Choquette *et al.*, 2012). Además, existen evidencias que sugieren que la respuesta hedónica a las propiedades sensoriales de los alimentos como el olfato y el gusto pueden influir en el comportamiento alimentario a través de la generación de señales de apetito y saciedad, lo cual conduce a sobrealimentación (van der Klaauw y Farooqi, 2015). A este respecto, aún cuando no se ha descrito a cuál o a cuáles moléculas odorantes responde la familia 4 de receptores olfatorios, ni existe evidencia funcional de su relación con la obesidad, estudios previos realizados tanto en niños como en adultos han demostrado una mayor disfunción y menor sensibilidad del sistema olfatorio en individuos con obesidad (Obrebowski *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2004). Además, estudios funcionales en modelos murinos han demostrado el desarrollo de obesidad en respuesta a la extirpación del bulbo olfatorio (Primeaux *et al.*, 2007). Esto sugiere que la variación en el número de copias en los genes de receptores olfatorios podría resultar en una respuesta olfatoria alterada que condicione una menor respuesta de saciedad, mayor ingesta de alimentos e incremento en el peso corporal.

Asociación de la CNV 10q22.2 con la obesidad.

La eliminación en una o dos copias de la CNV 10q22.2 se asoció con mayor riesgo de obesidad en adultos. La región 10q22.2 incluye 4 genes, *SYTXV* (sinaptotagmina), *GRPIN2* (proteína G regulada por el inhibidor de crecimiento neuronal 2), *LOC728643* (pseudogen de la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1) y *PPYR1* (receptor del polipéptido pancreático 1); de los cuales, el gen *PPYR1* participa en la regulación de la homeostasis energética. Por tanto, este gen ha sido

sugerido como responsable de la asociación con riesgo de obesidad, ya que mutaciones en el gen *PPYR1* se han asociado con obesidad severa en humanos (Katsuura *et al.*, 2002). Además, estudios en modelos murinos carentes de este gen describen la presencia de hiperfagia (Sainsbury *et al.*, 2003). Por tanto, es probable que la eliminación homocigota o heterocigota de la CNV 10q22.2 que incluye al gen *PPYR1* asociada a la obesidad en este estudio, disminuya la respuesta de saciedad, resultando en un incremento de la ingesta de alimentos y la ganancia de peso corporal.

Ausencia de asociación de las CNVs 1p31.1(NEGR1) y 16p12.3(GPRC5b) con la obesidad.

La falta de asociación con el riesgo de obesidad de las CNVs, 1p31.1(*NEGR1*) y 16p12.3(*GPRC5b*) en este estudio puede deberse a la baja frecuencia de eliminaciones (<5%) y el bajo poder estadístico del estudio(~12%). Dado que en poblaciones de origen europeo y chino, esas CNVs han presentado frecuencias de la eliminación entre 20 y 34% (Speliotes *et al.*, 2010; Bao-Yong *et al.*, 2009), mayores a las encontradas en este trabajo.

En conjunto estos hallazgos sugieren que aún cuando algunas CNVs se asocian con el riesgo de obesidad, el efecto es similar y no mayor al encontrado para los SNPs analizados en este estudio. Por tanto, el efecto de ambos tipos de variantes (SNPs y CNVs) no logra explicar la heredabilidad calculada para la obesidad.

Complicaciones relacionadas con la obesidad: Asociación genética con el hígado graso no alcohólico (HGNA).

Prevalencia de HGNA en sujetos con obesidad mórbida.

El HGNA es la enfermedad hepática crónica más común en el mundo, lo cual se debe principalmente al incremento en la prevalencia de obesidad (Browning *et al.*,

2004). La prevalencia de esteatohepatitis en este estudio fue más alta (40.9%), en comparación a la reportada en estudios similares de individuos con obesidad severa de origen europeo (18% y 20%), pero similar a la observada en individuos de origen hispano (55%) (Argentou *et al.*, 2009; Gorden *et al.*, 2013; Guajardo-Salinas *et al.*, 2010). Estas diferencias en la prevalencia de HGNA pueden ser explicadas, al menos en parte, por factores genéticos, ya que estudios recientes sugieren que la heredabilidad del HGNA es mayor en sujetos hispanos (20-34%) (Palmer *et al.*, 2013).

Asociación de genes de la obesidad con el HGNA.

Debido a que la obesidad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de HGNA (Lewis y Shuldiner, 2010), se ha sugerido que variantes genéticas asociadas con la obesidad, pueden participar en el desarrollo del HGNA (Guan *et al.*, 2014; Rankinen *et al.*, 2015). Sin embargo, en este estudio, de los 10 SNPs y las 3 CNVs candidatas previamente asociadas con la obesidad, sólo el SNP rs7498665 del gen *SH2B1* presentó asociación con la esteatosis hepática. Aun cuando el gen *SH2B1* se han asociado con resistencia a la insulina y DT2 (Robiou-du-Pont *et al.*, 2013; Lange *et al.*, 2016), ésta es la primera vez que se describe una asociación del SNP rs7498665/*SH2B1* con el HGNA. Este SNP condiciona el cambio del aminoácido Thr por Ala en la posición 484 de la proteína (Trh484Ala) que se predice por el programa PolyPhen como benigno. Estudios en modelos murinos demuestran que el silenciamiento del gen *SH2B1* resulta en el desarrollo de resistencia a la insulina, resistencia a la leptina, obesidad y esteatosis hepática (Duan *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2005). Además, la eliminación del gen *SH2B1* específicamente en el hígado, condiciona al incremento de la acumulación de TG hepáticos, a través del aumento en la síntesis de TG, disminución de la lipólisis y secreción de VLDLs (Sheng *et al.*, 2013). Estas evidencias demuestran la importancia del gen *SH2B1* en el mantenimiento de la homeostasis lipídica en el hígado.

Participación de genes previamente asociados con el HGNA.

Dado que con excepción del gen *SH2B1*, las variantes de riesgo para la obesidad no se asociaron con el HGNA, se evaluaron 5 variantes en genes previamente asociados con el HGNA en población europea (*PNPLA3*, Patatina como el dominio de la fosfolipasa que contiene la proteína 3; *LYPLAL1*, Lipofosfolipasa 1; *PPP1R3B*, Proteína fosfatasa subunidad reguladora 3; *NCAN*, Neurocan y *GCKR*, Regulador de glucocinasa) (Romeo *et al.*, 2008; Speliotes *et al.*, 2011).

Asociación de *PNPLA3* con esteatosis hepática.

La variante rs738409 del *PNPLA3* se asoció con un mayor grado de esteatosis evaluada tanto por histología como por cuantificación directa de triglicéridos en el tejido hepático. Esto coincide con estudios previos que han demostrado la asociación del alelo “G” de *PNPLA3* con el HGNA en sujetos con obesidad severa (Guichelaar *et al.*, 2013; Romeo *et al.*, 2010), así como con la esteatosis hepática en distintas poblaciones, particularmente de población México-americana. De manera interesante, la frecuencia del alelo “G” se encontró más alta en mexicanos (49%) que en individuos de origen europeo (23%) y africano (17%) (Hernaiz *et al.*, 2013; Romeo *et al.*, 2008; Wagenknecht *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2013), consistente con la mayor prevalencia de HGNA observada en este estudio. *PNPLA3* codifica para una enzima con actividad de hidrolasa y transacetilasa de triglicéridos, por lo cual puede promover tanto su anabolismo como su catabolismo (Jenkins *et al.*, 2004). El SNP rs738409 implica la sustitución de una isoleucina por una metionina en la posición 148 de la proteína. Estudios funcionales realizados en líneas celulares han demostrado que este SNP restringe el acceso del sustrato al sitio catalítico de la enzima reduciendo su actividad, lo cual resulta en la disminución de la hidrólisis y a su vez el incremento en la síntesis de triglicéridos hepáticos, favoreciendo su acumulación en los hepatocitos (Dongionvanni y Valenti, 2016). Estos hallazgos sustentan la fuerte asociación de la variante con la esteatosis y el contenido de triglicéridos hepáticos observada en este estudio.

Asociación de *LYPLAL1* y *PPP1R3B* con el contenido de triglicéridos hepáticos.

Las variantes rs12137855/*LYPLAL1* y rs4240624/*PPP1R3B* se asociaron con un mayor contenido de triglicéridos hepáticos, en concordancia con los hallazgos descritos por el consorcio GOLD (Speliotes *et al.*, 2011). El gen *LYPLAL1* codifica para una enzima perteneciente a la familia de lisofosfolipasas involucrada en la hidrólisis de triglicéridos (Speliotes *et al.*, 2011). Además, se ha sugerido que polimorfismos funcionales en este gen pueden disminuir su actividad enzimática (Burke y Dennis, 2009). Por tanto, es probable que la asociación con mayores niveles de triglicéridos hepáticos observada en este estudio sea consecuencia de un mecanismo molecular similar al descrito para la variante rs738409/*PNPLA3* (He *et al.*, 2010; Speliotes *et al.*, 2011).

Por otra parte, el gen *PPP1R3B* codifica para una proteína que regula el metabolismo del glucógeno, promoviendo su síntesis e inhibiendo su hidrólisis. Además, un estudio de expresión de *loci* de rasgos cuantitativos (eQTL, por sus siglas en inglés) demostró que la variante rs4240624 afecta la expresión del gen *PPP1R3B*. Por tanto, se ha propuesto que la asociación del alelo "A" de *PPP1R3B* con una incrementada esteatosis hepática refleja la disminución de las reservas de glucógeno en el hígado (Dwyer *et al.*, 1983; Hernaez *et al.*, 2013), lo cual podría favorecer la lipogénesis *de novo* y resultar en una mayor acumulación de triglicéridos hepáticos (Sanders y Griffin, 2016), consistente con la asociación observada en este estudio.

Asociación del gen *GCKR* con el HGNA.

El alelo "C" del SNP rs1260326/*GCKR* se asoció con una mayor acumulación de triglicéridos hepáticos, pero a su vez con menores niveles de insulina y HOMA-Ir, lo cual coincide con estudios previos que reportan la asociación de polimorfismos de

GCKR con esteatosis hepática y un menor índice glucémico (Speliotes *et al.*, 2011; Fesinmeyer *et al.*, 2013). El gen *GCKR* codifica para una proteína que regula negativamente la actividad de la glucocinasa hepática, enzima involucrada en la homeostasis de la glucosa. Análisis *in silico* del SNP rs1260326, el cual condiciona un cambio de la secuencia de aminoácidos en la proteína (Pro446Leu), sugieren que este no resulta en un efecto dañino. Sin embargo, estudios funcionales realizados en líneas celulares demostraron que el cambio Pro446Leu afecta la disponibilidad de *GCKR* e incrementa la actividad de la glucocinasa en el hígado, resultando en la disminución en los niveles de glucosa e insulina circulantes, pero por otra parte en el incremento de la glucólisis y lipogénesis *de novo* (Beer *et al.*, 2009), favoreciendo la acumulación de lípidos en el hígado. Estos datos sugieren que la presencia de la variante promueve el desarrollo de esteatosis hepática y a su vez, se asocia con una menor resistencia a la insulina.

Asociación de un Score de Riesgo Genético (SGR) con el riesgo de EHNA.

El SGR se construyó con los alelos de riesgo de los 5 SNPs (*PNPLA3*, *PPP1R3B*, *LYPLAL1*, *GCKR* y *SH2B1*) asociados de manera individual con el contenido de triglicéridos hepáticos. Este SRG explicó notablemente mejor la acumulación de triglicéridos hepáticos (20%), en comparación con la variante rs738409/*PNPLA3* (7.9%), la cual demostró de manera individual el efecto genético más alto sobre la acumulación del TG en el hígado. Estos resultados coinciden con estudios previos en los cuales se ha demostrado un efecto aditivo de las variantes de riesgo para HGNA sobre la esteatosis hepática (Hernaiz *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2013). Además, el SRG también se asoció con mayor daño hepático (esteatosis, balonamiento, inflamación) y con mayor riesgo de EHNA, lo cual no se observó en las asociaciones individuales, sugiriendo que en conjunto los polimorfismos ejercen un efecto mayor sobre el daño hepático a través de mecanismos metabólicos comunes como el incremento en la lipogénesis, disminución de la lipólisis y acumulación de lípidos en el hígado (Figura 11) (Dongiovanni *et al.*, 2015; Dongiovanni *et al.*, 2016). Esto coincide con estudios que sugieren que la

construcción de SRGs basados en el efecto biológico de las variantes, es más relevante que aquellos basados únicamente en asociaciones significativas (Vassy *et al.*, 2014). No obstante, a pesar de la fuerte asociación del SRG con un mayor riesgo de EHNA, éste no es capaz de discriminar a los sujetos con EHNA, por lo que no se puede considerar mejor predictor que las variables clínicas asociadas con EHNA. Sin embargo, es probable que la suma de un mayor número de variantes genéticas al SRG mejore su valor predictivo.

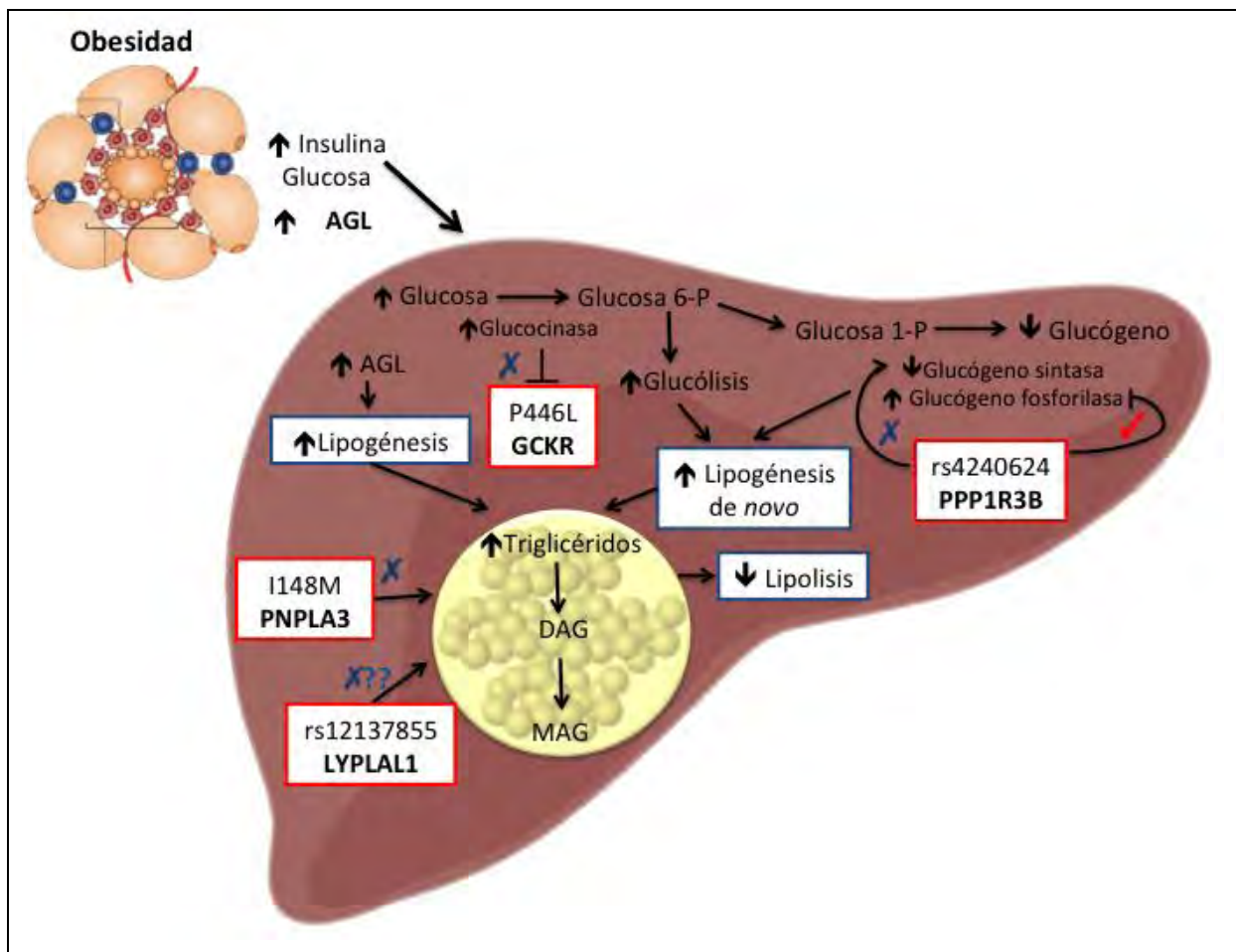


Figura 11. Mecanismo hipotético de acumulación de grasa hepática asociado con los polimorfismos de los genes *SH2B1*, *GCKR*, *PPP1R3B*, *PNPLA3* y *LYPLAL1*. El HGNA se caracteriza por la acumulación de grasa hepática en vacuolas lipídicas, resultado de la alteración en la homeostasis de triglicéridos. Se ha demostrado experimentalmente que la variante Iso148Met del gen *PNPLA3* es funcional y disminuye la actividad lipolítica de la

enzima sobre la hidrólisis de triglicéridos. Un mecanismo similar se ha propuesto para la variante del gen *LYPLAL1*, sugiriendo que en conjunto estas dos variantes condicionan una disminución en la lipólisis hepática. Por otra parte, estudios funcionales han demostrado que la variante Pro446Leu del gen *GCKR* incrementa la actividad de la glucocinasa hepática condicionando el aumento en la glucólisis. Además, la variante rs4240624 del gen *PPP1R3B*, se asocia con menores niveles de expresión del gen, por lo cual se ha propuesto una disminución de la síntesis de glucógeno hepático, sugiriendo que en conjunto el efecto de estas dos variantes resulta en el aumento de la lipogénesis de novo. En conjunto, los polimorfismos ejercen un efecto mayor sobre el daño hepático a través de mecanismos metabólicos comunes como el incremento en la lipogénesis, disminución de la lipólisis y acumulación de lípidos en el hígado. Modificado de Dongiovanni *et al.* (2016).

10. CONCLUSIONES

- Se confirmó que 7 de los 18 SNPs asociados con la obesidad en poblaciones de origen europeo, también se asocian con riesgo de obesidad en población mexicana. Además, al menos 5 *loci* participan en la modulación del IMC desde la infancia. Sin embargo, en conjunto estos *loci* sólo explican menos del 5% de la varianza del IMC en una muestra de población mexicana.
- La CNV 1p21.1 del gen *AMY1A* contribuye al riesgo de desarrollar obesidad desde la infancia. Además, un número ≥ 10 de copias de *AMY1A* se asoció con una mayor abundancia de la especie bacteriana *Prevotella stercorea*, lo cual podría representar un posible mecanismo, a través del cual esta CNV se asocia con el riesgo de obesidad.
- El análisis en la población de sujetos con obesidad mórbida, demostró que con excepción del locus del gen *SH2B1*, el cual participa en el metabolismo hepático de lípidos, las otras 12 variantes de riesgo para la obesidad no tienen un efecto sobre el HGNA.
- En contraste, se confirmó que polimorfismos previamente asociados con el HGNA en europeos (*PNPLA3*, *GCKR*, *LYPLAL1*, *PPP1R3B*), se asocian con una mayor acumulación de TG en el hígado. Además, un SRG construido con estos genes explicó el 20% del contenido de triglicéridos hepáticos y se asoció con un mayor riesgo de HGNA.

11. PERSPECTIVAS

Del presente trabajo se pueden derivar nuevos objetivos que incrementen el conocimiento acerca del componente genético de predisposición a obesidad para la población mexicana y que permitan dilucidar algunos de los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo, como son:

- Realizar análisis de mapeo fino de las regiones alrededor de los SNPs que presentaron asociación o tendencia de asociación con riesgo de obesidad o EHNA en este estudio, para la identificación de variantes causales.
- Identificar nuevas variantes genéticas de riesgo para la obesidad para población mexicana mediante análisis genéticos globales.
- Caracterizar a nivel funcional las variantes de riesgo para la obesidad, como la cercana a los genes *FAIM2/BCDNI3* mediante estudios en modelos *in vitro*.
- Evaluar si el efecto del número de copias del gen *AMY1A* es consistente en distintas poblaciones y caracterizar a nivel funcional su participación en la modulación de la microbiota intestinal.
- Evaluar mediante estudios de intervención dietaria la respuesta al consumo de diferentes proporciones y tipos de hidratos de carbono respecto al número de copias del gen *AMY1A* y su asociación con la composición de la microbiota intestinal.

12. REFERENCIAS

Accetto T, Avguštin G. (2015). Polysaccharide utilization locus and CAZYme genome repertoires reveal diverse ecological adaptation of *Prevotella* species. *Syst Appl Microbiol.* 38(7):453-461.

Alexander DH, Novembre J, Lange K, *et al.* (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 19:1655–1664.

Almal SH, Padh H. (2012). Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *J Hum Genet.* 57(1):6-13.

Almén MS, Jacobsson JA, Shaik JH, *et al.* (2010). The obesity gene, *TMEM18*, is of ancient origin, found in majority of neuronal cells in all major brain regions and associated with obesity in severely obese children. *BMC Med Genet.* 11:58.

Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, *et al.* (2008). Low physical activity accentuates the effect of the *FTO* rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes.* 57(1):95-101.

Argentou M, Tiniakos DG, Karanikolas M, *et al.* (2009). Adipokine serum levels are related to liver histology in severely obese patients undergoing bariatric surgery. *Obes Surg.* 19:1313–1323.

Ashwell M, Cole TJ, Dixon AK. (1996). Ratio of waist circumference to height is strong predictor of intra-abdominal fat. *BMJ.* 313:559–560.

Bao-Yong S, Tie-Lin Y, Lan-Juan Z, *et al.* (2009). Genome-wide association study suggested copy number variation may be associated with body mass index in the Chinese population. *J Hum Genet.* 54(4):199-202.

Barlow SE, Bobra SR, Elliott MB, *et al.* (2007). Recognition of childhood overweight during health supervision visits: Does BMI help pediatricians?. *Obesity (Silver Spring).* 15(1):225-232.

Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ, *et al.* (2009). The P446L variant in *GCKR* associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum Mol Genet.* 18:4081–4088.

Bellentani S, Marino M. (2009). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol.* 8(1):S4-S8.

Blundell JE, Dulloo AG, Salvador J, *et al.* (2014). Beyond BMI-Phenotyping the Obesities. *Obes Facts.* 7(5):322-328.

Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, *et al.* (2004). Admixture in the Hispanics of the San

Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet.* 68(2):139-53.

Bressler J, Fornaje M, Hanis CL, *et al.* (2009). The *INSIG2* rs7566605 genetic variant does not play a major role in obesity in a sample of 24,722 individuals from four cohorts. *BMC Med Genet.* 12:56.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, *et al.* (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 40:1387–1395.

Burke JE, Dennis EA. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res.* 50:S237–S242.

Canizales-Quinteros S, Aguilar-Salinas CA, Ortiz-López MG, *et al.* (2007). Association of *PPARG2* Pro12Ala variant with larger body mass index in Mestizo and Amerindian populations of Mexico. *Hum Biol.* 79(1):111-119.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7:335–336.

Carpenter D, Dhar S, Mitchell LM, *et al.* (2015). Obesity, starch digestion and amylase: association between copy number variants at human salivary (*AMY1*) and pancreatic (*AMY2*) amylase genes. *Hum Mol Genet.* 24(12):3472-3480.

Chen ZY, Patel PD, Sant G, *et al.* (2004). Variant brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type *BDNF* in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci.* 24(18):4401–4411.

Chesi A, Grant SF. (2015). The Genetics of Pediatric Obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 26(12):711-721.

Choquette AC, Bouchard L, Drapeau V, *et al.* (2012). Association between olfactory receptor genes, eating behavior traits and adiposity: results from the Quebec Family Study. *Physiol Behav.* 105(3):772-776.

Choudhry S, Seibold MA, Borrell LN, *et al.* (2007). Dissecting complex diseases in complex populations: asthma in latino americans. *Proc Am Thorac Soc.* 4(3):226-233.

Church C, Moir L, McMurray F, *et al.* (2010). Overexpression of *Fto* leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* 42(12):1086-1092.

Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, *et al.* (2015). *FTO* Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med.* 373(10):895-907.

Conrad DF, Pinto D, Redon R, *et al.* (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 464(7289):704-712.

Cotsapas C, Speliotes EK, Hatoum IJ, *et al.* (2009). Common body mass index associated variants confer risk of extreme obesity. *Hum Mol Genet*. 18:3502–3507.

de Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, *et al.* (2004). Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 110(16):2494-2497.

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, *et al.* (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:14691–14696.

Del-Rio-Navarro BE, Velazquez-Monroy O, Lara-Esqueda A, *et al.* (2008). Obesity and metabolic risks in children. *Arch Med Res*. 39(2):215-221.

de Onis M, Blössner M, Borghi E. (2010). Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr*. 92(5):1257-1264.

Després JP, Lemieux I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 444(7121):881-887.

Deurenberg P, Weststrate JA, Seidell JC. (1991). Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas. *Br J Nutr*. 65:105–114.

Dina C, Meyre D, Gallina S, *et al.* (2007). Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 39(6):724-726.

Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 121:91–100.

Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. (2015). Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *Biomed Res Int*. 2015:460190.

Dongiovanni P, Valenti L. (2016). Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 65(8):1026-1037.

Dorajoo R, Blaquemore AI, Sim X, *et al.* (2012). Replication of 13 obesity *loci* among Singaporean Chinese, Malay and Asian-Indian population. *Int J Obes (Lond)*. 36:159–163.

Duan C, Yang H, White MF, *et al.* (2004). Disruption of the *SH2-B* gene causes age-dependent insulin resistance and glucose intolerance. *Mol Cell Biol*. 24(17):7435-

7443.

Dwyer A, Doppman JL, Adams AJ, *et al.* (1983). Influence of glycogen on liver density: computed tomography from a metabolic perspective. *J Comput Assist Tomogr.* 7:70–73.

Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, *et al.* (2012). Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Front Endocrinol (Lausanne).* 28(3):29.

Falchi M, El-Sayed Moustafa JS, Takousis P, *et al.* (2014). Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet.* 46:492–497.

Farooqi IS. (2008). Monogenic human obesity. *Front Horm Res.* 36:1-11.

Farrell GC, Larter CZ. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 43:S99-S112.

Fava C, Sjögren M, Montagnana M, *et al.* (2013). Prediction of blood pressure changes over time and incidence of hypertension by a genetic risk score in Swedes. *Hypertension.* 61:319–326.

Fawcett KA, Barroso I. (2010). The genetics of obesity: *FTO* leads the way. *Trends Genet.* 26(6):266–274.

Felix JF, Bradfield JP, Monnereau C, *et al.* (2016). Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index. *Hum Mol Genet.* 15:389-403.

Fesinmeyer MD, Meigs JB, North KE, *et al.* (2013). Genetic variants associated with fasting glucose and insulin concentrations in an ethnically diverse population: results from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. *BMC Med Genet.* 14:98.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, *et al.* (2007). A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 316(5826):889-894.

Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, *et al.* (2008). Common variation in the *FTO* gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes.* 57(5):1419-1426.

Freedman DS, Khan LK, Serdula, *et al.* (2005). The relation of childhood BMI to adult

adiposity: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 115(1):22-27.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, *et al.* (2006). Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Res*. 16:949-961.

Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 18:499-502.

Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, *et al.* (2000). Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr*. 72(3):694-701.

Gorden A, Yang R, Yerges-Armstrong LM, *et al.* (2013). Genetic variation at *NCAN* locus is associated with inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease in morbid obesity. *Hum Hered*. 75:34-43.

Gray J, Yeo GS, Cox JJ, *et al.* (2006). Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) gene. *Diabetes*. 55:3366-3371.

Guajardo-Salinas GE, Hilmy A. (2010). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and utility of FIBROspect II to detect liver fibrosis in morbidly obese Hispano-American patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg*. 20:1647-1653.

Guan L, Shang XR, Liu FH, *et al.* (2014). Association of *INSIG2* rs9308762 with ALT level independent of BMI. *J Pediatr Gastroenterol*. 58(2):155-159.

Guichelaar MM, Gawrieh S, Olivier M, *et al.* (2013). Interactions of allelic variance of *PNPLA3* with non genetic factors in predicting nonalcoholic steatohepatitis and non hepatic complications of severe obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 21:1935-1941.

Guo G, Liu H, Wang L, *et al.* (2015). The Genome-Wide Influence on Human BMI Depends on Physical Activity, Life Course, and Historical Period. *Demography*. 52(5):1651-1670.

Gutierrez-Aguilar R, Kim DH, Woods SC, *et al.* (2012). Expression of new loci associated with obesity in diet-induced obese rats: from genetics to physiology. *Obesity (Silver Spring)*. 20(2):306-312.

Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, *et al.* (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

Guyenet SJ, Schwartz MW. (2012). Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of

obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(3):745-755.

Han JC, Liu QR, Jones M, *et al.* (2008). Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med.* 359:918–927.

Hardy R, Wills AK, Wong A, *et al.* (2010). Life course variations in the associations between *FTO* and *MC4R* gene variants and body size. *Hum Mol Genet.* 19:545–552.

Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zúñiga OA, *et al.* (2016). Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *J Clin Endocrinol Metab.* 101(1):233-242.

Haslam DW, James WP. (2005). Obesity. *Lancet.* 366(9492):1197-1209.

Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, *et al.* (2006). A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science.* 312:279–283.

Hernaez R, McLean J, Lazo M, *et al.* (2013). Association between variants in or near *PNPLA3*, *GCKR*, and *PPP1R3B* with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11:1183–1190.

Hernández-Avila M, Rivera-Dommarco J, Shamah Levy T, *et al.* Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016: Resultados ponderados. Instituto Nacional de Salud Pública. 14 de diciembre 2016.

Hernández-Avila M, Romieu I, Parra S, *et al.* (1998). Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in México City. *Salud Pública Mex.* 40(2):133-140.

He S, McPhaul C, Li JZ, *et al.* (2010). A sequence variation (I148M) in *PNPLA3* associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* 285:6706–6715.

Hinney A, Volckmar AL, Knoll N. (2013). Melanocortin-4 receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 114:147-191.

Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, *et al.* (2003). Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet.* 72:1492–1504.

Hollenbeck C, Reaven GM. (1987). Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 64(6):1169-1173.

Hotta K, Nakamura M, Nakata Y, *et al.* (2008). *INSIG2* gene rs7566605 polymorphism is associated with severe obesity in Japanese. *J Hum Genet.* 53:857–

862.

Hotta K, Nakamura M, Nakamura T, *et al.* (2009). Association between obesity and polymorphisms in *SEC16B*, *TMEM18*, *GNPDA2*, *BDNF*, *FAIM2* and *MC4R* in Japanese population. *J Hum Genet.* 54:727–731.

Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, *et al.* (2008). Variations in the *FTO* gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet.* 53(6):546-553.

Holzapfel C, Grallert H, Huth C, *et al.* (2010). Genes and lifestyle factors in obesity: results from 12,462 subjects from MONICA/KORA. *Int J Obes (Lond).* 34(10):1538-1545.

INEGI. Estadísticas de Mortalidad. (Consultada el 19 de enero de 2016). Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484>.

Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V, *et al.* Major gender difference in association of *FTO* gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 368(3):476-482.

Jarick I, Vogel CI, Scherag S, *et al.* (2011). Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Hum Mol Genet.* 20(4):840-852.

Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, *et al.* (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem.* 279:48968–48975.

Jung UJ, Choi MS. (2014). Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 15(4):6184-6223.

Kahn CR. (1978). Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism.* 27(2):1893-1902.

Karlsson CL, Onnerfält J, Xu J, *et al.* (2012). The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring).* 20(11):2257-2261.

Katsuura G, Asakawa A, Inui A. (2002). Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides.* 23(2):323-329.

Kaulfers AM, Deka R, Dolan L, *et al.* (2015). Association of *INSIG2* Polymorphism with Overweight and LDL in Children. *PLoS One.* 10(1):e0116340.

Kaur J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014:943162.

Kelly T, Yang W, Chen CS, *et al.* (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond).* 32(9):1431-1437.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, *et al.* (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 41:1313-1321.

Kosoy R, Nassir R, Tian C, *et al.* (2009). Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat.* 30:69–78.

Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, *et al.* (2002). 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat.* (246):1-190.

Lange LA, Graff M, Lange EM, *et al.* (2016). Evidence for Association between SH2B1 Gene Variants and Glycated Hemoglobin in Nondiabetic European American Young Adults: The Add Health Study. *Ann Hum Genet.* 80(5):294-305.

Lewis JP, Shuldiner AR. (2010). Genetics of the metabolic complications of obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 94:349-372.

Liem ET, Vonk JM, Sauer PJ, *et al.* (2010). Influence of common variants near *INSIG2*, in *FTO*, and near *MC4R* genes on overweight and the metabolic profile in adolescence: the TRAILS (TRacking Adolescents' Individual Lives Survey) Study. *Am J Clin Nutr.* 91(2):321-328.

Lim SY, Kim SI, Ryu YJ, *et al.* (2010). The body mass index as a prognostic factor of critical care. *Korean J Intern Med.* 25(2):162-167.

Li S, Zhao JH, Luan J, *et al.* (2010). Cumulative effects and predictive value of common obesity susceptibility variants identified by genome-wide association studies. *Am J Clin Nutr.* 91:184–190.

Locke AE, Kahali B, Berndt SI, *et al.* (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature.* 518(7538):197-206.

Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL : Human Kinetics Books, 1988.

Loos RJ, Bouchard C. (2003). Obesity--is it a genetic disorder?. *J Intern Med.* 254(5):401-425.

Loos RJ, Lindgren CM, Li S, *et al.* (2008). Common variants near *MC4R* are

associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* 40(6):768-775.

Lozupone C, Knight R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 71(12):8228-8235.

Lupski JR. (1998). Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 14(10):417-422.

Lyon HN, Emilsson V, Hinney A, *et al.* (2007). The association of a SNP upstream of *INSIG2* with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *Plos Genet.* 27:e61.

Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, *et al.* (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:15239–15244.

Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. (1997). Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet.* 27(4):325-351.

Maher B. (2008). Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature.* 456(7218):18-21.

Mandel AL, Peyrot des Gachons C, Plank KL, *et al.* (2010). Individual differences in *AMY1* gene copy number, salivary α -amylase levels, and the perception of oral starch. *PLoS One.* 5(10):e13352.

Marcovecchio ML, Florio R, Verginelli F, *et al.* (2016). Low *AMY1* Gene Copy Number Is Associated with Increased Body Mass Index in Prepubertal Boys. *PLoS One.* 11(5):e0154961.

Martínez-García F, Mansego ML, Rojo-Martínez G, *et al.* (2013). Impact of obesity-related genes in Spanish population. *BMC Genet.* 23(14):111.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, *et al.* (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28:412-419.

Mei H, Chen W, Jiang F, *et al.* (2012). Longitudinal replication studies of GWAS risk SNPs influencing body mass index over the course of childhood and adulthood. *PLoS One.* 7:e31470.

Mejía-Benítez MA, Bonnefond A, Yengo L, *et al.* (2015). Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase *AMY1* gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia.* 58(2):290-294.

Mejía-Benítez MA, Klünder-Klünder M, Yengo L, *et al.* (2013) Analysis of the

contribution of *FTO*, *NPC1*, *ENPP1*, *NEGR1*, *GNPDA2* and *MC4R* genes to obesity in Mexican children. *BMC Med Genet.* 14:21.

Meyre D. (2012). Is *FTO* a type 2 diabetes susceptibility gene?. *Diabetologia.* 55(4):873-876.

Meyre D, Delplanque J, Chèvre JC, *et al.* (2009). Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk *loci* in European populations. *Nat Genet.* 41(2):157-159.

Nakayama J, Watanabe K, Jiang J, *et al.* (2015). Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep.* 5:8397.

O'Rahilly S. (2009). Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature.* 462(19):307-314.

Obrebowski A, Obrebowska-Karsznia Z, Gawliński M. (2000). Smell and taste in children with simple obesity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 55(3):191-196.

Palmer ND, Musani SK, Yerges-Armstrong LM, *et al.* (2013). Characterization of European ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of African and Hispanic descent. *Hepatology.* 58:966–975.

Paniagua JA. (2016). Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes.* 7(19):483–514.

Parks BW, Nam E, Org E, *et al.* (2013). Genetic Control of Obesity and Gut Microbiota Composition in Response to High-Fat, High-Sucrose Diet in Mice. *Cell Metab.* 17(1):141–152.

Pérez-Lizaur AB, Kaufer-Horwitz M, Plazas M. (2008). Environmental and personal correlates of fruit and vegetable consumption in low income, urban Mexican children. *J Hum Nutr Diet.* 21(1):63-71.

Perichart-Perera O, Balas-Nakash M, Schiffman-Selechnik E, *et al.* (2007). Obesity increases metabolic syndrome risk factors in school-aged children from an urban school in Mexico city. *J Am Diet Assoc.* 107(1):81-91.

Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, *et al.* (2007). Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet.* 39(10):1256–1260.

Prentice AM. (2001). Overeating: The Health Risks. *Obes Res.* 9:234S–238S.

Price AL, Patterson N, Yu F, *et al.* (2007). A Genomewide Admixture Map for Latino Populations. *Am J Hum Genet.* 80(6):1024–1036.

Primeaux SD, Barnes MJ, Bray GA. (2007). Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behav Brain Res.* 180(2):190-196.

Prospective Studies Collaboration. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 373:1083-1096.

Qi L, Kang K, Zhang C, *et al.* (2008). Fat mass-and obesity-associated (*FTO*) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes.* 57(11):3145-3151.

Rankinen T, Sarzynski MA, Ghosh S, *et al.* (2015). Are there genetic paths common to obesity, cardiovascular disease outcomes, and cardiovascular risk factors?. *Circ Res.* 116(5):909-922.

Rask-Andersen M, Jacobsson JA, Moschonis G, *et al.* (2011). Association of *TMEM18* variants with BMI and waist circumference in children and correlation of mRNA expression in the PFC with body weight in rats. *Eur J Hum Genet.* 20(2):192-197.

Ravussin E, Valencia ME, Esparza J, *et al.* (1994). Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care.* 17(9):1067-1074.

Ren D, Li M, Duan C, *et al.* (2005). Identification of *SH2-B* as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab.* 2(2):95-104.

Renstrom F, Payne F, Nordstrom A, *et al.* (2009). Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet.* 18:1489–1496.

Richardson BE, Vander Woude EA, Sudan R, *et al.* (2004). Altered olfactory acuity in the morbidly obese. *Obes Surg.* 14(7):967-969.

Robiou-du-Pont S, Bonnefond A, Yengo L, *et al.* (2013). Contribution of 24 obesity-associated genetic variants to insulin resistance, pancreatic beta-cell function and type 2 diabetes risk in the French population. *Int J Obes (Lond).* 37(7):980-985.

Romeo S, Kozlitina J, Xing C, *et al.* (2008). Genetic variation in *PNPLA3* confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 40:1461–1465.

Romeo S, Sentinelli F, Dash S, *et al.* (2010). Morbid obesity exposes the association between *PNPLA3* I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *Int J Obes (Lond).* 34(1):190-194.

Rong R, Hanson RL, Ortiz D, *et al.* (2009). Association analysis of variation in/near *FTO*, *CDKAL1*, *SLC30A8*, *HHEX*, *EXT2*, *IGF2BP2*, *LOC387761*, and *CDKN2B* with type 2 diabetes and related quantitative traits in Pima Indians. *Diabetes*. 58:478–488.

Rouskas K, Kouvatsi A, Paletas K, *et al.* (2012). Common variants in *FTO*, *MC4R*, *TMEM18*, *PRL*, *AIF1*, and *PSCK1* show evidence of association with adult in the Greek population. *Obesity (Silver Spring)*. 20:389–395.

Rtveladze K, Marsh T, Barquera S, *et al.* (2014). Obesity prevalence in México: impact on health and economic burden. *Public Health Nutr*. 17:233-239.

Sainsbury A, Baldock PA, Schwarzer C, *et al.* (2003). Synergistic effects of Y2 and Y4 receptors on adiposity and bone mass revealed in double knockout mice. *Mol Cell Biol*. 23(15):5225-5233.

Sanders FW, Griffin JL. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 91(2):452-468.

Sandholt CH, Vestmar MA, Bille DS, *et al.* (2011). Studies of metabolic phenotypic correlates of 15 obesity associated gene variants. *PLoS One*. 6(9):e23531.

Savva SC, Tornaritis M, Savva ME, *et al.* (2000). Waist circumference and waist-to-height ratio are better predictors of cardiovascular disease risk factors in children than body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 24:1453–1458.

Scherag A, Dina C, Hinney A, *et al.* (2010). Two new Loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and German study groups. *PLoS Genet*. 6:e1000916.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM, *et al.* (2007). Genome-wide association scans shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*. 3(7):1200-1210.

Sha BY, Yang TL, Zhao LJ, *et al.* (2009). Genome-wide association study suggested copy number variation may be associated with body mass index in the Chinese population. *J Hum Genet*. 54(4):199-202.

Sheng L, Liu Y, Jiang L, *et al.* (2013). Hepatic *SH2B1* and *SH2B2* regulate liver lipid metabolism and VLDL secretion in mice. *PLoS One*. 8(12):e83269.

Shen WJ, Yao T, Kong X, *et al.* (2017). Melanocortin neurons: multiple routes to regulation of metabolism. *Biochim Biophys Acta*. S0925-4439(17)30144-8.

Sonestedt E, Gullberg B, Ericson U, *et al.* (2011). Association between fat intake, physical activity and mortality depending on genetic variation in *FTO*. *Int J Obes*

(Lond). 35(8):1041-1049.

Speakman JR, Djafarian K, Stewart J, *et al.* (2007). Assortative mating for obesity. *Am J Clin Nutr.* 86(2):316-323.

Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, *et al.* (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new *loci* associated with body mass index. *Nat Genet.* 42(11):937-948.

Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, *et al.* (2011). Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* 7(3):e1001324.

Stankiewicz P, Lupski JR. (2010). Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 61:437-455.

Stoddard P, Handley MA, Vargas Bustamante A, *et al.* (2011). The influence of indigenous status and community indigenous composition on obesity and diabetes among Mexican adults. *Soc Sci Med.* 73(11):1635-1643.

Stranger BE, Stahl EA, Raj T. (2011). Progress and promise of genome-wide associations studies for human complex trait genetics. *Genetics.* 187(2):367-383.

Talbert ME, Langefeld CD, Ziegler JT, *et al.* (2009). *INSIG2* SNPs associated with obesity and glucose homeostasis traits in Hispanics: the IRAS Family Study. *Obesity (Silver Spring).* 17(8):1554-1562.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. (2002). National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation.* 106(25):3143- 3421.

Thomsen M, Dahl M, Tybjærg-Hansen A, *et al.* (2012). β 2-adrenergic receptor Thr164Ile polymorphism, obesity, and diabetes: comparison with *FTO*, *MC4R*, and *TMEM18* polymorphisms in more than 64,000 individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(6):E1074-E1079.

Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, *et al.* (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven *loci* that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 41(1):18-24.

Usher CL, Handsaker RE, Esko T. (2015). Structural forms of the human amylase *locus* and their relationships to SNPs, haplotypes and obesity. *Nat Genet.* 47(8):921-925.

Van der Klaauw AA, Farooqi IS. (2015). The hunger genes: pathways to obesity. *Cell*. 161(1):19-32.

van Vliet-Ostaptchouk JV, Hofker MH, van der Schouw, *et al.* (2009). Genetic variation in the hypothalamic pathways and its role on obesity. *Obes Rev*. 10(6):593-609.

Vassy JL, Hivert MF, Porneala B, *et al.* (2014). Polygenic type 2 diabetes prediction at the limit of common variant detection. *Diabetes*. 63(6):2172-2182.

Viljakainen H, Andersson-Assarsson JC, Armenio M, *et al.* (2015). Low Copy Number of the *AMY1 Locus* Is Associated with Early-Onset Female Obesity in Finland. *PLoS One*. 10(7):e0131883.

Villalobos-Comparán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, *et al.* (2008). The *FTO* gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring)*. 16:2296– 2301.

Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, *et al.* (2007). 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*. 56(7):1881-1887.

Wagenknecht LE, Palmer ND, Bowden DW, *et al.* (2011). Association of *PNPLA3* with non-alcoholic fatty liver disease in a minority cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Liver Int*. 31:412–416.

Walker RW, Sinatra F, Hartiala J, *et al.* (2013). Genetic and clinical markers of elevated liver fat content in overweight and obese Hispanic children. *Obesity (Silver Spring)*. 21:E790–E797.

Warrington NM, Howe LD, Paternoster L, *et al.* (2015). A genome-wide association study of body mass index across early life and childhood. *Int J Epidemiol*. 44(2):700-712.

Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, *et al.* (2009). Six new *loci* associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet*. 41(1):25-34.

World Health Organization. Obesity and Overweight (Factsheet no 311) [(11 August 2015)]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.

Wu GD, Chen J, Hoffmann C, *et al.* (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*. 334(6052):105–108.

Xiang-Rui M, Jie-Yun S, Jun M, *et al.* (2014). Association study of childhood obesity

with eight genetic variants recently identified by genome-wide association studies. *Pediatr Res.* 76:310–315.

Xi B, Wang C, Wu L, *et al.* (2011). Influence of physical inactivity on associations between single nucleotide polymorphisms and genetic predisposition to childhood obesity. *Am J Epidemiol.* 173(11):1256-1262.

Xu B, Goulding EH, Zang K, *et al.* (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci.* 6:736–742.

Xu B, Xie X. (2016). Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neuro.* 17:282–292.

Yang TL, Guo Y, Li SM, *et al.* (2013). Ethnic differentiation of copy number variation on chromosome 16p12.3 for association with obesity phenotypes in European and Chinese populations. *Int J Obes (Lond).* 37(2):188-190.

Ye J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med.* 7(1):14-24.

Zhang D, Li Z, Wang H, *et al.* (2015). Interactions between obesity-related copy number variants and dietary behaviors in childhood obesity. *Nutrients.* 7(4):3054-3066.

13. ANEXOS.

Tabla Suplementaria 1. Características antropométricas y bioquímicas del estudio caso-control para el análisis de SNPs candidatos

Características	Delgados (n=473)	Sujetos con obesidad clase I, II (n=441)	Sujetos con obesidad Clase III (n=242)	^a P	^b P	^c P
Sexo (H/M)	170/303	141/300	63/179	0.206	0.007	0.105
Edad (años)	38.37 ± 13.99	42.52 ± 13.14	39.34 ± 10.99	4.4x10 ⁻⁰⁶	0.308	0.001
Antropométricas						
Peso (kg)	59.53 ± 8.08	86.13 ± 12.59	122.73 ± 22.77	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶
IMC (kg/m ²)	22.75 ± 1.89	33.43 ± 2.91	46.72 ± 5.93	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶
CC (cm)	79.43 ± 8.52	103.94 ± 10.58	129.65 ± 15.84	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶
Bioquímicas						
Glucosa (mg/dl)	91 (97.0-84.0)	98 (109.3-90.0)	100 (115.8-92)	2.56x10 ⁻¹¹	3.7x10 ⁻⁰⁶	0.851
Insulina (mU/ml)	6.1 (8.5-4.3)	13.2 (18.5-8.8)	20.2 (28.3-13.6)	1.0x10 ⁻³⁶	7.9x10 ⁻³⁴	7.7x10 ⁻¹¹
HOMA-IR	1.33 (1.99-0.93)	3.32 (5.12-2.09)	5.09 (7.52-3.35)	9.9x10 ⁻²⁸	1.9x10 ⁻²⁴	9.4x10 ⁻⁰⁸
CT (mg/dl)	201.09 ± 41.67	207.30 ± 41.81	185.31 ± 41.17	0.025	2.0x10 ⁻⁰⁶	9.5x10 ⁻¹¹
TG (mg/dl)	112 (158.8-79.0)	171 (240.8-125.3)	152 (220-119)	1.3x10 ⁻¹⁴	1.8x10 ⁻⁰⁵	3.9x10 ⁻⁰⁴
Col-HDL (mg/dl)	51.15 ± 13.42	42.24 ± 10.91	38.46 ± 10.88	1.4x10 ⁻²⁶	2.0x10 ⁻³⁶	1.8x10 ⁻⁰⁵
Col-LDL (mg/dl)	123.13 ± 32.65	124.72 ± 36.99	110.75 ± 30.19	0.502	3.4x10 ⁻⁰⁶	2.5x10 ⁻⁰⁶
Alteraciones Metabólicas						
Hiperglucemia n(%)	12 (2.5)	59 (13.4)	36 (14.9)	8.2x10 ⁻¹⁰	1.4x10 ⁻¹⁰	0.470
Resistencia a la insulina n(%)	60 (12.7)	235 (53.3)	175 (72.3)	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶	5.6x10 ⁻⁰⁹
Hipercolesterolemia n(%)	230 (48.6)	243 (55.1)	80 (33.1)	0.050	1.1x10 ⁻⁰⁴	5.9x10 ⁻⁰⁸
Hipertrigliceridemia n(%)	132 (27.9)	276 (62.6)	123 (50.8)	5.1x10 ⁻²⁶	6.8x10 ⁻¹⁰	0.004
Hipoalfalipoproteinemia n(%)	165 (34.9)	296 (67.1)	201 (83.1)	1.2x10 ⁻²²	3.1x10 ⁻³⁵	2.7x10 ⁻⁰⁶
Síndrome metabólico n(%)	24 (5.1)	236 (53.5)	130 (53.7)	1.0x10 ⁻³⁶	1.0x10 ⁻³⁶	0.020

Los datos se presentan como n(%), medias ± DE o mediana (rango intercuartil).

IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura; HOMA-IR, Índice de resistencia a la insulina; CT, Colesterol total; TG, triglicéridos; Col-HDL, Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; Col-LDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

^aP, comparación de sujetos delgados vs sujetos con obesidad clase I, II; ^bP, comparación de sujetos delgados vs sujetos con obesidad clase III; ^cP, comparación de sujetos con obesidad I, II vs sujetos con obesidad clase III. Los valores de P fueron obtenidos utilizando una prueba de T-student o χ^2 .

Tabla Suplementaria 2. Características antropométricas y bioquímicas del estudio de cohortes para el análisis de SNPs candidatos

Características	Niños (n=1218)	Adultos (n=945)	Indígenas (n=543)
Sexo (H/M)	578/640	341/604	178/365
Edad (años)	11.35 ± 2.52	39.68 ± 13.54	47.25 ± 15.86
Antropométricos			
Peso (kg)	48.27 ± 15.71	70.99 ± 15.52	61.87 ± 14.86
IMC (kg/m ²)	74.54 ± 24.67	27.34 ± 5.24	26.65 ± 4.691
CC (cm)	74.02 ± 12.13	89.07 ± 13.33	91.19 ± 13.64
Bioquímicos			
Glucosa (mg/dl)	89 (94-84)	94 (101-87)	100 (114-91)
Insulina (mU/ml)	6.5 (10.5-3.8)	8.6 (13.2-5.7)	10.7 (18.2-7.8)
HOMA-IR	1.41 (2.33-0.83)	2 (3.32-1.26)	3.16 (5.83-2.02)
CT (mg/dl)	159.28 ± 30.46	205.82 ± 42.44	190.94 ± 85.54
TG (mg/dl)	97 (134-71)	146.5 (213-101)	177.5 (230.25-126.75)
Col-HDL (mg/dl)	45.66 ± 10.99	46.27 ± 12.49	41.65 ± 12.37
Col-LDL (mg/dl)	94.02 ± 25.27	124.24 ± 34.30	109.35 ± 34.85
Estatus Nutricional			
Sobrepeso n(%)	290 (23.8)	354 (37.5)	222 (40.9)
Obesidad I, II n(%)	242 (19.9)	243 (25.7)	105 (19.3)
Obesidad III n(%)	48 (3.9)	18 (1.9)	6 (1.1)
Alteraciones metabólicas			
Hiper glucemia n(%)	84 (6.9)	45 (4.8)	105 (19.3)
Resistencia a la insulina n(%)	122 (10.0)	296 (31.3)	101 (18.6)
Hipercolesterolemia n(%)	114 (9.4)	501 (53.0)	193 (35.5)
Hipertrigliceridemia n(%)	576 (47.3)	456 (48.0)	339 (62.4)
Hipoalfalipoproteinemia n(%)	828 (67.9)	485 (51.3)	390 (71.8)
Síndrome metabólico n(%)	()	322 (34.1)	245 (45.1)

Los datos se presentan como n(%), medias ± DE o mediana (rango intercuartil). IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura; HOMA-IR, Modelo homeostático de resistencia a la insulina; CT, Colesterol total; TG, triglicéridos; Col-HDL, Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; Col-LDL, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad. El dx. nutricional se realizó en base a los criterios establecidos por la OMS y por el corte del percentil del IMC establecido por la CDC. La hiperglucemia se determinó con un valor de glucosa ≥126 mg/dL en adultos y ≥100 mg/dL en niños; la resistencia a la insulina con un valor de HOMA-IR ≥2.5; la hipercolesterolemia con un valor de colesterol >200 mg/dL; la hipertrigliceridemia con un valor de TG >150 mg/dL en adultos y >100 mg/dL en niños y la hipoalfalipoproteinemia con un valor de HDL-C <40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres y niños. El dx. de síndrome metabólico fue realizado utilizando los criterios establecidos por la ATP III para el caso de los adultos y por Ferranti y cols para el caso de los niños.

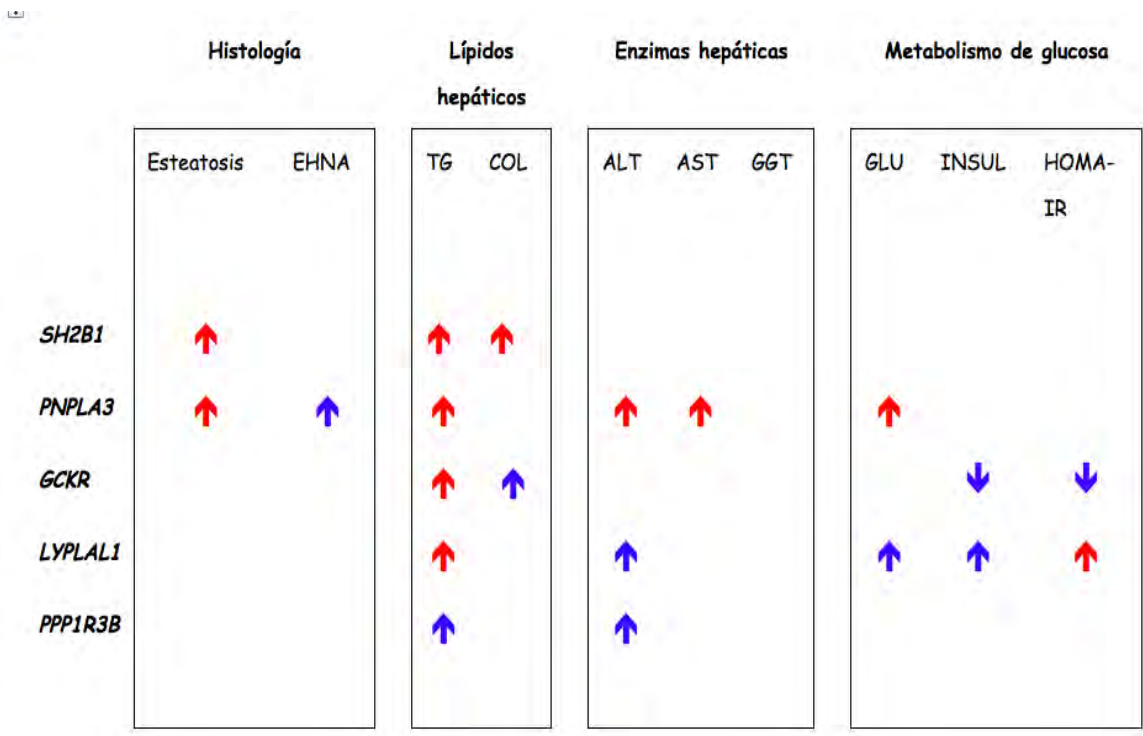


Figura suplementaria 1. Resumen de los efectos genéticos de los SNPs y el SGR sobre las variables metabólicas e histológicas del HGNA y el riesgo de EHNA. La dirección de las flechas indica la dirección de la asociación. Las flechas rojas indican asociaciones significativas ($P < 0.05$), en tanto las flechas azules indican una tendencia a la significancia ($P < 0.1$). La asociación del SRG con el riesgo de EHNA se realizó comparando el tercil más alto (3) del SRG vs el los terciles más bajos (1 y 2). Abreviaturas: EHNA, Esteatohepatitis no alcohólica; TG, Triglicéridos; COL, Colesterol; ALT, Alanina aminotransferasa; AST, Aspartato aminotransferasa; GGT, Gamma glutamil transpeptidasa; GLU, glucosa; Insul, insulina; HOMA-IR, Modelo homeostático de resistencia a la insulina.

Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults

Paola León-Mimila^{1,2,3}, Hugo Villamil-Ramírez^{1,2,3}, Marisela Villalobos-Comparán³, Teresa Villarreal-Molina⁴, Sandra Romero-Hidalgo³, Blanca López-Contreras¹, Roxana Gutiérrez-Vidal^{1,2}, Joel Vega-Badillo^{1,2}, Leonor Jacobo-Albavera⁴, Carlos Posadas-Romeros⁵, Adrián Canizalez-Román⁶, Blanca Del Río-Navarro⁷, Francisco Campos-Pérez⁸, Víctor Acuña-Alonzo⁹, Carlos Aguilar-Salinas¹⁰, Samuel Canizales-Quinteros^{1,2*}

1 Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)-Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City, Mexico, **2** Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), Mexico City, Mexico, **3** Departamento de Genómica Computacional, INMEGEN, Mexico City, Mexico, **4** Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares, INMEGEN, Mexico City, Mexico, **5** Departamento de Endocrinología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh), Mexico City, Mexico, **6** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Mexico, **7** Departamento de Alergia e Inmunología Clínica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico, **8** Clínica de Obesidad, Hospital Rubén Leñero, Mexico City, Mexico, **9** Escuela Nacional de Antropología e Historia, Mexico City, Mexico, **10** Departamento de Endocrinología y Metabolismo, INCMNSZ, Mexico City, Mexico

Abstract

Background: Several studies have identified multiple obesity-associated loci mainly in European populations. However, their contribution to obesity in other ethnicities such as Mexicans is largely unknown. The aim of this study was to examine 26 obesity-associated single-nucleotide polymorphisms (SNP) in a sample of Mexican mestizos.

Methods: 9 SNPs in biological candidate genes showing replications (*PPARG*, *ADRB3*, *ADRB2*, *LEPR*, *GNB3*, *UCP3*, *ADIPOQ*, *UCP2*, and *NR3C1*), and 17 SNPs in or near genes associated with obesity in first, second and third wave GWAS (*INSIG2*, *FTO*, *MC4R*, *TMEM18*, *FAIM2/BCDIN3*, *BDNF*, *SH2B1*, *GNPDA2*, *NEGR1*, *KCTD15*, *SEC16B/RASAL2*, *NPC1*, *SFRF10/ETV5*, *MAF*, *PRL*, *MTCH2*, and *PTER*) were genotyped in 1,156 unrelated Mexican-Mestizos including 683 cases (441 obese class I/II and 242 obese class III) and 473 normal-weight controls. In a second stage we selected 12 of the SNPs showing nominal associations with obesity, to seek associations with quantitative obesity-related traits in 3 cohorts including 1,218 Mexican Mestizo children, 945 Mexican Mestizo adults, and 543 Indigenous Mexican adults.

Results: After adjusting for age, sex and admixture, significant associations with obesity were found for 6 genes in the case-control study (*ADIPOQ*, *FTO*, *TMEM18*, *INSIG2*, *FAIM2/BCDIN3* and *BDNF*). In addition, *SH2B1* was associated only with class I/II obesity and *MC4R* only with class III obesity. SNPs located at or near *FAIM2/BCDIN3*, *TMEM18*, *INSIG2*, *GNPDA2* and *SEC16B/RASAL2* were significantly associated with BMI and/or WC in the combined analysis of Mexican-mestizo children and adults, and *FTO* locus was significantly associated with increased BMI in Indigenous Mexican populations.

Conclusions: Our findings replicate the association of 8 obesity-related SNPs with obesity risk in Mexican adults, and confirm the role of some of these SNPs in BMI in Mexican adults and children.

Citation: León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, et al. (2013) Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults. PLoS ONE 8(8): e70640. doi:10.1371/journal.pone.0070640

Editor: Joseph Devaney, Children's National Medical Center, Washington, United States of America

Received: April 19, 2013; **Accepted:** June 24, 2013; **Published:** August 8, 2013

Copyright: © 2013 León-Mimila et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by grant 11386 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cani@unam.mx

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The prevalence of obesity is rapidly increasing worldwide [1]. According to the 2012 National Health and Nutrition Survey in the Mexican population, the prevalence of overweight and obesity is 71.2% in adults aged above 20 years and 34.4% in children [2]. Moreover, according to the 2002 Mexican Family Life survey,

59% of indigenous Mexican individuals are overweight or obese [3]. Heritability of obesity has been estimated as high as 70% [4]. Using a biological candidate gene approach, more than 127 genes have been associated with obesity and/or obesity-related phenotypes [5]; while genome-wide association studies (GWAS) have identified more than 120 genes (the vast majority not

previously identified as biological candidates) associated with obesity mainly in European populations [6].

Although associations of many common genetic variants with obesity have been replicated mainly in several European and Asian populations [5,6] there are still few studies in the Mexican population [7–10]. This population resulted from recent admixture mainly of indigenous Mexican and European populations [11], and thus genetic variants that are common in Europeans are likely to be part of the genetic architecture of obesity in Mexicans. Using a case control design, we sought to assess the contribution of two different sets of SNPs with obesity in Mexican Mestizo adults: 9 SNPs in biological candidate genes showing replications in at least 10 studies (*PPARG*, *ADRB3*, *ADRB2*, *LEPR*, *GNB3*, *UCP3*, *ADIPOQ*, *UCP2*, and *NR3C1*) [5] and 17 SNPs in or near genes associated with obesity in first, second and third wave GWAS (*INSIG2*, *FTO*, *MCAR*, *TMEM18*, *FALM2/BCDIN3*, *BDNF*, *SH2B1*, *GNPDA2*, *NEGR1*, *KCTD15*, *SEC16B/RASAL2*, *NPC1*, *SFRF10/ETV5*, *MAF*, *PRL*, *MTCH2*, and *PTER*) [12–18]. In a second stage we selected of the SNPs showing nominal associations with obesity, to seek associations with quantitative obesity-related traits in 3 distinct cohorts of Mexican Mestizo children and adults, as well as Indigenous Mexicans.

Research Design and Methods

Case-control Study

The case-control study included 1 156 unrelated Mexican-Mestizos. Control, class I and class II obesity individuals were workers from several Governmental Institutions in Mexico City, including Instituto Nacional de Neurología y Neurociencias Manuel Velasco Suárez, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Universidad Nacional Autónoma de México, and Universidad Autónoma Metropolitana. Individuals with class III obesity were outpatients from Obesity Clinics at the INCMNSZ and the Dr. Rubén Leñero General Hospital. All participants were aged 18 to 82 years, without chronic disease that may compromise body weight (including cancer, HIV infection and thyroid disorders); 473 were non-diabetic normal weight subjects ($BMI > 18.5$ and ≤ 25 kg/m^2); 441 were obese class I/II individuals ($BMI \geq 30$ kg/m^2 and < 40 kg/m^2), and 242 were obese class III individuals ($IMC \geq 40$ kg/m^2) described by Villalobos-Comparán et al. [9]. Anthropometric characteristics of the subjects are summarized in Table S1. All participants provided written informed consent prior to the inclusion in the study.

Cohort Studies

This study analyzed three independent cohorts. The first group included 945 unrelated Mexican-mestizos aged 18–82 years, recruited at their work-sites at different governmental institutions in Mexico City (including the Instituto Nacional de Neurología y Neurociencias Manuel Velasco Suárez, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Universidad Nacional Autónoma de México, and Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa), 788 described by Villalobos-Comparán et al. [8]. A total of 441 of these subjects were also included in the case-control study described above.

The second group included 1 218 healthy unrelated school-aged Mexican-Mestizo children (595 boys and 658 girls) aged 6–15 years, recruited from a summer camp for children of employees of the Mexican Health Ministry (Convivencia Infantil 2008, Secretaría de Salud) and from a public junior high school in

Mexico City, previously described by Flores-Dorantes et al [19]. A parent or guardian of each child signed the consent form for participation.

The third group included 543 unrelated individuals aged over 18 years, belonging to 4 indigenous groups from rural communities: 77 Seris from Sonora located in Northern Mexico, 271 Nahuas and 112 Totonacas from Puebla in East-central Mexico, and 83 Zapotecs from Oaxaca in Southeastern Mexico. All individuals in this group, their parents and grandparents recognized themselves as indigenous, had been born and lived in their home communities, and spoke their native language. Blood samples were drawn with the permission of local authorities and a translator was used as needed.

This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committees of participant institutions.

Anthropometric and Biochemical parameters

Anthropometric measurements were determined following the procedures recommended by Lohman et al. [20] and included weight, height, waist circumference (WC) and hip circumference. All instruments were calibrated following the standard methods of the manufacturers. BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. In adults, obesity status was determined according to WHO (World Health Organization) criteria [21]. In children, BMI z-scores were calculated using age and sex specific BMI reference data, as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention [22]. Biochemical parameters including fasting glucose, insulin, total cholesterol, HDL-C and triglycerides serum levels were measured as previously described [23]. Homeostasis model assessment of B-cell function (HOMA-B) was estimated using a computer model [24].

SNP selection and genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood white cells using a commercial kit based on the salt fractionation method (QIAmp 96 DNA Blood Kit, Qiagen, Hilden, Germany). A total of 26 SNPs in or near genes previously associated with obesity risk in other populations were genotyped in cases and controls: 12 SNPs were selected from 9 biological candidate genes including rs3856806 (*PPARG*), rs4994 (*ADRB3*), rs1042719 (*ADRB2*), rs1137101 (*LEPR*), rs5443 (*GNB3*), rs1800849 (*UCP3*), rs2241766 (*ADIPOQ*), rs659366 (*UCP2*) and rs56149945 (*NR3C1*); while the remainder 17 SNPs were selected from first, second and third wave GWAS reports and included rs7566605 (*INSIG2*), rs9939609 (*FTO*), rs17782313 (*MCAR*), rs6548238 (*TMEM18*), rs7138803 (*FALM2/BCDIN3*), rs6265 (*BDNF*), rs7498665 (*SH2B1*), rs10938397 (*GNPDA2*), rs2815752 (*NEGR1*), rs29941 (*KCTD15*), rs10913469 (*SEC16B/RASAL2*), rs1805081 (*NPC1*), rs7647305 (*SFRS10/ETV5*), rs1424233 (*MAF*), rs4712652 (*PRL*), rs10838738 (*MTCH2*) and rs10508503 (*PTER*).

Because the Mexican-Mestizo population is admixed, ancestry informative markers (AIMs) were used to assess whether any association could be confounded by population stratification. A panel of 10 AIMs (rs4884, rs2695, rs17203, rs2862, rs3340, rs722098, rs203096, rs223830, rs1800498, and rs281478) distinguishing mainly Amerindian and European ancestry ($\delta > 0.44$) [8] were genotyped in the case-control sample.

Genotyping was performed using TaqMan Probes (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems) and/or KASPAR assays (Kbioscience, U.K. <http://www.kbioscience.co.uk/>). Call rate exceeded 95% for all SNPs tested, with no discordant genotypes in 10% of duplicate samples. In addition, all

samples were genotyped for rs756605 (*INSIG2*) using both methods, finding no discordant genotypes. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was not observed for any SNPs in any group ($P > 0.05$).

Statistical analyses

Associations of each SNP with obesity were tested using logistic regression analysis. The AdmixMap program was used to test the possible effect of population stratification on associations with obesity [25,26]. Because the Mexican-Mestizo population derived mainly from Amerindian and European (Spanish) populations, the model included two primary parental populations. Admixmap fits a logistic regression model of the trait on individual admixture, and it allows the inclusion of covariates such as age and sex. All associations were tested for additive, dominant and recessive inheritance models, reporting the most significant. To assess the combined effect of risk alleles, we calculated genotype score counting the number of risk alleles through a logistic model adjusted for age, sex and admixture.

All obesity-related quantitative variables were transformed to normal distribution with a mean of zero and standard deviation (SD) of one in each study separately using inverse normal transformation. Effect sizes were compared across traits and age groups using linear regression analysis. Combined association tests for obesity quantitative traits in children and adult populations and among Indigenous populations were conducted using a Mantel–Haenszel-like model. The combined estimated effect was computed as weighted average of the individual estimated effects using weights proportional to the inverse of the standard errors squared [27]. Cochran's Q test was used to analyze heterogeneity among study populations [28]. All statistical analyses were performed using SPSS (version 16.0; Chicago, IL). Because the majority of the SNPs analyzed were well validated variants, a P -value threshold < 0.05 was used for declaring significant association.

Results

Case-control study

Of the 9 biological candidate variants, only *NR3C1* rs56149945 showed a very low minor allele frequency (< 0.01), and was thus excluded from the analyses. Only 2 of the 8 SNPs previously associated with obesity using this approach showed significant association in the Mexican population. *ADIPOQ* rs2241766 showed a nominal significant association with overall obesity (OR 2.34, $P_{rec} = 0.033$, recessive model), and *UCP3* rs1800849 was significantly associated only with class I/II obesity (OR 1.33, $P_{add} = 0.050$, additive model; Table 1).

On the other hand, 5 of the 17 SNPs previously identified as obesity risk alleles by GWAS showed overall significant associations with obesity in the Mexican population (Table 1): *FTO* rs9939609 (OR 1.42, $P_{add} = 0.001$), *TMEM18* rs6548238 (OR 1.57, $P_{add} = 0.003$), *INSIG2* rs7566605 (OR 1.33, $P_{add} = 0.006$), *FAIM2/BCDIN3* rs7138803 (OR 1.88, $P_{rec} = 0.034$), and *BDNF* rs6265 (OR 1.33, $P_{rec} = 0.044$). On stratifying by obesity class, *SH2B1* rs7498665 was associated with class I/II obesity (OR 1.21, $P_{add} = 0.047$), and *MCR4* rs17782313 was associated with class III obesity (OR 1.85, $P_{add} = 0.003$). Interestingly, although *FTO* showed an overall association with obesity, the strongest and most significant association was observed for class III obesity ($P_{add} = 4 \times 10^{-6}$). Heterogeneity in effect sizes between class I/II and class III obesity was statistically significant only for *FTO* rs9939609 ($P_{het} = 0.031$) and borderline significant for *MCR4* rs17782313 ($P_{het} = 0.050$). All risk alleles significantly associated with obesity were consistent with those previously reported, except for *INSIG2* rs7566605 as the

risk allele is “C” in Europeans and “G” in the Mexican population. All associations remained significant after adjusting for admixture, except for that with the *UCP3* locus (Table 1).

When we examined the joint effects of the nine SNPs nominally associated with obesity, there was a significant increase in obesity risk with increasing mean number or risk alleles (\pm SD) adjusted for age, sex and admixture. Mean number of risk alleles was lower in normal weight (5.04 ± 1.49) than in class I/II obese (5.36 ± 1.53) and class III obese individuals (5.49 ± 1.59) (OR 1.16 95% CI 1.04–1.29, $P = 0.007$ and OR 1.22 95% CI 1.06–1.40, $P = 0.006$, respectively).

Cohort Studies: Associations with obesity-related traits in adults and children

We genotyped 12 SNPs in the 3 independent cohorts samples, including 9 SNPs showing significant association with obesity in the case-control study, plus 3 SNPs with $P < 0.20$ in order to include polymorphisms which may have not reached nominal significance because of weaker effect and/or reduced sample size. Table 2 summarizes the results of associations with BMI and WC in each cohort and in the combined sample. Four loci (*FAIM2/BCDIN3*, *TMEM18*, *INSIG2* and *KCTD15*) were significantly associated with BMI in adults, while only 2 loci (*FAIM2/BCDIN3* and *GNPDA2*) were significantly associated with BMI in children. In the combined analysis of Mexican-mestizo children and adults, 5 SNPs located at or near *FAIM2/BCDIN3*, *TMEM18*, *INSIG2*, *GNPDA2* and *SEC16B/RASAL2* were significantly associated with BMI and/or WC ($P < 0.05$). Three of these genes (*FAIM2/BCDIN3*, *TMEM18*, and *INSIG2*) also showed the strongest associations with obesity in the case-control study. *FAIM2/BCDIN3* rs7138803 showed the strongest and most significant effect on BMI in both children and adults. The presence of two risk A allele copies represent an increase of 0.505 SD unit of BMI equivalent to 2.6 kg/m² in adults ($P_{rec} = 0.001$), and a increase of 0.334 SD unit of BMI equivalent to 1.48 kg/m² in children ($P_{rec} = 0.008$). Of note, *FTO* and *MCR4* variants were not significantly associated with BMI/WC variation in children, adults or in the combined analysis, which is consistent with their association mainly with class III obesity.

While there was no heterogeneity in effect size on BMI between adult and children populations, the effect size of *TMEM18* rs6548238 on waist circumference was significantly heterogeneous ($P_{het} = 0.038$) as it was approximately 3 fold higher in adults than in children (Table 2). Interestingly, although *SH2B1* rs7498665 was not significantly associated with waist circumference in children or adults, heterogeneity in effect size was statistically significant ($P_{het} = 0.042$), as adults bearing the “G” allele showed increased waist circumference, while children bearing this allele showed decreased waist circumference.

Table S2 shows associations of the 12 gene variants analyzed with biochemical measurements in children and adults. No significant associations of these SNPs with biochemical parameters were observed in the combined analysis. However, in adults the *MCR4* rs17782313 obesity-risk allele was associated with increased glucose levels ($P_{add} = 0.034$), *TMEM18* rs6548238 and *FTO* rs9939609 were associated with lower fasting insulin levels ($P_{add} = 0.013$ and 0.050, respectively), while *FTO* was associated with lower triglyceride levels ($P_{add} = 0.048$) and *BDNF* was associated with higher triglyceride levels ($P_{rec} = 0.047$). In children, only *INSIG2* and *BDNF* were significantly associated with higher and lower triglyceride levels ($P_{add} = 0.004$ and $P_{rec} = 0.006$, respectively).

Table 1. Associations of Candidate SNP loci with Obesity in the Mexican Population.

Nearest gene	Chr	SNP	Ref allele	Test allele	Overall obese vs. normal weight			Class I/II obese vs. normal weight			Class III obese vs. normal weight			
					OR (95% CI)	<i>a</i> P	<i>b</i> P	OR (95% CI)	<i>a</i> P	<i>b</i> P	OR (95% CI)	<i>a</i> P	<i>b</i> P	<i>P</i> -Het
Biological candidates														
ADIPOQ	3	rs2241766	G	G	2.34 (1.07–5.12)	0.033	0.033	2.76 (1.23–6.19)	0.014	0.017	1.26 (0.37–4.22)	0.713	0.722	0.289
UCP3	11	rs1800849	C	C	1.25 (0.97–1.62)	0.085	0.086	1.33 (1.00–1.77)	0.050	0.061	1.09 (0.77–1.56)	0.632	0.667	0.398
ADRB3	12	rs4994	T	C	1.15 (0.89–1.48)	0.297	0.316	1.16 (0.88–1.52)	0.293	0.412	1.13 (0.81–1.58)	0.480	0.341	0.910
PPARG	3	rs3856806	C	T	1.18 (0.86–1.62)	0.313	0.315	1.14 (0.81–1.61)	0.442	0.447	1.28 (0.85–1.94)	0.240	0.268	0.678
ADRB2	5	rs1042719	G	C	1.09 (0.89–1.34)	0.408	0.447	1.12 (0.90–1.39)	0.326	0.421	1.03 (0.78–1.36)	0.853	0.761	0.638
UCP2	11	rs659366	C	T	1.08 (0.89–1.33)	0.436	0.438	1.06 (0.86–1.32)	0.581	0.581	1.14 (0.87–1.49)	0.357	0.365	0.709
LEPR	1	rs1137101	G	A	1.05 (0.85–1.30)	0.625	0.625	1.05 (0.83–1.31)	0.700	0.729	1.06 (0.80–1.41)	0.668	0.694	0.927
GNB3	12	rs5443	T	C	1.02 (0.84–1.23)	0.853	0.857	0.93 (0.76–1.15)	0.517	0.513	1.21 (0.92–1.59)	0.176	0.139	0.142
GWAS candidates														
FTO	16	rs9939609	A	A	1.42 (1.15–1.76)	0.001	0.003	1.19 (0.93–1.52)	0.174	0.146	1.88 (1.44–2.45)	3.4 × 10 ⁻⁶	1.8 × 10 ⁻⁵	0.031
TMEM18	2	rs6548238	C	C	1.57 (1.17–2.12)	0.003	0.001	1.74 (1.23–2.46)	0.002	0.004	1.29 (0.87–1.91)	0.200	0.028	0.260
INSIG2	2	rs7566605	C	G	1.33 (1.08–1.63)	0.006	0.006	1.38 (1.10–1.74)	0.005	0.006	1.23 (0.92–1.63)	0.161	0.114	0.511
FAIM2/BCDIN3	12	rs7138803	A	A	1.88 (1.05–3.37)	0.034	0.039	1.93 (1.03–3.61)	0.040	0.024	1.76 (0.84–3.65)	0.132	0.266	0.850
BDNF	11	rs6265	G	G	1.33 (1.01–1.74)	0.044	0.043	1.21 (0.89–1.63)	0.222	0.231	1.59 (1.09–2.32)	0.017	0.014	0.269
SH2B1	16	rs7498665	G	G	1.12 (0.94–1.33)	0.195	0.175	1.21 (1.00–1.46)	0.047	0.050	0.97 (0.78–1.22)	0.799	0.955	0.230
GNPDA2	4	rs10938397	G	G	1.13 (0.95–1.36)	0.117	0.183	1.18 (0.97–1.44)	0.097	0.070	1.05 (0.82–1.33)	0.709	0.946	0.443
MC4R	18	rs17782313	C	C	1.24 (0.89–1.72)	0.198	0.206	0.98 (0.68–1.42)	0.923	0.880	1.85 (1.23–2.80)	0.003	0.012	0.050
KCTD15	19	rs29941	C	C	1.13 (0.92–1.38)	0.237	0.163	1.14 (0.92–1.42)	0.234	0.052	1.13 (0.88–1.46)	0.342	0.828	0.958
SEC16B/RASAL2	1	rs10913469	C	C	1.10 (0.88–1.36)	0.410	0.413	1.24 (0.98–1.56)	0.072	0.111	0.79 (0.57–1.09)	0.151	0.276	0.070

Table 1. Cont.

Nearest gene	Chr	SNP	Ref allele	Test allele	Overall obese vs. normal weight			Class I/II obese vs. normal weight			Class III obese vs. normal weight			
					OR (95% CI)	^a P	^b P	OR (95% CI)	^a P	^b P	OR (95% CI)	^a P	^b P	P-Het
<i>NEGR1</i>	1	rs2815752	T	T	1.08 (0.88–1.31)	0.468	0.451	1.08 (0.86–1.34)	0.506	0.621	1.10 (0.84–1.43)	0.495	0.342	0.923
<i>NPC1</i>	18	rs1805081	A	G	1.07 (0.85–1.35)	0.585	0.567	1.15 (0.90–1.48)	0.269	0.228	0.87 (0.64–1.18)	0.396	0.338	0.130
<i>SFRF10/ETVS</i>	3	rs7647305	C	C	1.08 (0.81–1.44)	0.601	0.607	1.19 (0.87–1.64)	0.283	0.304	0.92 (0.64–1.32)	0.646	0.729	0.293
<i>MAF</i>	16	rs1424233	A	A	1.04 (0.83–1.32)	0.714	0.700	1.07 (0.84–1.37)	0.567	0.516	0.92 (0.67–1.26)	0.603	0.559	0.446
<i>PRL</i>	6	rs4712652	A	A	1.02 (0.82–1.26)	0.891	0.958	1.10 (0.87–1.39)	0.424	0.704	0.86 (0.64–1.15)	0.310	0.554	0.195
<i>MTCH2</i>	11	rs10838738	G	G	1.03 (0.83–1.28)	0.764	0.958	1.06 (0.84–1.33)	0.651	0.651	1.00 (0.76–1.32)	0.991	0.971	0.782
<i>PTER</i>	10	rs10508503	C	T	1.03 (0.55–1.93)	0.919	0.918	1.17 (0.61–2.26)	0.630	0.605	0.77 (0.30–1.94)	0.572	0.613	0.960

Chr, chromosome; CI, confidence interval; OR, odds ratio; P-Het, P-heterogeneity. SNPs were ranked by P-values. Statistically significant associations are bold-faced. ^aP-values were adjusted for age and sex, and ^bP-values were further adjusted for admixture. All P-values were tested under an additive model (*P*_{add}), except those reported for *ADIPOQ*, *BCDIN3/FAIM2* and *BDNF* genes which were analyzed under a recessive model (*P*_{rec}). doi:10.1371/journal.pone.0070640.t001

Table 2. Associations of 12 loci with BMI and WC in Mexican Adults and Children.

Trait	Nearest gene	SNP	Risk Chr allele	Adults (n = 945)			Children (n = 1218)			All subjects (n = 2163)			
				RAF	Effect size (SE)	P	RAF	Effect size (SE)	P	Effect size (SE)	P	P-Het	
BMI	<i>ADIPOQ</i>	rs2241766	3 G	17.6	0.14 (0.18)	0.420	18.2	0.05 (0.16)	0.757	0.09 (0.12)	0.442	0.695	
	<i>UCP3</i>	rs1800849	11 T	12.8	-0.01 (0.07)	0.855	11.2	0.03 (0.061)	0.597	0.01 (0.05)	0.789	0.625	
	<i>FTO</i>	rs9939609	16 A	19.4	0.05 (0.06)	0.392	18.1	0.08 (0.05)	0.125	0.07 (0.04)	0.085	0.757	
	<i>TMEM18</i>	rs6548238	2 C	92.5	0.25 (0.09)	0.005	91.1	0.09 (0.07)	0.149	0.15 (0.05)	0.004	0.166	
	<i>INSIG2</i>	rs7566605	2 G	76.6	0.15 (0.06)	0.007	73.4	0.03 (0.05)	0.475	0.08 (0.04)	0.024	0.095	
	<i>FAIM2/BCDIN3</i>	rs7138803	12 A	20.8	0.51 (0.15)	0.001	21.2	0.33 (0.13)	0.008	0.40 (0.09)	3.5 × 10⁻⁵	0.388	
	<i>BDNF</i>	rs6265	11 G	86.4	0.03 (0.08)	0.684	84.6	0.02 (0.06)	0.728	0.03 (0.05)	0.598	0.917	
	<i>GNPDA2</i>	rs10938397	4 G	35.6	0.08 (0.05)	0.106	35.2	0.09 (0.04)	0.021	0.09 (0.03)	0.005	0.810	
	<i>SH2B1</i>	rs7498665	16 G	49.9	0.06 (0.05)	0.181	50.3	-0.03 (0.04)	0.447	0.01 (0.03)	0.787	0.127	
	<i>MC4R</i>	rs17782313	18 C	7.3	-0.04 (0.09)	0.690	8.2	-0.04 (0.07)	0.607	-0.04 (0.06)	0.515	0.993	
	<i>KCTD15</i>	rs29941	19 C	62.6	0.11 (0.05)	0.020	55.2	0.02 (0.04)	0.658	0.054 (0.03)	0.072	0.121	
	<i>SEC16B/RASAL2</i>	rs10913469	1 C	20.4	0.07 (0.06)	0.210	20.5	0.06 (0.05)	0.243	0.06 (0.04)	0.090	0.861	
	WC	<i>ADIPOQ</i>	rs2241766	3 G	17.6	0.01 (0.17)	0.944	18.2	0.15 (0.16)	0.339	0.09 (0.12)	0.451	0.555
		<i>UCP3</i>	rs1800849	11 T	12.8	-0.05 (0.07)	0.431	11.2	0.05 (0.06)	0.402	0.01 (0.04)	0.931	0.253
		<i>FTO</i>	rs9939609	16 A	19.4	0.05 (0.06)	0.394	18.1	0.04 (0.05)	0.354	0.05 (0.04)	0.209	0.936
<i>TMEM18</i>		rs6548238	2 C	92.5	0.31 (0.09)	3.4 × 10⁻⁴	91.1	0.08 (0.07)	0.200	0.17 (0.05)	0.001	0.038	
<i>INSIG2</i>		rs7566605	2 G	76.6	0.15 (0.05)	0.007	73.4	0.04 (0.04)	0.321	0.08 (0.03)	0.014	0.143	
<i>FAIM2/BCDIN3</i>		rs7138803	12 A	20.8	0.62 (0.15)	3.3 × 10⁻⁵	21.2	0.28 (0.12)	0.024	0.42 (0.09)	1.1 × 10⁻⁵	0.082	
<i>BDNF</i>		rs6265	11 G	86.4	-0.03 (0.07)	0.692	84.6	0.04 (0.06)	0.450	0.02 (0.05)	0.741	0.437	
<i>GNPDA2</i>		rs10938397	4 G	35.6	0.11 (0.05)	0.021	35.2	0.04 (0.04)	0.304	0.07 (0.03)	0.023	0.274	
<i>SH2B1</i>		rs7498665	16 G	49.9	0.07 (0.04)	0.106	50.3	-0.05 (0.04)	0.229	0.01 (0.03)	0.903	0.042	
<i>MC4R</i>		rs17782313	18 C	7.3	0.03 (0.09)	0.770	8.2	-0.03 (0.07)	0.698	-0.01 (0.05)	0.908	0.639	
<i>KCTD15</i>		rs29941	19 C	62.6	0.08 (0.05)	0.074	55.2	0.03 (0.04)	0.449	0.05 (0.03)	0.082	0.365	
<i>SEC16B/RASAL2</i>		rs10913469	1 C	20.4	0.09 (0.05)	0.099	20.5	0.06 (0.05)	0.193	0.07 (0.03)	0.038	0.698	

Abbreviations: Chr, chromosome; RAF, risk allele frequency; SE, standard error; P-Het, P-heterogeneity; BMI, body mass index; WC, waist circumference. Effect values are presented as effect size per allele copy, except for *ADIPOQ*, *BCDIN3/FAIM2* and *BDNF* analyzed under a recessive model, where effect size is reported for two allele copies. P-values were adjusted for age and sex. Statistically significant associations are bold-faced.
doi:10.1371/journal.pone.0070640.t002

Association with obesity-related traits in Mexican Indigenous Populations

The 12 selected SNPs were genotyped in a total of 543 indigenous Mexicans. Overall, most obesity-risk alleles were less frequent in this group than in Mexican Mestizo and European populations. Comparisons of risk allele frequencies among European, Mestizo and Indigenous Mexican populations are shown in Table S3. Interestingly, only *FTO* rs9939609 was significantly associated with increased BMI, and each copy of the risk A allele increases 0.250 SD unit of BMI equivalent to 1.22 kg/m² ($P_{adj} = 0.045$; Table 3).

Discussion

In the present study, we analyzed 26 SNPs previously associated with obesity in a case-control study in adult Mexican Mestizo subjects. In this population, only 2 of the 8 (25%) biological

candidate genes (*ADIPOQ* and *UCP3*) were associated with obesity, although only *ADIPOQ* remained significant after adjusting for admixture. Given the substantial number of obesity association replications in various ethnicities [5], it is noteworthy that the proportion of these biological candidate genes associated with obesity in the present study was low. However, this is consistent with several other studies failing to show associations with such genes, and the fact that these genes are not significantly associated with obesity in most GWAS [16–18]. In addition, 7 of the 17 (41.2%) GWAS-selected genes (*FTO*, *TMEM18*, *INSIG2*, *FAIM2/BCDIN3*, *BDNF*, *SH2B1* and *MC4R*) were associated with obesity in this population. This proportion is similar to that reported in other studies seeking to replicate associations of these variants with obesity [29–31]. Thus, it is clear that some of the previously obesity-associated variants identified in Europeans also confer susceptibility to obesity in Mexican population. Interestingly, the significant ORs observed here were higher, although P-values were

Table 3. Association of 12 loci with BMI in Indigenous Mexican population.

Trait	Nearest gene	SNP	Chr	Risk allele	RAF	Effect size (SE)	P
BMI	<i>ADIPOQ</i>	rs2241766	3	G	20.34	-0.16 (0.22)	0.454
	<i>UCP3</i>	rs1800849	11	C	10.90	-0.02 (0.09)	0.808
	<i>FTO</i>	rs9939609	16	A	5.50	0.25 (0.13)	0.045
	<i>TMEM18</i>	rs6548238	2	C	94.24	0.07 (0.13)	0.562
	<i>INSIG2</i>	rs7566605	2	G	77.04	-0.02 (0.07)	0.804
	<i>FAIM2/BCDIN3</i>	rs7138803	12	A	16.42	0.05 (0.27)	0.844
	<i>BDNF</i>	rs6265	11	G	89.50	0.06 (0.10)	0.525
	<i>GNPDA2</i>	rs10938397	4	G	29.58	-0.01 (0.06)	0.864
	<i>SH2B1</i>	rs7498665	16	G	44.01	0.06 (0.06)	0.310
	<i>MC4R</i>	rs17782313	18	C	1.52	0.36 (0.20)	0.077
	<i>KCTD15</i>	rs29941	19	C	52.53	-0.04 (0.06)	0.518
	<i>SEC16B/RASAL2</i>	rs10913469	1	C	27.22	-0.07 (0.07)	0.308

Abbreviations: Chr, chromosome; RAF, risk allele frequency; SE, standard error; P-Het, P-heterogeneity; BMI, body mass index. Effect values are presented as effect size per allele copy, except for *ADIPOQ*, *BCDIN3/FAIM2* and *BDNF* analyzed under a recessive model, where effect size is reported for two allele copies. P-values were adjusted for age and sex. Statistically significant associations are bold-faced.

doi:10.1371/journal.pone.0070640.t003

lower than those reported in the original studies [12–18], which may be explained by the smaller sample size analyzed in this study.

FTO, *TMEM18* and *INSIG2* variants showed the most significant associations with obesity in this population. *FTO* and *TMEM18* are probably the most replicated genes showing the strongest and most significant effects in various different populations [30,32–34]. One of the most notable results is the association of obesity with *INSIG2*, as previous studies have shown conflicting results and few studies have replicated this association [35–38]. Moreover, in contrast to the original report of Herbert et al. [12], we found that the G and not the C allele confers risk for obesity. Linkage disequilibrium with other variants may explain this inverse association.

Interestingly, *FTO*, *MC4R* and *BDNF* loci were most significantly associated with class III obesity. The association of *FTO* rs9939609 with class III obesity has been previously observed in the Mexican and several other populations [8,14,39,40]. On the other hand, *MC4R* and *BDNF* mutations are known to cause monogenic obesity [41,42], and common variation in these genes has also been previously associated with severe obesity [15–18]. The more significant association with class III obesity may be explained by the presence of rare functional variants in high LD with the variants studied here.

Seventeen of the 25 SNPs analyzed failed to show associations with obesity in the Mexican population. However, the trend of association for most GWAS-selected SNPs was in the same direction as the initially reported findings. Considering that ORs reported in Europeans were around 1.1 for these 21 SNPs [5,16–18], and that most risk alleles were less frequent in Mexican Mestizos than in Europeans, the lack of association observed here may be due to insufficient statistical power (range 6.3%–72.7% for 13 of these SNPs). Further studies in larger samples are necessary to confirm whether these 13 or other SNPs contribute to the risk of obesity in Mexicans.

Some of the obesity-associated genes in this study have known functions, *ADIPOQ* is known to decrease body weight by increasing lipid oxidation in muscles and other organs [43], and *UCP3* plays an important role in human energy homeostasis [44]. However, little is known about the mechanisms responsible for associations of the majority of GWAS loci with obesity. Because *FTO*, *TMEM18*, *MC4R*, *FAIM2/BCDIN3*, *KCTD15* and *GNPDA2* are specifically expressed in hypothalamic regions [16,17], it has been suggested that the associations may result from neuronal effect on energy balance. However, many of these loci are located near multiple genes, and the causal variants need to be identified.

Although nominal significant associations of 12 SNPs with risk of obesity were found in the case-control study, not all were associated with BMI and/or WC in the population-based studies. Only the *FAIM2/BCDIN3* variant was associated with both BMI and WC in children and adults, suggesting that the obesogenic effect of this variant is present since early ages. This is consistent with previous reports [45,46]. In contrast, other SNPs showed differences according to age group. In adults, *TMEM18*, *INSIG2* and *KCTD15* were significantly associated with BMI, while in children only *GNPDA2* showed a significant association. The replication of the *GNPDA2* locus is consistent with a previous report in Mexican children [10].

It is noteworthy that, although *FTO* was most significantly associated with obesity in the case-control study, its association with BMI did not reach statistical significance in children, adults or in the combined analyses ($P_{\text{add}} = 0.125, 0.392$ and 0.085 , respectively). However, the direction of effect in both groups was consistent with the previous observation on obesity risk in Mexicans [8]. The lack of association of *FTO* with BMI in children is in accordance with a longitudinal study on the life course effects of *FTO*, which is weaker in childhood and strengthens up to age 20 years [47]. Moreover, the lack of association of *FTO* with BMI in adults is consistent with its most significant association with class III obesity, and the fact that only 2% of the adults included in this cohort had this class of obesity. The latter may also explain the lack of association of *MC4R* and *BDNF* with BMI in adults.

Based on linear regression analyses, the 12 obesity-associated SNPs in the current study explained only 3.3% and 1.1% of the variation in BMI in adults and children. This suggests that many more common variants with small effects, and perhaps rare variants with larger effect, remain to be identified to account for even the lower end of estimated heritability of BMI in Mexican populations (range 36–62%) [48,49]. Because genes are non-modifiable risk factors, the identification of obesity-related genes is only the first step in an attempt to understand this complex disease. Gene-environment or gene-diet interactions need to be explored to provide information that may help establish preventive measures.

Interestingly, we confirmed the effect of the *FTO* locus on obesity in adult indigenous Mexican populations, despite of lower frequency of risk allele as compared to Europeans. This finding is consistent with previous observations in Pima Indians [50]. For the remaining 11 obesity loci analyzed, no association with BMI was observed. Differences in allele frequencies and LD between populations may have masked possible associations. Moreover, due to the small effects reported for these variants, the sample size of our study may not have the power to detect all associations.

In conclusion, this is the first study analyzing several obesity-associated SNPs in Mexican adults, children and Indigenous populations. The study replicates the association of 8 SNPs with obesity risk in Mexican adults, and confirms the role of some of these SNPs in BMI of Mexican mestizo children and adults, and

Mexican Indigenous populations. Our results suggest that obesity risk loci identified in Europeans also confer risk for obesity and increased BMI in Mexicans, and that diverse ethnic groups share some degree of genetic predisposition to obesity.

Supporting Information

Table S1 Anthropometric characteristics of case and control subjects.
(DOC)

Table S2 Associations of 12 loci with Biochemical Characteristics in Mexican Adults and Children.
(DOC)

References

- Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J (2008) Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes* 32: 1431–1437.
- Secretaría de Salud – Instituto Nacional de Salud Pública. (2012) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.
- Stoddard P, Handley MA, Vargas-Bustamante A, Schillinger D (2011) The influence of indigenous status and community indigenous composition on obesity and diabetes among Mexican adults. *Soc Sci Med* 73: 1635–1643.
- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ (2007) Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 27: 325–351.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, et al. (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* (Silver Spring) 14: 529–644.
- Day FR, Loos RJ (2011) Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4: 222–238.
- Canizales-Quintero S, Aguilar-Salinas CA, Ortíz-López MG, Rodríguez-Cruz M, Villarreal-Molina MT, et al. (2007) Association of PPARG2 Pro12Ala variant with larger body mass index in Mestizo and Amerindian populations of Mexico. *Hum Biol* 79: 111–119.
- Villarreal-Compañán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, Rodríguez-Cruz M, García-Ulloa AC, et al. (2008) The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity* (Silver Spring) 16: 2296–2301.
- Villarreal-Compañán M, Villamil-Ramírez H, Villarreal-Molina T, Larrieta-Carrasco E, León-Mimila P, et al. (2012) PCSK1 rs6232 is associated with childhood and adult class III obesity in the Mexican population. *PLoS One* 7: e39037.
- Mejía-Benitez A, Klunder-Klunder M, Yengo L, Meyre D, Aradillas C, et al. (2013) Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Med Genet* 1: 14–21.
- Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, et al. (2009) Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8611–8616.
- Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A, et al. (2006) A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* 312: 279–283.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, et al. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316: 889–894.
- Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, et al. (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39: 724–726.
- Loos RJF, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, et al. (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 40: 768–775.
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, et al. (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 41: 25–34.
- Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, et al. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41: 18–24.
- Meyre D, Delplanque J, Chèvre JC, Lecoq C, Lobben S, et al. (2009) Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet* 41: 157–159.
- Flores-Dorantes T, Arellano-Campos O, Posadas-Sánchez R, Villarreal-Molina T, Medina-Urrutia A, et al. (2010) Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children. *Clin Chim Acta* 411: 1214–1217.
- Lohman T, Martorell R, Roche AF (1988) Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL: Human Kinetics Books.
- World Health Organization (WHO) (2000) Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *Tech Rep Ser* 894: 1–253.
- Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, et al. (2002) CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 246: 1–190.
- Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villarreal-Compañán M, et al. (2007) 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* 56: 1881–1887.
- Levy JC, Matthews DR, Hermans MP (1998) Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 21: 2191–2192.
- Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, et al. (2003) Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* 72: 1492–1504.
- Hoggart CJ, Shriver MD, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM (2004) Design and analysis of admixture mapping studies. *Am J Hum Genet* 74: 965–978.
- Helgason A, Pálsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, et al. (2007) Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet* 39: 218–225.
- Zeggini E, Ioannidis JP (2009) Meta-analysis in genome-wide association studies. *Pharmacogenomics* 10: 191–201.
- Sandholt CH, Vestmar MA, Bille DS, Borglykke A, Almird K, et al. (2011) Studies of Metabolic Phenotypic Correlates of 15 Obesity Associated Gene Variants. *PLoS One* 6: e23531.
- Hotta K, Nakamura M, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, et al. (2009) Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM18, GNPDA2, BDNF, FAIM2 and MC4R in Japanese population. *J Hum Genet* 54: 727–731.
- Ng MC, Tam CH, So WY, Ho JS, Chan AW, et al. (2010) Implication of genetic variants near NEGR1, SEC16B, TMEM18, ETV5/DGKG, GNPDA2, LIN7C/BDNF, MTH2, BCDIN3D/FAIM2, SH2B1, FTO, MC4R, and KCTD15 with obesity and type 2 diabetes in 7705 Chinese. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2418–25.
- Renstrom F, Payne F, Nordstrom A, Brito E, Rolandsson O, et al. (2009) Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet* 18: 1489–1496.
- Li S, Zhao JH, Luan J, Luben RN, Rodwell SA, et al. (2010) Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies. *Am J Clin Nutr* 91: 184–190.
- Reuskas K, Kouvasi A, Pateas K, Papazoglou D, Tsapas A, et al. (2012) Common variants in FTO, MC4R, TMEM18, PRL, AIF1, and PSCK1 show evidence of association with adult in the Greek population. *Obesity* (Silver Spring) 20: 389–395.
- Dina C, Meyre D, Samson C, Tichet J, Marre M, et al. (2007) Comment on “A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity”. *Science* 315: 187.
- Lyon HN, Emilsson V, Hinney A, Heid IM, Lasky-Su J, et al. (2007) The association of a SNP upstream of INSL2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoS Genet* 27: e61.
- Hotta K, Nakamura M, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, et al. (2008) INSL2 gene rs7566605 polymorphism is associated with severe obesity in Japanese. *J Hum Genet* 53: 857–862.
- Bressler J, Fornaje M, Hanis CL, Kao WH, Lewis CE, et al. (2009) The INSL2 rs7566605 genetic variant does not play a major role in obesity in a sample of 24,722 individuals from four cohorts. *BMC Med Genet* 12: 56.
- Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, et al. (2008) Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet* 53: 546–553.
- Cotsapas C, Speliotes EK, Hatoum IJ, Greenawald DM, Dobrin R, et al. (2009) Common body mass index-associated variants confer risk of extreme obesity. *Hum Mol Genet* 18: 3502–3507.

41. Farooqui IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, et al. (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with the melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106: 271–279.
42. Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, et al. (2006) Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 55: 3366–3371.
43. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, et al. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941–946.
44. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, et al. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15: 269–272.
45. Mei H, Chen W, Jiang F, He J, Srinivasan S, et al. (2012) Longitudinal replication studies of GWAS risk SNPs influencing body mass index over the course of childhood and adulthood. *PLoS One* 7: e31470.
46. Dorajoo R, Blaquemore AI, Sim X, Ong RT, Ng DP, et al. (2012) Replication of 13 obesity loci among Singaporean Chinese, Malay and Asian-Indian population. *Int J Obes (Lond)* 36: 159–163.
47. Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, et al. (2010) Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum Mol Genet* 19: 545–552.
48. Bastarrachea RA, Kent JW Jr, Rozada G, Cole SA, López-Alvarenga JC, et al. (2007) Heritability and genetic correlations of metabolic disease-related phenotypes in Mexico: preliminary report from the GEMM Family Study. *Hum Biol* 79: 121–129.
49. Li X, Quiñonez MJ, Wang D, Bulnes-Enriquez I, Jiménez X, et al. (2006) Genetic effects on obesity assessed by bivariate genome scan: the Mexican-American coronary artery disease study. *Obesity (Silver Spring)* 14: 1192–1200.
50. Rong R, Hanson RL, Ortíz D, Wiedrich C, Kobes S, et al. (2009) Association analysis of variation in/near FTO, CDKAL1, SLC30A8, HHEX, EXT2, IGF2BP2, LOC387761, and CDKN2B with type 2 diabetes and related quantitative traits in Pima Indians. *Diabetes* 58: 478–488.



A genetic risk score is associated with hepatic triglyceride content and non-alcoholic steatohepatitis in Mexicans with morbid obesity



Paola León-Mimila^{a,b}, Joel Vega-Badillo^{a,b}, Roxana Gutiérrez-Vidal^{a,b}, Hugo Villamil-Ramírez^b, Teresa Villareal-Molina^c, Elena Larrieta-Carrasco^d, Blanca E. López-Contreras^b, Luis R. Macías Kauffer^b, Diana G. Maldonado-Pintado^e, Nahúm Méndez-Sánchez^f, Armando R. Tovar^g, Rogelio Hernández-Pando^h, Rafael Velázquez-Cruz^c, Francisco Campos-Pérez^e, Carlos A. Aguilar-Salinasⁱ, Samuel Canizales-Quinteros^{b,*}

^a Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

^b Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), México City 14610, Mexico

^c Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares y Óseas, INMEGEN, México City 14610, Mexico

^d Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), México City 14000, Mexico

^e Clínica de Obesidad, Hospital Rubén Leñero, México City 11340, Mexico

^f Unidad de Investigación de Hígado, Fundación Médica Sur, México City 14050, Mexico

^g Departamento de Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ, México City 14000, Mexico

^h Departamento de Patología Experimental, INCMNSZ, México City 14000, Mexico

ⁱ Departamento de Endocrinología y Metabolismo, INCMNSZ, México City 14000, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2014

and in revised form 13 January 2015

Accepted 14 January 2015

Available online 15 January 2015

Keywords:

Liver fat content

NASH

NAFLD

Polymorphisms

GRS

ABSTRACT

Background and aims: Genome-wide association studies have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) near/in *PNPLA3*, *NCAN*, *LYPLAL1*, *PPP1R3B*, and *GCKR* genes associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mainly in individuals of European ancestry. The aim of the study was to test whether these genetic variants and a genetic risk score (GRS) are associated with elevated liver fat content and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in Mexicans with morbid obesity.

Methods: 130 morbidly obese Mexican individuals were genotyped for six SNPs in/near *PNPLA3*, *NCAN*, *LYPLAL1*, *PPP1R3B*, and *GCKR* genes. Hepatic fat content [triglyceride (HTG) and total cholesterol (HTC)] was quantified directly in liver biopsies and NASH was diagnosed by histology. A GRS was tested for association with liver fat content and NASH using logistic regression models. In addition, 95 ancestry-informative markers were genotyped to estimate population admixture proportions.

Results: After adjusting for age, sex and admixture, *PNPLA3*, *LYPLAL1*, *GCKR* and *PPP1R3B* polymorphisms were associated with higher HTG content ($P < 0.05$ for *PNPLA3*, *LYPLAL1*, *GCKR* polymorphisms and $P = 0.086$ for *PPP1R3B*). The GRS was significantly associated with higher HTG and HTC content ($P = 1.0 \times 10^{-4}$ and 0.048, respectively), steatosis stage ($P = 0.029$), and higher ALT levels ($P = 0.002$). Subjects with $\text{GRS} \geq 6$ showed a significantly increased risk of NASH (OR = 2.55, $P = 0.045$) compared to those with $\text{GRS} \leq 5$. However, the GRS did not predict NASH status, as AUC of ROC curves was 0.56 ($P = 0.219$).

Conclusion: NAFLD associated loci in Europeans and a GRS based on these loci contribute to the accumulation of hepatic lipids and NASH in morbidly obese Mexican individuals.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The prevalence of obesity is rapidly increasing worldwide (Kelly et al., 2008). Obesity is a primary risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and approximately 95% of morbidly obese

individuals develop NAFLD (Dixon et al., 2001). NAFLD is predicted to become the leading cause of liver disease in the world by 2020 (Bellentani and Marino, 2009), and includes a spectrum of diseases ranging from fatty infiltration (steatosis), fat and inflammation (non-alcoholic steatohepatitis/NASH) to fibrosis/cirrhosis (Farell and Larter, 2006). Nowadays the prevalence of hepatic steatosis is over 50% in some populations and is significantly higher in Hispanics than in black and white Americans (Browning et al., 2004; López-Velázquez et al., 2014). The prevalence of NAFLD is particularly high in morbidly obese subjects of Hispanic origin (Guajardo-Salinas and Hilmy, 2010).

* Corresponding author at: Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, UNAM, INMEGEN, Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Del. Tlalpan, Mexico City 14610, Mexico.

E-mail address: can@unam.mx (S. Canizales-Quinteros).

There is increasing evidence that genetic factors are involved in the development of NAFLD. Recently, large-scale genome-wide association (GWA) studies have identified novel genetic variants associated with NAFLD (Romeo et al., 2008; Speliotes et al., 2011). A single variant (rs738409; I148M) in *PNPLA3* (patatin like phospholipase domain containing protein 3) was strongly associated with increased hepatic fat content, inflammation, fibrosis and hepatic enzyme levels, suggesting that the variant increases the risk of NASH (Romeo et al., 2008; Rotman et al., 2010; Sookoian et al., 2009; Speliotes et al., 2010; Valenti et al., 2010). Additionally, the Genetics of Obesity-related Liver Disease (GOLD) Consortium identified four additional genetic variants that were associated with hepatic steatosis (HS) in or near genes *LYPLAL1* (lysophospholipase like 1), *PPP1R3B* (protein phosphatase 1, regulatory subunit 3b), *NCAN* (neurocan), and *GCKR* (glucokinase regulatory protein) (Speliotes et al., 2011). To date, the association of *PNPLA3*/I148M with NAFLD or transaminase levels has been widely replicated in various populations (Kottronen et al., 2009; Larrieta-Carrasco et al., 2013, 2014), however associations with other variants have not been consistent (Gorden et al., 2013; Hernaez et al., 2013; Lin et al., 2014; Palmer et al., 2013).

In the present study, we investigated whether the NAFLD-associated polymorphisms identified in GWA studies and a genetic risk score (GRS) based on these SNPs are associated with hepatic lipid content (triglycerides and cholesterol) and NAFLD in Mexican subjects with morbid obesity.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

We studied 130 consecutive Mexican Mestizo subjects aged 18 to 59 years with severe obesity (BMI ≥ 40 kg/m²) who underwent bariatric surgery, recruited from the Hospital General Ruben Leñero in Mexico City. Subjects with a history of viral hepatitis, evidence of other concomitant chronic liver disease, or with alcohol consumption >20 g/day were excluded from the study. The protocol was approved by the INMEGEN Ethics Committee. All participants provided written informed consent prior to their inclusion. The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki.

2.2. Anthropometric and biochemical parameters

Clinical and anthropometric data were collected from all participants. Anthropometric measurements were determined as previously described (León-Mimila et al., 2013). BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Morbid obesity status was determined according to WHO (World Health Organization) criteria with a BMI value ≥ 40 kg/m² (WHO, 2000).

Blood samples were taken after a 10-h overnight fast for biochemical measurements. Serum glucose, insulin, triglycerides, total and HDL cholesterol (HDL-C), were measured as previously described (Villarreal-Molina et al., 2007), and insulin sensitivity was calculated using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) index (Matthews et al., 1985). Serum concentrations of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured with commercially available standardized methods (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Serum adiponectin and leptin levels were determined using ELISA methods (Linco, St. Louis, MO). Type 2 diabetes (T2D) was defined as either self-reported use of glucose-lowering medication or fasting plasma glucose levels ≥ 126 mg/dL (ADA, 2010).

2.3. Liver histology

Liver biopsies were collected in RNAlater (Ambion/Applied Biosystems) at the time of surgery and stored at -80 °C. Liver biopsy specimens were fixed in 10% formaldehyde embedded in paraffin, stained

with hematoxylin–eosin and evaluated by an experienced pathologist. Histological characteristics were determined according to the Kleiner scoring system (Kleiner et al., 2005). Steatosis was scored as 0–3, inflammation 0–3, and hepatocellular ballooning 0–2. The sum of these pathological features was used to estimate NAFLD activity score (NAS). All participants were classified as controls (subjects with normal liver histology), individuals with simple steatosis (steatosis grade ranging from 1 to 2 without the presence of inflammation), individuals with possible or borderline NASH (NAS ranging from 3 to 4), and NASH-definite (NAS ≥ 5).

2.4. Measurement of hepatic triglyceride (HTG) and total cholesterol (HTC) content

Liver tissue (50 mg) was homogenized in saline solution (0.9%) and total lipids were extracted according to the method of Folch et al. (1957). Total lipids were extracted and homogenized in chloroform/methanol (2:1 vol/vol). The organic phase was dried under nitrogen stream, lipids were re-suspended in isopropanol and 10% Triton X-100. Triglycerides and total cholesterol concentrations were determined by spectrophotometry (Beckman DU 640, Beckman Instruments, Fullerton, CA), using commercial colorimetric assay kits (Diagnostic Systems, Holzheim, Germany) and normalized to total protein concentration.

2.5. Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral white blood cells using a commercial kit based on the salt fractionation method (QIAamp 96 DNA Blood Kit, Quiagen, Hilden, Germany). Genotyping was performed using pre-designed TaqMan Probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a LightCycler 480 Instrument II, Roche Applied Science, for 6 candidate SNPs: rs738409 (*PNPLA3*), rs12137855 (*LYPLAL1*), rs780094 and rs1260326 (*GCKR*), rs2228603 (*NCAN*) and rs4240624 (*PPP1R3B*). Call rate exceeded 95% for all SNPs tested, with no discordant genotypes in 10% of duplicate samples.

Because the Mexican-Mestizo population is admixed, ancestry informative markers (AIMs) were used to assess whether any association could be confounded by population stratification. A set of 95 AIMs distributed across the genome was genotyped using a GoldenGate BeadArray (Illumina). The AIMs were selected from a published report and distinguish mainly between three continental populations (American, European and African) (Kosoy et al., 2009).

2.6. Construction of the genetic risk score (GRS)

Four SNPs (*PNPLA3*, *LYPLAL1*, *PPP1R3B* and *GCKR*) were used to calculate the combined GRS, which was constructed by summing the number of risk alleles from these 4 SNPs in each individual. rs2228603 (*NCAN*) and rs780094 (*GCKR*) were not included in the GRS estimate because rs2228603 showed a very low allelic frequency (0.02) and rs780094 was in high linkage disequilibrium (LD) with rs1260326 ($D' = 0.92$). A weighted GRS (wGRS) was calculated multiplying the number of risk alleles for each SNP by its estimated effect (beta) obtained from the association analysis for HTG content. Genotypes for each SNP were scored using an additive model (0 for homozygous for the non-risk allele, 1 for heterozygous, and 2 for homozygous for the risk allele).

2.7. Statistical analysis

The chi-square test was used to assess whether the genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and to compare differences in categorical variables. All SNPs were in HWE. General linear models were used to compare mean values of quantitative traits across groups, with adjustment for age and sex. Population admixture proportions were determined using a maximum likelihood method implemented

Table 1
Clinical and biochemical characteristics of the study population.

Trait	All participants (n = 130)	Non-NASH (n = 77)	NASH (n = 53)	P-value
Age (years)	36.97 ± 9.22	37.25 ± 9.55	36.57 ± 8.81	0.680
Sex (male %)	33.08	25.97	43.40	0.038
BMI (kg/m ²)	44.34 ± 5.52	44.12 ± 5.72	44.67 ± 5.26	0.797
Total cholesterol (mg/dL)	173.15 ± 36.86	177.39 ± 35.66	166.98 ± 38.04	0.124
Triglycerides (mg/dL)	135.67 (80.60)	126.00 (75.25)	143.00 (90.25)	0.006
HDL-C (mg/dL)	34.53 ± 10.35	36.88 ± 10.62	31.12 ± 8.98	0.006
Fasting glucose (mg/dL)	99.36 (27.85)	96.33 (19.75)	105.00 (38.08)	0.001
Fasting insulin (μIU/mL)	14.90 (14.63)	12.65 (10.23)	19.10 (28.55)	0.005
HOMA-IR	3.41 (4.57)	3.11 (2.43)	4.88 (10.13)	0.001
T2D (%)	43 (33.1)	18 (23.4)	25 (47.2)	0.005
ALT (IU/L)	29.20 (23.50)	24.67 (21.71)	34.00 (24.33)	0.035
AST (IU/L)	30.75 (30.27)	28.83 (24.50)	34.00 (43.40)	0.070
GGT (IU/L)	18.00 (18.25)	16.00 (18.48)	20.50 (18.75)	0.263
Leptin (ng/mL)	34.41 ± 23.22	31.95 ± 23.25	37.98 ± 22.94	0.061
Adiponectin (μg/mL)	7.10 ± 2.88	7.92 ± 3.14	5.87 ± 1.89	0.001
HTG content (mg/mg protein)	1.050 (2.092)	0.710 (0.839)	2.500 (2.970)	6.3 × 10 ⁻⁸
HTC content (mg/mg protein)	0.100 ± 0.074	0.084 ± 0.049	0.121 ± 0.096	0.010
Steatosis degree (0–3)	1.73 ± 1.03	1.09 ± 0.76	2.66 ± 0.52	3.1 × 10 ⁻²⁵
Hepatocellular ballooning (0–2)	0.96 ± 0.79	0.52 ± 0.60	1.60 ± 0.57	1.1 × 10 ⁻¹⁸
Lobular inflammation (0–3)	1.10 ± 0.90	0.73 ± 0.77	1.64 ± 0.79	1.1 × 10 ⁻⁰⁹
NAS score (0–8)	3.79 ± 2.06	2.34 ± 1.15	5.91 ± 0.93	1.1 × 10 ⁻³⁶

Data are shown as mean ± standard deviations, medians (interquartile range) or n (%).

P values are given for comparison between non-NASH and NASH subjects.

BMI, body mass index; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model insulin resistance; T2D, type 2 diabetes; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; HTG, hepatic triglyceride; and HTC, hepatic total cholesterol.

in the program ADMIXTURE (Alexander et al., 2009); the model included three primary parental populations (American, European and African). Associations of each SNP and GRS with histologic characteristics of NAFLD (HS or NASH status) were tested using logistic regression analysis. Multiple linear regression analysis was performed to test the independent effect of each risk allele or GRS on biochemical and hepatic parameters adjusting for age, gender, BMI and admixture. All associations were tested under additive, dominant and recessive inheritance models, reporting the most significant model. Partial correlation coefficients (r^2) were used to evaluate the degree of variance explained by each allele risk or GRS. A $P < 0.05$ was considered significant. The discriminatory value for NASH risk was assessed by the area under the receiver operating characteristics (ROC) curve in a logistic regression model. Statistical analyses were performed using SPSS statistical software (version 16.0).

3. Results

3.1. Clinical characteristics of the study population

The study included 130 severely obese patients (66.92% were female). Mean age was 36.97 ± 9.22 years, and mean BMI was 44.34 ± 5.52 kg/m²; 53 (40.8%) of these individuals had NASH-definite. Of the 77 remainder individuals without NASH (non-NASH), 15 (11.5%) had

normal liver histology, 27 (20.8%) had simple steatosis, and 35 (26.9%) were borderline or possible NASH (Supplementary Table 1).

The demographic and clinical data of the obese subjects are shown in Table 1. Glucose and lipid metabolism parameters were significantly higher in the NASH group, as was the frequency of T2D ($P < 0.01$). Interestingly, adiponectin and HDL-C levels were significantly lower in NASH individuals ($P = 0.001$ and 0.006 , respectively). As expected, HTG content was up to three-fold higher in NASH than in non-NASH subjects (2.50 vs. 0.71 mg/mg protein, $P = 6.3 \times 10^{-8}$), and HTC content was also higher in NASH compared to non-NASH subjects (0.12 vs. 0.08 mg/mg protein, $P = 0.010$).

3.2. Genetic association with NAFLD histological spectrum

We evaluated whether the selected SNPs were associated with the histological features of liver damage in morbidly obese subjects (Table 2). Of all variants tested, only the *PNPLA3* "G" allele was significantly associated with an increased steatosis stage ($P = 0.011$, after adjustment for age, gender, BMI and admixture). Although the CG/GG genotypes were more frequent in NASH (81.1%) than in non-NASH subjects (68.8%), the difference did not reach statistical significance ($P = 0.209$). We also observed that both the *LYPLAL1* "C" and the *GCKR* "C" risk alleles showed a trend of association with a higher degree of steatosis without reaching statistical significance ($P = 0.105$

Table 2
Association of *PNPLA3*, *GCKR*, *LYPLAL1* and *PPP1R3B* SNPs with steatosis grade and NASH in morbidly obese subjects.

Gene/SNP	<i>PNPLA3</i> rs738409				<i>GCKR</i> rs1260326				<i>LYPLAL1</i> rs12137855				<i>PPP1R3B</i> rs4240624			
	CC	CG	GG	P_{add}	CC	CT	TT	P_{add}	CC	CT	TT	P_{res}	AA	GA	GG	P_{add}
Steatosis grade																
0	7 (46.6)	4 (26.7)	4 (26.7)	0.011	7 (46.7)	5 (33.3)	3 (20)	0.134	10 (66.7)	5 (33.3)	0 (0)	0.105	8 (53.3)	7 (46.7)	0 (0)	0.288
1	15 (33.3)	22 (48.9)	8 (17.8)		18 (40)	21 (46.7)	6 (13.3)		32 (71.1)	10 (22.2)	3 (6.7)		23 (51.1)	19 (42.2)	3 (6.7)	
2	7 (23.3)	18 (60)	5 (16.7)		12 (40)	14 (46.7)	4 (13.3)		22 (73.3)	8 (26.7)	0 (0)		18 (60)	9 (30)	3 (10)	
3	5 (12.5)	19 (47.5)	16 (40)		15 (37.5)	23 (57.5)	2 (5)		35 (87.5)	3 (7.5)	2 (5)		25 (62.5)	11 (27.5)	4 (10)	
NASH status																
Non-NASH	24 (31.2)	35 (45.4)	18 (23.4)	0.209	32 (41.5)	34 (44.2)	11 (14.3)	0.314	56 (72.7)	18 (23.4)	3 (3.9)	0.391	42 (54.5)	31 (40.3)	4 (5.2)	0.219
NASH	10 (18.9)	28 (52.8)	15 (28.3)		20 (37.7)	29 (54.7)	4 (7.6)		43 (81.1)	8 (15.1)	2 (3.8)		32 (60.4)	15 (28.3)	6 (11.3)	

Data express the absolute numbers and percentages of cases. P-values were obtained from logistic regression under an additive model (P_{add}) where effect size is reported per allele copy, except for *LYPLAL1* which was analyzed under a recessive model (P_{res}) where effect size is reported per two allele copies. P-values were obtained from multiple linear regression or logistic regression and adjusted for age, sex, BMI and admixture.

Table 3
Effects of *PNPLA3*, *GCKR*, *LYPLAL1* and *PPP1R3B* SNPs on liver fat content.

Gene	SNP	RA	RAF	HTG content		HTC content	
				Effect (SE)	P-value	Effect (SE)	P-value
<i>PNPLA3</i>	rs738409	G	0.50	0.63 (0.22)	0.013	0.01 (0.01)	0.916
<i>GCKR</i>	rs1260326	C	0.64	0.45 (0.25)	0.049	0.03 (0.01)	0.068
<i>LYPLAL1</i>	rs12137855	C	0.86	0.77 (0.39)	0.039	0.03 (0.02)	0.180
<i>PPP1R3B</i>	rs4240624	G	0.25	0.47 (0.26)	0.086	0.02 (0.01)	0.197

Effect values are presented as effect size per allele copy (additive model), except for *LYPLAL1*, where effect size is reported per two allele copies (recessive model). P-values were obtained from multiple linear regression and adjusted for age, sex, BMI and admixture. Triglyceride values were log transformed for analysis. SNP, single nucleotide polymorphism; RA, risk allele; RAF, risk allele frequency; SE, standard error; HTG, hepatic triglyceride; and HTC, hepatic total cholesterol.

and 0.134 respectively). None of these variants showed a significant association with inflammation or hepatic ballooning grade ($P > 0.10$).

3.3. Genetic effects on hepatic triglyceride (HTG) and total cholesterol (HTC) content

Associations with HTG content were consistent with those previously observed for steatosis stages. For each copy of the *PNPLA3* “G” risk allele, HTG content increased around 35% ($P = 0.013$). In the same manner, *LYPLAL1* and *GCKR* risk variants showed a significant association with higher HTG content ($P = 0.039$ and $P = 0.049$, respectively) and the *PPP1R3B* risk variant showed a similar trend for HTG content, although statistical significance was borderline ($P = 0.086$ after adjustment for age, gender, BMI and admixture) (Table 3 and Fig. 2). No significant associations with HTC content were observed.

3.4. Genetic association with metabolic traits

Although only the *PNPLA3* rs738409 “G” allele was significantly associated with higher ALT and AST levels ($P < 0.05$), the *PPP1R3B* “G” and the *LYPLAL1* “C” alleles showed a trend for association with higher ALT ($P = 0.114$ and 0.149 respectively). In addition, *PNPLA3* was associated with higher fasting glucose levels ($P = 0.029$). Interestingly, the rs1260326 *GCKR* “C” allele was significantly associated with lower insulin levels ($P = 0.048$), and the association remained significant after adjusting for diabetes status ($P = 0.033$). The association of this allele with HOMA-IR showed borderline significance ($P = 0.089$), and reached statistical significance after adjusting for diabetes status ($P = 0.039$) (Table 4).

Table 4
Associations of *PNPLA3*, *GCKR*, *LYPLAL1* and *PPP1R3B* SNPs with metabolic parameters.

Gene/SNP	<i>PNPLA3</i> /rs738409		<i>GCKR</i> /rs1260326		<i>LYPLAL1</i> /rs12137855		<i>PPP1R3B</i> /rs4240624	
	Effect (SE)	P_{add}	Effect (SE)	P_{add}	Effect (SE)	P_{res}	Effect (SE)	P_{add}
BMI (kg/m ²)	0.08 (0.69)	0.991	-0.93 (0.74)	0.111	-1.70 (1.17)	0.071	-0.06 (0.79)	0.941
Cholesterol (mg/dL)	1.13 (4.54)	0.710	-6.28 (4.88)	0.378	0.45 (7.86)	0.948	3.15 (5.18)	0.703
Triglycerides (mg/dL) ^a	0.77 (9.55)	0.931	11.12 (10.28)	0.364	27.47 (16.32)	0.181	6.75 (10.89)	0.854
HDL-C (mg/dL)	0.05 (1.28)	0.921	-2.76 (1.36)	0.061	-2.94 (2.19)	0.227	-1.05 (1.46)	0.551
Glucose (mg/dL) ^a	7.69 (2.73)	0.026	3.42 (3.03)	0.404	7.79 (4.84)	0.058	1.39 (3.23)	0.901
Insulin (μIU/mL) ^a	1.32 (3.21)	0.785	-9.23 (3.32)	0.048	7.19 (5.87)	0.064	0.20 (3.68)	0.733
HOMA-IR ^a	0.78 (0.92)	0.872	-2.21 (0.97)	0.089	2.02 (1.70)	0.039	0.25 (1.06)	0.802
ALT (U/L) ^a	12.78 (3.99)	0.020	5.03 (4.50)	0.957	10.37 (7.16)	0.149	5.43 (4.74)	0.114
AST (U/L) ^a	17.44 (4.79)	0.002	5.63 (5.46)	0.751	10.29 (8.71)	0.468	3.03 (5.77)	0.682
GGT (U/L) ^a	1.69 (2.71)	0.898	1.68 (2.92)	0.594	0.35 (3.08)	0.335	4.39 (3.78)	0.545

Effect values are presented as effect size per allele copy (P_{add}), except for *LYPLAL1* which was analyzed under a recessive model (P_{res}), where effect size is reported for two allele copies, standard error (SE). P-values were obtained from multiple linear regression and adjusted for age, sex, BMI and admixture.

SNP, single nucleotide polymorphism; BMI, body mass index; HDL-c, high density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; and GGT, gamma glutamyl transpeptidase.

^a Variables were log transformed for analysis.

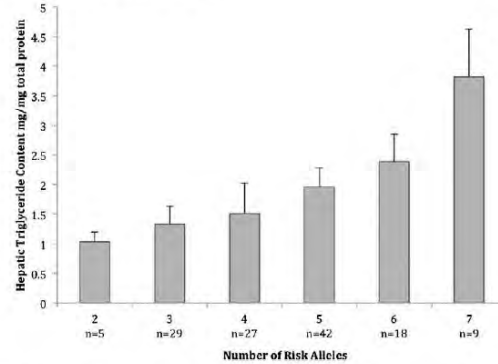


Fig. 1. Genetic effect of the number of risk alleles on hepatic triglyceride content. Mean hepatic triglyceride content significantly increased as a function of the number of risk alleles ($P = 1.0 \times 10^{-4}$ adjusted for age, sex, BMI, type 2 diabetes and admixture).

3.5. Association of the GRS with NAFLD

A GRS was calculated for each subject including the *PNPLA3*, *LYPLAL1*, *PPP1R3B* and *GCKR* SNPs; the range of risk alleles found in the sample was from two to seven. The GRS showed a significant stepwise increase in HTG content as a function of the number of risk alleles carried ($P = 1.0 \times 10^{-4}$; Fig. 1). The analysis using the wGRS yielded similar results ($P = 2.0 \times 10^{-4}$). The GRS was also significantly associated with higher steatosis stage, HTC content, and serum ALT and AST levels ($P < 0.05$) (Table 5 and Fig. 2). Moreover, although the mean GRS value was higher in NASH than non-NASH subjects (4.7 ± 1.4 vs. 4.3 ± 1.2), the difference was not significant (OR = 1.21; $P = 0.205$) (Table 5). Considering that the stage of hepatic damage can be influenced by the adiposity, we performed additional analyses stratifying by BMI tertiles. The associations of the GRS with HTG content remained significant in all BMI tertiles ($P < 0.05$), and although GRSs were higher in individuals with NASH in all BMI tertiles, the associations did not reach significance (Supplementary Table 2). Moreover, using tertiles of risk alleles (T1 = 2–3, n = 34; T2 = 4–5, n = 69; and T3 = 6–7 n = 27), we observed that morbidly obese individuals with a GRS ≥ 6 (tertile 3) showed a significantly increased risk of NASH (OR = 2.55, CI = 1.02–6.22; $P = 0.045$, after adjustment for age, gender, BMI and admixture) compared to those with a GRS ≤ 5 (tertiles 1 and 2; Supplementary Fig. 1). However, GRS did not predict NASH status, as AUC of ROC

Table 5
Association of GRS with the NAFLD-associated traits.

Clinical characteristics	Effect (SE) or OR (95% CI)	P-value
HTG content ^a	0.489 (0.122)	1.0 × 10 ⁻⁴
HTC content	0.012 (0.006)	0.048
ALT (U/L) ^a	8.221 (2.306)	0.002
AST (U/L) ^a	8.953 (2.766)	0.014
Steatosis grade	0.145 (0.071)	0.029
NASH	1.21 (0.89–1.64)	0.205

P-values were obtained from multiple linear regression or logistic regression and were adjusted for age, sex, BMI, type 2 diabetes status and admixture.

SE, standard error; OR, odds ratio; HTG, hepatic triglyceride; HTC, hepatic total cholesterol; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; and NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

^a Variables were log transformed for analysis.

curves was 0.56 (95% CI: 0.46–0.67; $P = 0.219$). Clinical variables (adiponectin, ALT and HDL-C levels, and diabetes status) were significant predictors of NASH status as AUC of ROC curves was 0.739 (95% CI: 0.647–0.831; $P < 0.001$). As expected, adding the GRS to the clinical variables did not significantly improve overall NASH status discrimination (AUC 0.744, 95% CI: 0.653–0.835).

4. Discussion

It is known that the prevalence of NAFLD is particularly high in individuals of Hispanic ancestry as compared to European-Americans and African-Americans, and that these differences could be explained in part by genetic factors (Schwimmer et al., 2009; Speliotes et al., 2011). Recent findings suggest that NAFLD heritability is highest in Hispanics, ranging from 20 to 34% (Palmer et al., 2013). NAFLD was highly prevalent in this group of morbidly obese individuals, as almost 90% showed histological evidence of NAFLD, consistent with previous studies in individuals with morbid obesity (Bellentani and Marino, 2009; Guichelaar et al., 2013; Stepanova et al., 2010). The frequency of NASH was higher (40.9%) than that reported in similar cohort studies of European individuals (17–20%) (Argentou et al., 2009; Gorden et al., 2013).

Unlike other reports of genetic associations with hepatic fat content measured by ultrasound, computed tomography scan or magnetic resonance imaging (MRI) (Palmer et al., 2013; Speliotes et al., 2011;

Walker et al., 2013), to our knowledge, this is the only genetic association study directly quantifying hepatic lipid content (triglycerides and total cholesterol) in hepatic tissue biopsies. As expected, HTG content was higher in NASH than in non-NASH liver biopsies. Interestingly, HTC content was also higher in NASH individuals, in accordance with previous studies suggesting that HTG accumulation is insufficient to explain the transition from steatosis to NASH (Caballero et al., 2009; Puri et al., 2007).

Risk allele frequencies of the variants here analyzed were similar to those reported in individuals of Mexican American ancestry (Hernaez et al., 2013), and the direction of effect of the alleles was as previously reported except for *PPP1R3B* and *GCKR* polymorphisms (Speliotes et al., 2011). Whether this inverse direction is due to differences in LD or gene-environment interactions remains to be determined. The association of the *PNPLA3* “C” risk allele with high ALT levels and increased HTG is in accordance with the well documented association of this functional variant with liver steatosis in various populations, particularly in Mexican-Americans in whom the “C” allele frequency is higher (Hernaez et al., 2013; Romeo et al., 2008; Wagenknecht et al., 2011; Walker et al., 2013). Moreover, in accordance with previous studies reporting the association of *PNPLA3* “C” allele with NASH and histological parameter NASH associated in severely obese European subjects (Guichelaar et al., 2013; Romeo et al., 2010), we observed that this allele was more frequent in NASH individuals, although the difference did not reach statistical significance. This lack of statistical significance with NAFLD histological spectrum may be due to the reduced sample size and/or the high percentage of borderline or possible NASH subjects included in non-NASH group (nearly 50%), which may have masked the significant difference.

LYPLAL1 rs12137855, *PPP1R3B* rs4240624 and *GCKR* rs1260326 polymorphisms were associated with increased HTG content, in consistency with the findings reported by the GOLD Consortium (Speliotes et al., 2011). *PNPLA3* and *LYPLAL1*-related proteins have been predicted to play a role in consecutive steps in triglyceride breakdown (Burke and Dennis, 2009a,b; Speliotes et al., 2011). Thus, functional polymorphisms in these genes could increase HTG content by this mechanism, as demonstrated for the *PNPLA3* “C” allele (He et al., 2010). Unlike these genes, *PPP1R3B* encodes for a protein that regulates glycogen breakdown (Agius, 2008). While it has been suggested that the association of the *PPP1R3B* “A” allele with increased hepatic echogenicity could

GENE	SNP	ALT levels	HTG content	Steatosis	NASH
<i>PNPLA3</i>	rs738409	↑	↑	↑	–
<i>GCKR</i>	rs1260326	–	↑	–	–
<i>LYPLAL1</i>	rs12137855	–	↑	–	–
<i>PPP1R3B</i>	rs4240624	–	↑*	–	–
<i>NCAN</i>	rs2228603	–	–	–	–
Genetic risk score		↑	↑	↑	↑

Fig. 2. Genetic effects of SNPs and GRS on NAFLD-related traits and NASH. Arrows indicate significant associations ($P < 0.05$) and the arrow with asterisk (*) indicates a trend to significance ($P < 0.1$). The association of GRS with NASH status was tested comparing the highest GRS tertile vs. the middle and lowest GRS tertiles. ALT, alanine transaminase; HTG, hepatic triglycerides; and NASH, non-alcoholic fatty liver disease.

reflect decreased glycogen (Dwyer et al., 1983; Hernaez et al., 2013), our results suggest that this polymorphism is associated with increased HTG content ($P = 0.086$). Moreover, we observed significant associations of *GCKR* rs1260326 with higher HTG content, and with lower serum insulin levels and HOMA-IR, in line with the previously reported associations of *GCKR* polymorphisms with liver lipids and glycemic traits (Fesinmeyer et al., 2013; Speliotes et al., 2011).

Using a GRS including *PNPLA3*, *PPP1R3B*, *LYPLAL1* and *GCKR* risk alleles, individuals carrying 7 risk alleles showed 3-fold higher HTG content than 2 risk allele carriers. This GRS accounted for 16.7% of HTG content variance, while *PNPLA3* alone was the single polymorphism showing the highest contribution to HTG content (7.9%) in this population. In addition, even though a GRS ≥ 6 was significantly associated with NASH, it proved to be a poor NASH predictor (AUC 0.56, $P = 0.219$), in consistency with a previous study assessing a GRS for elevated liver fat content (Hernaez et al., 2013; Walker et al., 2013).

In conclusion, although available genetic information cannot currently be used as predictive of NASH, some of the previously NAFLD-associated loci in Europeans also contribute to the accumulation of hepatic lipids and NASH in morbidly obese Mexican individuals, both independently and in an additive manner.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.012>.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by grants SALUD-2009-01-113861 and SALUD-2012-01-182801 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). PLM, JVB and RGV are in the Ciencias Bioquímicas PhD program from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and HVR is in the Ciencias Biológicas y de la Salud PhD program from Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), and they were supported by the PhD fellowships from CONACYT, México.

References

Agius, L., 2008. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* 414, 1–18.

Alexander, D.H., Novembre, J., Lange, K., 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 19, 1655–1664.

Argentou, M., Tiniakos, D.G., Karantolas, M., et al., 2009. Adipokine serum levels are related to liver histology in severely obese patients undergoing bariatric surgery. *Obes. Surg.* 19, 1313–1323.

Belentani, S., Marino, M., 2009. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* 8, 54–58.

Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., et al., 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40, 1387–1395.

Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009a. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, S237–S242.

Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009b. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 49–59.

Caballero, F., Fernández, A., De Lacy, A.M., et al., 2009. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and S1A expression in human NASH. *J. Hepatol.* 50, 789–796.

Dixon, J.B., Bhathal, P.S., O'Brien, P.E., 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121, 91–100.

Dwyer, A., Doppman, J.L., Adams, A.J., et al., 1983. Influence of glycogen on liver density: computed tomography from a metabolic perspective. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 7, 70–73.

Farell, G.C., Larter, C.Z., 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99–S112.

Fesinmeyer, M.D., Meigs, J.B., North, K.E., et al., 2013. Genetic variants associated with fasting glucose and insulin concentrations in an ethnically diverse population: results from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. *BMC Med. Genet.* 25, 98.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.

Gorden, A., Yang, R., Yerges-Armstrong, L.M., et al., 2013. Genetic variation at NCAN locus is associated with inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease in morbid obesity. *Hum. Hered.* 75, 34–43.

Guajardo-Salinas, G.E., Hilmy, A., 2010. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and utility of FIBROSpect II to detect liver fibrosis in morbidly obese Hispano-American patients undergoing gastric bypass. *Obes. Surg.* 20, 1647–1653.

Guichelaar, M.M., Gawrieh, S., Olivier, M., et al., 2013. Interactions of allelic variance of *PNPLA3* with non genetic factors in predicting nonalcoholic steatohepatitis and non hepatic complications of severe obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21, 1935–1941.

He, S., McPhaul, C., Li, J.Z., et al., 2010. A sequence variation (I148M) in *PNPLA3* associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 285, 6706–6715.

Hernaez, R., McLean, J., Lazo, M., et al., 2013. Association between variants in or near *PNPLA3*, *GCKR*, and *PPP1R3B* with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1183–1190.

Kelly, T., Yang, W., Chen, C.S., et al., 2008. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int. J. Obes.* 32, 1431–1437.

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., et al., 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313–1321.

Kosoy, R., Nassir, R., Tian, C., et al., 2009. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum. Mutat.* 30, 69–78.

Kotronen, A., Johansson, L.E., Johansson, L.M., et al., 2009. A common variant in *PNPLA3*, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 52, 1056–1060.

Larrieta-Carrasco, E., León-Mimila, P., Villarreal-Molina, T., et al., 2013. Association of the I148M/*PNPLA3* variant with elevated alanine transaminase levels in normal-weight and overweight/obese Mexican children. *Gene* 15, 185–188.

Larrieta-Carrasco, E., Acuña-Alonso, V., Velázquez-Cruz, R., et al., 2014. *PNPLA3* I148M polymorphism is associated with elevated alanine transaminase levels in Mexican Indigenous and Mestizo populations. *Mol. Biol. Rep.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-014-3341-0>.

León-Mimila, P., Villamil-Ramírez, H., Villalobos-Compan, M., et al., 2013. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in Mexican children and adults. *PLoS One* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070640>.

Lin, Y.C., Chang, P.F., Chang, M.H., et al., 2014. Genetic variants in *GCKR* and *PNPLA3* confer susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in obese individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 869–874.

López-Velázquez, J.A., Silva-Vidal, K.V., Ponciano-Rodríguez, G., et al., 2014. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann. Hepatol.* 13, 166–178.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., et al., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419.

Palmer, N.D., Musani, S.K., Yerges-Armstrong, L.M., et al., 2013. Characterization of European ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of African and Hispanic descent. *Hepatology* 58, 966–975.

Puri, P., Baile, R.A., Wiest, M.M., et al., 2007. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46, 1081–1090.

Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., et al., 2008. Genetic variation in *PNPLA3* confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* 40, 1461–1465.

Romeo, S., Sentinelli, F., Dash, S., et al., 2010. Morbid obesity exposes the association between *PNPLA3* I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *Int. J. Obes.* 34, 190–194.

Rotman, Y., Koh, C., Zmuda, J.M., et al., 2010. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*PNPLA3*) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 52, 894–903.

Schwimmer, J.B., Celedon, M.A., Lavine, J.E., et al., 2009. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 136, 1585–1592.

Sookoian, S., Castano, G.O., Burgueno, A.L., et al., 2009. A nonsynonymous gene variant in adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J. Lipid Res.* 50, 2111–2116.

Speliotes, E.K., Butler, J.L., Palmer, C.D., et al., 2010. *PNPLA3* variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. *Hepatology* 52, 904–912.

Speliotes, E.K., Yerges-Armstrong, L.M., Wu, J., et al., 2011. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001324>.

Stepanova, M., Hossain, N., Afendy, A., et al., 2010. Hepatic gene expression of Caucasian and African-American patients with obesity-related non-alcoholic fatty liver disease. *Obes. Surg.* 20, 640–650.

The American Diabetes Association, 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33, S62–S69.

Valenti, L., Al-Serri, A., Daly, A.K., et al., 2010. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51, 1209–1217.

Villarreal-Molina, M.T., Aguilar-Salinas, C.A., Rodríguez-Cruz, M., et al., 2007. 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* 56, 1881–1887.

Wagenknecht, L.E., Palmer, N.D., Bowden, D.W., et al., 2011. Association of *PNPLA3* with non-alcoholic fatty liver disease in a minority cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Liver Int.* 31, 412–416.

Walker, R.W., Sinatra, F., Hartiala, J., et al., 2013. Genetic and clinical markers of elevated liver fat content in overweight and obese Hispanic children. *Obesity (Silver Spring)* 21, E790–E797.

World Health Organization (WHO), 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. *Tech. Rep. Ser.* 894, pp. 1–253.

Participación en otros trabajos durante la realización del doctorado

1. Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits.
López-Contreras BE, Moran-Ramos S, Villarruel-Vázquez R, Macías-Kauffer L, Villamil-Ramírez H, **León-Mimila P**, Vega-Badillo J, Sánchez-Muñoz F, Llanos-Moreno LE, Ibarra-González I, Vela-Amieva M, Ochoa-Leyva A, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S.
Pediatr Obes. Under Review.
2. An amino acid signature associated with obesity predicts 2-year risk of hypertriglyceridemia in school-age children.
Moran-Ramos S, Ocampo-Medina E, Gutierrez-Aguilar R, Macias-Kauffer L, Villamil-Ramirez H, Lopez-Contreras B, **León-Mimila P**, Vega-Badillo J, Gutierrez-Vidal R, Villarruel-Vazquez R, Serrano-Carbajal E, Del-Río-Navarro B, Huertas-Vazquez A, Villarreal-Molina T, Ibarra-Gonzalez I, Aguilar-Salinas C, Vela-Amieva M, Canizales-Quinteros S.
Sci Rep. Under Review.
3. Interaction between FTO rs9939609 and the Native American-origin ABCA1 rs9282541 affects BMI in the admixed Mexican population.
Villalobos-Comparán M, Antuna-Puente B, Villarreal-Molina MT, Canizales-Quinteros S, Velázquez-Cruz R, **León-Mimila P**, Villamil-Ramírez H, González-Barrios JA, Merino-García JL, Thompson-Bonilla MR, Jarquin D, Sánchez-Hernández OE, Rodríguez-Arellano ME, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G, Campos-Pérez F, Quiterio M, Salmerón-Castro J, Carnevale A, Romero-Hidalgo S.
BMC Med Genet. 2017 May 2;18(1):46. doi: 10.1186/s12881-017-0410-y.
4. A combined linkage and association strategy identifies a variant near the GSTP1 gene associated with BMI in the Mexican population.

Villamil-Ramírez H, **León-Mimila P**, Macias-Kauffer LR, Canizalez-Román A, Villalobos-Comparán M, León-Sicairos N, Vega-Badillo J, Sánchez-Muñoz F, López-Contreras B, Morán-Ramos S, Villarreal-Molina T, Zurita LC, Campos-Pérez F, Huertas-Vazquez A, Bojalil R, Romero-Hidalgo S, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S.

J Hum Genet. 2017 Mar;62(3):413-418. doi: 10.1038/jhg.2016.145.

5. TGFBR2 mutation and MTHFR-C677T polymorphism in a Mexican mestizo population with cervico-cerebral artery dissection.

Ruiz-Franco A, Barboza MA, Jara-Prado A, Canizales-Quinteros S, **Leon-Mimila P**, Arguelles-Morales N, Vargas-González JC, Quiroz-Compean A, Arauz A. *J Neurol.* 2016 Jun; 263(6):1066-73. doi: 10.1007/s00415-016-8101-8.

6. Hepatic miR-33a/miR-144 and their target gene ABCA1 are associated with steatohepatitis in morbidly obese subjects.

Vega-Badillo J, Gutiérrez-Vidal R, Hernández-Pérez HA, Villamil-Ramírez H, **León-Mimila P**, Sánchez-Muñoz F, Morán-Ramos S, Larrieta-Carrasco E, Fernández-Silva I, Méndez-Sánchez N, Tovar AR, Campos-Pérez F, Villarreal-Molina T, Hernández-Pando R, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. *Liver Int.* 2016 Sep;36(9):1383-91. doi: 10.1111/liv.13109.

7. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals.

Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, Fuentes M, Pizarro M, Everardo P, de Avila F, Gómez-Valdés J, **León-Mimila P**, Hunemeier T, Ramallo V, Silva de Cerqueira CC, Burley MW, Konca E, de Oliveira MZ, Veronez MR, Rubio-Codina M, Attanasio O, Gibbon S, Ray N, Gallo C, Poletti G, Rosique J, Schuler-Faccini L, Salzano FM, Bortolini MC, Canizales-Quinteros S, Rothhammer F, Bedoya G, Balding D, Gonzalez-José R. *PLoS Genet.* 2014 Sep 25;10(9):e1004572. doi: 10.1371/journal.pgen.1004572. eCollection 2014 Sep.

8. PNPLA3 I148M polymorphism is associated with elevated alanine transaminase levels in Mexican Indigenous and Mestizo populations.

Larrieta-Carrasco E, Acuña-Alonzo V, Velázquez-Cruz R, Barquera-Lozano R, **León-Mimila P**, Villamil-Ramírez H, Menjivar M, Romero-Hidalgo S, Méndez-Sánchez N, Cárdenas V, Bañuelos-Moreno M, Flores YN, Quiterio M, Salmerón J, Sánchez-Muñoz F, Villarreal-Molina T, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S.

Mol Biol Rep. 2014 Jul;41(7):4705-11. doi: 10.1007/s11033-014-3341-0.

9. Association of the I148M/PNPLA3 variant with elevated alanine transaminase levels in normal-weight and overweight/obese Mexican children.

Larrieta-Carrasco E, **León-Mimila P**, Villarreal-Molina T, Villamil-Ramírez H, Romero-Hidalgo S, Jacobo-Albavera L, Gutiérrez-Vidal R, López-Contreras BE, Guillén-Pineda LE, Sánchez-Muñoz F, Bojalil R, Mejía-Domínguez AM, Méndez-Sánchez N, Domínguez-López A, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. *Gene.* 2013 May 15;520(2):185-8. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.038.

10. VNN1 gene expression levels and the G-137T polymorphism are associated with HDL-C levels in Mexican prepubertal children.

Jacobo-Albavera L, Aguayo-de la Rosa PI, Villarreal-Molina T, Villamil-Ramírez H, **León-Mimila P**, Romero-Hidalgo S, López-Contreras BE, Sánchez-Muñoz F, Bojalil R, González-Barrios JA, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. *PLoS One.* 2012;7(11):e49818. doi: 10.1371/journal.pone.0049818. PCSK1 rs6232 is associated with childhood and adult class III obesity in the Mexican population.

11. PCSK1 rs6232 is associated with childhood and adult class III obesity in the Mexican population.

Villalobos-Comparán M, Villamil-Ramírez H, Villarreal-Molina T, Larrieta-Carrasco E, **León-Mimila P**, Romero-Hidalgo S, Jacobo-Albavera L, Liceaga-Fuentes AE,

Campos-Pérez FJ, López-Contreras BE, Tusié-Luna T, Del Río-Navarro BE, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S.

PLoS One. 2012;7(6):e39037. doi: 10.1371/journal.pone.0039037.

12. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans.

Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, Villarreal-Molina T, Arellano-Campos O, Hünemeier T, Moreno-Estrada A, Ortiz-López MG, Villamil-Ramírez H, **León-Mimila P**, Villalobos-Comparan M, Jacobo-Albavera L, Ramírez-Jiménez S, Sikora M, Zhang LH, Pape TD, Granados-Silvestre Mde A, Montufar-Robles I, Tito-Alvarez AM, Zurita-Salinas C, Bustos-Arriaga J, Cedillo-Barrón L, Gómez-Trejo C, Barquera-Lozano R, Vieira-Filho JP, Granados J, Romero-Hidalgo S, Huertas-Vázquez A, González-Martín A, Gorostiza A, Bonatto SL, Rodríguez-Cruz M, Wang L, Tusié-Luna T, Aguilar-Salinas CA, Lisker R, Moises RS, Menjivar M, Salzano FM, Knowler WC, Bortolini MC, Hayden MR, Baier LJ, Canizales-Quinteros S.

Hum Mol Genet. 2010 Jul 15;19(14):2877-85. doi: 10.1093/hmg/ddq173.