



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

**ASOCIACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE LOS GENES *AMY1A* Y *AMY2A* Y  
LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AMILASA SALIVAL Y PANCREÁTICA CON  
OBESIDAD INFANTIL EN MÉXICO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA**

Miguel Alexander Vázquez Moreno

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Miguel Cruz López

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. Hospital de Especialidades Dr. Bernardo  
Sepúlveda. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Ciudad de México. Noviembre, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por la beca otorgada durante el desarrollo del doctorado (No. de becario: 615579 / CVU: 779646). Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo económico para realizar una estancia de investigación en la Universidad McMaster en Canadá (abril - junio 2019). Al Instituto Mexicano del Seguro Social por el financiamiento otorgado al proyecto bajo el Programa de Temas Prioritarios en Salud (FIS/IMSS/PROT/PRI0/17/062) y por el Apoyo Económico Complementario para la Realización del Doctorado.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES .....	2
<b>Generalidades de la obesidad</b> .....	2
<b>Definición y prevalencia</b> .....	2
<b>Diagnóstico</b> .....	3
<b>Patofisiología de la obesidad</b> .....	5
<b>Abordajes genéticos de la obesidad</b> .....	8
<i>Estudios de asociación del genoma completo (GWAS)</i> .....	9
<b>Asociación entre el número de copias de <i>AMY1A</i> y obesidad</b> .....	12
<b>Asociación entre la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y obesidad</b> .....	12
<b>Almidón en la dieta tradicional mexicana</b> .....	13
JUSTIFICACIÓN .....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGÍA .....	15
<b>Diseño experimental y población de estudio</b> .....	15
<b>Mediciones antropométricas</b> .....	16
<b>Toma de muestras de sangre</b> .....	17
<b>Extracción de DNA y determinación del NC de los genes <i>AMY1A</i> y <i>AMY2A</i></b> .....	17
<b>Medición de la actividad enzimática de <i>AMY1</i> / <i>AMY2</i></b> .....	18
<b>Meta-Análisis de asociación entre el NC de <i>AMY1A</i> y obesidad infantil en México</b> .....	18
<b>Medición de la ingesta de almidón</b> .....	19
<b>Análisis de los datos</b> .....	19
RESULTADOS.....	20
<b>Asociación del NC de <i>AMY1A</i> con obesidad</b> .....	21
<b>Meta-Análisis de asociación entre el NC de <i>AMY1A</i> y obesidad infantil en México</b> .....	23
<b>Asociación del NC de <i>AMY1A</i> y <i>AMY2A</i> con la actividad enzimática de <i>AMY1</i> y <i>AMY2</i></b> ...	25
<b>Asociación de la actividad enzimática de <i>AMY1</i> y <i>AMY2</i> con obesidad infantil</b> .....	27

<b>Efecto de la interacción entre la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y la ingesta de almidón, sobre la frecuencia de obesidad infantil. ....</b>	<b>29</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de peso corporal en niños y adultos de acuerdo al IMC.	4
<b>Tabla 2.</b> Características generales de los niños mexicanos con peso normal y obesidad incluidos al estudio, agrupados de acuerdo con el tipo de análisis realizado.	22
<b>Tabla 3.</b> Características generales de cada uno de los estudios realizados en niños mexicanos que se incluyeron en el Meta-Análisis para determinar la asociación entre el número de copias de AMY1A y obesidad infantil.	24
<b>Tabla 4.</b> Asociación de obesidad con diferentes combinaciones de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 en suero con obesidad en 764 niños mexicanos.	28
<b>Tabla 5.</b> Características generales de los niños incluidos al análisis de interacción entre la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y la ingesta de almidón, sobre la frecuencia de obesidad infantil.	30
<b>Tabla 6.</b> Interacción de la ingesta de almidón con la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 sobre el riesgo de obesidad infantil.	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> <i>Loci</i> asociados a obesidad y/o IMC en diferentes grupos étnicos	10
<b>Figura 2.</b> Asociación entre el número de copias de <i>AMY1A</i> y la actividad enzimática de <i>AMY1</i> en niños con peso normal y obesidad.	26
<b>Figura 3.</b> Asociación entre el número de copias de <i>AMY2A</i> y la actividad enzimática de <i>AMY2</i> en niños con peso normal y obesidad.	26
<b>Figura 4.</b> Asociación de diferentes combinaciones de actividad enzimática de <i>AMY1</i> y <i>AMY2</i> con riesgo de obesidad en diferentes terciles de ingesta de almidón.	32

## RESUMEN

La población infantil mexicana representa una población poco investigada caracterizada por presentar una dieta con alto contenido de almidón y alta prevalencia de obesidad. En 2015, se evidenció por primera vez en México la asociación entre el bajo número de copias (NC) del gen de amilasa salival (*AMY1A*) y el riesgo de obesidad infantil. Con base a esta evidencia se planteó investigar la asociación del NC de los genes *AMY1A* y *AMY2A* y la actividad enzimática de amilasa salival (*AMY1*) y pancreática (*AMY2*) en niños con obesidad infantil. Se recopilaron datos antropométricos y de ingesta de almidón. El NC de *AMY1A* y *AMY2A* se determinó por PCR digital en gotas y la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* por método enzimático colorimétrico. Mediante un Meta-Análisis de datos individualizado se incluyeron 3,100 niños, donde se confirmó la asociación entre el NC de *AMY1A* y el riesgo de obesidad infantil en México. También, se observó una asociación positiva entre el NC de *AMY1A* y *AMY2A* y la correspondiente actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* en niños con peso normal y con obesidad. La actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* se asoció negativamente con el riesgo de obesidad infantil, y la asociación se limitó a los niños que consumían una cantidad media/alta de almidón ( $P_{\text{interacción}} = 0.004$ ). Nuestros resultados sugieren que el aumento del NC de *AMY1A* y *AMY2A* se asocia con el incremento de la actividad de *AMY1* y *AMY2* y con menor riesgo de obesidad infantil. Además, los niños con medio y alto consumo de almidón y baja actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2*, presentan mayor riesgo de obesidad, en comparación con los niños con media y alta actividad enzimática. Nuestro estudio evidencia por primera vez que la interacción entre factores genéticos (NC), actividad



enzimática y estilo de vida (ingesta de almidón) puede contribuir al desarrollo de obesidad infantil en México.

## **ANTECEDENTES**

### **Generalidades de la obesidad**

#### **Definición y prevalencia**

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por una cantidad excesiva de grasa corporal como consecuencia de la interacción entre un estilo de vida sedentario, una mayor ingesta de energía y la predisposición genética. Actualmente es un problema global de salud y en las últimas cuatro décadas su prevalencia se ha triplicado en todo el mundo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), al 2016 se estimaron más de 1,900 millones de adultos con sobrepeso y obesidad ([www.who.int/](http://www.who.int/)). En tanto que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños de edad escolar, que oscilaba en menos del 1% en 1975 tuvo un incremento de 6–8% en 2016 y se espera que alcance el 9.1% en el presente año (2020)<sup>1,2</sup>. La obesidad está aumentando en todas las regiones del mundo y hasta el momento ningún país, con alto, medio o bajo desarrollo, ha tenido éxito en disminuir su prevalencia. Como ejemplo, al 2019 México ocupaba el primero y segundo lugar mundial de obesidad infantil y en adultos, respectivamente ([www.unicef.org/mexico/](http://www.unicef.org/mexico/)). En 2016, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de México informó una prevalencia de obesidad de 17.5%, 14.6% y 36.1% en niños de 5 a 11 años, adolescentes de 12 a 19 años, y adultos, respectivamente<sup>3</sup>. Estas prevalencias resultan alarmantes debido a que la obesidad infantil

se ha descrito como principal predictor de obesidad y complicaciones metabólicas en el adulto<sup>4</sup>.

### **Diagnóstico**

El diagnóstico de sobrepeso y obesidad se realiza empleando datos antropométricos basados en la medición de la talla y el peso corporal para calcular el índice de masa corporal (IMC) que se obtiene de dividir el peso corporal en kilogramos, entre la talla al cuadrado en metros. Aunque el IMC no distingue el sobrepeso asociado al exceso de grasa corporal, ésta es la herramienta comúnmente utilizada para determinar sobrepeso y obesidad en la práctica clínica e investigación<sup>5</sup>.

La clasificación internacional de peso corporal para adultos se describe en la Tabla 1. En niños de entre 2 y 19 años, la clasificación de peso corporal varía entre la edad y sexos, por lo que su clasificación se apega a estándares de referencia de acuerdo con el IMC percentil (IMCp) para edad y sexo. Los sistemas internacionales de diagnóstico para sobrepeso/obesidad generalmente usados son los de la OMS y los del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés). La clasificación de peso corporal para niños de entre 2 y 19 años de estas dos Organizaciones se describe en la Tabla 1. Los criterios del CDC fueron desarrollados empleando cinco encuestas representativas en Estados Unidos (1963-1994)<sup>6</sup>. El sistema de referencia de la OMS está basado en un estudio multicéntrico realizado en seis países (Brasil, Ghana, India, Omán, Noruega, Estados Unidos), incluyendo a niños criados en condiciones óptimas, amamantados exclusiva o preferentemente entre 4 y 12 meses y

alimentados con dietas complementarias de alta calidad, inmunizados y con atención médica regular<sup>7</sup>. Con estos criterios de selección de muestra, es probable que las diferencias en los tipos de alimentación de las poblaciones de referencia contribuyan a que el punto de corte para el diagnóstico de obesidad propuesto por la OMS (IMCp  $\geq 97$ ), sea menos estricto que el propuesto por el CDC (IMCp  $\geq 95$ )<sup>8</sup>. En este sentido, algunos estudios han reportado que el diagnóstico de obesidad por el CDC presenta mayor sensibilidad<sup>9</sup>, y debido a que la presencia de obesidad durante la infancia con mayor riesgo de desarrollar obesidad y complicaciones metabólicas en la vida adulta, el criterio del CDC ha sido ampliamente citado en la literatura<sup>9-11</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de peso corporal en niños y adultos de acuerdo al IMC.

Categoría de peso	Niños		Adultos
	CDCa <sup>6</sup>	OMSa <sup>12</sup>	OMS <sup>12</sup>
Bajo	< 5.0	< 3.0	< 18.5
Normal	5.0 < 85.0	3.0 < 85.0	18.5 < 25.0
Sobrepeso	85.0 < 95.0	85.0 < 97.0	25.0 < 30.0
Obesidad	$\geq 95.0$	$\geq 97.0$	$\geq 30.0$
Obesidad Clase I	-	-	30.0 < 35.0
Obesidad Clase II	-	-	35.0 < 40.0
Obesidad Clase III	-	-	$\geq 40$

a, IMC percentil.

## **Patofisiología de la obesidad**

La obesidad en la niñez y la adolescencia se asocia con enfermedades metabólicas de inicio temprano (como hipertensión, insulinoresistencia, dislipidemia, diabetes tipo 2 [DT2], hígado/páncreas graso no alcohólico, enfermedad cardiovascular, entre otras) y mortalidad prematura por todas las causas<sup>13,14</sup>. De hecho, la obesidad se considera como el principal factor de riesgo para desarrollar DT2, debido a que 85 y 80% de los niños y adultos con DT2, respectivamente, presentó sobrepeso u obesidad al momento de su diagnóstico<sup>15,16</sup>.

### *Tejido adiposo*

El tejido adiposo humano se divide en marrón y blanco, el primero es responsable de la actividad termogénica, mientras que el segundo (se distribuye a nivel subcutáneo y visceral) se encarga de almacenar grasa corporal y secretar proteínas de señalización que ejercen efectos metabólicos y antiinflamatorios (leptina, neuropéptido Y[NPY], adiponectina y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  [TNF $\alpha$ ]). La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo blanco cuya función principal es inhibir el apetito ante la ingesta de alimentos. Además, la leptina actúa en el núcleo arcuato del hipotálamo inhibiendo la secreción de NPY y proteína relacionada con agouti (AgRP), estimulando así la síntesis y secreción de proopiomelanocortina (POMC)<sup>17</sup>. La leptina también estimula la oxidación de lípidos y la absorción de glucosa en tejidos periféricos, previniendo así la lipotoxicidad (acumulación de lípidos en los tejidos no adiposos)<sup>18</sup>. La adiponectina también es secretada por el tejido adiposo durante la diferenciación del adipocito y tiene como

función principal estimular la sensibilidad a la insulina y la utilización de glucosa mediante la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético e inhibir la producción endógena de glucosa del hígado<sup>19-21</sup>. También tiene funciones antiinflamatorias como la disminución de los niveles de proteína C reactiva y expresión de TNF- $\alpha$ <sup>22</sup>, y antiaterogénicas al inhibir la adhesión de monocitos a células endoteliales, la transformación de macrófagos en células espumosas y aumento de la producción de óxido nítrico en el endotelio vascular<sup>19</sup>.

#### *Desregulación del tejido adiposo*

En condiciones de exceso de energía, el tejido adiposo almacena el exceso de nutrientes en forma de lípidos neutros, mientras que, en condiciones de déficit, provee nutrientes a otros tejidos a través de lipólisis. En exceso de energía el tejido adiposo presenta hipertrofia e hiperplasia. Primero, los adipocitos se hipertrofian y secretan hormonas y citocinas paracrinas que facilitan el reclutamiento y diferenciación de preadipocitos para almacenar el exceso de nutrientes (hiperplasia)<sup>23</sup>. Sin embargo, el tejido tiene un límite de expansión que cuando se alcanza, pierde funcionalidad y su capacidad de expandirse<sup>24,25</sup>. La razón de la pérdida de plasticidad celular en el tejido adiposo se debe a la acumulación de especies reactivas de oxígeno, derivadas de macrófagos, en respuesta a la inflamación causada por la hipertrofia y/o muerte de los adipocitos disfuncionales<sup>26</sup>. De esta manera, el tejido adiposo sólo tiene la capacidad de almacenar el exceso de grasa a través de la hipertrofia de sus células, causando lipotoxicidad, inflamación, hipoxia, secreción alterada de adipocinas y disfunción mitocondrial que contribuye al desarrollo de insulinoresistencia y mayor riesgo de DT<sup>27</sup>.

Además la acumulación de grasa en los tejidos ectópicos como el hígado, músculo esquelético, corazón y depósitos viscerales conduce a inflamación local e insulinoresistencia y en el páncreas se produce el reclutamiento de macrófagos, incrementando el estrés oxidativo que contribuye a la disfunción de la célula  $\beta$  y reducción de la secreción de insulina<sup>28</sup>.

Independientemente de la inflamación del tejido, en los adipocitos hipertróficos el exceso de lípidos en citoplasma provoca alteración en los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT4) que conlleva al desarrollo de resistencia a la insulina<sup>28</sup>. También, durante la hipertrofia del adipocito se promueve la inflamación local y sistémica a través del reclutamiento de macrófagos y células T, mediante la secreción de las principales citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)<sup>28</sup>.

TNF-  $\alpha$  contribuye al desarrollo de insulinoresistencia a través de la inhibición de la síntesis de adiponectina<sup>29</sup>. También interfiere en la fosforilación de residuos de tirosina en el primer sustrato de la cadena beta del receptor de insulina (IRS-1 por sus siglas en inglés) reduciendo la movilización de GLUT-4 y la entrada de glucosa en las células<sup>29</sup>. Además, activa a el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$  B por sus siglas en inglés) resultando en una mayor expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y músculo liso vascular, lo que incrementa la inflamación del tejido adiposo y la disfunción endotelial, que finalmente lleva a la formación de la placa ateromatosa<sup>30</sup>. La IL-6 producida por macrófagos y adipocitos incrementa su producción durante la hipertrofia, lo cual favorece el aumento de la síntesis de proteínas de fase aguda como proteína C reactiva en células hepáticas y reduce la actividad de la lipoproteína lipasa y la secreción de adiponectina en

el adipocito, contribuyendo así al desarrollo de resistencia a la insulina<sup>31</sup>. El aumento de lípidos en el citoplasma del adipocito también incrementa la concentración de MCP-1, promoviendo una mayor acumulación de macrófagos en el tejido adiposo. Otra vía de desarrollo de inflamación y resistencia a la insulina, es a través del incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), Caspasa 1, interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y TNF- $\alpha$  en macrófagos<sup>32</sup>. Como resultado de la interacción entre ácidos grasos libres y TNF- $\alpha$ , la activación de quinasas aminoterminales c-Jun (JNK) de células CD11c+ mediante receptores tipo Toll-4 (TLR4) y el factor nuclear kappa beta (NF-kappa $\beta$ ), promueven la fosforilación de serina-307 del IRS-1, reduciendo así la movilización de GLUT-4 y la entrada de glucosa en las células<sup>33,34</sup>.

### **Abordajes genéticos de la obesidad**

Gran parte de la variabilidad del IMC puede explicarse por la interacción de factores biológicos como la edad, sexo, origen étnico, componente genético y epigenético y microbiota intestinal<sup>35</sup>. En diferentes grupos étnicos se ha estimado que la heredabilidad del IMC varía de 40% a 52% en estudios realizados en familias y de 69% a 75% en estudios realizados en gemelos<sup>36</sup>.

La compleja interacción de factores genéticos y ambientales relacionados con la susceptibilidad de desarrollar obesidad, hacen que su abordaje genético sea complejo<sup>37</sup>. En la actualidad, con los avances tecnológicos como la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) han llevado a identificar nuevos *loci* de susceptibilidad a obesidad<sup>38</sup>. Con las evidencias proporcionadas por la NGS, los *loci*

asociados a obesidad y/o IMC se han analizado en diferentes etnias y poblaciones, principalmente mediante el estudio de genes candidato a través de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) y el estudio de variantes estructurales<sup>39</sup>.

#### *Estudios de asociación del genoma completo (GWAS)*

Los GWAS han tenido bastante éxito en la identificación de genes que predisponen a obesidad poligénica. El enfoque libre de hipótesis de este tipo de estudios permite evaluar la asociación de hasta 2,000,000 de variantes genéticas comunes (frecuencia del alelo menor >1%) generalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) distribuidas a través del genoma completo<sup>40</sup>. Este tipo de estudios ha proporcionado evidencia de superposición entre los genes para la obesidad infantil y los de la obesidad en adultos, a través de su asociación con obesidad y/o IMC<sup>35</sup>. Hasta el momento a través de los GWAS, se han identificado 741 *loci* independientes asociados con obesidad y/o IMC en 6 diferentes grupos étnicos (Figura 1)<sup>41</sup>. Los GWAS también han sido una herramienta importante para determinar la transferibilidad de predisposición a la obesidad a través de genes descubiertos en población europea y no europea<sup>35</sup>. Por ejemplo, los GWAS realizados en poblaciones no europeas han confirmado *loci* compartidos con poblaciones europeas e identificado señales de obesidad específicas en población africana, asiática oriental, asiática del sur y samoana<sup>42</sup>. Uno de los *loci* más estudiados por su transferibilidad étnica y alta asociación con obesidad y/o IMC, es el gen asociado con masa grasa y obesidad (*FTO*, por sus siglas en inglés), ya que sus variantes han sido identificadas desde los primeros GWAS realizados en



población europea. Los SNPs de *FTO* se comparten en poblaciones de ascendencia europea, africana y asiática. Sin embargo, los alelos que se asocian al aumento del IMC son menos frecuentes en poblaciones con ascendencia no europea<sup>43</sup>. Por lo que resulta importante continuar analizando la frecuencia de los alelos de riesgo en poblaciones vulnerables como las Latinoamericanas.

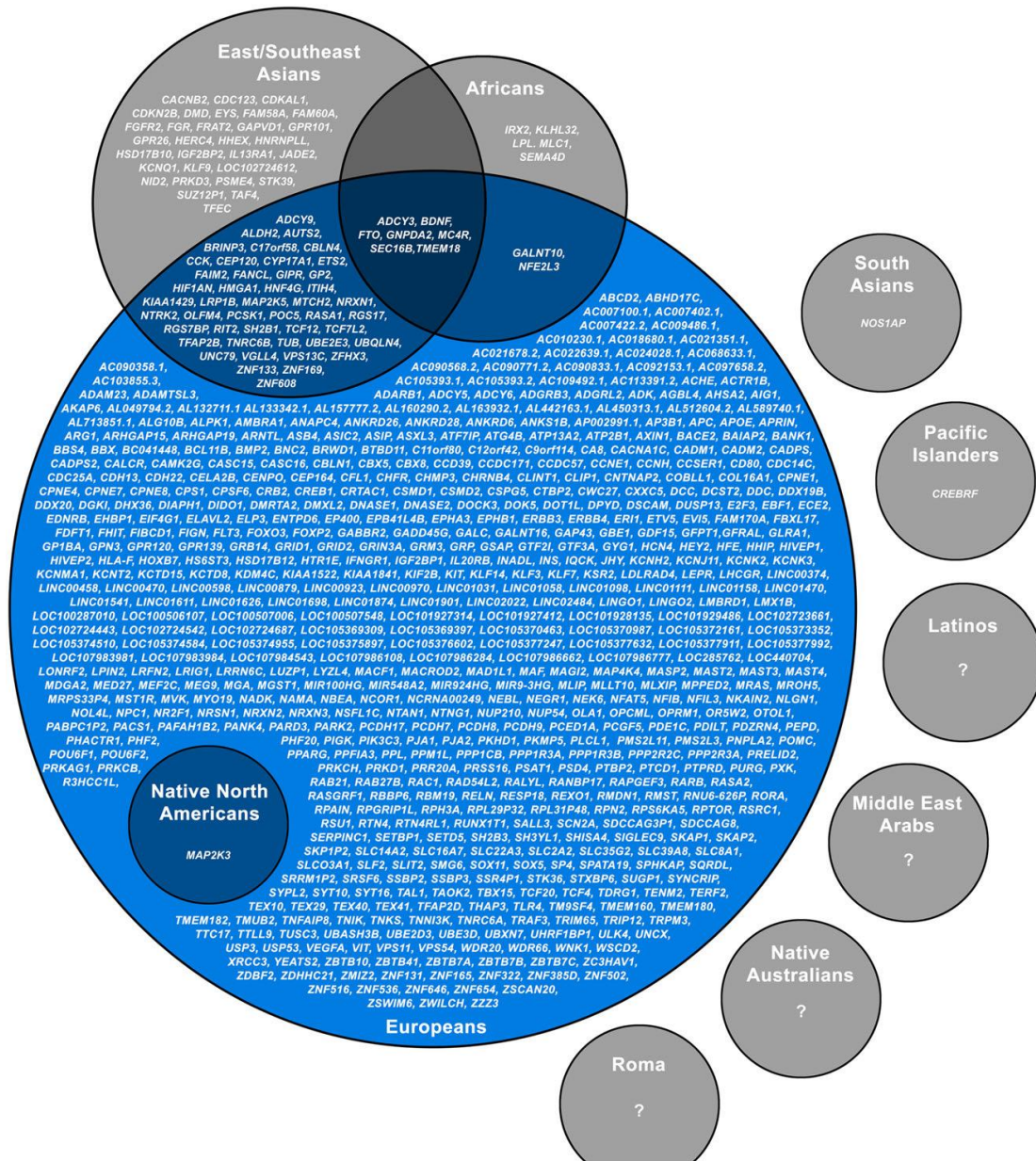


Figura 1. Loci asociados a obesidad y/o IMC en diferentes grupos étnicos<sup>42</sup>.

### *Estudio de variantes estructurales*

Las variantes estructurales en el genoma humano son descritas como variaciones en el número de copias (CNV, por sus siglas en inglés) de más 1 kb que dan como resultado un cambio en dosis/cantidad de copias de un gen en particular y representan al menos el 1% de la variabilidad genética humana<sup>44</sup>. La CNV comprende deleciones, duplicaciones, inserciones y translocaciones y han sido asociadas a enfermedades de origen poligénico como el autismo, epilepsia, esquizofrenia, síndrome metabólico DT2 y obesidad. Respecto a la obesidad, mientras que las variantes comunes de un solo nucleótido representan del 30% al 40% de la heredabilidad para el IMC en niños y adultos<sup>45</sup>, la CNV podrían explicar parte de la heredabilidad faltante de la obesidad<sup>46</sup>. Hasta el momento se sabe que la CNV es responsable de hasta el 17.7% de la variación de la expresión genética heredable de enfermedades poligénicas y que los mecanismos por los cuales se forman éstos son, generalmente, a través de recombinación meiótica desigual y errores de replicación<sup>47</sup>. Las enfermedades poligénicas con las que se ha asociado la CNV son autismo, obesidad y DT2<sup>48</sup>. La CNV que comúnmente se han estudiado por su asociación con obesidad son las regiones cerca del locus *NEGR1*, el cromosoma 10q11.22, así como en los cromosomas 11q11 y 10q26.3<sup>49-51</sup>. Otro de los genes que ha llamado la atención en los últimos años es el gen de amilasa salival (*AMY1A*) ya que la CNV del gen se ha asociado a obesidad en niños y adultos de diferentes grupos étnicos<sup>52</sup>.

### **Asociación entre el número de copias de *AMY1A* y obesidad**

En 2014, Falchi *et al.* evidenciaron la asociación entre el bajo número de copias (NC) del gen *AMY1A*, el bajo nivel de amilasa sérica y el alto riesgo de obesidad en adultos de Europa y Asia oriental<sup>52</sup>. La asociación entre el NC de *AMY1A* y obesidad / IMC ha sido replicada en adultos portugueses y mexicanos<sup>53,54</sup>. Sin embargo, en los estudios realizados en adultos de Estonia, China y Malasia esta asociación no presentó significancia estadística ( $p > 0.05$ )<sup>55,56</sup>. Adicionalmente, se encontró asociación en población infantil de Francia, Finlandia, Italia, Estados Unidos y México<sup>54,57-60</sup>.

### **Asociación entre la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y obesidad**

Derivado de la asociación entre el NC de *AMY1A* con obesidad / IMC, en 2017, Carpenter *et al.* y Bonnefond *et al.* demostraron que el NC de *AMY1A* y *AMY2A* correlaciona positivamente con la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática<sup>57,61</sup>. Además, Bonnefond *et al.* también evidenciaron que la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática correlaciona negativamente con el IMC en adultos franceses<sup>57</sup>.

### **Asociación entre el NC de *AMY1A* y *Prevotella* en obesidad**

En un estudio realizado en 2019 en adultos de Estados Unidos y en modelos animales, Poole *et al.*, evidenciaron una asociación entre el NC de *AMY1A*, obesidad y microbiota intestinal<sup>62</sup>. Se piensa que un mayor NC de *AMY1A* y actividad enzimática de amilasa salival y pancreática, confiere una ventaja para las personas con una dieta alta en almidón al mejorar la digestión en la cavidad oral e intestinal. Como una aproximación

al planteamiento de Pooleet *et al.*, en 2018 León-Mimila *et al.* evidenciaron una correlación positiva entre el NC de *AMY1A* y la abundancia relativa de *Prevotella* en adultos mexicanos. *Prevotella* es un género bacteriano que presenta enzimas y grupos de genes esenciales para la degradación y utilización de polisacáridos complejos.

### **Almidón en la dieta tradicional mexicana**

Los estudios moleculares y genéticos indican que la domesticación del maíz tuvo lugar en el suroeste de México<sup>63</sup>. Estudios que combinan técnicas moleculares en paleoecología y arqueología han documentado que el cultivo del maíz se dio desde la costa del Golfo de México en San Andrés, Tabasco, hace más de 7.000 años<sup>63</sup>. De éste punto de cultivo, la domesticación del maíz se generalizó hacia Centro y Sur América en el octavo milenio<sup>63</sup>.

La población mexicana tiene una dieta con alto contenido de almidón (maíz, trigo y diferentes variedades de frijol común)<sup>64</sup>. Se ha estimado que el contenido de almidón disponible en la tortilla de maíz es de 63-73%, después de las condiciones de procesamiento, y su consumo diario se reporta en aproximadamente 325 g, suministrando el 70% de las calorías y la mitad de las proteínas<sup>65</sup>.

Tomando en cuenta que los estudios que analizan la predisposición genética a la obesidad en México aún son escasos, la alta frecuencia de obesidad infantil en México y el alto consumo de almidón de maíz de la población mexicana, es primordial conocer cómo la CNVs de los genes *AMY1A* y *AMY2A*, a través de la actividad de sus

correspondientes enzimas, podrían aumentar o reducir el riesgo de desarrollar obesidad infantil.

## **JUSTIFICACIÓN**

México representa el segundo país con la prevalencia más alta de obesidad infantil en el mundo, lo que resulta alarmante debido a que este padecimiento se ha descrito como principal predictor de obesidad y complicaciones metabólicas en el adulto. Aunque se sabe que el componente genético de la obesidad podría explicar hasta el 75% de su heredabilidad, en México, la compleja interacción de factores genéticos y ambientales, como la ingesta de alimentos, ha sido explorada en pocos estudios. Por esta razón, resulta de importancia analizar la variación del NC del gen *AMY1A* en la población mexicana que presenta una alta prevalencia de obesidad infantil y consumo ancestral de alimentos ricos en almidón.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hasta el momento, los estudios que evidencian la asociación entre la variación del NC de *AMY1A* y el diagnóstico de obesidad son inconsistentes. Por otro lado, México representa el segundo país con la prevalencia más alta de obesidad en el mundo.

## **HIPÓTESIS**

El NC de *AMY1A* y *AMY2A* se asocia con la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y obesidad infantil.

## **OBJETIVOS**

### *Objetivo general*

Analizar la asociación del NC de los genes *AMY1A* y *AMY2A* y la actividad de amilasa salival y pancreática con obesidad infantil.

### *Objetivos específicos*

- Estimar la asociación del NC del gen *AMY1A* con obesidad infantil.
- Realizar un Meta-Análisis de asociación entre el NC del gen *AMY1A* y obesidad infantil en la población mexicana.
- Estimar la asociación del NC de los genes *AMY1A* y *AMY2A* con la actividad enzimática de amilasa salival (*AMY1*) y pancreática (*AMY2*).
- Estimar la asociación de la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* con obesidad infantil.
- Estimar el efecto de la interacción entre la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y la ingesta de almidón, sobre la frecuencia de obesidad infantil.

## **METODOLOGÍA**

### **Diseño experimental y población de estudio**

Se realizó un estudio transversal de casos y controles de obesidad en 1,895 niños de 6 a 12 años (1,054 con peso normal y 841 con obesidad) de 15 Estados de la República mexicana (Ciudad de México, Baja California Sur, Campeche, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas).

El presente proyecto fue aprobado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (CONBIOETICA-09-CEI-009-20160601) y se realizó cumpliendo con la Declaración de Helsinki. Antes del enrolamiento de cada participante al estudio, se obtuvo el asentimiento de los niños y los padres (o tutores legales) dieron su consentimiento informado por escrito. Los niños de la Ciudad de México fueron captados en las Unidades deportivas del IMSS: Naucalpan, Morelos, Nezahualcóyotl e Independencia. Los niños de Baja California Sur, Campeche, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas fueron captados en escuelas primarias públicas.

### **Mediciones antropométricas**

Los niños se presentaron a las sedes del estudio en ropa ligera y al momento de las mediciones de altura y peso se les pidió quitarse los zapatos. Todas las medidas fueron realizadas por personal capacitado. El peso se midió con una balanza digital (Seca, Hamburgo, Alemania) y la altura se midió usando un estadiómetro Seca. El IMC se calculó como peso (kg) / altura (m)<sup>2</sup> con percentiles para la edad y el sexo propuestos por el CDC<sup>6</sup>. El zIMC se determinó convirtiendo el IMC a puntajes de desviación estándar de edad y sexo usando el método LMS de acuerdo con el CDC<sup>66</sup>. Los niños con un IMC  $\geq 5$  y  $< 85$  percentil se clasificaron con peso normal y aquellos con un IMC  $\geq 95$  percentil con obesidad, de acuerdo con lo sugerido por el CDC (2000)<sup>6</sup>.

### **Toma de muestras de sangre**

Todos los niños incluidos al estudio fueron citados con un ayuno previo de 8-10 horas para la toma de una muestra de sangre de 10 ml. Las muestras se tomaron en un tubo con EDTA como anticoagulante y en uno seco. La muestra en el tubo con EDTA fue empleada para la extracción de DNA genómico y la muestra en el tubo seco se utilizó para extraer el suero y determinar la actividad de AMY1 y AMY2.

### **Extracción de DNA y determinación del NC de los genes *AMY1A* y *AMY2A***

El DNA genómico se extrajo de células mononucleares periféricas, utilizando el equipo AutoGenFlex STAR (Auto-Gen, Holliston, MA, EE. UU.). La pureza e integridad fueron evaluadas con las mediciones de absorbancia 260/280 nm (BioTek Instruments, Winooski, VT) y con electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. La determinación del NC se realizó mediante PCR digital en gotas, utilizando el Sistema QX200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) siguiendo el protocolo propuesto por Bonnefond *et al.*<sup>57</sup>. El volumen total de las reacciones fue de 40 µL, conteniendo 0.5 de la enzima U HindIII (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 11 µL de ddPCR SuperMix para sondas sin dUTP (Bio-Rad), 24 ng de ADN, 1.1 µL de sonda TaqMan dirigido a *AMY1A* o *AMY2A* (Hs07226362\_cn y Hs04204136\_cn, respectivamente; Thermo Fisher Scientific). Como gen de referencia se utilizó 1.1 µL de sonda TaqMan dirigido a la RNAsa P (Human RNaseP # 4403328; Thermo Fisher Scientific). El DNA genómico se digirió durante 5 minutos a 20° C, antes de ser mezclado con el aceite para generar las gotas de reacción en el QX200 (Bio-Rad). La amplificación se realizó por PCR en tiempo real en placas de 96 pozos (Bio-Rad) con un termociclador (Bio-Rad).



Los resultados de la PCR se leyeron usando un lector de gotas QX200 (Bio-Rad) y fueron analizados con el software QuantaSoft Analysis Pro (versión 1.0.596, Bio-Rad).

### **Medición de la actividad enzimática de AMY1 / AMY2**

La actividad enzimática de amilasa total y AMY2 se midieron en suero con un ensayo colorimétrico, en el analizador modular COBAS Icobas 8000 (Hoffman-La Roche. Basel, Suiza). La actividad enzimática de AMY1 se calculó restando la actividad de AMY2 de la actividad de la amilasa total basado en recomendaciones de Junge W. *et al.* (2001)<sup>67</sup>, solo los niños con actividades enzimáticas de 13 a 53 U/L de AMY2 y 29 a 99 U/L de amilasa total fueron incluidos en análisis.

### **Meta-Análisis de asociación entre el NC de AMY1A y obesidad infantil en México**

En el Meta-Análisis se incluyeron los datos del NC de AMY1A de 3,100 niños (1,693 con peso normal y 1,407 con obesidad) de tres estudios diferentes: 1) 1,895 niños (904 con peso normal y 678 con obesidad) del presente estudio; 2) 597 niños (304 con peso normal y 293 con obesidad de San Luis Potosí, Querétaro, Tijuana, Guanajuato y Ciudad de México) reportados por Mejía-Benítez *et al.* (2015); y 3) 921 niños (485 con peso normal y 436 con obesidad de Ciudad de México) reportados por León-Mimila *et al.* (2018). En todos los estudios, los niños con peso normal y con obesidad fueron definidos por los criterios del CDC (2000)<sup>6</sup>.

### **Medición de la ingesta de almidón**

La información de la ingesta de almidón se recopiló en 318 niños (198 con peso normal y 120 con obesidad, Tabla 3) de la Ciudad de México. Los patrones de ingesta de almidón se obtuvieron mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos semicuantitativo<sup>68</sup>. El consumo promedio diario se calculó en gramos de almidón según la frecuencia informada. El consumo de macronutrientes y la ingesta energética total de cada niño se determinó utilizando la base de datos de composición alimentaria de ENSANUT 2012<sup>68</sup>. Finalmente, para determinar la ingesta diaria de almidón dietético, se restaron los monosacáridos y disacáridos de la ingesta total de hidratos de carbono.

### **Análisis de los datos**

La distribución normal de variables continuas se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk. Para las variables que no presentaron normalidad, se aplicó el método de transformación de rangos inversos para alcanzar dicha normalidad. Los valores transformados fueron utilizados en los análisis. Las unidades de medida de las variables no se vieron afectadas por la transformación. La diferencia entre casos y controles de variables continuas y categóricas fueron evaluadas con las pruebas t de Student y Chi cuadrada, respectivamente. La asociación de variables continuas y categóricas se evaluó utilizando modelos de regresión lineal y logística, ajustado por edad, sexo y Estado de la república. En el Meta-Análisis, se utilizó un modelo de regresión logística ajustado por edad, sexo, estudio y Estado de la República para evaluar la asociación entre el NC de *AMY1A* y obesidad infantil. Con los datos sin normalizar, se crearon terciles de actividad enzimática

de AMY1 y AMY2 (denominadas como baja, media y alta actividad enzimática). Después se evaluó la asociación de los terciles con obesidad infantil.

Para la ingesta de almidón utilizamos el modelo residuos ajustado por ingesta de energía y los residuos se obtuvieron de un análisis de regresión lineal con la ingesta de almidón (gramos por día) como variable dependiente y la ingesta total de energía (MJ por día) como variable independiente. La interacción de la ingesta de almidón con la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 sobre el riesgo de obesidad infantil se evaluó mediante regresión logística. Las variables del efecto principal (actividad enzimática de AMY1 y AMY2) y el término de interacción se ingresaron en el modelo y se ajustaron por edad y sexo para evaluar el efecto sobre el riesgo de obesidad. Los valores P de dos colas  $<0.05$  se consideraron significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS (versión 22.0, IBM, Armonk, Nueva York).

## **RESULTADOS**

La asociación entre el NC de *AMY1A* y obesidad infantil se determinó en 1,582 niños ( $N_{\text{peso normal}}= 904$ ;  $N_{\text{obesidad}} = 678$ ) de Baja California Sur, Campeche, Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas. Para confirmar la asociación entre el NC de *AMY1A* y obesidad infantil, se realizó un Meta-Análisis con datos del NC de *AMY1A* de 3,100 niños ( $N_{\text{peso normal}}= 1,693$ ;  $N_{\text{obesidad}} = 1,407$ ) incluidos al presente estudio y previamente reportado en México. La asociación entre el NC de los genes *AMY1A* y *AMY2A* con la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 se evaluó en 451 niños ( $N_{\text{peso normal}}= 277$ ;  $N_{\text{obesidad}}= 174$ ) de la Ciudad de México. La asociación de la actividad

enzimática de AMY1 y AMY2 con obesidad infantil se estimó en 764 niños ( $N_{\text{peso normal}} = 427$ ;  $N_{\text{obesidad}} = 337$ ) de la Ciudad de México y Oaxaca. El efecto de la interacción entre la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 y la ingesta de almidón sobre la frecuencia de obesidad infantil, se determinó en 318 niños ( $N_{\text{peso normal}} = 198$ ;  $N_{\text{obesidad}} = 337$ ) de la Ciudad de México.

### **Asociación del NC de *AMY1A* con obesidad**

Las características de los 1,582 niños (904 con peso normal y 678 con obesidad) incluidos al análisis de asociación del NC de *AMY1A* con obesidad infantil se presentan en la Tabla 2. La edad y proporción de sexo fueron similares en ambos grupos de peso. El IMC e IMCz en niños con obesidad fue mayor que el de niños con peso normal ( $P_{\text{IMC}} = 4.1 \times 10^{-29}$ ,  $P_{\text{IMCz}} = 8.7 \times 10^{-42}$ ). Sin embargo, el grupo de niños con peso normal presentó 0.5 copias más de *AMY1A* que su contraparte con obesidad ( $p = 0.001$ ). El NC de *AMY1A* como variable continua se asoció negativamente con el riesgo de obesidad infantil (Variable continua: OR = 0.948 [CI95% = 0.912-0.985],  $p = 0.006$ , análisis ajustado por edad, sexo y Estado de la República).

**Tabla 2.** Características generales de los niños mexicanos con peso normal y obesidad incluidos al estudio, agrupados de acuerdo con el tipo de análisis realizado.

Tipo de Análisis / Variable	Peso normal	Obesidad	Valor <i>p</i>
<b>Asociación del NC de AMYIA con obesidad</b>	<b>N= 904</b>	<b>N= 678</b>	<b>NA</b>
Niñas, N (%)	453 (50.1)	352 (51.9)	0.477
Edad (años)	9.1 ± 2.0	9.1 ± 1.8	0.965
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16.6 ± 1.7	24.9 ± 3.3	<b>4.1x10<sup>-29</sup></b>
IMCz	0.02 ± 0.97	2.06 ± 1.39	<b>8.7x10<sup>-42</sup></b>
NC de AMYIA	6.5 ± 2.8	6.0 ± 2.4	<b>0.001</b>
<b>Asociación del NC con actividad enzimática</b>	<b>N= 277</b>	<b>N= 174</b>	<b>NA</b>
Niñas, N (%)	145 (52.3)	77 (44.3)	0.094
Edad (años)	9.7 ± 1.9	9.5 ± 1.8	0.325
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	17.1 ± 3.1	24.4 ± 2.9	<b>1.9x10<sup>-31</sup></b>
IMCz	0.23 ± 0.62	2.01 ± 0.66	<b>6.2x10<sup>-43</sup></b>
AMY1 (IU/L)	36.8 ± 19.5	31.6 ± 19.6	<b>0.007</b>
AMY2 (IU/L)	21.7 ± 7.3	19.5 ± 6.9	<b>0.002</b>
NC de AMYIA	6.8 ± 2.6	6.7 ± 2.5	0.510
NC de AMY2A	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	0.434
<b>Asociación de actividad enzimática con obesidad</b>	<b>N= 427</b>	<b>N= 337</b>	<b>NA</b>
Niñas, N (%)	250 (58.5%)	153 (45.4%)	<b>0.043</b>
Edad (años)	9.0 ± 1.9	9.2 ± 1.8	0.938
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16.9 ± 3.0	24.4 ± 2.7	<b>5.3x10<sup>-32</sup></b>
IMCz	0.24 ± 0.65	2.03 ± 0.77	<b>2.1x10<sup>-43</sup></b>
AMY1 (IU/L)	40.7 ± 20.5	35.6 ± 19.4	<b>0.001</b>
AMY2 (IU/L)	22.0 ± 7.0	20.0 ± 6.4	<b>5.7x10<sup>-5</sup></b>

Los datos se expresan como media ± desviación estándar o N (%). IMC, índice de masa corporal; IMCz: puntajes de desviación estándar ajustados de edad y sexo del IMC; AMY1: amilasa salival; AMY2: amilasa pancreática; NA: no analizado; NC, número de copias. La diferencia en la proporción de sexos y medias se analizaron con las pruebas Chi cuadrada y t de Student, respectivamente. Los valores significativos *p* (<0.05) se muestran en negritas.

### **Meta-Análisis de asociación entre el NC de *AMYIA* y obesidad infantil en México**

Las características de los 3,100 niños (1,693 con peso normal y 1,407 con obesidad) incluidos al Meta-Análisis de asociación del NC de *AMYIA* con obesidad infantil se presentan en la Tabla 3. En el estudio actual y en la cohorte de Mejía-Benítez *et al.*, la edad y proporción de sexo fueron similares en ambos grupos, sin embargo, el IMC e IMCz en niños con obesidad fue mayor que el de niños con peso normal (Estudio actual:  $P_{\text{IMC}}=4.1 \times 10^{-29}$ ,  $P_{\text{IMCz}}=8.7 \times 10^{-42}$ ; Mejía-Benítez *et al.*:  $P_{\text{IMC}}=6.4 \times 10^{-42}$ ;  $P_{\text{IMCz}}=2.9 \times 10^{-35}$ ). En ambas cohortes, el grupo de niños con peso normal presentó un mayor NC de *AMYIA* promedio que su contraparte con obesidad ( $P_{\text{Estudio actual}}=0.001$ ,  $P_{\text{Mejía-Benítez et al}}=4.25 \times 10^{-6}$ ). Mientras que, en la cohorte de León-Mimila *et al.*, la edad y el NC de *AMYIA* fueron similares en el grupo de peso normal y con obesidad, sin embargo, el IMC e IMCz fue mayor en niños con obesidad en comparación con el de niños con peso normal ( $P_{\text{IMC}}=3.9 \times 10^{-26}$ ,  $P_{\text{IMCz}}=8.4 \times 10^{-40}$ ). En el Meta-Análisis, el NC de *AMYIA* se asoció negativamente con el riesgo de obesidad infantil (N= 3,100; OR = 0.938 [CI95% = 0.914-0.963],  $p = 2.0 \times 10^{-6}$ ).

**Tabla 3.** Características generales de cada uno de los estudios realizados en niños mexicanos que se incluyeron en el Meta-Análisis para determinar la asociación entre el número de copias de *AMY1A* y obesidad infantil.

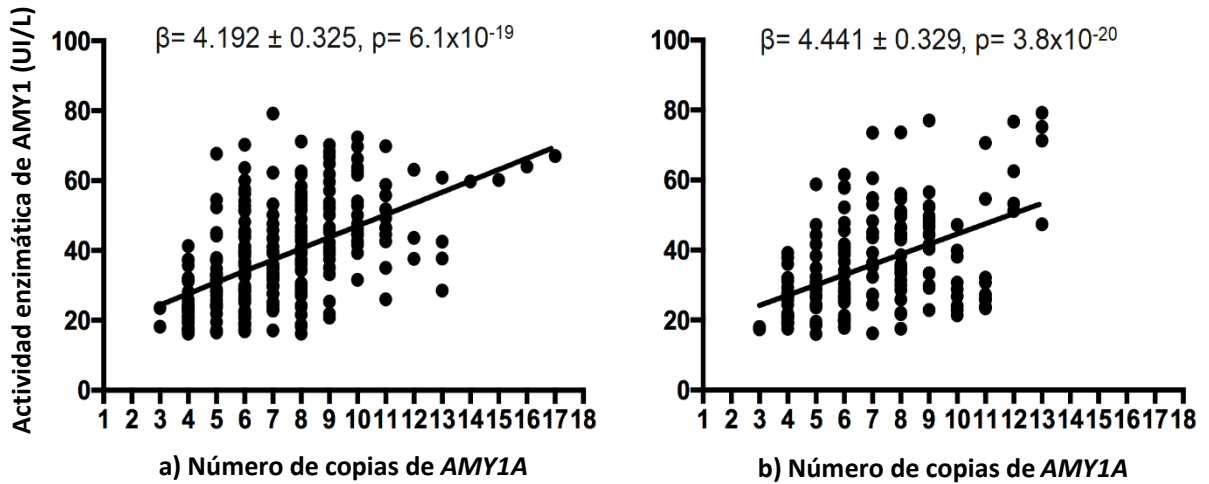
<b>Análisis / Variable</b>	<b>Peso normal N= 1,693</b>	<b>Obesidad N= 1,407</b>	<b>Valor <i>p</i></b>
<b>Estudio actual</b>	<b>N= 904</b>	<b>N= 678</b>	<b>NA</b>
Niñas, N (%)	453 (50.1)	352 (51.9)	0.477
Edad (años)	9.1 ± 2.0	9.1 ± 1.8	0.965
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16.6 ± 1.7	24.9 ± 3.3	<b>4.1x10<sup>-29</sup></b>
IMCz	0.02 ± 0.97	2.06 ± 1.39	<b>8.7x10<sup>-42</sup></b>
NC de <i>AMY1A</i>	6.5 ± 2.8	6.0 ± 2.4	<b>0.001</b>
<b>Mejía-Benítez <i>et al.</i></b>	<b>N= 304</b>	<b>N= 293</b>	<b>NA</b>
Niñas, N (%)	139 (45.7)	128 (43.7)	0.617
Edad (años)	9.5 ± 1.8	9.5 ± 1.7	0.880
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16.5 ± 1.8	25.2 ± 3.5	<b>6.4x10<sup>-42</sup></b>
IMCz	0.21 ± 0.93	2.02 ± 0.51	<b>2.9x10<sup>-35</sup></b>
NC de <i>AMY1A</i>	7.0 ± 2.7	6.1 ± 1.9	<b>4.25x10<sup>-6</sup></b>
<b>León-Mimila <i>et al.</i></b>	<b>N= 485</b>	<b>N= 436</b>	<b>NA</b>
Niñas, N (%)	266 (54.8)	178 (40.8)	<b>2.1x10<sup>-5</sup></b>
Edad (años)	8.9 ± 1.8	9.1 ± 1.8	0.162
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16.7 ± 1.7	24.6 ± 2.9	<b>3.9x10<sup>-26</sup></b>
IMCz	0.09 ± 0.69	2.06 ± 0.28	<b>8.4x10<sup>-40</sup></b>
NC de <i>AMY1A</i>	7.5 ± 3.1	7.1 ± 3.1	0.082

Los datos se expresan como media ± desviación estándar o N (%). IMC, índice de masa corporal; IMCz: puntajes de desviación estándar ajustados de edad y sexo del IMC; NA: no analizado; NC, número de copias. La diferencia en la proporción de sexos y medias se analizaron con las pruebas Chi cuadrada y t de Student, respectivamente. Los valores significativos de *p* (<0.05) se muestran en negritas.

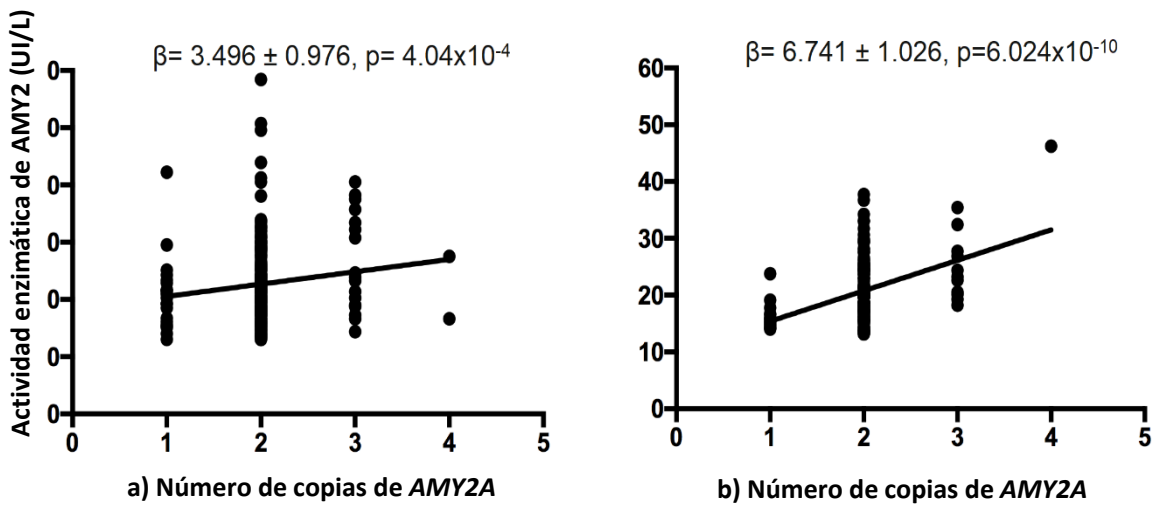
## **Asociación del NC de *AMY1A* y *AMY2A* con la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2***

Las características de los 451 niños (227 con peso normal y 174 con obesidad) incluidos al análisis de asociación del NC de *AMY1A* y *AMY2A* con la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* se presentan en la Tabla 2. La edad, proporción de sexo y el NC de *AMY1A* y *AMY2A* fueron similares en ambos grupos de peso. El IMC e IMCz en niños con obesidad fue mayor que el de niños con peso normal ( $P_{\text{IMC}}= 1.9 \times 10^{-31}$ ,  $P_{\text{IMCz}}= 6.2 \times 10^{-43}$ ). El grupo de niños con peso normal presentó una mayor actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* (5.2 y 2.2 UI/L, respectivamente) en comparación con su contraparte con obesidad ( $P_{\text{AMY1}}= 0.007$ ;  $P_{\text{AMY2}}= 0.002$ ). El NC de *AMY1A* y *AMY2A* se asoció positivamente con la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* respectivamente, en niños con peso normal (*AMY1*:  $\beta= 4.192 \pm 0.325$ ,  $p= 6.1 \times 10^{-19}$ ; *AMY2*:  $\beta= 3.496 \pm 0.976$ ,  $p= 4.04 \times 10^{-4}$ ; Figura 2) y con obesidad (*AMY1*:  $\beta= 4.441 \pm 0.3292$ ,  $p= 3.8 \times 10^{-20}$ ; *AMY2*:  $\beta= 6.741 \pm 1.026$ ,  $p= 6.024 \times 10^{-10}$ ; Figura 3). Análisis ajustado por edad, sexo y Estado de la República. Después de eliminar a los niños con cuatro copias de *AMY2A* del análisis de asociación con la actividad enzimática de *AMY2* (análisis de sensibilidad), la asociación se mantuvo significativa en ambos grupos (peso normal:  $\beta= 4.074 \pm 1.059$ ,  $p= 1.5 \times 10^{-4}$ ; obesidad:  $\beta= 6.415 \pm 1.094$ ,  $p= 2.358 \times 10^{-8}$ ).





**Figura 2.** Asociación entre el número de copias de *AMY1A* y la actividad enzimática de *AMY1* en niños a) con peso normal (n = 277) y b) obesidad (n = 174) utilizando un modelo de regresión lineal ajustado por edad, sexo y Estado de la República.



**Figura 3.** Asociación entre el número de copias de *AMY2A* y la actividad enzimática de *AMY2* en niños a) con peso normal (n = 277) y b) obesidad (n = 174) utilizando un modelo de regresión lineal ajustado por edad, sexo y Estado de la República.

### **Asociación de la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 con obesidad infantil.**

Las características de los 764 niños (427 con peso normal y 337 con obesidad) incluidos al análisis de asociación de la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 con obesidad infantil se presentan en la Tabla 2. La edad fue similar en ambos grupos, mientras que la proporción de niñas fue mayor en el de peso normal ( $p= 0.043$ ). El IMC e IMCz en niños con obesidad fue mayor que el de niños con peso normal ( $P_{\text{IMC}}= 5.3 \times 10^{-32}$ ,  $P_{\text{IMCz}}= 2.1 \times 10^{-43}$ ). El grupo de niños con peso normal presentó 5.1 y 2.0 UI/L de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 más que su contraparte con obesidad ( $P_{\text{AMY1}}= 0.001$ ;  $P_{\text{AMY2}}= 5.7 \times 10^{-5}$ ). La actividad enzimática de AMY1 y AMY2, como variable continua, se asoció negativamente con obesidad infantil (AMY1: OR= 0.984 [IC95% 0.976- 0.992],  $p= 4.493 \times 10^{-5}$ ; AMY2: OR = 0.960 [CI95% 0.938-0.983],  $p= 0.001$ , análisis ajustado por edad, sexo y Estado de la República). Además, se analizó la asociación de la actividad enzimática agrupándola por terciles: AMY1: baja (<27.7 UI / L), media (27.7-44.4 UI / L) y alta (> 44.4 UI / L); AMY2: baja (<17.8 UI / L), media (17.8-22.9 UI / L) y alta (> 22.9 UI / L). La asociación global de los terciles de actividad enzimática de AMY1 con obesidad infantil fue significativa (OR= 0.716 [IC95% 0.597-0.860],  $p= 3.42 \times 10^{-4}$ , análisis ajustado por edad, sexo y Estado de la República). De manera similar, la asociación global de los terciles de actividad enzimática AMY2 con la obesidad infantil fue significativa (OR= 0.754 [IC95% 0.631-0.902],  $p= 0.002$ , análisis ajustado por edad, sexo y Estado de la República). Posteriormente, se realizó un análisis de asociación utilizando combinaciones de los terciles de actividad enzimática de AMY1/AMY2 con obesidad infantil. La asociación global de estas categorías con la obesidad fue significativa (OR= 0.901 [CI% = 0.857-0.948],  $p= 5.564 \times 10^{-5}$ , análisis ajustado por edad,

sexo y Estado de la República). Los niños con baja/media, media/baja, media/alta, alta/baja, alta/media y alta/alta actividad enzimática de AMY1/AMY2 tenían un riesgo significativamente menor de obesidad en comparación con los niños con baja-baja actividad enzimática de AMY1/AMY2 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Asociación de obesidad con diferentes combinaciones de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 en suero con obesidad en 764 niños mexicanos.

Grupo de actividad enzimática		Categoría de peso corporal	N (%)	OR	Valor <i>p</i>
AMY1	AMY2				
B*	B*	Normal Obesidad	42 (40) 65 (60)	-	-
B	M	Normal Obesidad	45 (57) 34 (43)	0.388 (0.213-0.708)	<b>0.002</b>
B	A	Normal Obesidad	37 (54) 32 (46)	0.606 (0.311-1.179)	0.140
M	B	Normal Obesidad	54 (59) 38 (41)	0.469 (0.256-0.860)	<b>0.014</b>
M	M	Normal Obesidad	40 (47) 46 (53)	0.658 (0.360-1.200)	0.172
M	A	Normal Obesidad	50 (65) 27 (35)	0.295 (0.156-0.557)	<b>1.72x10<sup>-4</sup></b>
A	B	Normal Obesidad	30 (52) 28 (48)	0.510 (0.265-0.981)	<b>0.044</b>
A	M	Normal Obesidad	56 (63) 33 (37)	0.347 (0.187-0.645)	<b>0.001</b>
A	A	Normal Obesidad	73 (68) 34 (32)	0.239 (0.127-0.450)	<b>9.436x10<sup>-6</sup></b>
Global		Normal Obesidad	427 (56) 337 (44)	0.901 (0.857-0.948)	<b>5.564x10<sup>-5</sup></b>

Abreviaciones: AMY1: amilasa salival; AMY2: amilasa pancreática. Actividad enzimática AMY1 (IU/B): B, Baja (<27.7), M, media (27.7-44.4), A, alta (>44.4). Actividad enzimática AMY2 (IU/B): B, Baja (<17.8), M, media (17.8-22.9), A: alta (>22.9). Análisis por regresión logística ajustado por edad, sexo y Estado de la República. \*Grupo de referencia. Los valores significativos de *p* (<0.05) se muestran en negritas.

### **Efecto de la interacción entre la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y la ingesta de almidón, sobre la frecuencia de obesidad infantil.**

En una submuestra de 318 niños (198 de peso normal y 120 con obesidad) de la Ciudad de México, investigamos si la ingesta de almidón modifica la asociación de la actividad enzimática sérica de AMY1 y AMY2 con la obesidad infantil (Tabla 5). Los niños con peso normal y obesidad presentaron una ingesta similar de almidón (g/día) (peso normal =  $92.6 \pm 35.7$  versus obesidad =  $93.6 \pm 37.4$ ;  $p = 0.815$ ). El análisis de interacción entre la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 en particular, y la combinación de sus terciles con la ingesta de almidón, se realizó con la variable continua de ingesta (g/día). En este análisis, la actividad enzimática de AMY1, AMY2 mostraron interacción significativa con la ingesta de almidón sobre el riesgo de obesidad infantil ( $p = 0.049$  y  $p = 0.047$ , respectivamente, análisis ajustado por edad y sexo, Tabla 6). Las combinaciones de terciles de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 también mostraron interacción significativa con la ingesta de almidón sobre el riesgo de obesidad infantil ( $p = 0.023$ , análisis ajustado por edad y sexo, Tabla 5). Para confirmar la interacción entre la combinación de terciles de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 con la ingesta de almidón, se probó dicha interacción con los terciles de ingesta (baja, media, alta ingesta de almidón). Confirmamos una interacción significativa entre las combinaciones de terciles de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 y los terciles de ingesta de almidón ( $p = 0.004$ ). Los análisis post-hoc confirmaron que las combinaciones de terciles de actividad enzimática AMY1 y AMY2 se asociaron con el riesgo de obesidad infantil en los terciles de media y alta de ingesta de almidón ( $p = 0,012$  y  $p = 0,006$ , respectivamente),

pero no en el subgrupo de baja ingesta de almidón. ( $p= 0,77$ ) (pruebas ajustadas por edad y sexo, Figura 4).

**Tabla 5.** Características generales de los niños incluidos al análisis de interacción entre la actividad enzimática de amilasa salival y pancreática y la ingesta de almidón, sobre la frecuencia de obesidad infantil.

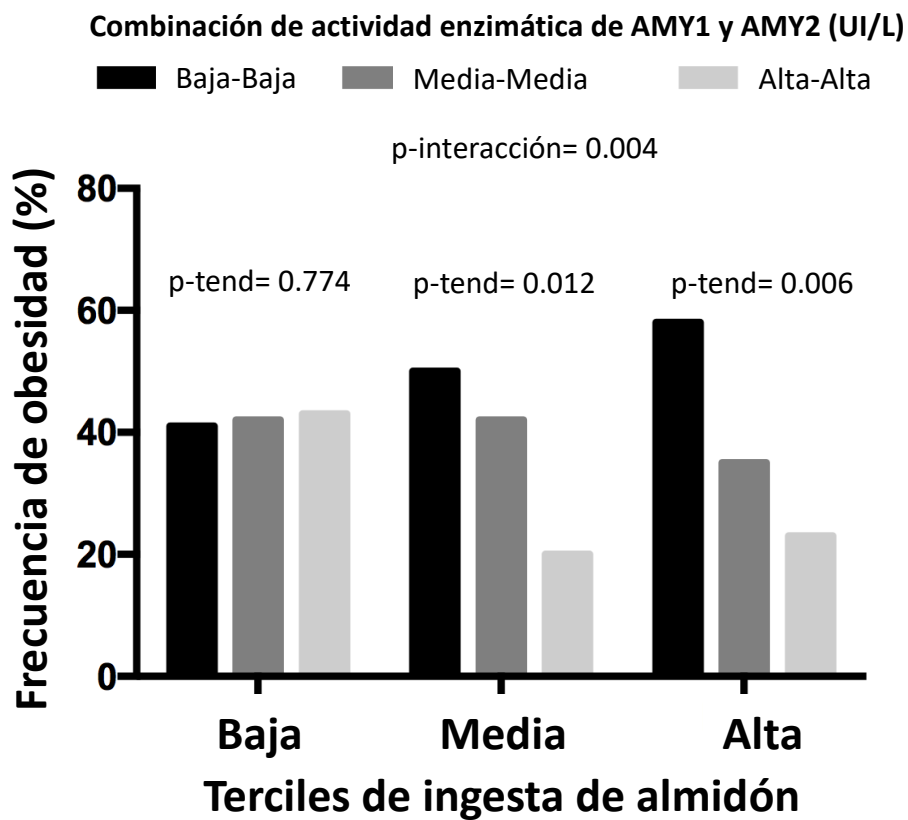
<b>Variable</b>	<b>N= 198</b>	<b>N= 120</b>	<b>Valor <i>p</i></b>
Niñas, N (%)	101 (51.0)	57 (47.5)	0.515
Edad (años)	9.8 ± 2.0	9.7 ± 2.0	0.540
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16.7 ± 3.2	25.0 ± 2.5	<b>1.8x10<sup>-34</sup></b>
IMCz	0.11 ± 0.65	2.09 ± 0.71	<b>2.4x10<sup>-40</sup></b>
AMY1 (UI/L)	36.3 ± 20.5	29.7 ± 19.4	<b>0.012</b>
AMY2 (UI/L)	21.1 ± 7.0	18.2 ± 6.4	<b>0.001</b>
AMY1A NC	6.6 ± 2.5	6.5 ± 2.6	0.443
AMY2A NC	1.95 ± 0.46	1.91 ± 0.44	0.681
Ingesta de energía (MJ/d)	9.4 ± 3.4	9.0 ± 3.3	0.576
Almidón (g/d)	92.6 ± 35.7	93.6 ± 37.4	0.815

Los datos se expresan como media ± desviación estándar o N (%). IMC, índice de masa corporal; IMCz: puntajes de desviación estándar ajustados de edad y sexo del IMC; AMY1: amilasa salival; AMY2: amilasa pancreática; NA: no analizado; NC, número de copias. La diferencia en la proporción de sexos y medias se analizaron con las pruebas Chi cuadrada y t de Student, respectivamente. Los valores significativos de  $p$  ( $<0.05$ ) se muestran en negritas.

**Tabla 6.** Interacción de la ingesta de almidón con la actividad enzimática de AMY1 y AMY2 sobre el riesgo de obesidad infantil.

Interacción de la ingesta de almidón con:	Peso normal / Obesidad N	Asociación	
		OR (IC 95%)	Valor <i>p</i>
Actividad enzimática de AMY1	182 / 115	0.999888 (0.999777- 0.999999)	<b>0.049</b>
Actividad enzimática de AMY2	182 / 115	0.999739 (0.999481- 0.999997)	<b>0.047</b>
Combinaciones de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 (BB/BM/BA/MB/MM/MA/AB/AM/AA)	182 / 115	0.99990 (0.99981- 0.99999)	<b>0.023</b>

Abreviaturas: BB: baja-baja; BM: baja-media; BA: baja-alta; MB: media-baja; MM: media-media; MA: media-alta; AB: alta-baja; AM: alta-media; AA: alta-alta. Análisis por regresión logística ajustado por edad y sexo. Los valores de *p* significativos ( $p < 0,05$ ) se indican en negrita.



**Figura 4.** Asociación de diferentes combinaciones de actividad enzimática de AMY1 y AMY2 con la frecuencia de obesidad en diferentes terciles de ingesta de almidón.  $N_{\text{Baja ingesta de almidón}} = 105$ ;  $N_{\text{Media ingesta de almidón}} = 108$ ;  $N_{\text{Alta ingesta de almidón}} = 105$ . Datos como frecuencia de obesidad. *P*-interacción y *P*-tendencia por regresión logística ajustada por edad y sexo.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo se enfocó en el análisis de niños mexicanos que se caracterizan por presentar una dieta con alto contenido de almidón y alta prevalencia de obesidad. Con los resultados obtenidos evidenciamos: 1) una asociación significativa entre el NC de *AMY1A* y obesidad infantil en una muestra de 1,582 niños de 15 diferentes Estados de la República, el cual se corroboró mediante un Meta-Análisis con 3,100 niños mexicanos; 2) una asociación positiva entre el NC de *AMY1A/AMY2A* y la actividad enzimática de *AMY1/AMY2* en niños con peso normal y obesidad; 3) una asociación negativa entre la actividad enzimática de *AMY1*, *AMY2* y sus combinaciones con obesidad infantil, específicamente en los niños que consumen una cantidad media/alta de almidón.

La asociación negativa entre el NC de *AMY1A* y la obesidad infantil observada en nuestros resultados, apoya los hallazgos de dos estudios previos en la población mexicana<sup>54,69</sup>. Sin embargo, la asociación del NC de *AMY1A* con obesidad infantil y la asociación positiva entre el NC de *AMY1A/AMY2A* y la actividad enzimática de *AMY1/AMY2* en niños con peso normal y obesidad, se estudian por primera vez en la población mexicana y los resultados obtenidos concuerdan con reportes previos de niños y adultos europeos<sup>52,57,61,70</sup>. Carpenter *et al.* en 2017 evidenciaron una correlación entre el NC de *AMY1A/AMY2A* en adultos europeos<sup>70</sup>. Del mismo modo, Falchi *et al.* en 2014 reportaron una asociación positiva entre el NC de *AMY1A/AMY2A* y la actividad enzimática sérica de *AMY1/AMY2* en individuos franceses con obesidad mórbida<sup>52</sup>. Bonnefond *et al.* en 2017 también reportaron una asociación negativa entre la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* con el IMC en la población francesa<sup>57</sup>. Además, Rukh *et al.* en 2017



evidenciaron que la ingesta de almidón en la dieta modifica la relación entre el NC de *AMY1A* con el IMC en adultos suecos<sup>70</sup>.

Nuestros datos contribuyen a entender uno de los mecanismos biológicos que puede resultar en una alta predisposición genética a la obesidad en niños mexicanos. Una actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* baja o alta determinada genéticamente por el NC de *AMY1A* y *AMY2A*, puede aumentar o disminuir el riesgo de obesidad en niños con una dieta media o alta en almidón. La asociación entre la digestión deficiente del almidón, inducida por la baja actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2*, y la obesidad puede parecer contradictoria a primera vista. Sin embargo, datos recientes sugieren que podría representar un caso de desregulación de diversidad bacteriana intestinal dado el aporte de los oligosacáridos como sustrato de la microbiota intestinal<sup>54</sup>. Esto se ilustra por la asociación significativa entre el NC de *AMY1A* y la abundancia del género bacteriano *Prevotella* en la microbiota intestinal de niños y adultos mexicanos reportada por Leon-Mimila *et al.* en 2018<sup>54</sup>. Teniendo en cuenta el papel importante de la composición de la microbiota intestinal en la regulación del equilibrio energético<sup>71</sup>, descifrar el impacto del NC de *AMY1A*, *AMY2A* y la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* en la diversidad de la microbiota intestinal y en la actividad de la amilasa bacteriana en las heces, podría representar un importante aporte de investigación en el futuro. Nuestro estudio proporciona un vínculo genético convincente entre el metabolismo de los hidratos de carbono y el riesgo de obesidad infantil en la población mexicana. Este hallazgo proporciona información sobre los mecanismos que subyacen a la obesidad, así como una justificación para la investigación de tratamientos innovadores para la obesidad basados en la manipulación de los niveles de enzimas digestivas<sup>52</sup>.

Nuestro estudio tiene varias fortalezas. Este es el primer estudio que describe la asociación del NC de *AMY1A* y *AMY2A* con la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2*, además de la asociación de la actividad enzimática *AMY1* y *AMY2* con obesidad en niños mexicanos, que representan una población poco investigada pero caracterizada por su alto consumo de almidón y una alta prevalencia de obesidad. Utilizamos tecnología innovadora para la determinación del NC de *AMY1A* y *AMY2A* y análisis sofisticados para determinar las asociaciones entre el NC de *AMY1A/AMY2A*, actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2*, consumo de almidón y obesidad infantil. Nuestros resultados muestran un menor riesgo de obesidad en el subgrupo de alta actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2*, con lo que se podría inferir que el efecto de una baja actividad de *AMY1* y *AMY2*, podría mitigarse con una dieta baja en almidón.

El estudio también presenta varias limitaciones. Somos conscientes de que nuestro diseño experimental fue modestamente desarrollado para un subconjunto de análisis. También reconocemos que usamos puntos de corte liberal para la significancia ( $P < 0.05$  bilateral). No estudiamos a adultos mexicanos y no proporcionamos datos sobre el microbiota intestinal y la actividad enzimática de la amilasa bacteriana en heces. Por último, en el Meta-Análisis de asociación entre el NC de *AMY1A* y obesidad infantil, combinamos los datos de NC determinados mediante diferentes métodos.

## CONCLUSIONES

- El aumento del NC *AMY1A* se asocia con menor riesgo de obesidad infantil.
- El aumento del NC de los genes *AMY1A* y *AMY2A* se asocia con el incremento de la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2*, respectivamente.
- El aumento de la actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2* se asocia con menor riesgo de obesidad infantil.
- Los niños con un consumo medio y alto de almidón y baja actividad enzimática de *AMY1* y *AMY2*, presentan mayor riesgo de obesidad, en comparación con los niños con media y alta actividad enzimática.

## PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

### *Artículos publicados*

1. Vazquez-Moreno M, Mejia-Benitez A, Sharma T, Peralta-Romero J, Locia-Morales D, Klunder-Klunder M, et al. Association of *AMY1A/AMY2A* copy numbers and *AMY1/AMY2* serum enzymatic activity with obesity in Mexican children. *Pediatr Obes.* 2020;15(8): e12641.
2. Vazquez-Moreno M, Perez-Herrera A, Locia-Morales D, Dizzel S, Meyre D, Stearns JC, Cruz M. Association of gut microbiome with fasting triglycerides, fasting insulin and obesity status in Mexican children. *Pediatr Obes.* 2020: e12748.

3. Vazquez-Moreno M, Locia-Morales D, Valladares-Salgado A, Sharma T, Wachter-Rodarte N, Cruz M, Meyre D. Sex/gender modifies the association between the MC4R p.Ile269Asn mutation and type 2 diabetes in the Mexican population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020: dgaa726.
4. Vazquez-Moreno M, Zeng H, Locia-Morales D, Peralta-Romero J, Asif H, Maharaj A, et al. The Melanocortin 4 Receptor p.Ile269Asn Mutation Is Associated with Childhood and Adult Obesity in Mexicans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(4).
5. Vazquez-Moreno M, Locia-Morales D, Perez-Herrera A, Gomez-Diaz RA, Gonzalez-Dzib R, Valdez-Gonzalez AL, et al. Causal Association of Haptoglobin With Obesity in Mexican Children: A Mendelian Randomization Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(7).
6. Suarez-Sanchez F, Vazquez-Moreno M, Herrera-Lopez E, Gomez-Zamudio JH, Peralta-Romero JJ, Castelan-Martinez OD, et al. Association of rs2000999 in the haptoglobin gene with total cholesterol, HDL-C, and LDL-C levels in Mexican type 2 diabetes patients. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(39):e17298.
7. Ramirez A, Hernandez M, Suarez-Sanchez R, Ortega C, Peralta J, Gomez J, et al. Type 2 diabetes-associated polymorphisms correlate with SIRT1 and TGF-beta1 gene expression. *Ann Hum Genet.* 2020;84(2):185-94.
8. Resendiz-Abarca CA, Flores-Alfaro E, Suarez-Sanchez F, Cruz M, Valladares-Salgado A, Del Carmen Alarcon-Romero L, et al. Altered Glycemic Control Associated With Polymorphisms in the SLC22A1 (OCT1) Gene in a Mexican Population With Type 2

Diabetes Mellitus Treated With Metformin: A Cohort Study. *J Clin Pharmacol.* 2019;59(10):1384-90.

### *Artículos en evaluación*

- Vázquez-Moreno et al., *Science Report.* 2020
- Vázquez-Moreno et al., *J Diabetes Complications.* 2020

## REFERENCIAS

1. Collaboration NCDRF. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet.* 2017;390(10113):2627-2642.
2. de Onis M, Blossner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(5):1257-1264.
3. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacional. *Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca, México.* 2020.
4. Parsons TJ, Power C, Logan S, Summerbell CD. Childhood predictors of adult obesity: a systematic review. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23 Suppl 8:S1-107.
5. Must A, Anderson SE. Body mass index in children and adolescents: considerations for population-based applications. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(4):590-594.
6. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, et al. 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat 11.* 2002(246):1-190.
7. Group WHOMGRS. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl.* 2006;450:76-85.
8. de Onis M, Garza C, Onyango AW, Borghi E. Comparison of the WHO child growth standards and the CDC 2000 growth charts. *J Nutr.* 2007;137(1):144-148.
9. Janssen I, Katzmarzyk PT, Srinivasan SR, et al. Utility of childhood BMI in the prediction of adulthood disease: comparison of national and international references. *Obes Res.* 2005;13(6):1106-1115.
10. W.H.O. Physical Status: The use and Interpretation of Anthropometry. *Technical report Series 854* 1995; Geneva, Switzerland: World Health Organization.
11. Twells LK, Newhook LA. Obesity prevalence estimates in a Canadian regional population of preschool children using variant growth references. *BMC Pediatr.* 2011;11:21.
12. W.H.O. Obesity and overweight. *World Health Organization.* 2020:<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Último acceso: mayo 02, 2020.

13. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-781.
14. Griffiths LJ, Parsons TJ, Hill AJ. Self-esteem and quality of life in obese children and adolescents: a systematic review. *Int J Pediatr Obes*. 2010;5(4):282-304.
15. Rosenbloom AL, Silverstein JH, Amemiya S, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. Type 2 diabetes mellitus in the child and adolescent. *Pediatr Diabetes*. 2008;9(5):512-526.
16. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association Annual Meeting, 1999: diabetes and obesity. *Diabetes Care*. 2000;23(1):118-124.
17. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(4):225-253.
18. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002;415(6869):339-343.
19. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).
20. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. 2003;26(8):2442-2450.
21. Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol*. 2018;8(3):1031-1063.
22. Folco EJ, Rocha VZ, Lopez-Illasaca M, Libby P. Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. *J Biol Chem*. 2009;284(38):25569-25575.
23. Dulloo AG, Jacquet J, Solinas G, Montani JP, Schutz Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 2:S4-17.
24. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(11):633-643.
25. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-787.
26. Maumus M, Sengenès C, Decaunes P, et al. Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):4098-4106.
27. Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(9):639-660.
28. Singh RG, Yoon HD, Wu LM, Lu J, Plank LD, Petrov MS. Ectopic fat accumulation in the pancreas and its clinical relevance: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Metabolism*. 2017;69:1-13.
29. Peraldi P, Spiegelman B. TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. *Mol Cell Biochem*. 1998;182(1-2):169-175.
30. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):360-376.
31. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 2001;60(3):349-356.
32. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):446-462.

33. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-336.
34. Engin AB. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:327-343.
35. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(12):943-986.
36. Stryjecki C, Alyass A, Meyre D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. *Obes Rev*. 2018;19(1):62-80.
37. Marjoram P, Zubair A, Nuzhdin SV. Post-GWAS: where next? More samples, more SNPs or more biology? *Heredity (Edinb)*. 2014;112(1):79-88.
38. Li A, Meyre D. Challenges in reproducibility of genetic association studies: lessons learned from the obesity field. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(4):559-567.
39. Choquet H, Meyre D. Molecular basis of obesity: current status and future prospects. *Curr Genomics*. 2011;12(3):154-168.
40. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):5-22.
41. Yengo L, Sidorenko J, Kemper KE, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in approximately 700000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet*. 2018;27(20):3641-3649.
42. Tam V, Turcotte M, Meyre D. Established and emerging strategies to crack the genetic code of obesity. *Obes Rev*. 2019;20(2):212-240.
43. Loos RJ, Yeo GS. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(1):51-61.
44. D'Angelo CS, Koiffmann CP. Copy number variants in obesity-related syndromes: review and perspectives on novel molecular approaches. *J Obes*. 2012;2012:845480.
45. Yang J, Bakshi A, Zhu Z, et al. Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. *Nat Genet*. 2015;47(10):1114-1120.
46. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-753.
47. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*. 2006;16(8):949-961.
48. Antunez-Ortiz DL, Flores-Alfaro E, Burguete-Garcia AI, et al. Copy Number Variations in Candidate Genes and Intergenic Regions Affect Body Mass Index and Abdominal Obesity in Mexican Children. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2432957.
49. Zhang D, Li Z, Wang H, et al. Interactions between obesity-related copy number variants and dietary behaviors in childhood obesity. *Nutrients*. 2015;7(4):3054-3066.
50. Jarick I, Vogel CI, Scherag S, et al. Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Hum Mol Genet*. 2011;20(4):840-852.
51. Yang TL, Guo Y, Shen H, et al. Copy number variation on chromosome 10q26.3 for obesity identified by a genome-wide study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1):E191-195.
52. Falchi M, El-Sayed Moustafa JS, Takousis P, et al. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet*. 2014;46(5):492-497.

53. Pinho S, Padez C, Manco L. High AMY1 copy number protects against obesity in Portuguese young adults. *Ann Hum Biol.* 2018;45(5):435-439.
54. Leon-Mimila P, Villamil-Ramirez H, Lopez-Contreras BE, et al. Low Salivary Amylase Gene (AMY1) Copy Number Is Associated with Obesity and Gut Prevotella Abundance in Mexican Children and Adults. *Nutrients.* 2018;10(11).
55. Yong RY, Mustaffa SB, Wasan PS, et al. Complex Copy Number Variation of AMY1 does not Associate with Obesity in two East Asian Cohorts. *Hum Mutat.* 2016;37(7):669-678.
56. Usher CL, Handsaker RE, Esko T, et al. Structural forms of the human amylase locus and their relationships to SNPs, haplotypes and obesity. *Nat Genet.* 2015;47(8):921-925.
57. Bonnefond A, Yengo L, Dechaume A, et al. Relationship between salivary/pancreatic amylase and body mass index: a systems biology approach. *BMC Med.* 2017;15(1):37.
58. Viljakainen H, Andersson-Assarsson JC, Armenio M, et al. Low Copy Number of the AMY1 Locus Is Associated with Early-Onset Female Obesity in Finland. *PLoS One.* 2015;10(7):e0131883.
59. Marcovecchio ML, Florio R, Verginelli F, et al. Low AMY1 Gene Copy Number Is Associated with Increased Body Mass Index in Prepubertal Boys. *PLoS One.* 2016;11(5):e0154961.
60. Venkatapoorna CMK, Ayine P, Parra EP, et al. Association of Salivary Amylase (AMY1) Gene Copy Number with Obesity in Alabama Elementary School Children. *Nutrients.* 2019;11(6).
61. Carpenter D, Mitchell LM, Armour JA. Copy number variation of human AMY1 is a minor contributor to variation in salivary amylase expression and activity. *Hum Genomics.* 2017;11(1):2.
62. Poole AC, Goodrich JK, Youngblut ND, et al. Human Salivary Amylase Gene Copy Number Impacts Oral and Gut Microbiomes. *Cell Host Microbe.* 2019;25(4):553-564 e557.
63. Pohl ME, Piperno DR, Pope KO, Jones JG. Microfossil evidence for pre-Columbian maize dispersals in the neotropics from San Andres, Tabasco, Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(16):6870-6875.
64. Sáyago-Ayerdi S, Tovar J, Zamora-Gasga V, Bello-Pérez L. Starch digestibility and predicted glycaemic index (pGI) in starchy foods consumed in Mexico. *Starch.* 2014;66:91–101.
65. Tovar J, Sáyago-Ayerdi S, Peñalver C, Paredes-López O, Bello-Pérez LA. In vitro starch hydrolysis index and predicted glycemic index of corn tortilla, black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), and Mexican "taco". *Cereal Chem.* 2003;80(5):533–535.
66. Leaf-nosed bat. In. *Encyclopædia Britannica: Encyclopædia Britannica Online*; 2009.
67. Junge W, Wortmann W, Wilke B, et al. Development and evaluation of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37 degrees C according to the principle recommended by the IFCC. *Clin Biochem.* 2001;34(8):607-615.
68. Gaona-Pineda EB, Mejia-Rodriguez F, Cuevas-Nasu L, Gomez-Acosta LM, Rangel-Baltazar E, Flores-Aldana ME. Dietary intake and adequacy of energy and nutrients in Mexican adolescents: Results from Ensanut 2012. *Salud publica de Mexico.* 2018;60(4):404-413.
69. Mejia-Benitez MA, Bonnefond A, Yengo L, et al. Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia.* 2015;58(2):290-294.
70. Rukh G, Ericson U, Andersson-Assarsson J, Orho-Melander M, Sonestedt E. Dietary starch intake modifies the relation between copy number variation in the salivary amylase gene and BMI. *Am J Clin Nutr.* 2017;106(1):256-262.



71. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-1031.

## Association of *AMY1A/AMY2A* copy numbers and *AMY1/AMY2* serum enzymatic activity with obesity in Mexican children

Miguel Vázquez-Moreno<sup>1,2</sup> | Aurora Mejía-Benitez<sup>2</sup> | Tanmay Sharma<sup>2</sup> |  
Jesús Peralta-Romero<sup>1</sup> | Daniel Locia-Morales<sup>1</sup> | Miguel Klünder-Klünder<sup>3</sup> |  
National Obesity Network Mexico<sup>4</sup> | Miguel Cruz<sup>1</sup> | David Meyre<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Hamilton, Canada

<sup>3</sup>Departamento de Investigación en Salud Comunitaria, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Instituto Mexicano del seguro social, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Canada

### Correspondence

David Meyre, Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Michael DeGroote Centre for Learning & Discovery, Room 3205, 1280 Main Street West, Hamilton, ON L8S 4K1, Canada. Email: meyre@d@mcmaster.ca

Miguel Cruz, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Av. Cuauhtémoc, 330 C.P. 06725, México City, Mexico. Email: mcruztl@yahoo.com

### Funding information

Canada Research Chairs: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Instituto Mexicano del Seguro Social; Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud PhD program from Universidad Nacional Autónoma de México; Mexican Institute of Social Security under the program of Priority Health Topics 2017

### SUMMARY

**Background:** Mexican children are characterized by a high-starch intake diet and high prevalence of obesity.

**Objectives:** To investigate the association of *AMY1A/AMY2A* copy numbers (CNs) and *AMY1/AMY2* serum enzymatic activity with childhood obesity in up to 427 and 337 Mexican cases and controls.

**Methods:** Anthropometric and dietary starch intake data were collected. CN of *AMY1A/AMY2A* and *AMY1/AMY2* serum enzymatic activity were determined using droplet digital PCR (ddPCR) and enzymatic colorimetry, respectively. An individual participant level data meta-analysis of association between *AMY1A* CNVs and obesity was also performed.

**Results:** A positive association between *AMY1A/AMY2A* CNs and their corresponding *AMY1/AMY2* serum enzyme activity was observed in children with normal weight and obesity. The serum enzyme activity of *AMY1* and *AMY2* was negatively associated with childhood obesity risk, and the association was restricted to kids eating medium/high amount of starch ( $P_{\text{interaction}} = .004$ ). While no association between *AMY1A* and *AMY2A* CNs and childhood obesity was observed in our sample, we confirmed a significant association between *AMY1A* CN and obesity in a meta-analysis of 3100 Mexican children.

**Conclusions:** Our data suggest that genetically determined salivary and pancreatic amylase activity can increase/decrease the risk of obesity in Mexican children, this effect being blunted by a low-starch diet.

### KEYWORDS

amylase, childhood obesity, copy-number variants, dietary starch intake, enzyme activity, Mexican population

## 1 | INTRODUCTION

The global prevalence of obesity has nearly tripled since 1975 according to the world health organization, but it affects certain countries more than others. Mexico has the second highest rate of obesity in the world, after the United States. In 2016, the national survey of health and nutrition of Mexico reported obesity prevalence rates of 15.3%, 13.9%, and 33.3% among children between the ages of 5 and 11 years, 12 and 19 years, and adults, respectively.<sup>1</sup> Childhood and adolescent obesity are associated with early-onset of co-morbidities (eg, type 2 diabetes, cardiovascular disease, cancer), and premature all-cause adult mortality.<sup>2</sup> While some therapeutic interventions are available for children (eg, lifestyle and behavioral modifications), there has been limited success in curbing the obesity epidemic so far.<sup>3</sup> Understanding the causes of obesity, especially in high-risk pediatric populations, has the potential to improve prediction, prevention and treatment of the disease.<sup>4</sup>

The recent obesity epidemic in Mexico can be explained in part by a rapid nutritional transition to Western diet and a decrease in average physical activity induced by the fast urbanization of the country.<sup>5,6</sup> However, not everyone exposed to an "obesogenic environment" becomes obese, and large inter-individual differences in body mass index (BMI) are observed among the Mexican population.<sup>5,7</sup> These differences can be attributed to biological factors: in utero programming, sex, age, ancestral background, gut microbiome, epigenetic and genetics.<sup>4</sup>

Twin and family studies in diverse ethnic groups, including Latino Americans, suggest that 40% to 75% of BMI variation is driven by genetic factors.<sup>8</sup> While common single-nucleotide variants account for 30% to 40% of heritability for BMI in children and adults,<sup>9,30</sup> structural variations may explain part of its missing heritability.<sup>11</sup> Rare and frequent copy number variants (CNVs) have been associated with childhood and adult obesity, predominantly in populations of European ancestry.<sup>4</sup> However, most of these associations have been challenging to reproduce.<sup>12</sup>

This is illustrated by the copy numbers (CNs) of the human salivary (AMY1A) and pancreatic (AMY2A) amylase genes.<sup>13,14</sup> In 2014, Falchi et al evidenced an association between low CN of the AMY1A gene, low serum amylase enzyme levels, and high risk of adult obesity in European and East Asian populations.<sup>13</sup> However, the accuracy of the q-PCR CN measurement method used in the Falchi et al study has been questioned,<sup>14-17</sup> and alternative methods (eg, droplet digital PCR [ddPCR] in combination with or without the classic q-PCR, PCR junction fragment assay) have been proposed to genotype the CN at the AMY1A and AMY2A genes.<sup>14-17</sup> In European populations, there is a fundamental structural distinction between haplotypes containing odd or even numbers of AMY1 gene units, which is in turn coupled with CN in pancreatic amylase genes AMY2A and AMY2B.<sup>16</sup> The association between CN at the AMY1A gene, genotyped using ddPCR, and BMI/obesity has been replicated in some but not all adult European and East Asian cohorts.<sup>14,15,18</sup> With respect to childhood obesity, associations between AMY1A CN and childhood obesity status have been described in European and African-American populations.<sup>17,19-21</sup> Additionally, an association between serum AMY1 and AMY2 enzymatic activity and BMI has also been observed in adult Europeans.<sup>17</sup>

Studying the associations of CNs at the AMY1A and AMY2A genes and serum AMY1 and AMY2 enzymatic activity with obesity-related traits in the Mexican population is of great interest, considering their high consumption of dietary starch.<sup>22,23</sup> This is owing to the fact that natural selection has resulted in a higher number of AMY1A copies in populations exposed to high-starch consumption,<sup>24</sup> and dietary starch intake has been shown to potentially modify the relation between AMY1A CN and BMI.<sup>25</sup> Mejia-Benitez et al reported an association between low AMY1A CN, measured by digital qPCR, and obesity in Mexican children.<sup>26</sup> More recently, AMY1A CN, measured by ddPCR, was associated with childhood and adult obesity in an independent Mexican sample.<sup>27</sup> While promising, these associations need further confirmation at this stage. In addition, the association of CN at the AMY2A gene and AMY1/AMY2 serum enzymatic activity with obesity has never been investigated to date in the Mexican population. Hence, this study aimed to assess: (a) the correlation between serum enzymatic activity of AMY1 and AMY2; (b) the association between serum enzymatic activity of AMY1 and AMY2 and childhood obesity; (c) the correlation between CNs of AMY1A and AMY2A genes; (d) the association between CNs of AMY1A and AMY2A genes and serum enzymatic activity of salivary and pancreatic amylase; (e) the association of CNs of AMY1A and AMY2A genes with childhood obesity; (f) the interaction between CNs of AMY1A and AMY2A genes, enzymatic activity of salivary and pancreatic amylase, starch intake and obesity risk; and (g) to perform a meta-analysis of association of the CN of AMY1A gene with childhood obesity in the Mexican population (Figure 1).

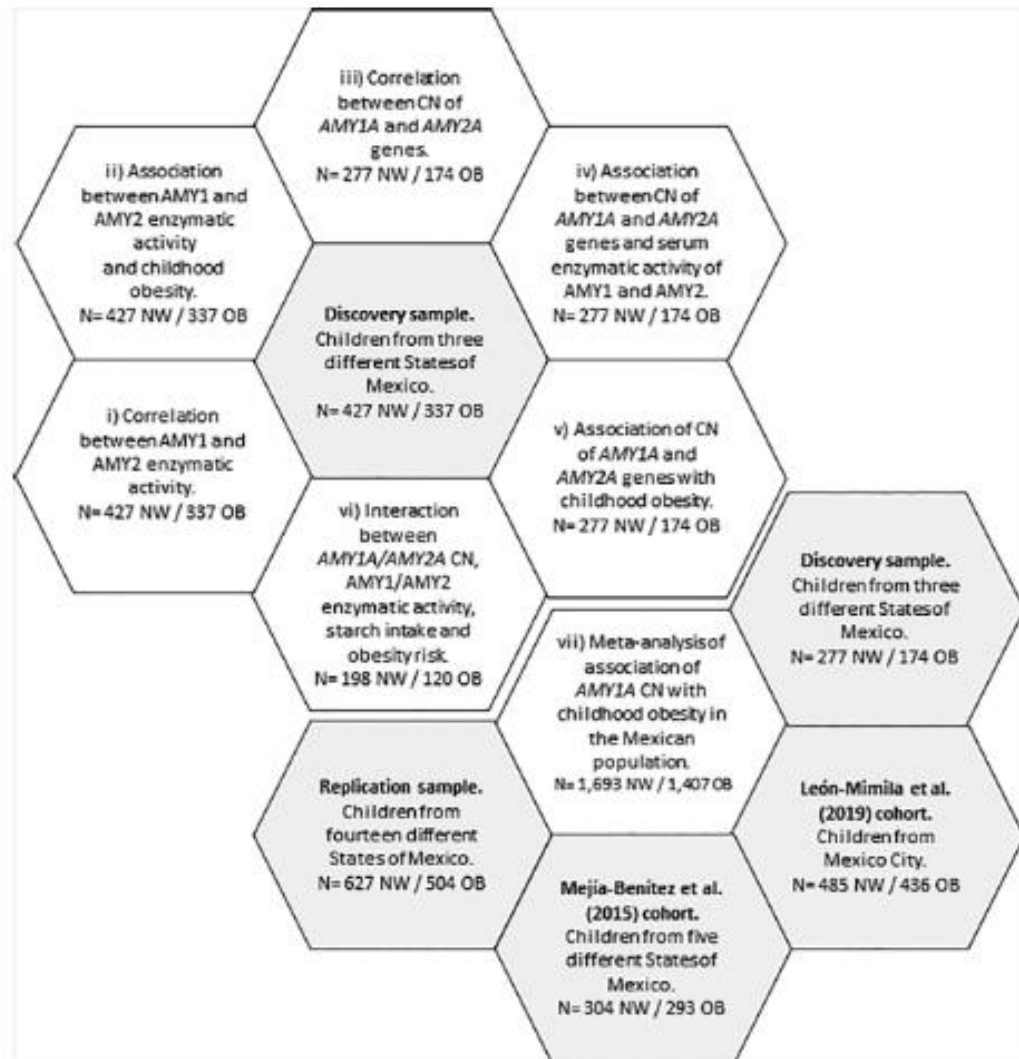
## 2 | METHODS

### 2.1 | Study participants

The research was approved by the ethics committee of the Mexican National Health Service ("Instituto Mexicano del Seguro Social" CONBIOETICA-09-CEI-009-20160601) and was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki. Child assent was obtained and parents (or legal guardians) provided written informed consent prior to enrollment into the study. In our discovery sample, a total of 764 children (427 with normal-weight and 337 with obesity) between the ages of 6 and 12 were enrolled from three different States in Mexico (Campeche, Oaxaca, and Mexico City) to evaluate the association of serum enzymatic activity of AMY1 and AMY2 ( $N_{\text{normal-weight}} = 427$ ;  $N_{\text{obesity}} = 337$ ) and CN of AMY1A and AMY2A ( $N_{\text{normal-weight}} = 277$ ;  $N_{\text{obesity}} = 174$ ) with obesity. The study was conducted from 2011 to October 2018 (Table 1).

In our replication sample, as part of the National Obesity Network Mexico initiative, we also collected genetic (AMY1A CN) and clinical data for 1131 children (627 with normal-weight and 504 with obesity), between the ages of 6 and 12, that were enrolled from 14 different States in Mexico (Baja California Sur, Campeche, Estado de Mexico, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Queretaro, Sinaloa, Sonora and Tamaulipas). The recruitment was conducted between June 2016 and October 2018 (Table S1).





**FIGURE 1** Flowchart of the study design. The study aims are represented in a white background and the sample(s)/cohort(s) are represented in a grey background. Abbreviations: AMY1, salivary amylase; AMY2, pancreatic amylase; CN, copy number; NW, normal weight; OB, obesity

## 2.2 | Anthropometric measurements

Subjects were instructed to wear light clothing and remove their shoes for the height and weight measurements. All measurements were performed by a trained nurse. Weight was measured using a digital weighing scale (Seca, Hamburg, Germany) to the nearest 0.1 kg and height was measured using a Seca 225 stadiometer to the nearest 0.1 cm. BMI was calculated as weight (kg)/height (m)<sup>2</sup> with percentiles for age and sex derived from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2000 references.<sup>20</sup> Children with a BMI  $\geq$ 5th and < 85th percentile were classified as normal weight, those with a

BMI  $\geq$ 85th and <95th percentile as overweight, and those with a BMI  $\geq$ 95th percentile as obese. We only enrolled children with normal-weight and obesity in this study (case control study design).

## 2.3 | Processing of blood samples

A blood sample for DNA extraction was collected in participants of the discovery and replication studies, following a 12-hour fast. In Campeche, Mexico City and Oaxaca states, two blood samples were taken, one of 4 mL to extract genomic DNA and one of 5 mL to

**TABLE 1** General characteristics of Mexican children with normal weight and obesity included in the discovery sample

Analysis/Trait	Normal weight	Obese	P value
<b>AMY1/AMY2 enzymatic activity analysis (discovery sample)</b>	<b>N = 427</b>	<b>N = 337</b>	<b>NA</b>
Female, N (%)	250 (58.5%)	153 (45.4%)	<b>0.043</b>
Age (years)	9.0 ± 1.9	9.2 ± 1.8	0.938
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	16.9 ± 3.0	24.4 ± 2.7	<b>5.3 × 10<sup>-32</sup></b>
SDS-BMI	0.24 ± 0.65	2.03 ± 0.77	<b>2.1 × 10<sup>-43</sup></b>
AMY1 (IU/L)	40.7 ± 20.5	35.6 ± 19.4	<b>0.001</b>
AMY2 (IU/L)	22.0 ± 7.0	20.0 ± 6.4	<b>5.7 × 10<sup>-5</sup></b>
<b>AMY1A/AMY2A copy number analysis (subset of the discovery sample)</b>	<b>N = 277</b>	<b>N = 174</b>	<b>NA</b>
Female, N (%)	145 (52.3)	77 (44.3)	0.094
Age (years)	9.7 ± 1.9	9.5 ± 1.8	0.325
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	17.1 ± 3.1	24.4 ± 2.9	<b>1.9 × 10<sup>-31</sup></b>
SDS-BMI	0.23 ± 0.62	2.01 ± 0.66	<b>6.2 × 10<sup>-43</sup></b>
AMY1 (IU/L)	36.8 ± 19.5	31.6 ± 19.6	<b>0.007</b>
AMY2 (IU/L)	21.7 ± 7.3	19.5 ± 6.9	<b>0.002</b>
AMY1A CN	6.8 ± 2.6	6.7 ± 2.5	0.510
AMY2A CN	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	0.434
<b>Starch intake interaction analysis (subset of the discovery sample)</b>	<b>N = 198</b>	<b>N = 120</b>	<b>NA</b>
Female, N (%)	101 (51.0)	57 (47.5)	0.515
Age (years)	9.8 ± 2.0	9.7 ± 2.0	0.540
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	16.7 ± 3.2	25.0 ± 2.5	<b>1.8 × 10<sup>-34</sup></b>
SDS-BMI	0.11 ± 0.65	2.09 ± 0.71	<b>2.4 × 10<sup>-40</sup></b>
AMY1 (IU/L)	36.3 ± 20.5	29.7 ± 19.4	<b>0.012</b>
AMY2 (IU/L)	21.1 ± 7.0	18.2 ± 6.4	<b>0.001</b>
AMY1A CN	6.6 ± 2.5	6.5 ± 2.6	0.443
AMY2A CN	1.95 ± 0.46	1.91 ± 0.44	0.681
Energy intake (MJ/d)	9.4 ± 3.4	9.0 ± 3.3	0.576
Starch (g/d)	92.6 ± 35.7	93.6 ± 37.4	0.815

Abbreviations: BMI, body mass index; SDS-BMI, -age and -sex adjusted SD scores of BMI; AMY1, salivary amylase; AMY2, pancreatic amylase; NA, not analyzed.

Notes: Data are expressed as mean ± SD or N (%). Difference in sex ratios was analyzed using the  $\chi^2$  test. Differences in means tests were analyzed using Student's *t*-tests. Significant *P* values (*P* < .05) are reported in bold.

extract the serum and to analyze the enzymatic activity of salivary and pancreatic amylase. Blood sample tubes for enzymatic activity analyses were kept in a vertical position for 30 minutes and centrifuged at 15 000 RPM for 10 minutes in the clinical laboratory from each local recruitment center. The serum was extracted and stored in 500  $\mu$ L aliquots together with the blood sample for DNA extraction at -20°C. The serum aliquots and blood sample tubes for DNA extraction were sent to the laboratory of the Mexican Institute of Social Security in Mexico City by project collaborators in an airtight cooler with at least 10 kg of dry ice. DNA extraction and enzymatic activity analyses were centralized in laboratories from Mexico City.

## 2.4 | Measurement of AMY1/AMY2 serum enzymatic activity

The participants were scheduled for clinical laboratory evaluation following a 12 hours overnight fasting period. Serum enzymatic activities of total amylase and AMY2 were measured by enzymatic colorimetric assay, with a COBAS Icobas 8000 modular analyzer series (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland). Experiments were performed in the CENAREM core laboratory facility (Mexico City). The enzymatic activity of AMY1 was calculated by subtracting the activity of AMY2 from the activity of total amylase. Only children with enzymatic activities of

13 to 53 U/L of AMY2 and 29 to 99 U/L of total amylase were included for analysis, based on previous recommendations.<sup>29</sup>

## 2.5 | DNA extraction and AMY1A and AMY2A CN detection

Genomic DNA of peripheral mononuclear cells was obtained from children. DNA was purified using the AutoGenFlex STAR (Auto-Gen, Holliston, MA, USA), and the purity and integrity were verified by 260/280 nm measurements (BioTek Instruments, Winooski, VT) as well as by electrophoresis in 0.8% agarose gels stained with ethidium bromide. The CN detection was performed by ddPCR using the QX200 system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) following the protocol proposed by Bonnefond et al.<sup>17</sup> Each duplex reaction of 40  $\mu$ L contained 0.5 of U HindIII (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 11  $\mu$ L of ddPCR SuperMix for Probes no dUTP (Bio-Rad), 24 ng of DNA, 1.1  $\mu$ L of TaqMan assay targeting AMY1A or AMY2A (Hs07226362\_cn or Hs04204136\_cn, respectively; Thermo Fisher Scientific) and 1.1  $\mu$ L of TaqMan assay targeting the reference RNase P assay (Human RNase P #4403328; Thermo Fisher Scientific). Genomic DNA was digested for 5 minutes at 20°C before submitting them to the Droplet Generator Oil (Bio-Rad) in the QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) and performing the PCR amplification in 96-well reaction plate (Bio-Rad) with a Thermal Cycler (Bio-Rad). Results from PCR amplification were read using a QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) and analyzed with the QuantaSoft Analysis Pro software (version 1.0.596, Bio-Rad). DNA extraction and CN genotyping were performed at the IMSS laboratory in Mexico City.

## 2.6 | Dietary starch intake measurement

Dietary starch intake information was collected in a subset of 318 children (198 with normal-weight and 120 with obesity, Table 1) from our discovery study sample ( $N_{total} = 764$ ). Intake patterns were obtained through a frequency questionnaire of semi-quantitative food consumption.<sup>30</sup> The average daily consumption was calculated in grams of food according to the frequency reported. The consumption of macronutrients and the total energy intake for each child was determined using the database of composition food of ENSANUT 2012.<sup>30</sup> Finally, to determine the daily dietary starch intake, we subtracted monosaccharides and disaccharides from the total carbohydrate intake.

## 2.7 | Meta-analysis

To confirm the association of the CN of AMY1A with childhood obesity in the Mexican population, we performed a meta-analysis using individual participant data from four independent cohorts with no overlap between studies (3100 children:  $N_{normal-weight} = 1693$ ;  $N_{obesity} = 1407$ , Table S1). Individual participant data meta-analyses

are more powered than study-level meta-analyses and are considered as the gold standard in epidemiology.<sup>31,32</sup> A double-blind search in the PubMed database was performed by M.V.M. and A.M.B. using the following key words: ("CNV" OR "copy-number variant") AND "obesity" AND "children" AND ("Mexican" OR "Mexico") AND "AMY1A". Two eligible studies in the literature including 304 controls and 293 cases from five different States of Mexico<sup>25</sup> and 485 controls and 436 cases from Mexico City<sup>27</sup> were selected. We also included two unpublished studies with genotype data pertaining to AMY1A CNs: 277 controls and 174 cases of obesity from the current study, as well as 627 controls and 504 cases from 14 States of Mexico. In all the studies, children with normal-weight and obesity were defined by the CDC 2000 criteria.<sup>25</sup> Logistic regression was used to test the association between AMY1A CN as a continuous or categorical (tertiles) variable and childhood obesity status. The regression model was adjusted for age, sex, study and state.

## 2.8 | Data analysis

The normal distribution of continuous variables was tested using the Shapiro-Wilk test. For the traits that significantly deviated from normality (ie, AMY1 and AMY2 enzyme activities), a rank-based inverse normal transformation was applied and the transformed values were used in the analyses (Table S2). The original units of measure in each variable were not affected by the rank-based inverse normal transformation (Figure S1). Differences between cases and controls for continuous and categorical traits were tested with Student's *t* and  $\chi^2$  test, respectively. The correlation between continuous traits was evaluated by Spearman's Rho. The association with continuous and categorical traits was assessed using linear and logistic regression models adjusted for age, sex and state. We created tertiles of AMY1/AMY2 serum enzymatic activities (low, medium and high) based on the raw data (Table S3). We then assessed the association between different combinations of tertiles of AMY1/AMY2 enzymatic activity, separately and together, with childhood obesity. The low AMY1, low AMY2, and alternatively the low AMY1/low AMY2 and medium AMY1/medium AMY2 enzymatic activity groups were considered as the reference groups. For the dietary starch intake, we used the residual model adjusted for energy and residuals that were taken from a regression analysis with starch intake (grams per day) as the dependent variable and total energy intake (MJ per day) as an independent variable. The interaction of starch intake with AMY1A/AMY2A CN and enzymatic activity of AMY1 and AMY2 on risk of childhood obesity was assessed using logistic regression. The variables of the main effect (AMY1A/AMY2A CN and enzymatic activity of AMY1 and AMY2) and the interaction term were entered into the model and adjusted for age and sex to evaluate the effect on obesity risk. We did not perform association studies between enzymatic activity and CN and SDS-BMI as a continuous trait. Obesity case control study designs are not compatible with these analyses and hence may result in biased estimations of the effects.<sup>33</sup> Based on the fact that (a) the present study is hypothesis-driven; (b) several independent research questions



are investigated; (c) a subset of these research questions have been previously tested in the literature; (d) several outcomes are not independent; applying a global Bonferroni correction across all the outcomes reduces the chance of making type I errors, but increases the chance of making type II errors.<sup>24,25</sup> Therefore, two-sided *P*-values <.05 were considered significant for each research question. All statistical analyses were performed with SPSS (version 22.0, IBM, Armonk, NY).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Characteristics of the study population

The characteristics of the 427 and 337 participants with normal-weight and obesity (discovery sample) are shown in Table 1. In the discovery sample, the average BMI in children with obesity was 7.5 kg/m<sup>2</sup> higher and 1.62 units higher with respect to SDS-BMI units. The obesity group contained 6.6% more boys than their normal-weight counterparts. The age was similar in the two groups.

#### 3.2 | Correlation between serum enzyme activity of AMY1 and AMY2

A positive correlation between the continuous values of serum enzymatic activity of AMY1 and AMY2 was observed in children with normal weight ( $Rho = 0.173$ ,  $P = 3.1 \times 10^{-4}$ ) and obesity ( $Rho = 0.217$ ,  $P = 5.7 \times 10^{-5}$ ) (Figure S2).

#### 3.3 | Association of serum enzymatic activity of AMY1 and AMY2 with childhood obesity

In children with normal weight, enzymatic activity levels of salivary and pancreatic amylase were higher by 14.3% and 10%, respectively, than in children with obesity (AMY1:  $40.7 \pm 20.5$  vs  $35.6 \pm 19.4$ ,  $P = .001$ ; AMY2:  $22.0 \pm 7.0$  vs  $20.0 \pm 6.4$ ,  $P = 5.7 \times 10^{-5}$ , Table 1). Tests adjusted for age, sex and state also showed a negative association between serum enzymatic activity of AMY1 and AMY2 as a continuous variable, and childhood obesity (AMY1:  $N = 764$ ,  $OR = 0.984$  [95% confidence interval (CI95%) 0.976-0.992],  $P = 4.493 \times 10^{-5}$ ; AMY2:  $N = 764$ ,  $OR = 0.960$  [CI95% 0.938-0.983],  $P = .001$ ). We then created tertiles of low (<27.7 IU/L), medium (27.7-44.4 IU/L) and high (>44.4 IU/L) activity of AMY1 and low (<17.8 IU/L), medium (17.8-22.9 IU/L) and high (>22.9 IU/L) activity of AMY2 (Table S3). The global association of AMY1 enzymatic activity tertiles with childhood obesity was significant ( $OR = 0.716$  [CI95% 0.597-0.860],  $P = 3.42 \times 10^{-4}$ , test adjusted for age, sex and state). Children with medium and high AMY1 enzymatic activity had a significantly lower risk of obesity when compared to children with low AMY1 enzymatic activity ( $OR = 0.676$  [CI95% 0.473-0.968],  $P = .032$  and  $OR = 0.509$  [CI95% 0.351-0.738],  $P = 3.63 \times 10^{-4}$ , respectively, tests adjusted for

age, sex and state). Similarly, the global association of AMY2 enzymatic activity tertiles with childhood obesity was significant ( $OR = 0.754$  [CI95% 0.631-0.902],  $P = .002$ , test adjusted for age, sex and state). Children with high (but not medium) AMY2 enzymatic activity had a significantly lower risk of obesity when compared to children with low AMY2 enzymatic activity ( $OR = 0.769$  [CI95% 0.541-1.093],  $P = .143$  and  $OR = 0.572$  [CI95% 0.400-0.819],  $P = .002$ , respectively, tests adjusted for age, sex and state). We then tested the association of the nine combinations of AMY1/AMY2 enzymatic activity tertiles with childhood obesity, based on their positive correlation in our sample. The global association of these categories with obesity was significant ( $OR = 0.901$  [CI% = 0.857-0.948],  $P = 5.564 \times 10^{-5}$ , test adjusted for age, sex and state). Children with low-medium, medium-low, medium-high, high-low, high-medium and high-high enzymatic activity of AMY1/AMY2 had a significantly lower risk of obesity when compared to children with low-low enzymatic activity of AMY1/AMY2 (Table 2). Using children with medium-medium enzyme activity of AMY1/AMY2 as the reference group did not sensibly change the results (Table S4).

#### 3.4 | Correlation between CNs of AMY1A and AMY2A genes

The CN of AMY1A in the whole sample ranged from 2 to 17. Sixty-one percent of children displayed a multiple of two copies of AMY1A (ie, even CN). Carriers of six copies of the AMY1A CN were the most frequent (18.5%) (Figure 2). In contrast, AMY2A CN ranged from 2 to 4 in the whole sample. Eighty-two percent of children displayed two or a multiple of two copies of AMY2A. Carriers of two copies of the AMY2A were the most common (81.4%) (Figure 2). Children with normal-weight having a multiple of two copies of AMY1A were more likely to have two copies of AMY2A ( $OR = 2.063$  [CI95% = 1.082-3.931],  $P = .028$ ). Similar pattern was found for children with obesity ( $OR = 2.251$  [CI95% = 1.062-4.772],  $P = .034$ ). We also found a significant positive correlation between CN of AMY1A and AMY2A as continuous variables in children with normal-weight ( $Rho = 0.179$ ,  $P = .003$ , Table S5). However, this correlation was not significant in children with obesity ( $Rho = 0.029$ ,  $P = .707$ , Table S5).

#### 3.5 | Association between CNs of AMY1A and AMY2A genes and serum enzyme activity of salivary and pancreatic amylase

The CN of AMY1A and AMY2A were positively associated with serum enzymatic activity of salivary and pancreatic amylase, respectively, in children with normal weight (CN and enzymatic activity analyzed as continuous traits; salivary:  $\beta = 4.192 \pm 0.325$ ,  $P = 6.1 \times 10^{-19}$ ; pancreatic:  $\beta = 3.496 \pm 0.976$ ,  $P = 4.04 \times 10^{-9}$ ) and obesity (salivary:  $\beta = 4.441 \pm 0.3292$ ,  $P = 3.8 \times 10^{-20}$ ; pancreatic:  $\beta = 6.741 \pm 1.026$ ,  $P = 6.024 \times 10^{-10}$ ) (Figures S3 and S4). In order to evaluate the potential impact of four copies of AMY2A on the association with

**TABLE 2** Association of different combinations of enzyme activity of AMY1 and AMY2 with obesity in 764 Mexican children

Enzyme activity group		Weight status	N (%)	Obesity	P
AMY1	AMY2				
L*	L*	Normal	42 (40)	—	—
		Obese	65 (60)		
L	M	Normal	45 (57)	0.388	<b>0.002</b>
		Obese	34 (43)	(0.213-0.708)	
L	H	Normal	37 (54)	0.606	0.140
		Obese	32 (46)	(0.311-1.179)	
M	L	Normal	54 (59)	0.469	<b>0.014</b>
		Obese	38 (41)	(0.256-0.860)	
M	M	Normal	40 (47)	0.658	0.172
		Obese	46 (53)	(0.360-1.200)	
M	H	Normal	50 (65)	0.295	<b>1.72 × 10<sup>-4</sup></b>
		Obese	27 (35)	(0.156-0.557)	
H	L	Normal	30 (52)	0.510	<b>0.044</b>
		Obese	28 (48)	(0.265-0.981)	
H	M	Normal	56 (63)	0.347	<b>0.001</b>
		Obese	33 (37)	(0.187-0.645)	
H	H	Normal	73 (68)	0.239	<b>9.436 × 10<sup>-4</sup></b>
		Obese	34 (32)	(0.127-0.450)	
Global		Normal	427 (56)	0.901	<b>5.564 × 10<sup>-5</sup></b>
		Obese	337 (44)	(0.857-0.948)	

Abbreviations: AMY1, salivary amylase; AMY2, pancreatic amylase.

Notes: Enzyme activity AMY1 (IU/L). L, low (<27.7), M, medium (27.7-44.4), H, high (>44.4). Enzyme activity AMY2 (IU/L). L, low (<17.8), M, medium (17.8-22.9), H, high (>22.9). Analysis by logistic regression, model adjusted for age, sex and state. Significant P values ( $P < .05$ ) are reported in bold.

\*Reference group in the analysis.

serum enzymatic activity of pancreatic amylase, we performed a sensitivity analysis without the four copies of AMY2A gene carriers. The CN of AMY2A was still significantly associated with serum enzymatic activity of pancreatic amylase in children with normal weight ( $\beta = 4.074 \pm 1.059$ ,  $P = 1.5 \times 10^{-4}$ ) and obesity ( $\beta = 6.415 \pm 1.094$ ,  $P = 2.358 \times 10^{-5}$ ). The cross associations of AMY1A CN/AMY2 enzymatic activity and AMY2A CN/AMY1 enzymatic activity as continuous variables were not significant in any group of study (normal weight:  $P = .653/P = .123$ ; obesity:  $P = .315/P = .931$ ) (Figures S5 and S6).

### 3.6 | Association of CN of AMY1A and AMY2A genes with obesity

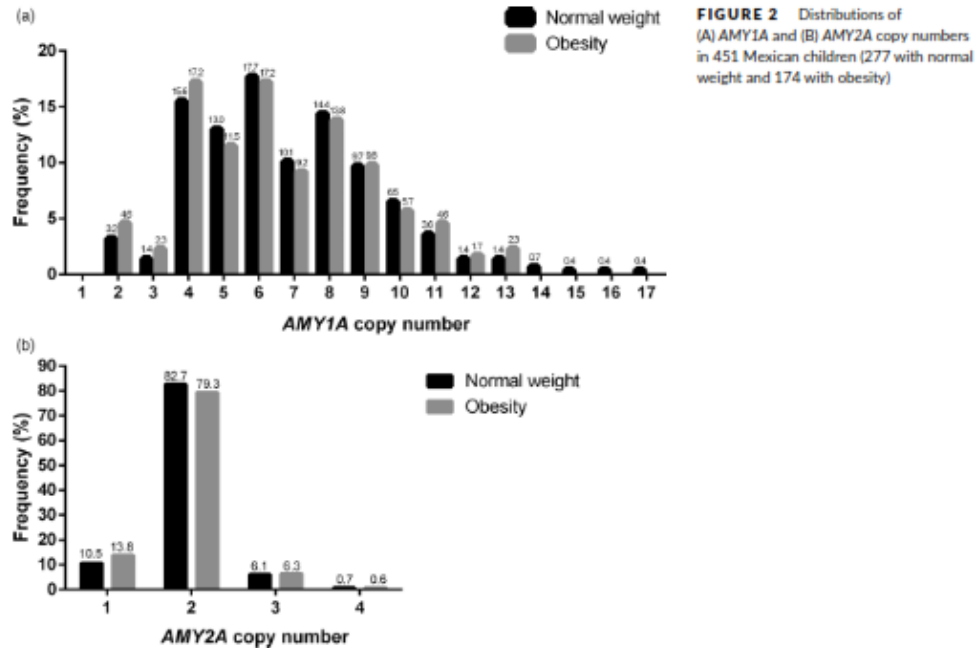
The association of AMY1A and AMY2A CN analyzed as a continuous trait with childhood obesity was not significant ( $N = 451$ , OR = 0.985 [CI95% = 0.934-1.039],  $P = .584$ ; OR = 0.854 [CI95% = 0.559-1.304],  $P = .465$ , respectively). Based on their distribution in the whole sample, we created tertiles of low (<6), medium (6-8) and high (>8) CN of AMY1A and low (<2), medium (2) and high (>2) CN of AMY2A (Table S3). Again, the association of AMY1A and AMY2A with childhood obesity was not significant (OR<sub>AMY1A</sub> = 1.000472

[CI95% = 0.850-1.178],  $P = .995$ ; OR<sub>AMY2A</sub> = 0.848 [CI95% = 0.543-1.323],  $P = .467$ ). Both analyses were adjusted for age, sex, study and state. We then created a new variable resulting from the multiplication of CNs of AMY1A and AMY2A, based on their positive correlation in our sample. The association of AMY1A/AMY2A CN combinations with childhood obesity only showed a trend of association when adjusted for age, sex and state (OR = 0.827 [CI95% = 0.673-1.017],  $P = .072$ ).

### 3.7 | Interaction between CN of AMY1A and AMY2A genes, enzymatic activity of salivary and pancreatic amylase, starch intake and obesity risk

In a subset of 198 and 120 children with normal-weight and obesity, we then investigated if starch intake modulates the association of CN of AMY1A and AMY2A genes, and serum enzymatic activity of AMY1 and AMY2 with childhood obesity (Table 1). Children with normal weight and obesity presented similar starch intake (g/day) (normal weight =  $92.6 \pm 35.7$  vs obesity =  $93.6 \pm 37.4$ ;  $P = .815$ ). The CN of AMY1A and AMY2A genes did not show a significant interaction with starch intake on the risk of childhood obesity when analyzed





separately (CN and starch intake analyzed as continuous traits, tests adjusted for age and sex, Table 3). Similar nonsignificant results were observed for the AMY1A/AMY2A CN tertile combinations (Table 3). In contrast, the enzyme activity of AMY1, AMY2 displayed a significant interaction with starch intake when tested with the risk of childhood obesity (CN and starch intake analyzed as continuous traits, tests adjusted for age and sex,  $P = .049$  and  $P = .047$ , respectively, Table 3). Similarly, the combinations of tertiles of enzyme activity of AMY1 and AMY2 showed a significant interaction with starch intake on the risk

of childhood obesity ( $P = .023$ , Table 3). To confirm the interaction between the combination of AMY1/AMY2 enzymatic activity, starch intake and obesity, we used combinations of tertiles of enzyme activity of AMY1 and AMY2 and tertiles of starch intake (Table S3). We confirmed a significant interaction between the combinations of tertiles of enzyme activity of AMY1 and AMY2 and tertiles of starch intake ( $P = .004$ ). Post-hoc analyses confirmed that the combinations of tertiles of AMY1 and AMY2 enzymatic activity were associated with childhood obesity in the medium and high tertiles of starch

**TABLE 3** Interaction of starch intake with AMY1A/AMY2A copy numbers and enzyme activity of AMY1 and AMY2 on risk of childhood obesity

Interaction of starch intake with:	Normal weigh/Obesity (N)	Association	
		OR (95% IC)	P
AMY1A copy number	191/117	0.999971 (0.999-1.001)	.928
AMY2A copy number	162/89	1.001 (0.998-1.004)	.625
Combinations of AMY1A and AMY2A copy numbers (LL/LM/LH/ML/MM/MH/HL/HM/HH)	162 /89	1.00015 (0.99953-1.00077)	.645
AMY1 enzyme activity	182/115	0.999888 (0.999777-0.999999)	<b>.049</b>
AMY2 enzyme activity	182/115	0.999739 (0.999481-0.999997)	<b>.047</b>
Combinations of AMY1 and AMY2 enzyme activity (LL/LM/LH/ML/MM/MH/HL/HM/HH)	182/115	0.99990 (0.99981-0.99999)	<b>.023</b>

Abbreviations: LL, low-low; LM, low-medium; LH, low-high; ML, medium-low; MM, medium-medium; MH, medium-high; HL, high-low; HM, high-medium; HH, high-high.

Notes: Analysis by logistic regression model adjusted for age and sex. Significant  $P$  values ( $P < .05$ ) are reported in bold.

intake ( $P = .012$  and  $P = .006$ , respectively), but not in the low starch intake subgroup ( $P = .77$ ) (tests adjusted for age and sex, Figure 3).

### 3.8 | Meta-analysis of association of the CN of AMY1A gene with childhood obesity in the Mexican population

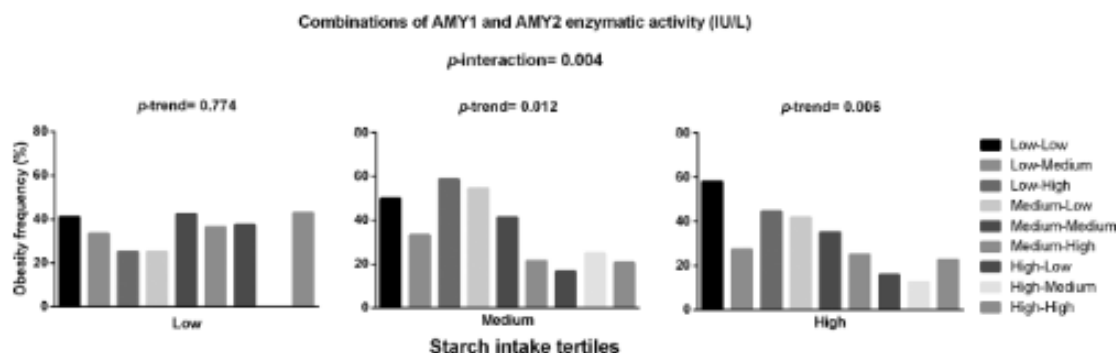
Since two larger Mexican cohorts previously reported an association between AMY1A CN and childhood obesity,<sup>26,27</sup> the lack of association in our sample may be related to modest statistical power. We therefore performed a meta-analysis using individual participant data from four independent Mexican case control studies ( $N_{obesity} = 1407$ ,  $N_{normal\_weight} = 1693$ , Table S1). The mean CN was lower in children with obesity compared to normal weight ( $6.4 \pm 2.6$  copies vs  $6.9 \pm 6.4$  copies,  $P = 1.0 \times 10^{-5}$ ). A significant negative association was found between AMY1A CN as a continuous variable and childhood obesity (OR = 0.937 [CI95% = 0.912-0.962],  $P = 2.0 \times 10^{-5}$ , Table S6). We then categorized the AMY1A CN using tertiles (low (<5), medium (5-8) and high (>8)) based on their distribution in the whole sample ( $N = 3100$ ). Again, a significant negative association between AMY1A CN and childhood obesity was observed (OR = 0.807 [CI95% = 0.726-0.897],  $P = 7.5 \times 10^{-5}$ , Table S7). Both tests were adjusted for age, sex, study and state. Sex and state, but not age and study, were significantly associated with childhood obesity in both regression models (Tables S6 and S7).

## 4 | DISCUSSION

We focused our research in Mexican children who are characterized by high-dietary intake of starch and high prevalence of obesity. We evidenced (a) a positive correlation between AMY1/AMY2 serum enzymatic activity in children with normal weight and obesity; (b) a negative association between the serum enzymatic activity of AMY1, AMY2 and their combinations and childhood obesity in individuals

eating medium/high amount of starch; 3) a contrasted pattern of correlation between AMY1A and AMY2A CNs in children with normal weight and obesity; (d) a positive association between AMY1A/AMY2A CNs and AMY1/AMY2 serum enzymatic activity in children with normal weight and obesity; (e) a trend of association between AMY1A/AMY2A CN combinations and childhood obesity; (f) a compelling association between AMY1A CN and childhood obesity in a meta-analysis of >3000 participants.

Our results are consistent with the existing literature. As an illustration, the negative association between AMY1A CN and childhood obesity observed in our meta-analysis of Mexican participants supported findings from two previous studies in the Mexican population.<sup>26,27</sup> While most of our findings (points 1-5 as cited above) have been evidenced for the first time in the Mexican population, they are in line with previous reports of European children and adults.<sup>13,16,17,25</sup> Carpenter et al evidenced a correlation between AMY1A/AMY2A CNs in European adults.<sup>16</sup> Similarly, Falchi et al reported a positive association between AMY1A/AMY2A CNs and AMY1/AMY2 serum enzymatic activity in French individuals with morbid obesity.<sup>13</sup> Strong negative associations between AMY1 or AMY2 enzymatic activity and BMI were also reported by Bonnefond et al in the French population.<sup>17</sup> Additionally, Rukh et al evidenced that dietary starch intake modifies the relation between AMY1A CN and BMI in Swedish adult participants.<sup>25</sup> Our data contributes to unveil a biological mechanism that results in high genetic predisposition to obesity in Mexican children. A genetically determined low/high salivary and pancreatic amylase activity can increase/decrease the risk of obesity in children with a medium/high-starch diet. The association between deficient digestion of starch, as induced by low enzymatic activity of AMY1 and AMY2 amylases, and obesity may seem counter-intuitive at a first glance. However, recent data suggest that it could represent a case of intestinal dysbiosis given the contribution of oligosaccharides as a substrate to the gut microbiota.<sup>27</sup> This is illustrated by the significant association between AMY1A CN and Prevotella bacteria abundance in the gut microbiome of Mexican children and adults reported by Leon-Mimila et al.<sup>27</sup> Considering the important role of gut microbiome



**FIGURE 3** Association of different combinations of tertiles of enzyme activity of AMY1 and AMY2 with obesity risk in tertiles of starch intake.  $N_{Low}$  starch intake = 105;  $N_{Medium}$  starch intake = 108;  $N_{High}$  starch intake = 105. Data as frequency of obesity.  $P$ -interaction and  $P$ -trend by logistic regression model adjusted for age and sex

composition in the regulation of energy balance,<sup>36</sup> deciphering the impact of *AMY1A/AMY2A* CNs/enzymatic activity of *AMY1* and *AMY2* on the whole gut microbiome diversity and on bacterial amylase activity in feces represents an important direction of research for the future. Our study provides a compelling genetic link between carbohydrate metabolism and risk of childhood obesity in the Mexican population. This finding provides insight into original biological mechanisms underlying obesity, as well as a rationale for the investigation of innovative obesity treatments based on the manipulation of digestive enzyme levels.<sup>12</sup>

Our study has several strengths. This is the first report that describes the associations of *AMY2A* CN with *AMY2* enzymatic activity and *AMY1/AMY2* enzymatic activity with obesity in Mexican children. We focused our research on Mexican children, a traditionally under-investigated but highly relevant population characterized by high-starch intake and high prevalence of obesity. We used innovative technologies and sophisticated analyses for *AMY1A/AMY2A* CN, serum enzymatic activity of *AMY1* and *AMY2*, starch intake consumption and childhood obesity, and our study can therefore be considered as the most exhaustive report to date in the Mexican population.<sup>26,27</sup> Our study displays a lower risk of obesity in the high-high *AMY1/AMY2* enzymatic activity subgroup. Our results further elucidate how these effects can be totally blunted by a low-starch diet.

Nevertheless, our study also presents several limitations. We are aware that our experimental design was modestly powered for a subset of analyses. We also acknowledge that we used liberal cut-offs for significance (two-sided  $P < .05$ ), and we strongly recommend that novel associations should be replicated in independent Mexican samples. We did not study Mexican adults and did not provide data on gut microbiome and bacterial amylase enzymatic activity. Lastly, we combined CN data genotyped by different methods in our meta-analysis of association between *AMY1A* CN and childhood obesity. While there is no doubt that the *AMY1A/AMY2A* CN detection accuracy varies depending on the laboratory method used, the absence of between-study heterogeneity in our meta-analysis suggests that the impact of methodological bias, at least with respect to the *AMY1A* CN, may be minimal.<sup>14,17</sup>

In conclusion, our data suggests that genetically determined low/high salivary and pancreatic amylase activity can increase/decrease the risk of obesity by two-times in a case control Mexican pediatric population, with the effect being blunted by a low- dietary intake of starch. Our study contributes to unveil a biological mechanism that predisposes to childhood obesity, and paves the way of future nutrigenomic interventions based on dietary recommendations adapted to specific genetic/biomarker profiles in Mexican children.

#### CONFLICT OF INTEREST

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


#### ACKNOWLEDGEMENTS

M.V.M, M.C. and D.M. designed the study; M.V.M, A.M.B., T.S., J.P.R., D.L.M., M.K.K., M.C. and D.M. conducted research; M.V.M,

A.M.B. and D.M. analyzed data; M.V.M., A.M.B. and D.M. wrote the manuscript; M.V.M., A.M.B. and D.M. designed the tables and figures. T.S., J.P.R., D.L.M., M.K.K. and M.C. critically reviewed the manuscript for important intellectual content; M.V.M., M.C. and D.M. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript. We are grateful to all participants involved in this study. We would like to acknowledge Aracely Méndez-Padron (Instituto Mexicano del Seguro Social [IMSS], Mexico) and Anila Qasim (McMaster University, Canada) for the technical assistance. We would like to thank Dr. Paola León-Mimila and Pr. Samuel Canizales-Quinteros for assistance in retrieving data for the meta-analysis. We would like to thank Dr. Jennifer Stearns for helpful discussions. This work was supported by grants from the Mexican Institute of Social Security under the program of Priority Health Topics 2017 (Grant No. FIS/IMSS/PROT/PRI0/17/062). MVM (Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud PhD program from Universidad Nacional Autónoma de México) and DLM (Ciencias Biomédicas PhD program from Universidad Autónoma de Guerrero) were supported by PhD fellowships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and IMSS (Mexico). In addition, MVM received a travel award from the IMSS, Mexico. D.M. is supported by a Canada Research Chair in Genetics of Obesity.

#### ORCID

Miguel Cruz  <https://orcid.org/0000-0001-9985-6172>

David Meyre  <https://orcid.org/0000-0003-4850-7444>

#### REFERENCES

1. Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Gomez-Acosta LM, et al. Effects of SaludArte program in feeding and nutrition components in school children in Mexico city. *Salud Pública de México*. 2017;59(6):621-629.
2. Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *Int J Obes*. 2011;35(7):891-898.
3. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-781.
4. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci*. 2016;130(12):943-986.
5. Stern D, Piamas C, Barquera S, Rivera JA, Popkin BM. Caloric beverages were major sources of energy among children and adults in Mexico, 1999-2012. *J Nutr*. 2014;144(6):949-956.
6. Aceves-Martins M, Llauro E, Tarro L, Sola R, Giralt M. Obesity-promoting factors in Mexican children and adolescents: challenges and opportunities. *Glob Health Action*. 2016;9:29625.
7. Wardle J, Boniface D. Changes in the distributions of body mass index and waist circumference in English adults, 1993/1994 to 2002/2003. *Int J Obes*. 2008;32(3):527-532.
8. Stryjecki C, Alyass A, Meyre D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. *Obes Rev*. 2018;19(1):62-80.
9. Llewellyn CH, Trzaskowski M, Plomin R, Wardle J. Finding the missing heritability in pediatric obesity: the contribution of genome-wide complex trait analysis. *Int J Obes*. 2013;37(11):1506-1509.
10. Yang J, Bakshi A, Zhu Z, et al. Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. *Nat Genet*. 2015;47(10):1114-1120.



11. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-753.
12. Walters RG, Coin LJ, Ruokonen A, et al. Rare genomic structural variants in complex disease: lessons from the replication of associations with obesity. *PLoS One*. 2013;8(3):e58048.
13. Falchi M, El-Sayed MJS, Takousis P, et al. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet*. 2014;46(5):492-497.
14. Usher CL, Handsaker RE, Esko T, et al. Structural forms of the human amylase locus and their relationships to SNPs, haplotypes and obesity. *Nat Genet*. 2015;47(8):921-925.
15. Yong RY, Mustafa SB, Wasan PS, et al. Complex copy number variation of AMY1 does not associate with obesity in two east Asian cohorts. *Hum Mutat*. 2016;37(7):669-678.
16. Carpenter D, Dhar S, Mitchell LM, et al. Obesity, starch digestion and amylase: association between copy number variants at human salivary (AMY1) and pancreatic (AMY2) amylase genes. *Hum Mol Genet*. 2015;24(12):3472-3480.
17. Bonnefond A, Yengo L, Dechaume A, et al. Relationship between salivary/pancreatic amylase and body mass index: a systems biology approach. *BMC Med*. 2017;15(1):37.
18. Pinho S, Padez C, Manco L. High AMY1 copy number protects against obesity in Portuguese young adults. *Ann Hum Biol*. 2018;45(5):435-439.
19. Viikari-Juntura H, Andersson-Assarsson JC, Armenio M, et al. Low copy number of the AMY1 locus is associated with early-onset female obesity in Finland. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131883.
20. Marcovecchio ML, Florio R, Verginelli F, et al. Low AMY1 gene copy number is associated with increased body mass index in Prepubertal boys. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154961.
21. Venkatapoorna CMK, Ayine P, Parra EP, et al. Association of salivary amylase (AMY1) gene copy number with obesity in Alabama elementary school children. *Nutrients*. 2019;11(6). pii: E1379-1388.
22. Sayago-Ayerdi SG, Tovar J, Zamora-Gasca VM, Bello-Perez LA. Starch digestibility and predicted glycaemic index (pGI) in starchy foods consumed in Mexico. *Star*. 2013;66(1-2):91-101.
23. Sayago-Ayerdi SG, Tovar J, Osorio-Diaz P, Paredes-Lopez O, Bello-Perez LA. In vitro starch digestibility and predicted glycemic index of corn tortilla, black beans, and tortilla-bean mixture: effect of cold storage. *J Agric Food Chem*. 2005;53(4):1281-1285.
24. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, et al. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet*. 2007;39(10):1256-1260.
25. Rukh G, Ericson U, Andersson-Assarsson J, Orho-Melander M, Sonestedt E. Dietary starch intake modifies the relation between copy number variation in the salivary amylase gene and BMI. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(1):256-262.
26. Mejia-Benitez MA, Bonnefond A, Yengo L, et al. Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia*. 2015;58(2):290-294.
27. Leon-Mimila P, Villamil-Ramirez H, Lopez-Contreras BE, et al. Low salivary amylase gene (AMY1) copy number is associated with obesity and gut Prevotella abundance in Mexican children and adults. *Nutrients*. 2018;10(11). pii: E1607-1619.
28. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, et al. CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat*. 2000;2002(246):1-190.
29. Junge W, Wortmann W, Wilke B, et al. Development and evaluation of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37 degrees C according to the principle recommended by the IFCC. *Clin Biochem*. 2001;34(8):607-615.
30. Gaona-Pineda EB, Mejia-Rodriguez F, Cuevas-Nasu L, Gomez-Acosta LM, Rangel-Baltazar E, Flores-Aldana ME. Dietary intake and adequacy of energy and nutrients in Mexican adolescents: results from Ensanut 2012. *Salud Publica de Mexico*. 2018;60(4):404-413.
31. Chalmers I. The Cochrane collaboration: preparing, maintaining, and disseminating systematic reviews of the effects of health care. *Ann NY Acad Sci*. 1993;703:156-163. discussion 163-155.
32. Ehteshami S, Qasim A, Meyre D. Loss-of-function mutations in the melanocortin-3 receptor gene confer risk for human obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2019;20(8):1085-1092.
33. Wang J, Shete S. Estimation of odds ratios of genetic variants for the secondary phenotypes associated with primary diseases. *Genet Epidemiol*. 2011;35(3):190-200.
34. Feise RJ. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC Med Res Methodol*. 2002;2:8.
35. Leon AC, Heo M, Teres JJ, Morikawa T. Statistical power of multiplicity adjustment strategies for correlated binary endpoints. *Stat Med*. 2007;26(8):1712-1723.
36. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-1031.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Vázquez-Moreno M, Mejía-Benitez A, Sharma T, et al. Association of AMY1A/AMY2A copy numbers and AMY1/AMY2 serum enzymatic activity with obesity in Mexican children. *Pediatric Obesity*. 2020:e12641. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12641>

#### APPENDIX A | AUTHOR'S APPENDIX

##### National Obesity Network Mexico.

**Baja California Sur State:** Andrea S. Álvarez-Villaseñor; Kelly G. Acosta; Raquel Flores-Torrecillas; Uriel Flores-Osuna; Mariell G. García-Avilés.

**Campeche State:** Roxana del S. González-Dzib.

**Chihuahua State:** René A. Gameros-Gardea.

**México State:** María L. Pizano-Zárate; María del S. Romero-Figueroa; Jorge A. Núñez-Hernández; Verónica de León-Camacho;

**Mexico City:** Roberto Karam-Araujo; Perla Corona-Salazar; Adán Valladares-Salgado, Fernando Suarez-Sánchez; Jaime Gómez-Zamudio; Eugenia Flores-Alfaro.

**Guanajuato State:** Gloria P. Sosa-Bustamante; Arturo Reyes-Hernández; Catalina Peralta-Cortázar; Emmanuel G. Martínez-Morales; Luz V. Díaz de León-Morales; Irma L. del C. González-González; Arturo M. Reyes-Sosa; Sonia Lazcano-Bautista; Marcela Martínez-Chávez; Fátima D. González-Serrano; Alma N. Rodríguez-Alfaro; Blanca O. Murillo-Ortiz.

**Hidalgo State:** María G. Arteaga-Alcaraz; Nandy García-Silva; Moisés Herrera-Lemus; Gress M. Gómez-Arteaga.

**Michoacán State:** Anel Gómez-García; Martha V. Urbina-Treviño; Diana C. Villalpando-Sánchez; Cleto Álvarez-Aguilar.

**Nayarit:** Ramón E. Jiménez-Arredondo.

**Monterrey State:** Martha I. Dávila-Rodríguez; Francisco González-Salazar; Laura H. de la Garza-Salinas.

**Oaxaca State:** Aleyda Pérez-Herrera.

**Puebla State:** Socorro Méndez-Martínez; Jorge Martínez-Torres; Elizabeth Méndez-Fernández; Víctor A. Segura-Bonilla; Mariana Gutiérrez-Hernández.

**Querétaro State:** Lilia S. Gallardo-Vidal; Leticia Blanco-Castillo; José J. García-González.

**Sinaloa State:** Julio M. Medina-Serrano; Adrián Canizales-Román.

**Sonora State:** Cruz M. López-Morales; Jaime G. Valle-Leal.

**Tamaulipas State:** Martín Segura-Chico; Rafael Violenté-Ortiz; Verónica Fernández-Jiménez; Norma A. Sánchez-Hernández.

# Association of gut microbiome with fasting triglycerides, fasting insulin and obesity status in Mexican children

Miguel Vazquez-Moreno<sup>1</sup> | Aleyda Perez-Herrera<sup>2</sup> | Daniel Locia-Morales<sup>1</sup> | Sara Dizzel<sup>3</sup> | David Meyre<sup>4,5</sup> | Jennifer C. Stearns<sup>3,6</sup> | Miguel Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, Oaxaca, Mexico

<sup>3</sup>Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

<sup>4</sup>Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

<sup>5</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

<sup>6</sup>Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

## Correspondence

Miguel Cruz, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc, 330 C.P. 06725, México City, Mexico. Email: mcruz@yahoo.com

Jennifer C. Stearns, McMaster University, Health Sciences Center, Room 3N6, 1200 Main Street West, Hamilton, ON L8S 4L8, Canada. Email: steams@mcmaster.ca

## Funding information

Instituto Mexicano del Seguro Social, Grant/Award Number: FIS/IMSS/PROT/PRIO/17/062

## Abstract

**Background:** The association of gut microbiota with obesity and its cardio-metabolic complications in paediatric populations is still controversial.

**Objective:** We investigated the association of obesity and cardio-metabolic traits with gut microbiota on 167 and 163 children with normal weight and obesity from Mexico City and Oaxaca, Mexico.

**Methods:** Anthropometric and biochemical traits were measured. The microbial communities were determined by high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA gene v3-v4 region.

**Results:** The gut microbial community structure was associated with obesity and fasting plasma insulin (FPI) in Mexico City ( $P_{\text{Obesity}} = 0.012$ ,  $P_{\text{FPI}} = 0.0003$ ) and Oaxaca ( $P_{\text{Obesity}} = 0.034$ ,  $P_{\text{FPI}} = 0.016$ ), and with triglycerides (TG) in Oaxaca ( $P = .0002$ ). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio was positively associated with TG in Oaxaca ( $P = .003$ ). Firmicutes and Bacteroidetes phyla were positively and negatively associated with obesity (Mexico City:  $P_{\text{Firmicutes}} = 0.013$ ,  $P_{\text{Bacteroidetes}} = 0.009$ ) and TG (Oaxaca:  $P_{\text{Firmicutes}} = 0.002$ ,  $P_{\text{Bacteroidetes}} = 0.004$ ). In Oaxaca, Verrucomicrobia was negatively associated with obesity ( $P = .004$ ). In Mexico City, the bacterial genus *Fusicatenibacter*, *Romboutsia*, *Ruminococcaceae*, *Ruminiclostridium*, *Blautia*, *Clostridium*, *Anaerostipes* and *Intestinibacter* were associated with obesity and FPI, while in Oaxaca, *Bacteroides*, *Alistipes* and *Clostridium* were associated with TG.

**Conclusion:** The gut microbial community structure in children is associated with obesity and FPI in Mexico City, and with obesity, FPI and TG in Oaxaca.

## KEYWORDS

gut microbiota, insulin, Mexico, paediatric obesity, triglycerides

## 1 | INTRODUCTION

In the last three decades obesity rates have reached the point of a global epidemic. In 2018, after the United States, Mexico had the

second highest rate of obesity in the world. According to the 2016 national survey of health and nutrition in Mexico, 15.3% of 5 to 11 year-old, 13.9%, 12 to 19 year-old, and 33.3% of adults had obesity.<sup>1</sup> This disorder is associated with a significantly increased risk of health complications including type 2 diabetes, cardiovascular disease, certain types of cancer and premature all-cause adult mortality.<sup>2</sup> Obesity results from the complex interplay of environmental, societal,

Jennifer C. Stearns and Miguel Cruz jointly supervised this work.

Miguel Vazquez-Moreno and Aleyda Perez-Herrera contributed equally to this work.



## Sex/gender modifies the association between the *MC4R* p.Ile269Asn mutation and type 2 diabetes in the Mexican population

Miguel Vázquez-Moreno<sup>1,2</sup>, Daniel Loča-Morales<sup>1</sup>, Adan Valladares-Salgado<sup>1</sup>, Tanmay Sharma<sup>2</sup>, Niels Wachter-Rodarte<sup>3</sup>, Miguel Cruz<sup>1,\*</sup>, David Meyre<sup>2,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Hamilton, Canada.

<sup>3</sup>Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico.

<sup>4</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Canada.

<sup>5</sup>Inserm UMRS 954 N-GERE (Nutrition-Genetics-Environmental Risks), University de Lorraine, Faculty of Medicine, Nancy, France.

\***Address for corresponding** Dr. Miguel Cruz, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc, 330 C.P. 06725, México City. Tel: 52 55 57612358; Fax: 5255 56276914. Email: mcruz1@yahoo.com. Dr. David Meyre, Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Michael DeGroote Centre for Learning & Discovery, Room 3205, 1280 Main Street West, Hamilton, ON L8S 4K1, Canada. Tel: 905.525.9140 Ext. 26802. Fax: 905.528.2814. Email: meyre@mcmaster.ca.

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of the Endocrine Society. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com jc.2020-01705 See [https://academic.oup.com/endocrinesociety/pages/Author\\_Guidelines](https://academic.oup.com/endocrinesociety/pages/Author_Guidelines) for Accepted Manuscript disclaimer and additional information.

## The Melanocortin 4 Receptor p.Ile269Asn Mutation Is Associated with Childhood and Adult Obesity in Mexicans

Miguel Vázquez-Moreno,<sup>1,2</sup> Helen Zeng,<sup>2</sup> Daniel Locia-Morales,<sup>1</sup> Jesús Peralta-Romero,<sup>1</sup> Hamza Asif,<sup>2</sup> Arjuna Maharaj,<sup>2</sup> Vivian Tam,<sup>2</sup> María D.S. Romero-Figueroa,<sup>3</sup> Gloria P. Sosa-Bustamante,<sup>4</sup> Socorro Méndez-Martínez,<sup>5</sup> Aurora Mejía-Benítez,<sup>2</sup> Adán Valladares-Salgado,<sup>1</sup> Niels Wachter-Rodarte,<sup>6</sup> National Obesity Network Mexico,<sup>7</sup> Miguel Cruz,<sup>1</sup> and David Meyre<sup>2,8</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México; <sup>2</sup>Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Hamilton, Canada; <sup>3</sup>Centro de Investigación en Ciencias de la Salud (CICSA), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac, Campus Norte, Huixquilucan, México; <sup>4</sup>Hospital de Gineco-Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social León, Guanajuato, México; <sup>5</sup>Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social Puebla, Puebla, México; <sup>6</sup>Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México; <sup>7</sup>Instituto Mexicano del Seguro Social México, Investigators listed in the appendix; and <sup>8</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Canada

ORCID number: 0000-0003-4850-7444 (D. Meyre).

**Context:** Rare partial/complete loss-of-function mutations in the melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene are the most common cause of Mendelian obesity in European populations, but their contribution to obesity in the Mexican population is unclear.

**Objective and Design:** We investigated whether deleterious mutations in *MC4R* contribute to obesity in Mexican children and adults.

**Results:** We provide evidence that the *MC4R* p.Ile269Asn (rs79783591) mutation may have arisen in modern human populations from a founder event in native Mexicans. The *MC4R* Isoleucine 269 is perfectly conserved across 184 species, which suggests a critical role for the amino acid in *MC4R* activity. Four in silico tools (SIFT, PolyPhen-2, CADD, MutPred2) predicted a deleterious impact of the p.Ile269Asn substitution on *MC4R* function. The *MC4R* p.Ile269Asn mutation was associated with childhood ( $N_{\text{controls}} = 952$ ,  $N_{\text{cases}} = 661$ , odds ratio (OR) = 3.06, 95% confidence interval (95%CI) [1.94–4.85]) and adult obesity ( $N_{\text{controls}} = 1445$ ,  $N_{\text{cases}} = 2,487$ , OR = 2.58, 95%CI [1.52–4.39]). The frequency of the *MC4R* p.Ile269Asn mutation ranged from 0.52 to 0.59% and 1.53 to 1.59% in children and adults with normal weight and obesity, respectively. The *MC4R* p.Ile269Asn mutation co-segregated perfectly with obesity in 5 multigenerational Mexican pedigrees. While adults with obesity carrying the p.Ile269Asn mutation had higher BMI values than noncarriers, this trend was not observed in children. The *MC4R* p.Ile269Asn mutation accounted for a population attributable risk of 1.28% and 0.68% for childhood and adult obesity, respectively, in the Mexican population.

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

© Endocrine Society 2019. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.

permissions@oup.com

Received 13 September 2019. Accepted 13 December 2019.

First Published Online 16 December 2019.

Corrected and Typeset 12 March 2020.



## Causal Association of Haptoglobin With Obesity in Mexican Children: A Mendelian Randomization Study

Miguel Vázquez-Moreno,<sup>1,2,\*</sup> Daniel Locia-Morales,<sup>1,6,\*</sup> Aleyda Perez-Herrera,<sup>3</sup> Rita A. Gomez-Diaz,<sup>4</sup> Roxana Gonzalez-Dzib,<sup>5</sup> Adriana L. Valdez-González,<sup>4</sup> Eugenia Flores-Alfaro,<sup>6</sup> Perla Corona-Salazar,<sup>1</sup> Fernando Suarez-Sanchez,<sup>1</sup> Jaime Gomez-Zamudio,<sup>1</sup> Adan Valladares-Salgado,<sup>1</sup> Niels Wachter-Rodarte,<sup>4</sup> Miguel Cruz,<sup>1,8</sup> and David Meyre<sup>2,7,8</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, 06720, Mexico; <sup>2</sup>Department of Health Research Methods, Evidence, and Impact, McMaster University, Hamilton L8S 4K1, Canada; <sup>3</sup>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral-Regional Unidad Oaxaca, Oaxaca, 71230, Mexico; <sup>4</sup>Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, 06720, México; <sup>5</sup>Servicio de Prestaciones Médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social, Delegación Campeche, Campeche, 24010, Mexico; <sup>6</sup>Laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, 39090, Mexico; and <sup>7</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton L8S 4K1, Canada

ORCID number: 0000-0003-4850-7444 (D. Meyre).

**Context:** Little is known about the association between haptoglobin level and cardiometabolic traits. A previous genome-wide association study identified rs2000999 in the *HP* gene as the stronger genetic contributor to serum haptoglobin level in European populations.

**Objective and Design:** We investigated the association of *HP* rs2000999 with serum haptoglobin and childhood and adult obesity in up to 540/697 and 592/691 Mexican cases and controls, respectively. Anthropometric and biochemical data were collected. Serum haptoglobin was measured by an immunoturbidimetry assay. *HP* rs2000999 was genotyped using the TaqMan technology. Mendelian randomization analysis was performed using the Wald and inverse variance weighting methods.

**Results:** Haptoglobin level was positively associated with childhood and adult obesity. *HP* rs2000999 G allele was positively associated with haptoglobin level in children and adults. *HP* rs2000999 G allele was positively associated with childhood but not adult obesity. The association between *HP* rs2000999 and childhood obesity was removed after adjusting for haptoglobin level. In a Mendelian randomization analysis, haptoglobin level genetically predicted by *HP* rs2000999 showed a significant causal effect on childhood obesity by the Wald and inverse variance weighting methods.

**Conclusion:** Our data provide evidence for the first time for a causal positive association between serum haptoglobin level and childhood obesity in the Mexican population. Our study

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

© Endocrine Society 2020. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Received 8 November 2019. Accepted 16 April 2020.

First Published Online 20 April 2020.

Corrected and Typeset 30 May 2020.

\*These authors contributed equally to this work.

†These authors jointly supervised this work.

Abbreviations: BMI, body mass index; CNV, copy number variant; DBP, diastolic blood pressure; FPG, fasting plasma glucose; FPI, fasting plasma insulin; GWAS, genome-wide association study; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HOMA-B, homeostatic model assessment for beta-cell function; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; HP, haptoglobin gene; SDS-BMI, BMI standard deviation scores adjusted for age and gender; SBP, systolic blood pressure; SNP, single nucleotide polymorphism; TC, total cholesterol; TG, triglyceride.

## Association of rs2000999 in the haptoglobin gene with total cholesterol, HDL-C, and LDL-C levels in Mexican type 2 diabetes patients

Fernando Suarez-Sanchez, PhD<sup>a</sup>, Miguel Vazquez-Moreno, MS<sup>a</sup>, Ema Herrera-Lopez, MS<sup>a</sup>, Jaime H. Gomez-Zamudio, PhD<sup>a</sup>, José J. Peralta-Romero, PhD<sup>a</sup>, Osvaldo D. Castelan-Martinez, PhD<sup>b</sup>, Miguel Cruz, PhD<sup>a</sup>, Esteban J. Parra, PhD<sup>c</sup>, Adan Valladares-Salgado, PhD<sup>a,\*</sup>

### Abstract

Recently, studies have shown significant association between the rs2000999 polymorphism in the haptoglobin-encoding gene (*HP*) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and total cholesterol (TC) levels, which are important risk factors for cardiovascular diseases. However, the association of rs2000999 with serum lipids in Latin American diabetic populations is still uncharacterized. Here, we analyzed the association of rs2000999 with TC, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and LDL-C levels in 546 Mexican adults with type 2 diabetes (T2D) and in 654 controls without T2D. In this observational case-control study we included adults from 4 centers of the Mexican Social Security Institute in Mexico City recruited from 2012 to 2015. TC, HDL-C, LDL-C, triglycerides (TG), and glucose levels were measured by an enzymatic colorimetric method. The variant rs2000999 was genotyped using TaqMan real time polymerase chain reaction. The percentage of Native-American ancestry showed a negative association with the rs2000999 A allele. In contrast, the rs2000999 A allele had a strong positive association with European ancestry, and to a lesser extent, with African ancestry. Linear regression was used to estimate the association between the variant rs2000999 and lipid concentrations, using different genetic models. Under codominant and recessive models, rs2000999 was significantly associated with TC and LDL-C levels in the T2D group and in controls without T2D. In addition, the group with T2D showed a significant association between the variant and HDL-C levels. In summary, the rs2000999 A allele in Mexican population is positively associated with the percentage of European and negatively associated with Native American ancestry. Carriers of the A allele have increased levels of TC and LDL-C, independently of T2D diagnosis, and also increased concentrations of HDL-C in the T2D sample.

**Abbreviations:** GWAS = genome-wide association study, HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol, *HP* = haptoglobin-encoding gene, LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol, SE = standard error, T2D = type 2 diabetes, TC = total cholesterol, TG = triglycerides.

**Keywords:** haptoglobin, HDL-C, LDL-C, Mexican population, rs2000999, total cholesterol, type 2 diabetes

Editor: Leonardo Roever.

Suarez-Sanchez Fernando and Vazquez-Moreno Miguel Equal contribution.

Financial support: This work was supported by the Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT) project 130352.

The authors have no conflicts of interests to disclose.

<sup>a</sup> Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

<sup>b</sup> Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. <sup>c</sup> Department of Anthropology, University of Toronto at Mississauga, Mississauga, ON, Canada.

\* Correspondence: Adan Valladares-Salgado, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México, CP 06720, México (e-mail: adanval@gmail.com).

Copyright © 2019 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and build upon the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

How to cite this article: Fernando SS, Miguel VM, Herrera-Lopez E, Gomez-Zamudio JH, Peralta-Romero JJ, Castelan-Martinez OD, Cruz M, Parra EJ, Adan VS. Association of rs2000999 in the haptoglobin gene with total cholesterol, HDL-C and LDL-C levels in Mexican type 2 diabetes patients. *Medicine* 2019;98:39(e17298).

Received: 22 March 2019 / Received in final form: 22 August 2019 / Accepted: 27 August 2019

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000017298>



### 1. Introduction

The National Institute of Statistics and Geography (INEGI) reported in 2018 that cardiovascular diseases are the primary cause of death in Mexico.<sup>[1]</sup> The most important risk factors for the onset of these diseases are high levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides, and low levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). Genetic studies of the loci associated with lipid levels have enabled the identification of polymorphisms that may serve to develop new approaches for the prevention and treatment of cardiovascular diseases. In particular, our research group has collaborated with other research institutions with the objective of characterizing the loci associated with dyslipidemia in the Mexican and Hispanic populations. In a genome-wide association study (GWAS), we found that the genes, *CELSR2*, *ZNF259/APOA5*, *KANK2/DOCK6* and *NCAN/MAU2*, were associated with TC levels; *CELSR2*, *APOB*, and *NCAN/MAU2* with LDL-C levels<sup>[2]</sup>; and *DAGLB* with HDL-C levels.<sup>[3]</sup> The same GWAS study failed to find an association between the haptoglobin-encoding (*HP*) gene (located at chromosome 16q22.2) with lipid levels. However, previous studies have showed that the A allele of the rs2000999 polymorphism in *HP* is associated with high levels of TC and LDL-C. It has been proposed that the rs2000999 A allele, which is associated with reduced *HP* expression, has decreased antioxidant protection for APOE, contributing to elevated cholesterol levels.<sup>[4,5]</sup>



ORIGINAL ARTICLE

## Type 2 diabetes-associated polymorphisms correlate with *SIRT1* and *TGF-β1* gene expression

Ángeles Ramírez<sup>1\*</sup> | Miriam Hernández<sup>1\*</sup> | Rocío Suárez-Sánchez<sup>2</sup>  | Clara Ortega<sup>1</sup> |  
Jesús Peralta<sup>1</sup> | Jaime Gómez<sup>1</sup> | Adán Valladares<sup>1</sup> | Miguel Cruz<sup>1</sup> |  
Miguel Alexander Vázquez-Moreno<sup>1</sup> | Fernando Suárez-Sánchez<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Ciudad de México, México

<sup>2</sup>Laboratorio de Medicina Genómica, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación LGII, Ciudad de México

### Correspondence

Fernando Suárez-Sánchez, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, CP06720 Col. Doctores, Ciudad de México, México.  
Email: fernandossfg@yahoo.com.mx

\*These authors contributed equally to this work.

### Funding information

Instituto Mexicano del Seguro Social, Grant/Award Number: FIS/IMSS/PROT/G14/1333

### Abstract

The polymorphisms rs3758391 and rs1800470 located in *SIRT1* and *TGF-β1* have been associated with type 2 diabetes in different populations but its functional effect is not clear. In this study, we evaluated their effect on the expression of *SIRT1* and *TGF-β1* in peripheral blood as well as their participation in the formation of DNA-protein complexes in a pancreas-derived cell line. It has been described that *SIRT1* and *TGF-β1* participate in cell growth and regulation of production and secretion of insulin in the pancreas. Anthropometric and biochemical profiles of 127 adults were measured. Genotypes for rs3758391 and rs1800470 were determined using TaqMan assays. Expression analysis of *SIRT1* and *TGF-β1* were performed using real-time PCR. Gene expression of these genes increased  $1.8 \pm 0.6$ - and  $1.3 \pm 0.6$ -fold in patients carrying the TT genotype of rs3758391 and rs1800470 when compared to carriers of the CC genotype. Then, we tested whether these single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (and rs932658, which is in linkage disequilibrium with rs3758391) are located in regulatory DNA-protein binding sites by electrophoretic mobility shift assays using nuclear extract from the pancreas-derived cell line BxPC-3. The electrophoretic mobility shift assay showed no binding of nuclear proteins to DNA. In conclusion, the genotypes of rs3758391 and rs1800470 are associated with modifications in the expression of the genes *SIRT1* and *TGF-β1*, respectively, but none of the tested SNPs are located in regulatory DNA-protein binding sites.

### KEYWORDS

diabetes, rs1800470, rs3758391, rs932658, *SIRT1*, *TGF-β1*


## 1 | INTRODUCTION

The prevalence of metabolism-related diseases has increased worldwide in the last few decades. One of these diseases is type 2 diabetes (T2D), which is characterized by hyperglycemia and insulin resistance in adipose, liver, and muscle tissues as well as decreased insulin secretion capacity by  $\beta$  cells (American Diabetes Association, 2018). T2D is a multifactorial disease with environmental and genetic

components, which have different effect sizes with complex and still not well comprehended interactions (Barroso & McCarthy, 2019). In particular, genome-wide association studies (GWAS) have identified more than 400 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with T2D and/or the severity of comorbidities such as cardiovascular disease, hypertension, retinopathy, nephropathy, and diabetic foot, among others (Barroso & McCarthy, 2019; Mahajan et al., 2018; Raina et al., 2015; Scott et al., 2017).

# Altered Glycemic Control Associated With Polymorphisms in the *SLC22A1* (OCT1) Gene in a Mexican Population With Type 2 Diabetes Mellitus Treated With Metformin: A Cohort Study

The Journal of Clinical Pharmacology  
 2019, 00(0) 1–7  
 © 2019, The American College of Clinical Pharmacology  
 DOI: 10.1002/jcph.1423

Carlos Alberto Reséndiz-Abarca, MSc<sup>1,2</sup>, Eugenia Flores-Alfaro, PhD<sup>1</sup> , Fernando Suárez-Sánchez, PhD<sup>2</sup>, Miguel Cruz, PhD<sup>2</sup>, Adán Valladares-Salgado, PhD<sup>2</sup>, Luz del Carmen Alarcón-Romero, PhD<sup>1</sup>, Miguel Alexander Vázquez-Moreno, MSc<sup>2</sup>, Niels Agustín Wachter-Rodarte, MD, MSc<sup>3</sup>, and Jaime Héctor Gómez-Zamudio, PhD<sup>2</sup>

## Abstract

The organic cation transporters OCT1 and OCT2 and the multidrug and toxin extrusion transporter MATE1, encoded by the *SLC22A1*, *SLC22A2*, and *SLC47A1* genes, respectively, are responsible for the absorption of metformin in enterocytes, hepatocytes, and kidney cells. The aim of this study was to evaluate whether genetic variations in the *SLC22A1*, *SLC22A2*, and *SLC47A1* genes could be associated with an altered response to metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. A cohort study was conducted in 308 individuals with a diagnosis of type 2 diabetes mellitus of less than 3 years and who had metformin monotherapy. Three measurements of blood glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) were obtained at the beginning of the study and after 6 and 12 months. Five polymorphisms were analyzed in the *SLC22A1* (rs622342, rs628031, rs594709), *SLC22A2* (rs316019), and *SLC47A1* (rs2289669) genes by real-time polymerase chain reaction. The results showed a significant association among genotypes CC-rs622342 ( $\beta = 1.36$ ;  $P < .001$ ), AA-rs628031 ( $\beta = 0.98$ ;  $P = .032$ ), and GG-rs594709 ( $\beta = 1.21$ ;  $P = .016$ ) in the *SLC22A1* gene with an increase in HbA<sub>1c</sub> levels during the follow-up period. Additionally, a significant association was found in the CGA and CAG haplotypes with an increase in HbA<sub>1c</sub> levels compared to the highest-frequency haplotype (AGA). In conclusion, the genetic variation in the *SLC22A1* gene was significantly related to the variation of the HbA<sub>1c</sub> levels, an important indicator of glycemic control in diabetic patients. This information may contribute to identifying patients with an altered response to metformin before starting their therapy.

## Keywords

Type 2 diabetes mellitus, metformin, *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC47A1*

Diabetes mellitus is a chronic disease that occurs when the pancreas does not produce or secrete sufficient insulin or when the body is not able to use this hormone effectively; thus, glucose does not appropriately become incorporated into the cells, and a hyperglycemic state is generated. Initial treatment in patients with diabetes mellitus is a combination of changes in lifestyle, mainly healthy eating and exercise; in addition, the use of drugs can be recommended. Metformin is the drug of choice to treat diabetic patients due to its low cost and euglycemic effectiveness. Additionally, in contrast to other medications, metformin does not cause hypoglycemia or hyperinsulinemia, common side effects associated with other antidiabetic drugs.<sup>1</sup> Metformin is not metabolized and is excreted unchanged in urine, with a half-life of ~5 hours. The classic functional mechanisms of metformin are decreasing the state of hepatic energy, decreasing hepatic glucose production and fatty acid synthesis,

as well as reducing gastrointestinal glucose absorption and improving peripheral sensitivity to insulin.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

<sup>2</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda,” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>3</sup>Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda,” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

Submitted for publication 29 December 2018; accepted 28 March 2019.

## Corresponding Author:

Jaime Héctor Gómez-Zamudio, PhD, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, 06720 Ciudad de México, México

Email: jaim\_gomez\_zamudio@hotmail.com